



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diana Teresa Serra Patrão

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientado pela Professora Doutora Bárbara Silva Rocha e pela Dra. Fátima Maria Madureira Vale e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diana Teresa Serra Patrão

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientado pela Professora Doutora Bárbara Silva Rocha e pela Dra. Fátima Maria Madureira Vale e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde da Guarda de 11 de janeiro de 2022 a 15 de julho de 2022

Setembro de 2022

Agradecimentos

Aos meus **pais** Elsa Serra e Manuel Patrão pela paciência, pelo esforço, pelo apoio constante, por serem um “porto” que me dá força para avançar, mas ao qual sei que posso sempre voltar.

À minha **irmã** Cristiana Patrão por me chatear a cabeça muitas vezes, mas que demonstra sempre preocupação e me dá força e conforto com o seu lado meigo quando percebe que algo não está muito bem.

Aos meus **padrinhos** Helena Batista e Rui Paixão, e suas filhas, minhas primas Alice e Benedita, por me terem acolhido na sua casa e por me fazerem sentir como se estivesse na minha.

À minha **prima** Suse Maximino por ser a minha confidente, pela confiança também em mim depositada, pelas partilhas e conversas diárias para desabafar, desanuviar, rir, me motivar e que me ensinam a ver a vida de outras formas.

À minha **estrela**, por estar “sempre comigo”.

À **Professora Doutora Bárbara Rocha** por ser orientadora do meu relatório de estágio, pela disponibilidade, pelo constante acompanhamento e pelas orientações e sugestões que me permitiam sempre melhorar o meu trabalho.

À **Dra. Fátima Vale** pela possibilidade de estagiar no Serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde da Guarda, de contactar com todas as áreas clínico-laboratoriais, de vivenciar o contexto real de trabalho laboratorial neste serviço.

Ao **Dr. Paulo Tavares** pela preocupação sempre demonstrada, pela disponibilidade, pelo acompanhamento, pela dedicação, pela orientação e pela paciência durante a partilha de ensinamentos e discussão dos casos clínicos.

A **toda a equipa de técnicos** do Serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde da Guarda pela integração, pela partilha de ensinamentos e experiências, pelas amizades construídas e pela constante confiança depositada em mim.

A todos o meu Obrigada.

Índice

Agradecimentos	i
Índice	iii
Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas	vii
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	1
2. Hematologia	3
2.1. Hemograma.....	3
2.1.1. Série Eritrocitária	4
2.1.2. Série leucocitária	13
2.1.3. Série Plaquetária	17
2.2. Hemostase e Coagulação.....	21
2.2.1. Teste de coagulação sanguínea	24
2.3. Velocidade de sedimentação.....	27
2.4. Hemoglobinopatias.....	27
3. Bioquímica	31
3.1. Amostras e Equipamentos em Bioquímica	31
3.2. Parâmetros bioquímicos.....	33
3.2.1. Metabolismo dos lípidos e risco cardiovascular	33
3.2.2. Avaliação da lesão do miocárdio	36
3.2.3. Metabolismo das proteínas	40
3.2.4. Avaliação do metabolismo do ferro	43
3.2.5. Avaliação do metabolismo mineral ósseo	46
3.2.6. Avaliação do equilíbrio hidroeletrolítico	48
3.2.7. Avaliação da Função hepática	51
4. Imunologia	57
5. Microbiologia	59
6. Casos Clínicos	61
6.1. Caso Clínico 1	61
6.2. Caso Clínico 2	63
7. Conclusão	67
Referências	69

Índice de Figuras

Figura 1 - Eritrócitos hipocrómicos (A), eritrócitos microcíticos (B) e eritrócitos macrocíticos (C).	10
Figura 2 - Células em alvo (A), Esferócitos (B), Drepanócitos (C), Draciócitos (D).	11
Figura 3 - Ponteados basófilos (A), Corpos de Pappenheimer (B), Corpos de Heinz (C).	12
Figura 4 - <i>Rouleaux</i> (A), Agregados de eritrócitos (B).	13
Figura 5 - Neutrófilo (A), Eosinófilo (B), Basófilo (C), Monócito (D), Linfócito (E).	14
Figura 6 - Neutrófilo hipersegmentado (A), Neutrófilo hiposegmentado (B), Blastos (C).	17
Figura 7 - Representação da Via extrínseca (A), Via intrínseca (B) e Via comum (C) da cascata de coagulação sanguínea, bem como do processo de fibrinólise (D).	23
Figura 8 - Padrão normal típico para eletroforese de proteínas séricas.	41

Índice de Tabelas

Tabela I - Condições que se encontram associadas à elevação das diferentes populações de leucócitos, com respetivos valores de elevação para indivíduos adultos.	16
Tabela II - Condições que se encontram associadas ao decréscimo das diferentes populações de leucócitos, com respetivos valores de decréscimo para indivíduos adultos.	16
Tabela III - Parâmetros importantes no estudo do metabolismo do ferro e as suas alterações associadas a determinadas patologias.	46
Tabela IV - Resultados laboratoriais caso clínico I.	61
Tabela V - Resultados laboratoriais caso clínico II.	63

Lista de Abreviaturas

- Acs** - Anticorpos
- ADH** - Hormona Antidiurética
- ADN** - Ácido Desoxirribonucleico
- Ags** - Antígenos
- ALP** - Fosfatase Alcalina
- ALT** - Alanina Aminotransferase
- ANP** - Peptídeo Natriurético Atrial
- ARN** - Ácido Ribonucléico
- AST** - Aspartato Aminotransferase
- ATP** - Adenosina Trifosfato
- BAARs** - Bacilos Ácido-Álcool Resistentes
- BNP** - Peptídeo Natriurético tipo B
- CHCM** - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
- CID** - Coagulação Intravascular Disseminada
- CK** - Creatina Cinase
- CK-Mt** - Creatina Cinase Mitocondrial
- CNP** - Peptídeo Natriurético tipo C
- CO₂** - Dióxido de Carbono
- cTnI** - Troponina cardíaca I
- cTns** - Troponinas cardíacas
- cTnT** - Troponina cardíaca T
- CVC** - Cateter Venoso Central
- DM** - Diabetes Mellitus
- EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
- Ert** - Número Total de Eritrócitos
- ESP** - Esfregaço de Sangue Periférico
- FEIA** - *Fluorescence Enzymatic Immunoassay*
- FI** - Fator Intrínseco
- Hb** - Hemoglobina
- HbA1c** - Hemoglobina glicada

HCM - Hemoglobina Corpuscular Média

HDL - *High-Density Lipoprotein*

HPCL - *High Performance Liquid Chromatography*

hs-cTnI - Troponina cardíaca I de alta sensibilidade

Ht - Hematócrito

IDL - *Intermediate-Density Lipoprotein*

Ig - Imunoglobulina

INR - Razão Normalizada Internacional

IRF - Número de reticulócitos imaturos (*Immature Reticulocyte Fraction*)

ISI - Índice de Sensibilidade Internacional

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

LDH - Lactato Desidrogenase

LDL - *Low-Density Lipoprotein*

NAD - Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

NADH - Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina reduzido

NPs - Peptídeos Natriuréticos

O₂ - Oxigénio

PAI - Ativador do Plasminogénio

PCR - Proteína C Reativa

PCT - Plaquetócrito

PDW - Distribuição do diâmetro das plaquetas (*Platelet Distribution Width*)

PL - Fosfolípidos

PTH - Paratormona

rARN - Ácido Ribonucléico ribossómico

RDW - Distribuição do diâmetro dos eritrócitos (*Red Cell Distribution Width*)

RET - Reticulócitos

SLS - Laurilsulfato de Sódio

SPC - Serviço de Patologia Clínica

T4 - Tiroxina ou tetraiodotironina

TF - Fator Tecidual

TG - Triglicerídeos

TP - Tempo de Protrombina

TPA - Ativador Tecidual de Plasminogénio

TSH - Hormona Estimulante da Tireoide

TTPa - Tempo de Tromboplastina Parcial ativado

UIBC - Capacidade insaturada de ligação de ferro (*Unsaturated Iron-Binding Capacity*)

ULS - Unidade Local de Saúde

UPA - Ativador do Plasminogénio do tipo Urocinase

URLs - Unidades de Luz Relativa

VCM - Volume Corpuscular Médio

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

VLDL - *Very Low-Density Lipoprotein*

VPM - Volume Plaquetar Médio

VS - Velocidade de Sedimentação

γ-GT - γ-glutamilttransferase

Resumo

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra culmina com a realização de um estágio curricular, de índole profissional, cujos objetivos consistem na aquisição de formação, na sedimentação e aplicação dos conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado em contexto real de trabalho.

O estágio curricular decorreu no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Hospital Sousa Martins, inserido na Unidade Local de Saúde (ULS) da Guarda. Após uma breve descrição desta instituição de acolhimento e do seu funcionamento, o presente relatório de estágio pretende descrever as atividades desenvolvidas durante o estágio no SPC da ULS da Guarda.

O estágio englobou as quatro principais áreas de diagnóstico clínico-laboratorial – Hematologia, Bioquímica, Microbiologia e Imunologia –, onde tive a oportunidade de trabalhar e colocar em prática, consolidar, desenvolver e aprofundar os conhecimentos adquiridos durante a frequência do mestrado. Contudo, são abordadas de forma mais breve as áreas de Microbiologia e de Imunologia e descritos de forma mais aprofundada os parâmetros analíticos mais frequentemente determinados nas áreas de Hematologia e de Bioquímica, bem como metodologias e equipamentos utilizados.

Serão ainda descritos dois casos clínicos, que evidenciam não só o papel fundamental do laboratório bem como a necessidade de relacionar os resultados das várias áreas que o constituem para a obtenção de um diagnóstico.

Palavras-chave: Análises Clínicas, Bioquímica, Diagnóstico, Hematologia, SPC da ULS da Guarda.

Abstract

The Master's Degree in Clinical Analysis from the University of Coimbra culminates with a curricular internship, of professional nature, with the objectives of acquiring training, strengthening and applying the knowledge acquired throughout the master's course in a real workplace environment.

The curricular internship was at the Clinical Pathology Service (CPS) of the Sousa Martins Hospital, a part of the Guarda Local Health Unit (LHU). After a brief description of this host institution and its operation, the present internship report is intended to describe the activities developed during the internship at the CPS of the Guarda LHU.

The internship encompassed the four main areas of clinical and laboratory diagnosis - Hematology, Biochemistry, Microbiology and Immunology - where I had the opportunity of working and putting into practice, consolidating, developing and deepening the knowledge acquired during the attendance of the master's course. Nonetheless, the areas of Microbiology and Immunology are approached in a briefer way, whereas the most frequently determined parameters, as well as the used methodologies and equipments of the areas of Hematology and Biochemistry are described in a much deeper way.

Furthermore, two clinical/study cases will be described which emphasize not only the fundamental role of the laboratory but also the need to relate the results of the various areas of which it is constituted, in order to obtain a diagnosis.

Keywords: Clinical Analysis, Biochemistry, Diagnosis, Hematology, CPS of the Guarda LHU.

I. Introdução

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra proporciona uma formação especializada nas várias áreas de diagnóstico clínico-laboratorial e permite, através de um estágio curricular em contexto real de trabalho, aplicar e consolidar os conhecimentos adquiridos bem como sedimentar e adquirir novas competências. O culminar do mestrado com a realização deste estágio de caráter profissional prepara-nos para integrar a rotina de um laboratório.

O Hospital Sousa Martins foi criado em 1907 como sanatório para o tratamento da tuberculose. Com o decorrer dos tempos e com a descoberta dos antibióticos, a incidência da tuberculose foi diminuindo e deixou de ser um problema sério para a saúde pública. Assim sendo, a existência do sanatório deixou de ser pertinente e passou a funcionar como hospital distrital nas últimas décadas. Em 2008 foi constituída a ULS da Guarda tendo como atividade principal a prestação de cuidados de saúde primários, diferenciados e continuados à população. Para além do Hospital Sousa Martins, esta nova estrutura integra o Hospital Nossa Senhora de Assunção, em Seia, e todos os Centros de Saúde do distrito à exceção do de Aguiar da Beira. Desta forma, o SPC da ULS da Guarda recebe amostras provenientes de centros de saúde, de outro hospital, das consultas externas, do internamento e das urgências.

O SPC da ULS da Guarda, sob a responsabilidade da Dra. Fátima Vale, encontra-se em processo de acreditação. Está organizado em cinco setores, Bioquímica, Hematologia, Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular. Os setores de Hematologia e Bioquímica encontram-se organizados num conceito *open space*, permitindo a colaboração e entreatajuda dos vários técnicos destes setores.

O presente relatório de estágio descreve o meu tempo de estágio realizado no SPC da ULS da Guarda, onde tive a oportunidade de passar e trabalhar em todas as áreas analíticas do laboratório já mencionadas, contando com o apoio de todos os elementos do SPC da ULS da Guarda. Contudo, as áreas de Hematologia e Bioquímica são abordadas de uma forma mais profunda que as áreas de Microbiologia e Imunologia.

2. Hematologia

A Hematologia é a área laboratorial que se dedica ao estudo dos elementos figurados (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e não figurados (plasma) do sangue. A análise dos elementos figurados permite identificar alterações qualitativas e quantitativas que contribuem para o diagnóstico de doenças hematológicas, de alterações na hematopoiese e nos órgãos hematopoiéticos, como medula óssea, gânglios linfáticos e baço. Por sua vez, a análise do plasma permite avaliar distúrbios na hemostase e no processo de coagulação.

No SPC da ULS da Guarda, são avaliados parâmetros do hemograma, da coagulação, velocidade de sedimentação (VS), a hemoglobina glicada (HbA1c) e outros parâmetros que contribuem para o diagnóstico de hemoglobinopatias. Todos estes são sujeitos a um controlo de qualidade interno diário, utilizando controlos para o parâmetro em causa. Posteriormente, os resultados são analisados com a respetiva carta de Levey-Jennings e validados antes da análise das amostras diárias.

2.1. Hemograma

O hemograma permite avaliar de forma quantitativa e qualitativa os três principais componentes do sangue periférico, podendo ser dividido em três partes de acordo com as três linhagens de células sanguíneas: eritrograma, leucograma e trombocitograma correspondentes às células vermelhas, às células brancas e às plaquetas, respetivamente. Desta forma, o hemograma constitui a base de qualquer avaliação hematológica.

A amostra utilizada no hemograma é o sangue total, sendo utilizado na colheita um tubo que contém o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) tripotássico (3K). O EDTA inibe a coagulação e a agregação plaquetária após a colheita ao estabelecer uma forte ligação com o cálcio presente no plasma, um íão essencial à coagulação. (1) É um anticoagulante que, na proporção adequada com a amostra, permite manter morfologia e melhorar a observação das células sanguíneas. O hemograma é obtido com base no tamanho e na morfologia das células, pelo que o EDTA é o anticoagulante de eleição a ser usado. (2)

No SPC da ULS da Guarda, o hemograma é obtido através de um processo automatizado, realizado no equipamento Sysmex XE-5000. O Sysmex é um analisador hematológico automático e diferencial que contabiliza e distingue os diversos tipos de células no sangue total, incluindo as células mais imaturas como os blastos, e também em líquidos biológicos, como líquido cefalorraquidiano (LCR). (1)

2.1.1. Série Eritrocitária

Eritrograma

O eritrograma é a componente do hemograma cujos parâmetros permitem avaliar de forma quantitativa e qualitativa as células da série eritrocitária/vermelha, os eritrócitos. Estes são produzidos na medula óssea a partir de um precursor mielóide por um processo designado de eritropoiese e circulam em média 120 dias. Para que este processo ocorra são necessários alguns fatores, entre eles a eritropoietina, uma hormona que controla o processo e cuja síntese ocorre essencialmente no rim em resposta à hipóxia, o ferro, o ácido fólico e a vitamina B12. A deficiência nestes nutrientes pode desencadear anemias graves. (3)

O eritrograma engloba a contagem dos eritrócitos, a concentração da hemoglobina (Hb), o hematócrito (Ht), o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), o índice de distribuição eritrocitária e a contagem de reticulócitos (RET). A análise destes parâmetros permite classificar os eritrócitos com base nas variações de volume e cor e avaliar a presença de células imaturas, auxiliando no diagnóstico de patologias, tais como anemia. (3)

▪ Eritrócitos

Os eritrócitos são as células que existem em maior quantidade no sangue, sendo contabilizados num indivíduo adulto cerca de $3,9-6,5 \times 10^{12}$ eritrócitos/L, atendendo a que os seus valores de referência variam com a idade e o sexo. A Hb é uma molécula que faz parte do conteúdo intracelular dos eritrócitos e que lhes confere a função de transporte do oxigénio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) entre os tecidos e os pulmões. (3)

Os eritrócitos são células anucleadas que apresentam uma forma de disco bicôncavo com um diâmetro de 8 μm e uma membrana flexível. Estas características permitem que os eritrócitos passem repetidamente pela microcirculação, cujo diâmetro mínimo é de 3,5 μm , mantenham a Hb no estado reduzido (ferroso) para ligar o O_2 e mantenham o equilíbrio osmótico apesar da alta concentração de proteína na célula, principalmente Hb. Assim, durante os cerca de 120 dias de vida útil, os eritrócitos transportam a Hb pela vasculatura, permitindo a realização de trocas gasosas bem-sucedidas. (3)

Este parâmetro é determinado diretamente pelo autoanalisador através de um método de deteção por impedância elétrica combinado com tecnologia de foco hidrodinâmico, sendo expresso em número de eritrócitos por unidade de volume de sangue ($\times 10^{12}/L$). (3)

▪ Hemoglobina

A Hb é uma proteína especializada presente nos eritrócitos cuja principal função é permitir trocas gasosas, ao transportar o O_2 para todos os tecidos e devolver o CO_2 dos tecidos para os pulmões. É uma molécula globular formada por dois componentes essenciais: o componente heme que corresponde a um anel de porfirina (protoporfirina IX) que tem ligado no seu centro um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}), ao qual o O_2 e CO_2 se ligam; acresce ainda a componente globina que corresponde a cadeias polipeptídicas. Deste modo, uma molécula de hemoglobina é constituída por dois pares de cadeias polipeptídicas, ou seja, por 4 subunidades, sendo cada uma composta por uma cadeia polipeptídica ligada a um grupo heme. Um indivíduo ao longo do seu desenvolvimento sintetiza diferentes tipos de cadeias polipeptídicas, cada uma com o seu grupo heme, dando origem a diferentes tipos de hemoglobina. No sangue normal de um adulto existem 3 tipos de hemoglobina, a Hb A ($\alpha_2\beta_2$) que contém duas cadeias α e duas cadeias β , a Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) que contém duas cadeias α e duas cadeias δ e a Hb F ou fetal ($\alpha_2\gamma_2$) que contém duas cadeias α e duas cadeias γ . A Hb A é a hemoglobina dominante após os 6-12 meses de idade, representando 96 a 98% da Hb total num adulto. (3)

A determinação da Hb é utilizada no diagnóstico de anemia, quando os valores se encontram baixos, e como indicador de Policitemia Vera, quando se encontram elevados. Os valores de referência para a concentração da Hb dependem da idade e do sexo do indivíduo em causa. (3) No geral este parâmetro varia entre 12-17, sendo expresso em g/dL. (2) Este parâmetro é determinado diretamente pelo autoanalisador através do método Laurilsulfato de Sódio (SLS)-hemoglobina, que utiliza espectrofotometria para quantificar a Hb. (1)

▪ Hematócrito

O Ht corresponde à proporção do volume que os eritrócitos ocupam no total da amostra, sendo expresso em valor percentual ou em Litro/Litro. Este parâmetro é determinado pelo autoanalisador através de um método de deteção por impedância elétrica combinado com focagem hidrodinâmica. (1)

O valor do Ht pode ser influenciado pelo tamanho e número dos eritrócitos. (1) Um valor baixo de Ht pode estar associado a uma diminuição no número de eritrócitos devido a hemólise, hemorragia ou a uma eritropoiese ineficaz, uma vez que pode resultar numa menor produção de eritrócitos e num volume celular menor. Um valor elevado de Ht pode ocorrer

devido um aumento de eritrócitos (eritrocitose) ou a uma diminuição do volume de plasma.
(2)

- **Volume Corpuscular Médio**

O VCM corresponde ao volume médio dos eritrócitos, sendo expresso em fentolitros (fL). Este parâmetro é determinado diretamente pelo autoanalisador por cálculo através do quociente entre o volume ocupado pelos eritrócitos (Ht) e o número total de eritrócitos (Ert), multiplicado por 10, através da seguinte fórmula:

$$\text{VCM} = \frac{\text{Ht}}{\text{Ert}} * 10$$

O intervalo de referência é 80-100 fL. (1) A nível prático, as várias formas de anemia podem ser classificadas de acordo com o valor deste parâmetro em microcítica (VCM diminuído), normocítica (VCM normal) ou macrocítica (VCM aumentado), permitindo distinguir potenciais etiologias da anemia.

- **Hemoglobina Corpuscular Média e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média**

A HCM corresponde à hemoglobina média existente em cada eritrócito, sendo expressa em picogramas (pg). Este parâmetro resulta do quociente entre a hemoglobina (Hb) e o número total de eritrócitos (Ert), multiplicado por 10, através da seguinte fórmula:

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb (g/dL)} * 10}{\text{Ert}}$$

O intervalo de referência é 26-32 pg, para um adulto. (2)

Um outro parâmetro que relaciona a Hb nos eritrócitos é a CHCM, que representa a concentração média de hemoglobina em cada eritrócito, com intervalo de referência de 32-36 g/dL. Os eritrócitos podem ser definidos como normocrómicos (HCM normal) e hipocrómicos (HCM diminuído). A hipocromia ocorre associada a situações de talassémias e de deficiência na eritropoiese devido a défice de ferro. (1) (2)

▪ **Distribuição do Diâmetro dos Eritrócitos**

A Distribuição do Diâmetro dos Eritrócitos (RDW- *Red Cell Distribution Width*) indica a amplitude de distribuição do volume dos eritrócitos, ou seja, representa em percentagem o índice de anisocitose eritrocitária, heterogeneidade do tamanho dos eritrócitos. O seu valor é expresso em percentagem e obtido pelo autoanalisador através da base da curva de distribuição do tamanho dos eritrócitos obtida, sendo o seu intervalo de referência de 11,9-14,5%. (1)

Uma alteração do RDW reflete uma profunda desregulação na hemostase dos eritrócitos, envolvendo distúrbios tanto na eritropoiese como na normal sobrevivência dos eritrócitos. A observação de um valor de RDW abaixo do intervalo de referência convencional não é frequente e clinicamente é de difícil interpretação, enquanto um valor de RDW aumentado reflete a presença de anisocitose, que pode ser atribuída à presença de eritrócitos microcíticos ou macrocíticos ou, ainda, à mistura de ambos. (4)

Como regra geral, anemias causadas por deficiências nutricionais (como ferro, folato ou vitamina B12) tendem a estar associadas a maior grau de anisocitose do que aquelas causadas por defeitos genéticos ou distúrbios primários da medula óssea. A combinação do VCM e RDW permite uma classificação adicional das anemias uma vez que, embora não seja exato, um VCM baixo com um RDW alto sugere deficiência de ferro, enquanto um VCM e RDW altos sugerem deficiência de folato e/ou vitamina B12. (4)

▪ **Reticulócitos**

Os RET e os eritroblastos são parâmetros que também podem ser avaliados no hemograma. Os RET correspondem à forma imatura dos eritrócitos que são libertados da medula óssea para o sangue periférico, existindo em ambos os locais. Estes diferem dos eritrócitos, porque contêm restos de ácido ribonucléico ribossómico (rARN) que estavam presentes em grandes quantidades no citoplasma dos precursores nucleados dos quais derivam, os eritroblastos. Os ribossomas residuais aparecem como pequenos pontos azuis, uma vez que possuem a propriedade de reagir com certos corantes básicos, como o azul brilhante de Cresil. (2) Após se formarem na medula óssea, os reticulócitos são libertados para o sangue periférico onde circulam e perdem o seu ácido ribonucléico (ARN) transformando-se em eritrócitos maduros. Deste modo, a sua contagem no sangue periférico é um indicador da capacidade da medula óssea responder à diminuição de eritrócitos com a

produção de novos, pelo que é importante a sua avaliação nas anemias. (1) Os valores de referência para este parâmetro são de 0,5-2,5% ou de $50-100 \times 10^9/L$. (2)

Em situações de anemias, uma resposta normal consiste no aumento da síntese de eritropoietina de modo a estimular a síntese de eritrócitos na medula, levando por sua vez a um aumento dos reticulócitos no sangue periférico, uma vez que são as células imaturas imediatamente anteriores aos eritrócitos que são libertadas para a circulação. No entanto, situações de anemia em que não se verifica um aumento deste parâmetro são sugestivas de uma diminuição da capacidade da medula óssea responder e aumentar a produção dos eritrócitos ou de uma falha na produção e/ou estimulação por parte da eritropoietina. (1, 3)

Este parâmetro é determinado pelo autoanalisador por citometria de fluxo, através da emissão de fluorescência de corantes que se ligam seletivamente ao ARN. Esta emissão depende do grau de maturação dos reticulócitos, ou seja, da quantidade de ARN que possuem. Assim, quanto mais imaturo é o reticulócito, maior é a quantidade de ARN e maior é a fluorescência emitida. Desta forma, o autoanalisador diferencia-os em reticulócitos de baixa (mais maduros), média e alta (mais imaturos) fluorescência. (1)

Alterações quantitativas

Os parâmetros do eritrograma podem encontrar-se alterados em distintas patologias, sendo as anemias uma delas. Por definição, existe uma situação de anemia quando os valores de Hb se encontram abaixo do valor mínimo do intervalo de referência, sendo este 12 g/dL nas mulheres e 13 g/dL nos homens. Esta diminuição pode ser ou não acompanhada pela diminuição da contagem de eritrócitos.

As alterações nos valores de VCM e da HCM permitem fornecer informações sobre o tipo e causas de anemia. Assim, um VCM e uma HCM abaixo dos respetivos valores mínimos dos intervalos de referência classifica a anemia como microcítica e hipocrómica e pode ser observada em casos de diminuição de ferro (sideropenia) por deficiência ou sequestro (anemia da inflamação ou de doença crónica), talassémia, anemia sideroblástica (defeito na síntese do heme) ou em intoxicação por chumbo. Um VCM e uma HCM dentro dos respetivos intervalos de referência classificam a anemia como normocítica e normocrómica, podendo ser observada em casos de anemias hemolíticas, em alguns casos de anemia da doença crónica, insuficiência renal, após perda aguda de sangue e insuficiência da medula óssea, por exemplo, após quimioterapia. Um VCM acima do valor máximo do intervalo de referência classifica a anemia como macrocítica e pode ser observada em casos de anemia megaloblástica, causada por

deficiência em vitamina B12 ou ácido fólico, e em casos de anemia não megaloblástica, causada por álcool, doença hepática, mielodisplasia e anemia aplástica. (3, 5)

Durante a análise das anemias, é importante avaliar a contagem de reticulócitos bem como o número de reticulócitos imaturos (IRF - *immature reticulocyte fraction*). Isto porque a contagem de RET e a IRF são indicadores da atividade eritropoiética da medula óssea e auxiliam na distinção de anemias regenerativas (RET aumentados) e hiporregenerativas (RET diminuídos) e porque a IRF pode ser considerada um índice sensível e precoce da eritropoiese.

As anemias hemolíticas adquiridas ou por perda de sangue são caracterizadas pelo aumento da eritropoiese, pelo que a estes tipos de anemias encontra-se associado um aumento na contagem de RET e de IRF. Nas anemias que se devem a uma redução na atividade medular, como ocorre nos casos de doença renal crónica onde a síntese de eritropoietina se encontra comprometida, verifica-se uma diminuição na contagem de RET e de IRF. Uma aplicação também particularmente útil destes parâmetros é permitir, durante os casos de reticulocitopenia, identificar precocemente a regeneração medular em pacientes submetidos a transplante de medula óssea ou quimioterapia. Particularmente, na monitorização de tratamentos de anemias nutricionais e do sucesso dos transplantes de medula óssea, um aumento na fração de IRF pode prever a eficácia do tratamento e o sucesso do transplante antes mesmo do aumento da contagem de reticulócitos. (1)

Alterações qualitativas

O eritrograma reúne informações importantes no diagnóstico de distúrbios ou patologias que envolvam a série eritrocitária, no entanto, os equipamentos automatizados não conseguem detetar e identificar várias alterações qualitativas nos eritrócitos que fornecem informações adicionais e auxiliam a definir um diagnóstico. Deste modo, a forma de avaliar a presença de alguns tipos de alterações qualitativas é através da observação microscópica do esfregaço de sangue periférico (ESP). Durante a observação microscópica das células da série eritrocitária, pode ser avaliada a variação de cor (anisocromia), de tamanho (anisocitose) e de forma (poiquilocitose). Na avaliação da anisocromia podem ser visualizados eritrócitos com uma cor menos intensa, hipocrócimos (Figura 1A), já na avaliação da anisocitose podem ser visualizados eritrócitos com um tamanho menor ou maior que o normal, microcíticos (Figura 1B) ou macrocíticos (Figura 1C), respetivamente. Os índices hematimétricos obtidos no eritrograma devem ser comparados com as alterações observadas no ESP, de forma a confirmar se os índices obtidos se encontram corretos.

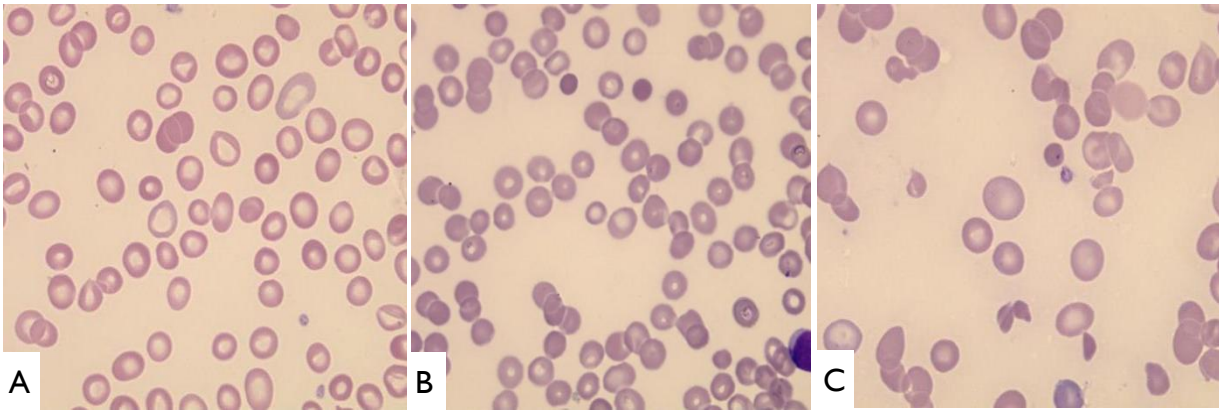


Figura 1 - Eritrócitos hipocrômicos (A), eritrócitos microcíticos (B) e eritrócitos macrocíticos (C). (6)

Na avaliação microscópica da poiquilositose, algumas das principais alterações morfológicas que podem ser observadas incluem células em alvo, esferócitos, drepanócitos e draciócitos.

Células em alvo

Também denominadas *Target Cells* ou codócitos, apresentam-se como células que possuem um ponto central corado e uma borda periférica de citoplasma hemoglobinizado, sendo separados por um citoplasma sem coloração ou com coloração mais leve devido a possuir nessa zona menor concentração de Hb (Figura 2A). Surgem devido a modificações do conteúdo em lípidos, mais especificamente a um aumento do colesterol e de fosfolípidos (PL). Esta alteração morfológica encontra-se associada a situações de hemoglobinopatias, talassemias, doença hepática obstrutiva, anemia por deficiência de ferro e pós-esplenectomia. (1, 2, 3)

Esferócitos

Correspondem a eritrócitos que perderam a forma de disco bicôncavo e apresentam uma forma esférica, mantendo um contorno regular e demonstrando maior fragilidade osmótica (Figura 2B). Esta alteração morfológica encontra-se associada a esferocitose hereditária, anemia hemolítica autoimune, reações transfusionais tardias, doença hemolítica do recém-nascido, queimaduras severas e sépsis. (1, 2, 3)

Drepanócitos

Correspondem a eritrócitos que apresentam uma forma semelhante a uma foice (Figura 2C). Estas células aparecem na designada drepanocitose ou anemia falciforme, uma doença hematológica hereditária caracterizada pela produção anormal de Hb, Hb S. Os eritrócitos com esta alteração morfológica podem causar oclusão dos vasos sanguíneos, impedindo o fluxo sanguíneo para os órgãos e tecidos. (1, 2, 3)

Draciócitos

Correspondem a eritrócitos que apresentam uma forma semelhante a uma gota ou lágrima (Figura 2D). Esta alteração morfológica encontra-se principalmente associada a mielofibrose e hematopoiese extramedular. (1, 2, 3)

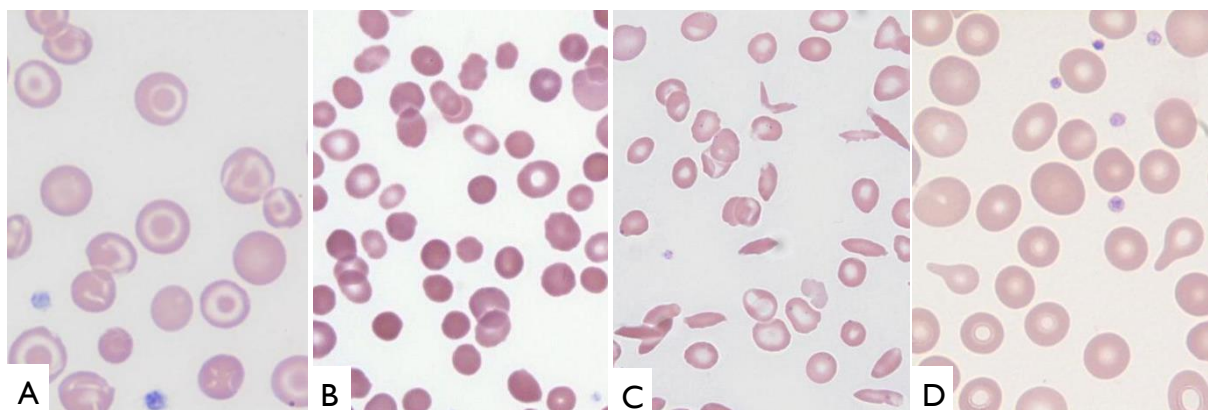


Figura 2 - Células em alvo (A), Esferócitos (B), Drepanócitos (C), Draciócitos (D). (7)

Para além da poiquilocitose, outros fenómenos a ter em atenção durante a observação microscópica de um ESP são as inclusões eritrocitárias que incluem o ponteadado basófilo, os corpos de Pappenheimer e os corpos de Heinz.

Ponteadado basófilo

É formado por agregados ribossomais contendo ARN, na forma de partículas finas ou grossas, distribuídos pelo citoplasma (Figura 2A). Encontram-se associados a talassemias, hemoglobinopatias, envenenamento por chumbo e deficiência de pirimidina 5'nucleotidase. (1)

Corpos de Pappenheimer ou grânulos sideróticos

Estes corpos são grânulos de ferro que se distribuem pelo citoplasma em menor número em comparação com o ponteadado basófilo. Quando se dispõem de forma a rodear a membrana dos eritrócitos, são designados de sideroblastos. São visíveis na coloração de May-Grünwald-Giemsa, mas a confirmação de ferro nos grânulos observados é realizada com a coloração de Perls que utiliza o azul da Prússia, específico para o ferro (Figura 2B). Encontram-se associados a pós-esplenectomia, a desordens no metabolismo do ferro, como a anemia sideroblástica (presença de sideroblastos), e a anemias hemolíticas de um modo geral. (1, 2, 3)

Corpos de Heinz

Estes corpos são inclusões únicas ou múltiplas encontradas em eritrócitos maduros, geralmente ligadas à membrana do eritrócito, e correspondem a Hb oxidada desnaturada que precipitou (Figura 2C). Encontram-se associados a Hb instável, a algumas hemoglobinopatias e algumas deficiências enzimáticas como de glicose-6-fosfato-desidrogenase, que causa stresse oxidativo. Os corpos de Heinz apenas são visualizados com a coloração supravital. (2, 3)

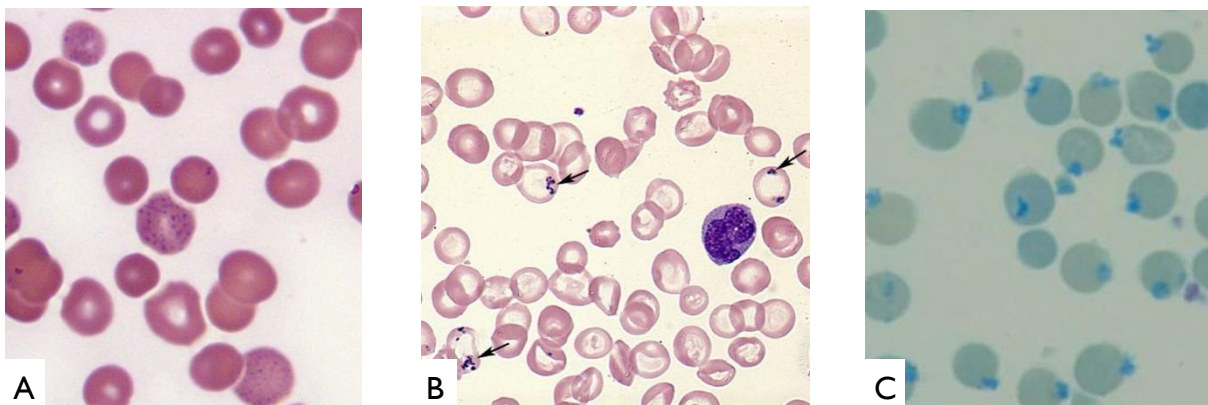


Figura 3 - Ponteadado basófilo (A), Corpos de Pappenheimer (B), Corpos de Heinz (C). (7)

Na observação do ESP, também é possível avaliar a presença de *rouleaux* eritrocitário e aglutinação eritrocitária. Estes dois fenômenos podem ser facilmente confundidos, pelo que deve ser realizada uma análise atenta para os distinguir. O *rouleaux* é definido como o empilhamento de eritrócitos na forma de pilhas de moedas na parte fina da extensão do esfregaço (Figura 3A). A sua presença está associada a situações que geram hiperproteinemia, como é o caso do Mieloma Múltiplo e de estados inflamatórios. A elevada quantidade de proteínas causa uma diminuição da força de repulsão entre os eritrócitos o que facilita o empilhamento e a formação do *rouleaux*. A aglutinação é definida por agregados de eritrócitos como resultado da presença de um autoanticorpo frio, ou seja, autoanticorpos que podem

atuar a qualquer temperatura abaixo de 37°C (Figura 3B). O anticorpo em questão é uma imunoglobulina (Ig) M e geralmente os agregados de eritrócitos sobrepõem-se. De modo a reverter a aglutinação eritrocitária, é necessário incubar a amostra a 37°C, durante 30 minutos, e posteriormente reanalisá-la, de modo a se obterem resultados mais confiáveis das contagens de eritrócitos. (1)

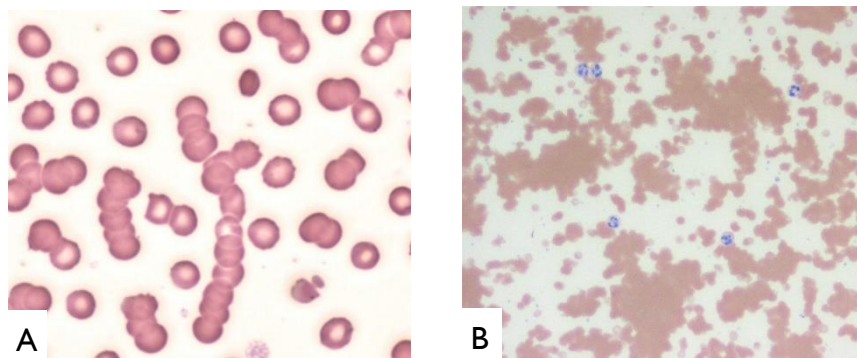


Figura 4 - Rouleaux (A), Agregados de eritrócitos (B). (7)

2.1.2. Série leucocitária

Leucograma

O leucograma é a parte do hemograma cujos parâmetros permitem avaliar de forma quantitativa as células da série leucocitária/branca, os leucócitos. Os leucócitos constituem uma importante defesa do organismo contra infecções e são compostos pelos neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos T e B. Estas células são produzidas a partir de células precursoras mielóides (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos) e linfóides (linfócitos T e B) formadas na medula óssea, que se diferenciam em células poliformonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos). Os neutrófilos, eosinófilos e basófilos constituem as designadas células granulocíticas, uma vez que possuem grânulos no seu citoplasma. (3)

O elemento celular mais abundante a nível dos leucócitos é o neutrófilo, sendo constituído por um núcleo segmentado com 3 a 5 lóbulos ligados por uma fina banda de cromatina e por um citoplasma abundante com granulações neutrófilas (Figura 5A). Os grânulos contêm mieloperoxidase, hidrolases ácidas, lactoferrina, lisozima e outras enzimas. Os neutrófilos possuem um tempo de vida útil no sangue de 6 a 10 horas e são especializados sobretudo na eliminação de bactérias. (3)

Os eosinófilos são semelhantes aos neutrófilos, sendo constituídos por um núcleo com 2 ou, no máximo, 3 lóbulos ligados por uma banda de cromatina, e por um citoplasma abundante com granulações eosinófilas, um pouco mais grosseiras, caracterizadas pela cor laranja (Figura 5B). Estas células desempenham um papel na imunidade local e no reparo tecidual, uma vez que se encontram envolvidas no desencadear das respostas alérgicas com a desgranulação dos seus grânulos com histamina, na defesa contra parasitas e na remoção da fibrina formada durante a inflamação. (3)

Os basófilos são os elementos celulares menos abundantes a nível dos leucócitos e são constituídos por um núcleo com 3 lóbulos e um citoplasma abundante com granulações basófilas que contêm heparina e histamina, sendo mais grosseiras e abundantes que as dos neutrófilos e eosinófilos, que se sobrepõem ao núcleo e impedem muitas vezes a sua visualização (Figura 5C). Estas células possuem locais de fixação da Ig E que, ao estabelecer ligação com o antígeno, desencadeia a sua desgranulação com a libertação de histamina, encontrando-se envolvidas essencialmente em processos alérgicos. Os basófilos são células circulantes e uma vez nos tecidos diferenciam-se em mastócitos. (3)

Os monócitos são as maiores células sanguíneas, sendo constituídos por um núcleo oval ou reniforme e por um citoplasma abundante cinzento-azulado com granulações finas e azurófilas, com ou sem vacúolos (Figura 5D). Estas células possuem um papel importante quando existe uma infeção nos tecidos ou órgãos, dado que são células circulantes e, uma vez nos tecidos, diferenciam-se em macrófagos que possuem a capacidade de fagocitar os microrganismos e combater a infeção, constituindo um mecanismo de defesa contra bactérias e vírus. (3)

Os linfócitos são os segundos elementos celulares mais comuns do leucograma e são células pequenas constituídas por uma cromatina densa com uma fina membrana nuclear, formando um núcleo redondo ou oval, e por um citoplasma pouco abundante azul-claro (Figura 5E). Estas células são a principal linha de defesa contra as infeções, não só virais, mas também no combate ao desenvolvimento de tumores. A nível morfológico não é possível distinguir os linfócitos T dos B, sendo realizado com base em marcadores. (3)

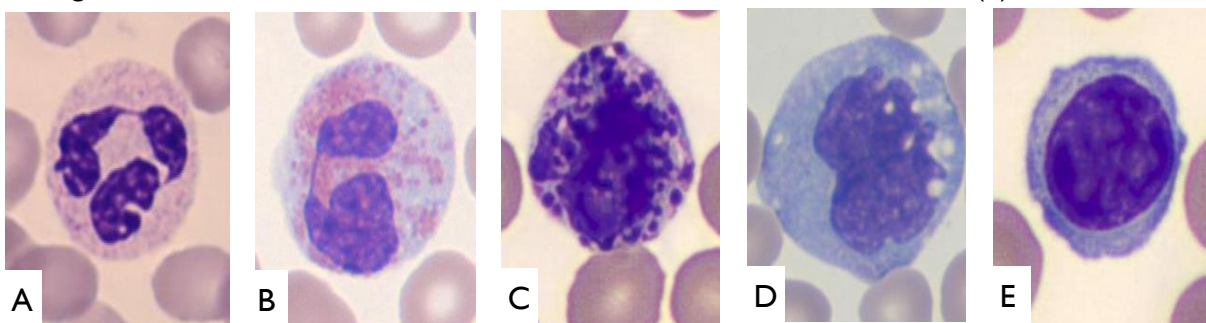


Figura 5 - Neutrófilo (A) (6), Eosinófilo (B) (7), Basófilo (C) (7), Monócito (D) (7), Linfócito (E) (7).

As células que constituem o leucograma são determinadas e contabilizadas diretamente pelo autoanalisador através de fluorescência de citometria de fluxo. Este método permite analisar características das células sanguíneas, como o tamanho e a complexidade celular, através da detecção de fluorescência e dispersão da luz geradas. As informações provenientes dos diferentes detetores de luz são combinadas e permitem agrupar as células semelhantes num gráfico de dispersão, possibilitando diferenciar as populações leucocitárias (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos). (1)

Os valores são fornecidos sob a forma de percentagem e de número absoluto, sendo que as interpretações devem ser realizadas com base nos valores absolutos e não nos relativos, uma vez que estes últimos podem levar a interpretações erradas de quais subpopulações de leucócitos se encontram normais ou alteradas. (2)

Alterações quantitativas

A presença de uma contagem de células fora do intervalo de referência pode indicar uma ampla gama de etiologias, desde casos benignos até a rinofaringite não complicada ou uma leucemia aguda. Vários fatores afetam por si só, sem nenhuma patologia associada, os próprios intervalos de referência dos leucócitos e das respectivas populações de células. Dois dos fatores mais comuns são a idade e a gravidez. Assim, torna-se importante avaliar os resultados das contagens fornecidos pelo leucograma com os intervalos de referência adequados a cada situação, de forma a identificar as alterações, e juntamente com outros parâmetros analíticos ser possível identificar a etiologia dessas alterações. (8)

Uma contagem elevada de leucócitos é designada de leucocitose, sendo $4,0 - 10,0 \times 10^9$ células/L o intervalo de referência para os leucócitos num adulto. A Tabela I apresenta possíveis condições que podem ser associadas ao aumento de células de cada população leucocitária. (2, 8)

Na situação oposta, uma contagem de leucócitos abaixo do intervalo de referência é designada de leucopenia, podendo ser congénita ou adquirida. A existência de uma situação de neutropenia encontra-se associada a um risco aumentado de infeção. A Tabela II apresenta possíveis condições que podem ser associadas ao decréscimo de células de cada linha leucocitária. (8)

Tabela I - Condições que se encontram associadas à elevação das diferentes populações de leucócitos, com respetivos valores de elevação para indivíduos adultos. (8)

Linha celular	Terminologia	Possíveis Condições Associadas
Neutrófilos	Neutrofilia	Infeções (normalmente bacteriana, podendo também ocorrer um aumento imprevisível em infeção viral), indução por fármacos (como lítio), inflamação crónica, tabagismo, obesidade, stresse, exercício físico, neoplasias, necrose de tecidos, distúrbios mieloproliferativos, hemólise.
Eosinófilos	Eosinofilia	Infeções parasitárias, doenças alérgicas, indução por fármacos, condições dermatológicas, neoplasias.
Basófilos	Basofilia	Condições alérgicas, leucemias, doenças inflamatórias crónicas.
Linfócitos	Lintocitose	Infeções virais e bacterianas, distúrbios endócrinos, leucemia aguda ou crónica.
Monócitos	Monocitose	Infeções virais e fúngicas, doenças autoimunes (como lúpus e artrite reumatoide).

Tabela II - Condições que se encontram associadas ao decréscimo das diferentes populações de leucócitos, com respetivos valores de decréscimo para indivíduos adultos. (8)

Linha celular	Terminologia	Possíveis Condições Associadas
Neutrófilos	Neutropenia	Medicação (mais comuns agentes de quimioterapia), infeções bacterianas graves, infeções virais, sépsis, deficiências nutricionais (como vitamina B12, folato e cobre), doenças hematológicas (como leucemia, anemia aplástica), doenças autoimunes, distúrbios congénitos.
Eosinófilos	Eosinopenia	Transtorno de stresse agudo, terapias com glucocorticóides, Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH).
Linfócitos	Lintocitopenia	Transtorno de stresse agudo, VIH, imunossuppressores (esteroides, álcool), insuficiência da medula óssea.
Monócitos	Monocitopenia	Transtorno de stresse agudo, terapias com glucocorticóides, anemia aplástica, tricoleucemia, quimioterapia.

Alterações qualitativas

A avaliação de alterações qualitativas na série leucocitária tem de ser realizada através da observação microscópica do ESP uma vez que os equipamentos automatizados não possuem a capacidade de as identificar e distinguir. Algumas das alterações que podem ser observadas no ESP incluem neutrófilos hipersegmentados, granulócitos hipossegmentados, corpúsculos de Döhle e blastos.

Neutrófilos hipersegmentados

Correspondem a neutrófilos que apresentam 6 ou mais lóbulos (Figura 6A). A presença desta alteração morfológica é uma importante característica no diagnóstico das anemias megaloblásticas, encontrando-se também associada ao uso de corticóides, mielodisplasias e quimioterapia. (1, 2)

Granulócitos hipossegmentados

Correspondem a granulócitos cujo núcleo não apresenta ou apresenta uma diminuição na sua segmentação. Esta alteração morfológica pode ser encontrada principalmente em neutrófilos (Figura 6B), mas também em eosinófilos e basófilos em determinadas situações. Neutrófilos com um ou dois lóbulos discretamente ligados são considerados hipossegmentados e encontram-se associados à síndrome de Pelger-Huët ou pseudo Pelger-Huët. Esta última encontra-se associada a quimioterapia, doenças mieloproliferativas e mielodisplasias. (1, 2)

Blastos

Correspondem a células ainda indiferenciadas (Figura 6C) de origem mielóide (mieloblastos) ou linfóide (linfoblastos) e que aparecem aumentadas na leucemia mielóide aguda e leucemia linfóide aguda, respetivamente, sendo o aumento de blastos superior a 20% na medula óssea. Nas neoplasias mielóides crónicas, como síndromes mielodisplásicas e neoplasias mieloproliferativas, pode ser encontrado um aumento baixo na contagem de blastos. (1, 3)

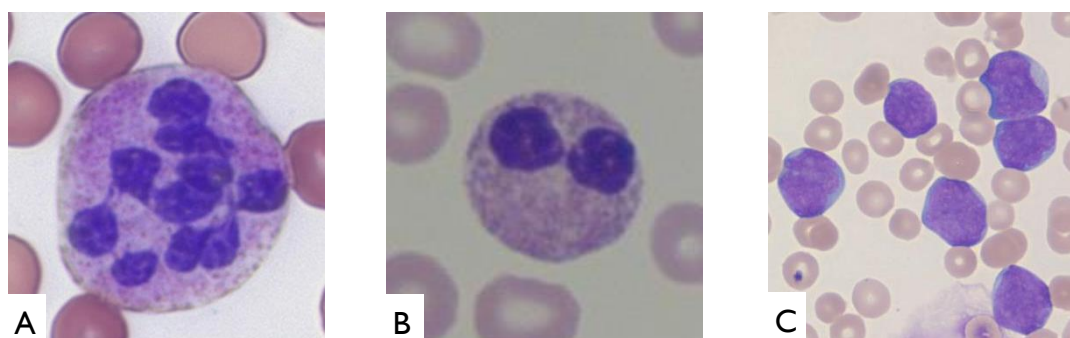


Figura 6 - Neutrófilo hipersegmentado (A), Neutrófilo hipossegmentado (B), Blastos (C). (7)

2.1.3. Série Plaquetária

Trombocitograma

O trombocitograma é a parte do hemograma cujos parâmetros permitem avaliar de forma qualitativa e quantitativa as células da série plaquetária, as plaquetas ou trombócitos. Estas células são produzidas na médula óssea a partir dos megacariócitos, que são formados também na medula óssea por ação da trombopoietina sobre um precursor mielóide. O processo é designado de trombocitopoiese, e as plaquetas acabam por circular em média 8 a 10 dias, sendo posteriormente retiradas da circulação pelo baço. (1, 3)

O trombocitograma engloba a contagem das plaquetas, o volume plaquetar médio (VPM), o plaquetócrito (PCT) e o índice de distribuição do tamanho das plaquetas. A análise destes parâmetros permite avaliar variações na contagem e no volume das plaquetas, permitindo avaliar alterações no processo de hemostase. (3)

▪ **Plaquetas**

As plaquetas são produzidas na medula óssea através da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos. A maturação do megacariócito consiste numa replicação síncrona endomitótica, ou seja, numa replicação do ácido desoxirribonucleico (ADN) do megacariócito sem que ocorra divisão nuclear ou citoplasmática. Deste modo, ocorre um aumento do volume citoplasmático à medida que o número de lóbulos nucleares aumenta em múltiplos de dois. Os megacariócitos maduros são extremamente grandes, constituindo uma das maiores células do corpo, com um único núcleo lobulado excêntricamente posicionado e uma baixa relação núcleo-citoplasma. (1, 3) As pontas das extensões do citoplasma dos megacariócitos sofrem fragmentação e os fragmentos que daí resultam são as plaquetas, apresentando as características de um tamanho muito reduzido, discóide, 1,5-3,5 μm de diâmetro, forma irregular, anucleadas e incapazes de realizar divisão celular. (2, 3) Cada megacariócito dá origem a aproximadamente 1 000-5 000 plaquetas, sendo posteriormente libertadas para a corrente sanguínea através do endotélio dos nichos vasculares da medula óssea onde residem os megacariócitos. (3)

A manutenção da hemostase perante um dano vascular depende de uma estreita interação entre a parede do vaso sanguíneo, as plaquetas circulantes e os fatores de coagulação do sangue. Assim, as plaquetas são um dos principais componentes que contribuem para a manutenção da integridade do endotélio vascular ao aderirem aos vasos sanguíneos danificados e formarem agregados plaquetares que controlam a hemorragia. Lesões que sejam mais extensas e envolvam vasos sanguíneos maiores requerem também a participação do sistema de coagulação para fornecer um coágulo de fibrina firme e estável. (3, 9)

A contagem normal das plaquetas é aproximadamente $250 \times 10^9/\text{L}$, sendo o intervalo de referência $150-400 \times 10^9/\text{L}$. Este parâmetro é determinado diretamente pelo autoanalisador através de um método de deteção por impedância elétrica combinado com focagem hidrodinâmica. É muito comum os valores apresentarem-se diminuídos (trombocitopenia) em indivíduos que se encontram a realizar tratamentos como quimioterapia, sendo importante antes de cada nova sessão de tratamento analisar a contagem de plaquetas, uma vez que o

tratamento vai reduzir ainda mais os seus valores e aumentar o risco de hemorragias descontroladas que podem ser fatais. Nestes casos, é necessário verificar se existe uma trombocitopenia ou uma pseudotrombocitopenia, podendo ser útil realizar um ESP. (3)

- **Volume Plaquetar Médio**

O VPM corresponde ao volume médio das plaquetas, sendo expresso em fentolitros (fL). O autoanalisador determina o volume das plaquetas e obtém uma curva de distribuição dos volumes, cujo pico corresponde ao valor deste parâmetro. (1)

O VPM é útil para monitorizar a recuperação da contagem de plaquetas nos casos de trombocitopenias, uma vez que ocorre um aumento precoce deste parâmetro quando as plaquetas começam a aumentar. Uma limitação do seu uso nesta interpretação é o facto de os analisadores hematológicos, por vezes, não conseguirem fornecer o VPM quando a contagem de plaquetas é extremamente baixa. Um VPM baixo, acompanhado por uma contagem de plaquetas normal, alta ou baixa, é associado a situações que causam danos na medula óssea, como a quimioterapia citotóxica e supressão da medula devido a uma sépsis. (1)

- **Plaquetócrito**

O PCT corresponde à fração ocupada pelas plaquetas na massa de sangue, sendo expresso em valor percentual ou em Litro/Litro. Este parâmetro resulta do produto do VPM e a contagem de plaquetas, através da seguinte fórmula: (1)

$$\text{PCT} = \text{VPM} * \text{contagem de plaquetas}$$

- **Distribuição do Diâmetro das Plaquetas**

A Distribuição do Diâmetro das Plaquetas (*PDW-Platelet Distribution Width*) indica a amplitude de distribuição do volume das plaquetas presentes na amostra, ou seja, representa o índice de anisocitose plaquetária, heterogeneidade do tamanho das plaquetas tal como nos eritrócitos. O seu valor é obtido pelo autoanalisador através da base da curva de distribuição do tamanho das plaquetas obtida, sendo expresso em fL. (1)

Em populações saudáveis, verifica-se a existência de uma relação direta entre VPM e PDW, sendo mantida nos casos de púrpura trombocitopénica idiopática e na leucemia

mielóide crónica, onde ambos estão aumentados. Esse facto não ocorre nos casos de anemia megaloblástica ou durante quimioterapia, em que o VPM diminui com o aumento do PDW. (1)

Alterações quantitativas

Na circulação periférica do sangue circulam cerca de $150-400 \times 10^9$ plaquetas/L, tendo um papel tanto na hemostase primária como na secundária. A não ativação das plaquetas pode ser responsável por hemorragias, enquanto uma ativação excessiva pode ser responsável por obstrução dos vasos sanguíneos. (3) Quando a contagem de plaquetas é menor que o valor de referência, existe a situação designada por trombocitopenia. Em geral, se a contagem de plaquetas for inferior a $100 \times 10^9/L$, não se espera que ocorra sangramento mesmo numa operação. Abaixo desta contagem a probabilidade de sangramento aumenta, sendo que abaixo de $10 \times 10^9/L$ existem graves riscos associados à ocorrência de um sangramento excessivo e prolongado. Existem três mecanismos principais para a trombocitopenia, sendo eles a rápida destruição, a produção reduzida e o sequestro. (9)

A rápida destruição ou consumo de plaquetas é a razão pela qual a trombocitopenia é frequentemente observada e ocorre quando a taxa de destruição das plaquetas ultrapassa a taxa de produção. Este mecanismo depende de razões intracorpúsculares ou extracorpúsculares, podendo ocorrer tanto por motivos imunológicos, como por exemplo numa resposta autoimune (Púrpura Trombocitopénica idiopática), como por motivos não imunológicos, como por exemplo na Coagulação Intravascular Disseminada (CID), na Púrpura Trombocitopénica Trombótica congénita ou em transfusões massivas de sangue. A trombocitopenia que ocorre por redução na produção de plaquetas deve-se a uma supressão ou hipoplasia dos megacariócitos na medula óssea, devido a uma trombocitopoiese ineficaz ou defeitos nos mecanismos que a controlam por fatores hereditários ou não, como é o caso da ação de fármacos mielossupressores, infeções e da radiação. A hipoplasia ou aplasia megacariocítica pura é uma situação rara. A trombocitopenia que ocorre por sequestro das plaquetas deve-se a uma captura pelo baço, por existência de neoplasias, congestão ou inflamação, ou a uma hipotermia intensa. (9)

Na situação contrária, quando a contagem de plaquetas é maior que o valor de referência, existe uma trombocitose, sendo associada a um maior risco de formação de trombos no interior dos vasos sanguíneos. A trombocitose pode ser de origem primária ou secundária. A trombocitose primária surge em contexto de doenças hematológicas primárias

que causam disfunção da medula óssea como neoplasias mieloproliferativas (trombocitemia essencial, policitemia vera). As causas da trombocitose secundária incluem deficiência de ferro, infecção, inflamação, dano tecidual (incluindo cirúrgico), pós-esplenectomia, perda aguda de sangue e malignidade de órgãos sólidos, como cancro do pulmão, cervical ou da mama. (10)

Alterações qualitativas

A contagem de plaquetas pode encontrar-se falsamente diminuída devido a alterações qualitativas/morfológicas (agregação plaquetar induzida pelo EDTA, satelitismo plaquetar) ou à formação de coágulos na amostra, originando a designada pseudotrombocitopenia. (2)

Em cerca de 1% dos indivíduos, o anticoagulante EDTA induz a formação de agregados plaquetares. Neste caso, é necessário realizar um ESP e verificar se não existem agregados plaquetares ou pedir colheita de amostra num tubo de Tromboexact, que avalia apenas a série plaquetária e contém uma mistura de anticoagulante que impede a formação de agregados, de forma a verificar se a contagem de plaquetas se encontra verdadeiramente baixa. Como alternativa, pode ser solicitada a repetição da colheita da amostra utilizando um anticoagulante alternativo, habitualmente o citrato. (1, 2) Ocasionalmente, as plaquetas podem circundar os neutrófilos por adesão, observando-se aquilo que se designa por satelitismo plaquetar. Esta situação foi relatada em indivíduos com autoanticorpos antiplaquetários, mas é mais comumente observado em indivíduos aparentemente saudáveis. (2)

A presença de plaquetas gigantes é uma outra alteração da série plaquetária que pode ser observada no ESP em várias condições plaquetárias hereditárias incomuns, como a síndrome das plaquetas cinzentas (aparência cinzenta), e em patologias adquiridas como anemia megaloblástica e distúrbios mieloproliferativos e em situações de hipoesplenismo. (2)

2.2. Hemostase e Coagulação

A hemostase é um processo fisiológico complexo que protege o sistema vascular quando ocorre uma lesão, ao produzir nesse local um coágulo para interromper o sangramento e, no final, dissolve o coágulo à medida que a lesão cicatriza. Este processo é conseguido através de um conjunto de mecanismos que, de modo integrado, contribuem para rapidamente parar a hemorragia localmente e de modo autolimitado, de forma a não comprometer o normal fluxo sanguíneo. (2) Os cinco principais componentes envolvidos na

hemostase são as plaquetas, fatores da coagulação, inibidores da coagulação, sistema fibrinolítico e células endoteliais dos vasos sanguíneos. (3)

A hemostase ocorre em três etapas: hemostase primária (trombo plaquetar), hemostase secundária (trombo de fibrina insolúvel) e hemostase terciária ou fibrinólise (dissolução do trombo). (11) A hemostase primária consiste na vasoconstrição, que diminui o fluxo sanguíneo, e na ativação das plaquetas, que aderem ao local da lesão e agregam-se com outras plaquetas, resultando na formação do primeiro trombo muito lábil (plaquetar). Esta resposta inicial é rápida e de curta duração. A hemostase secundária consiste na ativação de diferentes proteínas pro-coagulantes no plasma, de forma a formar um coágulo de fibrina insolúvel que estabiliza o trombo plaquetar. A etapa final da hemostase é a fibrinólise, que consiste na digestão e remoção gradual do coágulo de fibrina à medida que a cicatrização ocorre. (3)

A resposta hemostática é representada por uma cascata da coagulação que resume o processo de formação do coágulo (Figura 7). Quando ocorre uma lesão, o primeiro passo é a vasoconstrição, ocorrendo uma diminuição do fluxo sanguíneo na área da lesão que previne a hemorragia e ativa as plaquetas por contacto, resultando na ativação da via intrínseca. Por outro lado, a lesão vascular expõe e ativa o fator tecidual ligado à membrana (fator III ou TF) que interage com o fator VII plasmático e ativa a via extrínseca. Após a ativação destas duas vias, é desencadeado um conjunto de reações em cascata que resultam na ativação consecutiva de proteínas precursoras circulantes (fatores da coagulação), convergindo na via comum, onde ocorre a conversão da protrombina (fator II) em trombina. Esta última, tem como principais funções promover a agregação plaquetar e converter o fibrinogénio em fibrina que forma o coágulo de fibrina, insolúvel e estável. A separação das vias só se verifica *in vitro*, porque, *in vivo*, são dependentes uma da outra e ocorrem em simultâneo. (3)

A geração de trombina é dependente de três complexos enzimáticos, cada um constituído por protease, cofator, PL e cálcio. Sendo eles: (i) da via extrínseca (VIIa, TF, PL, Ca^{2+}) que gera Xa; (ii) da via intrínseca (IXa, VIIIa, PL, Ca^{2+}) que também gera Xa; e (iii) complexo de protrombinase (Xa, Va, PL, Ca^{2+}). (3)

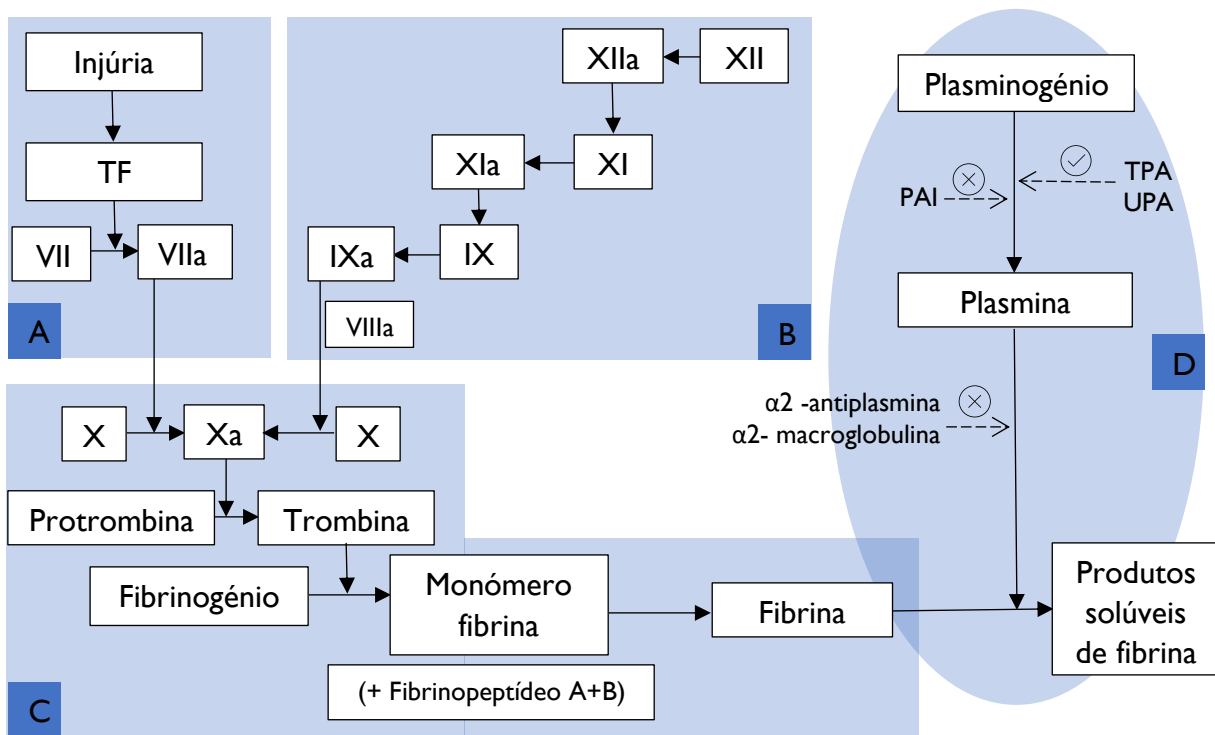


Figura 7 - Representação da Via extrínseca (A), Via intrínseca (B) e Via comum (C) da cascata de coagulação sanguínea, bem como do processo de fibrinólise (D). O sufixo "a" representa a forma ativada do fator em causa. Ativador do Plasminogénio do tipo Urocinase – UPA, Ativador Tecidual de Plasminogénio – TPA, Inibidor do Ativador do Plasminogénio – PAI, (⊗)=inibição, (⊙)=ativação. (3)

Quando a reparação dos tecidos termina, o coágulo é removido através da designada fibrinólise, um processo onde o plasminogénio (proenzima plasmática) é convertido em plasmina, uma serina protease que dissolve o coágulo de fibrina impedindo que este se perpetue no tempo e comprometa o normal fluxo sanguíneo. Quando ocorre a lesão do endotélio, existe também libertação de TPA e UPA, ativadores da fibrinólise. O TPA é uma protease que se liga à fibrina, aumentando a capacidade de conversão do plasminogénio em plasmina, sendo esta conversão facilitada pela UPA (Figura 7). Para que a fibrinólise seja um processo fisiológico e não excessivo, atuam também inibidores, como é o caso do PAI que inativa o TPA e consequentemente a formação da plasmina; e da α_2 -antiplasmina e α_2 -macroglobulina, que inativam a plasmina em circulação. (3)

Entre as proteínas plasmáticas existem proteínas com atividade pro-coagulante, fatores da coagulação, e não coagulante, inibidores da coagulação ou fatores anticoagulantes. Os vários fatores envolvidos na coagulação são na maioria sintetizados pelo fígado e numa forma inativa, sendo que alguns deles necessitam de vitamina K para a sua síntese. Os fatores II, VII, IX, X (pro-coagulantes) e a proteína C e a S (anticoagulantes) são fatores dependentes da vitamina K. Deste modo, alterações nos fatores da coagulação podem encontrar-se relacionadas com insuficiências hepáticas, hipovitaminose K, síndromes de má absorção ou terapias com

anticoagulantes orais. Os íons cálcio têm também um papel fundamental no processo de coagulação, sendo essenciais em várias etapas da cascata de coagulação. (3)

A resposta hemostática depende assim de um delicado equilíbrio entre mecanismos pro-coagulantes e anticoagulantes aliados a um processo de fibrinólise, de modo a prevenir situações de hemorragias severas e eventos trombóticos. (11)

2.2.1. Teste de coagulação sanguínea

A avaliação laboratorial da hemostase consiste em testes que permitem identificar defeitos da via intrínseca, extrínseca e comum da cascata de coagulação, e monitorizar a terapêutica com anticoagulantes.

O anticoagulante de escolha para o estudo dos fatores da coagulação é o citrato de sódio que, tal como o EDTA, quelam o íon cálcio, sendo utilizados tubos que contêm uma solução de citrato trissódico. (1) A proporção anticoagulante:sangue deve ser de 1:9, e é crítica porque, uma vez não respeitada, podem ocorrer efeitos osmóticos e alterações na concentração do íon cálcio livre que afetam os resultados dos testes de coagulação. (2)

No SPC da ULS da Guarda, alguns dos parâmetros que fazem parte das análises de rotina da coagulação são o Tempo de Protrombina (TP), o Tempo de Tromboplastina Parcial ativado (TTPa), os D-Dímeros, o Fibrinogénio e o Tempo de Trombina (TT). Estes parâmetros são determinados no aparelho automatizado ACL TOP 5000, após centrifugação dos tubos para obter o plasma onde se realizam os testes.

▪ Tempo de Protrombina

O TP mede o tempo de coagulação na presença de uma concentração ótima de extrato tecidual (tromboplastina), sendo adicionado juntamente com fosfolípidos e cálcio em excesso ao plasma no tubo de citrato de sódio para a sua determinação. (3) Este parâmetro, permite avaliar a eficiência da via extrínseca (fator VII), da via comum (fatores II, V, X e fibrinogénio) e monitorizar a terapêutica com anticoagulantes orais, como a varfarina (inibe a síntese de vitamina K e, sem ela, os fatores II, VII e X não podem ser ativados). (11)

Como o valor de TP obtido depende da tromboplastina usada em cada laboratório e é importante na monitorização da terapia com anticoagulantes, existiu a necessidade de uniformizar este parâmetro pelo que se desenvolveu, a nível mundial, a designada Razão Normalizada Internacional (INR). No cálculo da INR, é relacionado o TP do doente (TP_{doente})

com o TP de controlo (TP_{controlo}) obtido através de uma *pool* de amostras com TP normal, e utilizado o Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) como referência, através da seguinte equação:

$$IRN = \left(\frac{TP_{\text{doente}}}{TP_{\text{controlo}}} \right)^{ISI}$$

O valor normal de INR situa-se entre 0,9 a 1,1, para um indivíduo que não realize terapia com anticoagulantes orais, e entre 2,0 e 3,0 para um indivíduo que realize terapia. Quando os valores se encontram aumentados, indicam que o indivíduo pode encontrar-se hipocoagulado, o que significa que não será capaz de responder de forma eficaz caso tenha uma hemorragia. O TP pode estar elevado, por exemplo, devido a insuficiência hepática, deficiência em vitamina K, uso de anticoagulantes orais, CID, deficiências congénitas ou adquiridas nos fatores envolvidos e, quando elevado de forma isolada, pode indicar deficiência de fator VII. (3)

▪ **Tempo de Tromboplastina Parcial ativado**

O TTPa avalia globalmente a via intrínseca ao medir o tempo de coagulação do plasma sem a presença do fator tecidual, sendo adicionado ao plasma com citrato os fosfolípidos, iões cálcio e um ativador do fator XII. Este parâmetro permite avaliar a eficiência da via intrínseca (fatores VIII, IX, XI, XII), da via comum (fatores X, V, II e fibrinogénio) e monitorizar doentes sob terapêutica com anticoagulante heparina (potencia a atividade da antitrombina). (11)

Quando os valores se encontram aumentados, indicam que o indivíduo pode encontrar-se hipocoagulado. O TTPa pode estar aumentado devido a hepatopatias, à presença de heparina, CID ou défices congénitos ou adquiridos de determinado fator da via intrínseca ou comum. (3) Não é comum um indivíduo apresentar deficiência de dois fatores, pelo que, quando o TP e o TTPa se encontram ambos alterados, pensa-se em défice de fatores da via comum e, quando o TP se encontra normal e o TTPa alterado, em défice de fatores da via intrínseca. (1)

- **D-Dímero**

O D-Dímero é um produto solúvel e específico da digestão de fibrina reticulada pela plasmina. A sua quantificação permite avaliar a capacidade de dissolução do coágulo, diagnosticar trombooses e/ou embolias e monitorizar a terapêutica trombolítica de forma a avaliar a diminuição do tamanho do coágulo. (I)

Este parâmetro apresenta um valor preditivo negativo elevado o que indica que, quando se encontra dentro dos valores normais, exclui-se a presença de trombose venosa profunda e embolia pulmonar; em contrapartida, quando se encontra elevado, pode indicar a presença de qualquer uma das situações anteriores bem como de CID e infeções. (I)

- **Fibrinogénio**

O fibrinogénio é ativado pela trombina, resultando a sua conversão em fibrina e subsequente formação de um coágulo eficaz. Este parâmetro é útil no diagnóstico de hipofibrinogenemia (deficiência quantitativa na produção do fibrinogénio), disfibrinogenemia (deficiência qualitativa), CID e fibrinólise primária. (II)

Um aumento dos valores de fibrinogénio pode estar associado a um maior risco de formação de coágulos, revelando-se um importante marcador trombótico, e a situações inflamatórias e de gestação, uma vez que é também uma proteína de fase aguda. Por sua vez, uma diminuição dos valores é frequentemente encontrada na CID e nas doenças hepáticas. (I)

- **Tempo de Trombina**

O TT permite avaliar a conversão do fibrinogénio em fibrina na fase final da via comum da cascata de coagulação. Este parâmetro mede o tempo que o coágulo de fibrina demora a ser formado após a adição de trombina ao plasma citratado. O TT é útil no diagnóstico de hipofibrinogenemia, disfibrinogenemia, na deteção de inibidores da trombina, na avaliação da CID e na monitorização do anticoagulante varfarina e terapêutica anticoagulante. (12)

O intervalo de referência normal do TT varia de acordo com o tipo e a concentração da trombina presente na preparação usada no ensaio e é estabelecido pelo laboratório que realiza o teste. (12)

2.3. Velocidade de sedimentação

A VS é baseada no princípio da sedimentação de eritrócitos no plasma de uma amostra anticoagulada e mede a velocidade com que essa sedimentação ocorre durante um período de tempo especificado, sendo expressa em milímetro/hora.

A membrana citoplasmática dos eritrócitos apresenta carga negativa devido à presença de ácido siálico, o que cria um potencial de repulsão entre os eritrócitos, designado de potencial Zeta. Este potencial de repulsão impede que os eritrócitos se empilhem em *roleaux* e sedimentem rapidamente, resultando em valores de referência de VS baixos para indivíduos normais. (1) A VS pode ser influenciada por vários fatores que alteram a capacidade de agregação dos eritrócitos, incluindo alterações quantitativas e qualitativas nos eritrócitos e alterações dos níveis de circulação de várias proteínas plasmáticas como o fibrinogênio e imunoglobulinas. (13) Quando essas alterações ocorrem, o potencial Zeta acaba por ser vencido e os eritrócitos empilham-se, resultando num aumento da VS. (1)

Este parâmetro permite avaliar o nível de proteínas de fase aguda e consequentemente de inflamação. No entanto, é um parâmetro pouco específico uma vez que se encontra alterado em diversas patologias, como gripes, infeções, inflamações, leucemias, anemias ou hemoglobinopatias. (13) No entanto, apesar de não ser específica de nenhuma doença em particular, e por si só não permitir tirar conclusões, continua a ser muito útil na clínica como análise complementar para estabelecer diagnóstico de várias doenças e monitorizar a atividade inflamatória. (14) Assim, normalmente, a VS é avaliada em conjunto com o hemograma e a proteína C reativa (PCR) (proteína não específica de fase aguda). (13)

Os valores de referência da VS variam com a idade e o sexo do indivíduo, pelo que são fatores que se devem ter em conta quando os valores de referência são estabelecidos. (13)

No SPC da ULS da Guarda, este parâmetro é avaliado em amostras colhidas em tubos com anticoagulante EDTA e realizado após o hemograma de forma automatizada no equipamento VESMATIC CUBE 80.

2.4. Hemoglobinopatias

Hemoglobina glicada

HbA1c é uma variante estrutural da Hb A que resulta de uma reação não enzimática entre a glicose que circula no sangue e os grupos amina livres existentes na hemoglobina dos eritrócitos. A reação de glicação da Hb a HbA1c é lenta, irreversível e está relacionada com a concentração plasmática da glicose a que os eritrócitos são expostos, sendo integrada na Hb

destas células ao longo do seu tempo de vida. O facto de o tempo médio de vida dos eritrócitos ser de 120 dias e a formação da HbA1c ser irreversível leva a que esta variante da hemoglobina reflita a glicémia média das últimas 8 a 12 semanas e forneça informações sobre o controlo da glicémia e da eficácia do tratamento da diabetes durante um longo período de tempo antes do ensaio. (15)

Ao contrário da concentração de glicose no plasma, a determinação da HbA1c é independente de fatores como o jejum, prática de exercício físico, variações dos níveis de glicose que ocorrem ao longo do dia, apresenta pouca variabilidade biológica e é uma amostra estável não alterada por fatores agudos. Deste modo, a determinação da HbA1c constitui uma vantagem em relação ao diagnóstico da Diabetes Mellitus (DM) através do doseamento da glicémia em jejum, uma vez que pode ser obtida a qualquer altura do dia e valores iguais ou acima de 6,5% fazem diagnóstico de DM. Estas características fazem da HbA1c um indicador de grande utilidade clínica, tanto no diagnóstico como na monitorização da concentração plasmática da glicose de doentes diabéticos e, ainda, na previsão do desenvolvimento de complicações microvasculares da diabetes. (15)

Na ULS da Guarda, a determinação da HbA1c é realizada de forma automatizada no equipamento TOSOH G8. Este analisador automático utiliza a *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) para identificar e quantificar os diferentes tipos de hemoglobina da amostra.

Na interpretação dos resultados da HbA1c, é importante ter em atenção se existem patologias associadas que interfiram na determinação, como as hemoglobinopatias que levam à presença de diferentes tipos de Hb que interferem na determinação da HbA1c pela HPLC, ou provoquem a diminuição do tempo de semi-vida dos eritrócitos, nomeadamente a anemia que causa desde logo alterações nas concentrações de Hb. (15)

Hemoglobina S

A Hb S é a variante estrutural mais comum resultante de mutações nos genes das globinas. A sua origem resulta da mudança de uma única base no ADN (adenina por timina), que leva a que ocorra a substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina na posição 6 da cadeia β -globina. A herança do gene β -globina falciforme dá origem a um grupo de distúrbios da Hb designado por doença falciforme. (3)

A Hb S ($Hb \alpha_2\beta_2^S$) é insolúvel e forma cristais na presença de baixas pressões de oxigénio. A Hb S desoxigenada polimeriza dentro dos eritrócitos e forma longas fibras entrelaçadas com reticulação, resultando na formação de eritrócitos mais rígidos e que assumem a forma de foice. Estes eritrócitos falciformes (drepanócitos) podem bloquear diferentes áreas da microcirculação ou grandes vasos, causando enfartes de vários órgãos. (3) Adicionalmente, os polímeros intracelulares levam a alterações na membrana celular dos eritrócitos, aderência anormal dos eritrócitos ao endotélio vascular e a neutrófilos e formação de substâncias oxidantes. (2)

A anemia falciforme ou drepanocitose ocorre em indivíduos que sejam homozigóticos para o gene Hb S ($Hb S/Hb S$) ou heterozigóticos mas com a dupla condição $Hb S/Hb C$ ou $Hb S/\beta$ -talassemia. As características clínicas destes indivíduos são uma anemia hemolítica grave pontuada por crises, no entanto os sintomas da anemia são geralmente leves em relação à sua gravidade, uma vez que a Hb S liberta oxigénio para os tecidos com relativa facilidade em comparação com a Hb A. As manifestações clínicas da Hb S são muito variáveis; alguns indivíduos têm uma vida quase normal sem crises, mas outros desenvolvem crises graves ainda na infância, podendo morrer na infância ou como adultos jovens. As crises podem ser devido a oclusão dos vasos, aplasia das células ou hemólise, podendo causar lesões em vários órgãos. Na anemia falciforme não é detetada Hb A e a quantidade de Hb F é variável, sendo geralmente de 5-15%, quantidades maiores habitualmente estão associadas a um distúrbio mais leve. (3)

A condição heterozigótica ($Hb A/Hb S$), designada por traço falciforme, é uma condição benigna sem anemia e muito comum, onde a Hb S varia entre 25-45% da Hb total. (3) O ESP não está associado a anormalidades hematológicas, apresentando eritrócitos com aparência normal, embora a deformação dos eritrócitos para a forma de foice/falciformação ocorra em condições de baixa pressão de oxigénio como é o caso de altitudes muito altas ou em casos em que os indivíduos têm crises. (2)

Na ULS da Guarda, a determinação de diferentes tipos de hemoglobina na amostra. também realizada por HPLC de forma automatizada no equipamento TOSOH G8.

3. Bioquímica

A Bioquímica analisa diversos parâmetros que assumem uma grande importância na avaliação de múltiplas funções desempenhadas no organismo de um indivíduo, permitindo não só direcionar o diagnóstico de inúmeras patologias como também monitorizar a terapêutica instituída a um indivíduo.

3.1. Amostras e Equipamentos em Bioquímica

A amostra mais utilizada para determinar os parâmetros da área de Bioquímica é o soro, sendo utilizado na colheita um tubo sem anticoagulante que contém um gel de poliacrílico que, após centrifugação, permite formar uma camada entre o coágulo e o soro que funciona como uma barreira durante o transporte e armazenamento da amostra. São ainda utilizados tubos de fluoreto para determinar lactato, que contém fluoreto como inibidor da glicólise; tubos designados homocisteína para determinar o parâmetro homocisteína, que contém um estabilizador que mantém a sua concentração constante até 8 horas após a colheita do sangue; e tubos com anticoagulante EDTA para a determinação de peptídeo natriurético tipo B (BNP) e amónia. Para além do soro, uma das amostras também mais utilizadas em Bioquímica é a urina e outros líquidos como LCR e de derrame (ascítico, pleural, articular).

No SPC da ULS da Guarda, o equipamento utilizado na determinação dos parâmetros bioquímicos é o Alinity ci-series. Este divide-se em 2 módulos, o Alinity c e Alinity i. O Alinity c é o módulo da química clínica e utiliza como métodos a fotometria e potenciometria, por outro lado o Alinity i é o módulo da imunquímica e utiliza como método a quimioluminescência.

A fotometria mede a intensidade de luz que incide sobre um detetor, após esta incidir sobre a amostra e ser absorvida. O termo fotometria foi definido originalmente como o processo usado para medir a intensidade da luz independente do comprimento de onda, no entanto, os equipamentos atuais permitem isolar um intervalo estreito de comprimento de onda do espectro de luz e medir a intensidade de luz que atinge o detetor apenas nesse comprimento de onda específico. A medição da intensidade da luz detetada a comprimentos de onda específicos, após ser absorvida pela amostra, é designada por espectrofotometria. (16)

A potenciometria mede a diferença de potencial eléctrico entre dois eléctrodos de uma célula eletroquímica. Esta célula é constituída por dois eléctrodos em contacto com uma solução eletrolítica que conduz iões. Esta solução pode ser a amostra que contém os iões a

serem medidos ou uma solução de referência em caso de calibração. Um dos elétrodos é o eletrodo de referência e o outro é um eletrodo seletivo de iões, uma vez que possui uma membrana seletiva para o ião específico a determinar. (16)

A quimioluminescência é a emissão de luz produzida durante uma reação química. No Alinity é realizado um imunoenensaio quimioluminescente, uma vez que é utilizada uma molécula quimioluminescente para detetar e quantificar ligações entre o analito (antigénio) e o anticorpo. Inicialmente, o antigénio é incubado com o anticorpo que está a revestir micropartículas paramagnéticas. O analito presente na amostra liga-se às micropartículas através dos anticorpos (Acs). Procede-se a uma lavagem da mistura que permite retirar todos os componentes da amostra à exceção do analito que se encontra ligado às partículas paramagnéticas. Posteriormente, é novamente adicionado e incubado anticorpo, mas desta vez conjugado com éster de acridina. É adicionada uma série de soluções que permite que ocorra uma reação quimioluminescente medida em unidades de luz relativa (URLs). Existe uma relação direta entre a quantidade de analito na amostra e as URLs detetadas pelo sistema ótico do módulo Alinity i. A concentração do analito é calculada a partir de uma curva de calibração preparada através da análise de calibradores que contêm quantidades conhecidas do analito.

As amostras de soro e imunosoro destinadas à área de Bioquímica são sujeitas a um processo de centrifugação e posteriormente são colocadas no aliquotador ACCELERATOR p540. Este permite dar entrada no laboratório de todas as amostras, incluindo as amostras da área de hematologia, (com exceção das amostras pediátricas, amostras com análises específicas como BNP, amónia, homocisteína entre outras) ao ler o código de barras e, posteriormente, distribui as amostras de acordo com o grau de urgência, executando alíquotas quando necessário. Se a amostra se encontrar hemolisada, ictérica ou lipémica deve-se introduzir um comentário no pedido da amostra que será tido em conta na posterior análise e validação dos resultados obtidos e, caso as amostras possuam coágulos ou fibrina, é importante que estes sejam retirados antes de colocar as amostras no autoanalisador Alinity, para evitar erros de pipetagem de amostra.

Todos os parâmetros analisados são sujeitos a um controlo de qualidade interno diário (no início do dia) utilizando material de controlo com 2 ou 3 níveis de concentração. Caso os valores do parâmetro em causa se encontrem dentro dos limites definidos na sua carta de Levey-Jennings, os valores obtidos são aceites e procede-se à análise das amostras diárias, caso contrário, devem ser tomadas medidas corretivas, como por exemplo repetir os controlos, utilizar calibradores ou trocar os reagentes.

3.2. Parâmetros bioquímicos

3.2.1. Metabolismo dos lípidos e risco cardiovascular

O termo lípido aplica-se a uma classe de compostos solúveis em solventes orgânicos, mas quase insolúveis em água. Os lípidos contêm principalmente ligações carbono-hidrogénio, podendo também conter grupos polares que os torna anfipáticos, ou seja, com porções com afinidade para a água, como é o caso dos fosfolípidios. Estes formam as bicamadas lipídicas na interface aquosa das membranas biológicas, constituindo um importante componente de todas as membranas celulares. (16)

Os lípidos, ao serem insolúveis em água, necessitam de ser transportados na corrente sanguínea na forma de complexos proteína-lípidos, designados por lipoproteínas. Estas são constituídas por lípidos, principalmente triglicerídeos (TG), colesterol e ésteres de colesterol, envolvidos por uma camada estabilizadora de fosfolípidios na qual são inseridas as proteínas (apolipoproteínas). As apolipoproteínas exercem uma função estabilizadora e permitem que os complexos sejam reconhecidos por recetores específicos no fígado e nos tecidos periféricos. O fígado apresenta um papel importante no metabolismo das lipoproteínas, uma vez que sintetiza lipoproteínas de muito baixa densidade (*Very Low-Density Lipoprotein-VLDL*) e lipoproteínas de alta densidade (*High-Density Lipoprotein-HDL*). (17)

Os TG têm origem principalmente na dieta, mas também são sintetizados no fígado a partir de ácidos gordos livres circulantes e glicerol. O fígado incorpora os TG com apolipoproteínas e forma as designadas VLDLs. Estas são um veículo de transporte dos TG produzidos no fígado em concentrações elevadas numa situação de abundância de produtos metabólicos (como numa situação pós-prandial) para os locais de depósito como o tecido adiposo, para serem utilizados quando necessário. Uma vez junto do tecido adiposo, as VLDLs sofrem a ação de uma lipase e os TG formados passam para o tecido adiposo. Deste modo, as VLDLs perdem TG mas em contrapartida ganham colesterol e originam as lipoproteínas de densidade intermédia (*Intermediate-Density Lipoprotein-IDL*). Estas podem continuar a sofrer a ação da lipase e, ao perderem mais conteúdo em TG, originam as lipoproteínas de baixa densidade (*Low-Density Lipoprotein-LDL*). Posteriormente, as IDLs e as LDLs são degradadas pelo fígado após serem captadas por recetores específicos da superfície celular, sendo os seus constituintes utilizados na formação de mais VLDLs. (17)

Os lípidos e as lipoproteínas encontram-se intimamente envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose, um processo inflamatório complexo iniciado pelo acumular de lípidos e colesterol na zona da íntima das artérias que leva à formação de placas

ateroscleróticas, que podem obstruir as artérias. É um processo patológico e a causa subjacente de distúrbios cardiovasculares comuns, como enfarte agudo do miocárdio, doença cerebrovascular e doença vascular periférica. (16, 17) No SPC da ULS da Guarda são determinados o colesterol total, TG, colesterol HDL e o colesterol LDL, que são parâmetros que permitem analisar o perfil lipídico de um indivíduo e avaliar o risco cardiovascular.

Colesterol total e triglicerídeos

O colesterol é um componente da membrana de todas as células e o precursor das hormonas esteroides e dos ácidos biliares, sendo encontrado exclusivamente em animais. Apresenta na sua estrutura um grupo polar hidroxilo (OH) que o torna anfipático e o permite inserir-se nas membranas celulares. (16)

No organismo, o colesterol total resulta da sua ingestão e da sua síntese no organismo. O colesterol da dieta no intestino é primeiro solubilizado através de um processo designado por emulsificação que envolve a formação de micelas com a intervenção de sais biliares. O colesterol das micelas é absorvido e uma vez nas células da mucosa intestinal é incorporado com TG, fosfolípidos e apolipoproteína B-48 formando grandes partículas de lipoproteínas designadas por quilomicrons. Estes são libertados para a linfa e entram na circulação, onde entregam os lípidos da dieta ao fígado e tecidos periféricos. O colesterol é sintetizado por todas as células do corpo, mas principalmente pelo fígado. (16) Nem todo o colesterol sintetizado pelo fígado é imediatamente utilizado para formar lipoproteínas, algum é oxidado em sais biliares. O colesterol é eliminado do organismo na forma de sais biliares e nas fezes na forma de colesterol livre. (17)

Os processos de absorção e de síntese de colesterol são processos autorregulados. Quando no interior das células existe colesterol em excesso, ocorre uma diminuição da síntese de colesterol e de recetores de LDL. A diminuição da expressão de recetores de LDLs nas células, principalmente nos hepatócitos, leva a um aumento de colesterol na circulação, contribuindo principalmente para este aumento o colesterol LDL. (16)

Quando se determina a concentração de lípidos no soro de uma amostra, de um indivíduo que se encontra em jejum, a maior parte do colesterol total determinado é o reflexo das partículas de LDL em circulação, com uma contribuição de 20 a 30% das partículas de HDL. A concentração de TG determinada em jejum reflete em grande parte o número de partículas de VLDL em circulação, uma vez que em condições normais de jejum os quilomicrons não se encontram presentes. Se o indivíduo não se encontrar em jejum, a

concentração total de TG aumenta devido à presença adicional de quilomicrons ricos em TG e o soro da amostra apresenta uma aparência turva, conferida pelos quilomicrons. (17)

Colesterol HDL

As HDLs são produzidas no fígado e no intestino e possuem na sua superfície a apolipoproteína AI, característica destas lipoproteínas. As HDLs nascentes apresentam uma forma de disco e interagem com as células periféricas, de forma a removerem o colesterol que as células possuem em excesso para depois o transportarem até ao fígado, sendo as HDLs responsáveis pelo transporte reverso do colesterol. O colesterol que é captado pelas HDLs sofre um processo de esterificação, permitindo que os ésteres de colesterol fiquem aprisionados no interior das HDLs até serem removidos para o fígado, uma vez que são mais hidrofóbicos que o colesterol. A esterificação do colesterol converte as HDLs em forma de disco em HDLs esféricas. Estas são a principal forma de HDLs em circulação e funcionam também como aceitador extracelular de colesterol. No fígado, são removidos seletivamente os ésteres de colesterol às HDLs esféricas e, no final, as HDLs voltam de novo para a circulação e continuam o transporte reverso do colesterol. (16) As HDLs podem também transferir o colesterol para as outras lipoproteínas, quando estas sofrem ação da lipase, e para tecidos sintéticos esteroides, como os ovários, testículos e córtex adrenal. (17)

A nível clínico é importante monitorizar as concentrações de HDL no soro através do colesterol-HDL, uma vez que se correlacionam inversamente com o risco de doença aterosclerótica. Baixas concentrações de HDL indicam que o transporte reverso do colesterol é menor e, conseqüentemente, existe um aumento e acumulação de colesterol em circulação e, por sua vez, nos tecidos periféricos, incluindo as artérias. Desta forma, concentrações mais altas de HDL diminuem o risco de doenças cardiovasculares, enquanto concentrações mais baixas aumentam esse risco. (17)

Colesterol LDL

As LDLs são o principal transportador de colesterol para o fígado e células periféricas e possuem na sua superfície a apolipoproteína B-100 (apoB-100), característica destas lipoproteínas. As partículas de LDL podem depositar colesterol nas paredes da vasculatura periférica, o que contribui para o desenvolvimento da aterosclerose. (17)

A diminuição da captação das LDLs a nível hepático, por diminuição do número ou da capacidade funcional dos recetores LDLs no fígado, resulta num aumento da sua concentração na circulação. Consequentemente, ocorre um aumento de LDLs que entram através do endotélio e são retidas na íntima. A zona da íntima caracteriza-se por ser um meio oxidante constituído por espécies oxidativas sintetizadas por macrófagos, células endoteliais e musculares lisas. As LDLs retidas na íntima sofrem a ação oxidante deste meio, sendo convertidas em LDLs minimamente oxidadas e depois em LDLs extensamente oxidadas, que são capturadas por macrófagos uma vez que passam a ser reconhecidas por recetores não regulados. Estes vão ficando preenchidos de colesterol e formam dentro do endotélio células espumosas (“*foam cells*”) que com o tempo levam à formação da placa aterosclerótica, que pode romper e originar um trombo que provoca a obstrução da artéria. Desta forma, as LDLs oxidadas apresentam propriedades pró-ateroscleróticas, uma vez que contribuem e estimulam os processos subjacentes ao desenvolvimento das placas, como por exemplo induzir a libertação de citocinas que promovem a adesão de células T e monócitos ao endotélio, contribuindo para o quadro inflamatório que acompanha a aterosclerose e para maior presença de macrófagos na zona da íntima. (16, 17)

A monitorização clínica da concentração de LDLs através do colesterol LDL é importante, uma vez que existe uma forte associação entre concentrações elevadas de LDL e um aumento do risco cardiovascular devido à maior probabilidade de desenvolver placas ateroscleróticas e consequente obstrução de artérias. (17)

3.2.2. Avaliação da lesão do miocárdio

A forma mais grave de cardiopatia isquémica é o enfarte agudo do miocárdio, vulgarmente conhecido como ataque cardíaco. Este ocorre quando uma das artérias do coração fica obstruída, por exemplo por um coágulo, resultando num desequilíbrio entre a oferta e a necessidade de oxigénio nas células musculares, os miócitos. Quando o suprimento de sangue a uma região do músculo cardíaco é bloqueado, leva a que os miócitos deixem de funcionar por falta de oxigénio e nutrientes, podendo causar a morte de muitas células musculares da região afetada. Desta forma, o contributo da região afetada para a contração e bombeamento de sangue para o resto do corpo diminui. Através de uma análise bioquímica, é possível detetar constituintes das células musculares cardíacas que são libertados aquando da morte celular, os marcadores cardíacos. A análise destes marcadores permite detetar lesão do miocárdio que juntamente com o eletrocardiograma e história de dor torácica permitem

realizar um diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio. (16) No SPC da ULS da Guarda é determinada a creatina cinase (CK), as troponinas cardíacas (cTns) e a mioglobina como marcadores de necrose do miocárdio; o BNP como marcador de stresse e isquemia miocárdial e a homocisteína como fator de risco cardiovascular. (18)

Creatina cinase

A CK é uma enzima presente no músculo cardíaco, no músculo esquelético e no cérebro. Existem três isoenzimas citosólicas e uma isoenzima mitocondrial (CK-Mt) de CK. As enzimas citosólicas são dímeros de duas subunidades designadas por M e B. A CK-MM é a isoenzima predominante no músculo cardíaco e esquelético, a CK-BB é a isoenzima predominante no cérebro e músculo liso e a CK-MB é a isoenzima predominante no músculo cardíaco. Apesar de a CK-MB ser mais específica do coração, devido à sua predominância neste músculo, não é correto ser referida como isoenzima cardíaca uma vez que também se encontra presente no músculo esquelético, mesmo que em percentagens menores. (16)

Quando ocorre uma lesão do miocárdio, a CK-MB aparece na corrente sanguínea 4 a 6 horas após o início da dor torácica e atinge o pico entre 10 a 12 horas após o enfarte agudo do miocárdio. O melhor momento para a deteção desta isoenzima é entre 6 a 48 horas após o início das dores pois, após este período, devido à sua eliminação, a CK-MB volta ao normal e pode já não ser detetada. Desta forma, nos casos em que se realizam análises tardias, os valores de CK-MB determinados já podem ser normais e originam uma imagem incorreta da ocorrência de um enfarte. A determinação da concentração de CK-MB de amostras em série fornece melhores informações do que determinações únicas; por exemplo, um indivíduo que apresenta dor torácica mas não regista aumento da concentração de CK-MB é improvável que esteja a sofrer um enfarte agudo do miocárdio, enquanto a não descida da concentração de CK-MB pode indicar que está a sofrer um enfarte. (18)

A CK total é determinada diretamente no soro da amostra pelo autoanalisador através de espectrofotometria, por aumento da absorção a 340 nm. A fração CK-MB é também analisada diretamente no soro da amostra pelo autoanalisador mas através de um imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência.

Troponinas cardíacas

As troponinas são as proteínas contráteis das células musculares que regulam a interação entre a actina e a miosina. Os diferentes tipos de troponina são a troponina T, I e C. As troponinas I e T apresentam isoenzimas encontradas apenas no coração, denominadas por troponinas cardíacas I e T e referidas como cTnI e cTnT, respetivamente. cTnI e cTnT possuem diferentes sequências de aminoácidos codificadas por diferentes genes e são diferentes das troponinas predominantes encontradas em outros músculos, como o músculo esquelético. Por outro lado, a troponina C não é útil como marcador cardíaco, pois é expressa no coração mas não apresenta uma isoenzima específica apenas deste músculo. (16, 18)

As troponinas localizam-se principalmente nas miofibrilas e, quando ocorre uma lesão no miocárdio, existe um aumento dos níveis das cTns na corrente sanguínea. A cTnI aumenta em 4 a 6 horas, atinge o pico em 12 horas e retorna aos níveis basais em 3 a 10 dias, enquanto a cTnT permanece elevada por 12 a 48 horas e retorna ao normal em 10 dias. A existência de um enfarte agudo do miocárdio é altamente improvável se os níveis das cTns não se encontrarem aumentados. Ambas são altamente específicas e sensíveis ao dano do miocárdio, embora se saiba que a cTnT aumenta nos casos de angina instável. (18)

A CK-MB pode aumentar em casos de distrofia muscular, doença renal terminal e em indivíduos saudáveis que realizam exercício físico extremo, pelo que nestes casos a presença de concentrações normais de cTns indica que é improvável a CK-MB em circulação ter origem no coração e existir uma lesão do miocárdio. (18)

No SPC da ULS da Guarda é determinada a troponina cardíaca I de alta sensibilidade (hs-cTnI) diretamente no soro da amostra através de um imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência, utilizando Acs específicos para a cTnI. Este imunoensaio é muito útil uma vez que permitir detetar a cTnI em concentrações muito baixas, o que viabiliza não só um diagnóstico mais precoce da lesão do miocárdio como também aumenta a precisão de diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio em casos suspeitos, possibilitando uma intervenção mais precoce. (18)

Mioglobina

A mioglobina é uma proteína à qual se liga o O₂ e localiza-se no citoplasma das células do músculo cardíaco e esquelético, pelo que não apresenta especificidade cardíaca. (16) Quando ocorre uma lesão do miocárdio, a mioglobina é libertada no espaço de 1 hora e

umenta mais rapidamente que as cTns ou a CK-MB. O seu pico após um enfarte do miocárdio é atingido entre 8 a 10 horas e retorna ao normal após 24 horas. Desta forma, a mioglobina oferece algumas vantagens como sensível indicador precoce e excelente preditor negativo de lesão do miocárdio. (18)

No entanto, como não é específica do miocárdio, situações de lesões do músculo esquelético e diminuição da sua eliminação pelos rins (como casos de insuficiência renal) podem causar aumentos nas concentrações de mioglobina, o que torna o seu uso limitado. (16, 18)

Este parâmetro é determinado diretamente no soro da amostra pelo autoanalisador através de um imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência.

BNP

Os peptídeos natriuréticos (NPs) são um grupo de moléculas estruturalmente semelhantes que se encontram envolvidas na excreção de sódio e água, reduzindo assim a pressão arterial. (18) A família de NPs inclui o peptídeo natriurético atrial (ANP), o BNP e o peptídeo natriurético tipo C (CNP). (16)

O BNP é uma hormona libertada principalmente pelo miocárdio dos ventrículos o que faz com que seja muito específico a nível cardíaco. O BNP é libertado como uma hormona contrarreguladora em resposta a uma variedade de stresses cardíacos, principalmente ao estiramento cardíaco que se gera devido a um aumento do volume sanguíneo. (16)

O BNP atua e promove a vasodilatação, modula a natriurese, a diurese, a inibição da renina e da aldosterona e ajuda a reduzir a pressão arterial. (18) Deste modo, esta hormona é um marcador sensível de alterações na fisiologia ventricular com elevado valor preditivo, sendo os seus aumentos úteis no diagnóstico de insuficiência cardíaca (IC) e na avaliação do risco de ocorrer um enfarte agudo do miocárdio. (16)

Para a monitorização de BNP é colhido sangue num tubo de EDTA, posteriormente sujeito a um processo de centrifugação do qual resulta plasma. Deste plasma, é separada uma alíquota onde se determinam os níveis de BNP. É importante separar-se a alíquota e proceder-se à sua análise o mais rápido possível, uma vez que a degradação do BNP ocorre por clivagem mediada por proteases *in vivo* e *in vitro* que tornam a concentração de BNP instável no sangue colhido. Este parâmetro é determinado no plasma diretamente pelo autoanalisador através de um imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência.

Homocisteína

A homocisteína é um aminoácido que não é encontrado na dieta e que resulta do metabolismo da metionina, um aminoácido obtido pela dieta. No organismo, a metionina é sujeita a um grupo de reações e metabolizada em homocisteína, ocorrendo pelo meio a formação de S-adenosilmetionina que funciona como dador de grupos metil no organismo. Uma vez formada a homocisteína, esta pode sofrer metilação e formar novamente metionina por ação da vitamina B12 e ácido fólico, ou pode ser convertida em cisteína por ação da vitamina B6. Deste modo, défices nutricionais em vitamina B12, B6 e ácido fólico afetam os processos de metabolização da homocisteína e podem ser a causa do seu aumento, pelo que a homocisteína deve ser analisada juntamente com estes nutrientes.

A homocisteína tem uma ação tóxica direta no endotélio vascular devido a aumentar o stresse oxidativo e a inflamação nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, aumentar a rigidez dos vasos sanguíneos com a calcificação vascular e aumentar a coagulação sanguínea. Todos estes mecanismos afetam negativamente a função vascular conduzindo à disfunção endotelial, pelo que a concentração circulante de homocisteína é um fator de risco independente para doença cardiovascular. Assim, altas concentrações de homocisteína são relacionadas com isquemia cardíaca, acidente vascular cerebral, trombose, estenose da artéria coronária e insuficiência cardíaca. (17)

Este parâmetro é determinado diretamente no plasma da amostra pelo autoanalisador através de um imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência.

3.2.3. Metabolismo das proteínas

As proteínas são polímeros de aminoácidos ligados covalentemente entre si através de uma ligação amida, referida como ligação peptídica. As proteínas apresentam uma grande diversidade estrutural de forma a desempenhar diversas funções, algumas das quais incluem a catálise de reações químicas (síntese de ADN e ARN), produção de energia, servir de canais iónicos, defesa imunológica e constituir redes de sinalização para comunicação intracelular. (16)

Vários fatores, como o estado nutricional, função hepática e terapêuticas afetam seletivamente subfrações de proteínas e, por consequência, o doseamento das proteínas totais. A hiperproteinemia pode surgir associada a desidratação e a produção excessiva como

no Mieloma Múltiplo e a hipoproteïnemia pode surgir associada a hidratação excessiva, perda excessiva a nível renal ou gastrointestinal, hemorragia ou queimaduras. (16)

No SPC da ULS da Guarda o proteinograma é obtido utilizando o CAPILLARYS sebia 2. Este realiza uma eletroforese capilar para separar as proteínas totais em solução livre nas suas diferentes frações, com base no peso molecular e mobilidade eletroforética que a carga lhes confere. As proteínas são submetidas a um campo elétrico e, devido à sua carga positiva, migram em direção à extremidade negativa, separando-se ao longo de um capilar de sílica de acordo com o peso molecular. As proteínas são detetadas diretamente durante a migração e quantificadas permitindo obter um gráfico (Figura 8), o proteinograma, que fornece dados gráficos sobre as quantidades relativas e absolutas das várias proteínas. (19, 20)

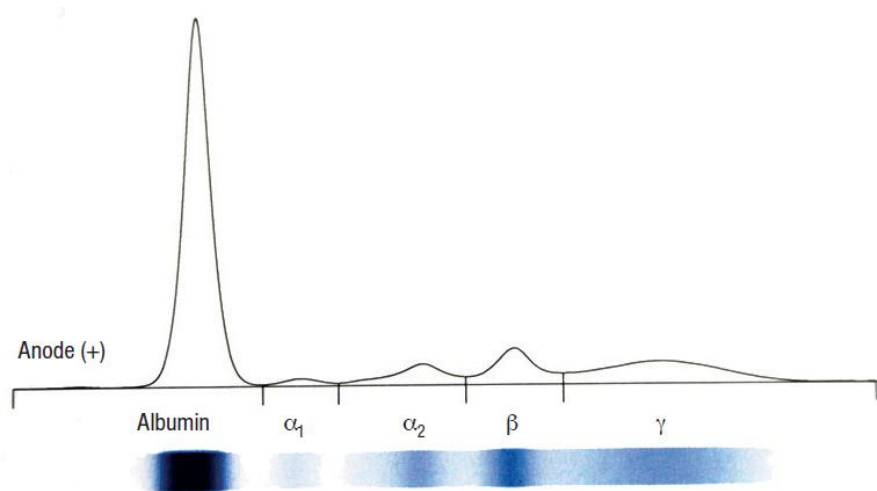


Figura 8 - Padrão normal típico para eletroforese de proteínas séricas. O pico maior representa a albumina, encontrando-se mais próxima do eletrodo positivo devido a possuir maior peso molecular. Os próximos cinco picos encontram-se em direção ao eletrodo negativo e representam as globulinas α -1, α -2, β -1, β -2 e γ , encontrando-se este último mais próximo do eletrodo negativo. (19)

O padrão obtido pela eletroforese distingue as duas principais frações de proteínas: a albumina que representa o principal componente proteico do soro e as globulinas que representam uma fração menor do conteúdo total de proteínas séricas, sendo a IgG a principal globulina em indivíduos saudáveis. (19, 20)

No SPC da ULS da Guarda a separação adicional das imunoglobulinas nas suas subfrações é realizada através de imunosubtração, permitindo identificar e caracterizar as imunoglobulinas monoclonais. Nesta técnica, inicialmente é obtido o perfil proteico completo de referência da amostra e depois são obtidos os perfis anti-soro que consistem em perfis proteicos obtidos após a amostra ser misturada com anti-soros específicos contra as cadeias pesadas γ (IgG), α (IgA) e μ (IgM), e cadeias leves κ e λ .

Albumina

A albumina é a proteína mais abundante na circulação sanguínea durante a vida de um indivíduo, representando mais de metade da massa das proteínas plasmáticas. É sintetizada no fígado e apresenta um tempo de meia-vida normal na circulação de 15 a 19 dias, ao contrário da maioria das proteínas plasmáticas que apresentam um tempo de meia-vida de 7 dias ou menos. Devido à sua elevada concentração plasmática e tamanho médio, a albumina é o principal componente que contribuiu para a manutenção da pressão oncótica no espaço vascular, apresentando outras funções como a ligação e transporte de um grande número de compostos, incluindo ácidos gordos, bilirrubina, cálcio e fármacos. (16)

As concentrações de albumina encontram-se diminuídas quando existe perda, um aumento na sua degradação ou uma diminuição da sua produção pelo fígado. Pelo que, situações como desnutrição, doença hepática significativa, perda de função renal (como na síndrome nefrótica), enteropatia, inflamação, sépsis, queimaduras e gravidez podem ser responsáveis por uma diminuição das concentrações de albumina. Por outro lado, as concentrações de albumina encontram-se aumentadas em indivíduos com hipovolemia, como nos casos de desidratação. (16, 20)

Frações α -1, α -2, β -1, β -2 e γ

Em direção ao eletrodo negativo do campo elétrico aplicado, os picos a seguir à albumina, correspondem às frações α -1, α -2, β -1, β -2 e γ . (20)

A fração α -1 é composta pela α 1-antitripsina, α -fetoproteína e HDL. Esta fração pode encontrar-se aumentada em situações que causam um aumento de α -fetoproteína, como é o caso de tumores hepáticos, tumores das células germinativas, gravidez e processos inflamatórios. Uma diminuição desta fração pode ocorrer devido a deficiência de α 1-antitripsina ou doença hepática, por causar diminuição da produção de globulinas. (19, 20)

A fração α -2 é composta pela ceruloplasmina, α ₂-macroglobulina e haptoglobina. Um aumento desta fração pode ocorrer em situações de inflamação, uso de esteroides, insuficiência renal e síndrome nefrótica. Por outro lado, pode ser observada uma diminuição em situações de doença hepática, hemólise, enteropatias e má nutrição. (19, 20)

A fração β -1 é composta principalmente pela transferrina e LDL. Um aumento desta fração pode ocorrer em situações de deficiência de ferro, inflamação e hiperlipidemia. Por outro lado, a má nutrição pode causar uma diminuição desta fração. (19, 20)

A fração β -2 é composta pela β_2 -microglobulina e C3. Um aumento desta fração pode ocorrer em processos inflamatórios, enquanto situações de má nutrição podem causar uma diminuição. (19, 20)

A fração γ é composta por imunoglobulinas, deste modo representa a fração com maior interesse clínico. O seu aumento na forma policlonal pode indicar infeção ou inflamação enquanto na forma monoclonal pode indicar Mieloma Múltiplo. Por outro lado, a sua diminuição pode indicar imunodeficiência humoral hereditária e doença renal. (19, 20)

A PCR e o fibrinogénio encontram-se na área entre as frações β e γ , podendo aumentar em casos de doenças hepáticas e processos inflamatórios. (19, 20)

3.2.4. Avaliação do metabolismo do ferro

O ferro assume um papel fundamental para a sobrevivência dos organismos vivos, sendo necessário para o transporte de O_2 , produção de energia, síntese de ADN e respiração celular. Ao mesmo tempo, em excesso pode ser tóxico devido à sua capacidade de existir em vários estados de oxidação, o que facilita a formação de radicais que causam danos no ADN, proteínas e lípidos. Desta forma, níveis de ferro inadequados são prejudiciais e contribuem para uma ampla gama de doenças, sendo a sua hemostase essencial. O próprio corpo não possui nem a capacidade de sintetizar ferro nem um mecanismo fisiológico para excretar ferro, pelo que os seus níveis têm de ser cuidadosamente equilibrados através da ingestão, absorção, armazenamento, utilização e reciclagem. (21) No SPC da ULS da Guarda são determinados parâmetros como o ferro, ferritina, transferrina e capacidade total de ligação do ferro (TIBC - *Total Iron-Binding Capacity*) para avaliar o metabolismo do ferro.

Ferro

Um adulto contém aproximadamente 3-5 g de ferro, dos quais a maior parte é encontrada incorporada na Hb e o restante encontra-se localizado na mioglobina das fibras musculares, no fígado, nos macrófagos e na medula óssea. Diariamente são perdidos cerca de 1 a 2 mg de ferro através do suor, perda de sangue, descamação das células epiteliais, mas a síntese de Hb por si só requer 20 a 25 mg de ferro por dia. Para apoiar a síntese de Hb, processos metabólicos, compensar a perda e manter as reservas, é importante que o ferro seja reciclado e regulado dentro do sistema. (22)

A absorção do ferro ocorre a nível do duodeno e jejuno proximal, no entanto apenas uma percentagem da quantidade total de ferro da dieta é absorvida. O ferro existe na dieta como ferro heme e não heme. O ferro heme é encontrado na Hb e na mioglobina e é derivado da carne vermelha, peixe e aves, enquanto o ferro não heme deriva principalmente de frutas e vegetais. Enquanto o ferro heme é prontamente absorvido por incorporação em porfirinas, o ferro não heme existe principalmente como ferro férrico (Fe^{3+}), que tem de ser reduzido a ferro ferroso (Fe^{2+}) para ser absorvido. Deste modo, o ferro não heme apresenta uma menor biodisponibilidade que o ferro heme. (22)

O ferro corporal total encontra-se em proteínas como a Hb, na circulação ligado à transferrina ou armazenado ligado à ferritina, principalmente no fígado e na medula óssea. (22) Um regulador chave da hemostase sistémica do ferro é a hepcidina, uma proteína sintetizada principalmente no fígado e libertada em resposta à sobrecarga de ferro. Esta inibe a libertação de ferro dos macrófagos e a sua absorção no intestino, uma vez que inibe a ferroportina e, como consequência, inibe a libertação de ferro na corrente sanguínea. A sua síntese diminui com a hipoxia e aumenta com a inflamação devido à interleucina 6 e outras citocinas. (3, 22)

Nos países desenvolvidos, a perda crónica de sangue (uterina ou gastrointestinal) é a causa prevalente de deficiência de ferro, enquanto o défice nutricional raramente é a causa por si só. Por outro lado, a anemia hemolítica, intoxicação por chumbo, necrose hepática aguda e hemocromatose (excesso de absorção de ferro) são algumas situações que podem provocar aumento das concentrações de ferro. (3)

Ferritina

A ferritina é uma proteína com um núcleo altamente rico em ferro, o que a torna uma forma de armazenamento de ferro que pode ser libertado quando é necessário. No entanto, a maioria do ferro utilizado é libertado do enterócito através da ferroportina para a corrente sanguínea. Ao armazenar o ferro, a ferritina impede que este contacte com os fluidos corporais e forme radicais que podem causar danos oxidativos nas células. (16, 22)

A determinação de ferritina auxilia no diagnóstico de doenças que afetam o metabolismo do ferro, como é o caso da anemia por deficiência de ferro onde a ferritina se encontra diminuída; e os casos de hemacromatose, de danos em tecidos ou de doenças inflamatórias (ferritina é uma proteína de fase aguda) ou malignas onde a ferritina se encontra aumentada. (3)

Transferrina

A transferrina é uma glicoproteína que possui dois locais de ligação para o ferro férrico (Fe^{3+}), permitindo que o ferro se mantenha solúvel e seja transportado na circulação sanguínea até aos alvos que possuem recetores de transferrina, principalmente os eritroblastos na medula óssea que incorporam o ferro na Hb. (3, 21) Desta forma, a transferrina limita também a formação de radicais e fornece ferro às células, duas importantes funções. (21)

A maior parte do ferro fornecido à transferrina tem origem no ferro da Hb que é libertado para o plasma quando os eritrócitos, no final de vida, são degradados nos macrófagos do sistema reticuloendotelial. Apenas uma pequena fração de ferro transportado pela transferrina tem origem na dieta. (3)

A saturação e quantificação de recetores solúveis de transferrina são determinações associadas a este parâmetro e cujas alterações auxiliam num diagnóstico, no entanto estas determinações não são realizadas no SPC da ULS da Guarda. (Tabela III)

Capacidade insaturada de ligação de ferro e Capacidade total de fixação do ferro

Em indivíduos saudáveis apenas 1/3 da transferrina encontra-se saturada de ferro, correspondendo a capacidade insaturada de ligação de ferro (UIBC - *Unsaturated Iron-binding Capacity*) à porção de transferrina que ainda não foi saturada com ferro. A TIBC corresponde à capacidade total que existe de o ferro se ligar a proteínas do sangue. Como a transferrina é a principal proteína de ligação do ferro na circulação, a TIBC é uma boa medida indireta da quantidade de transferrina que está disponível para se ligar ao ferro. Assim, é importante notar que, embora a TIBC seja um reflexo da quantidade de transferrina disponível, a TIBC e a transferrina não são sinónimos. (3, 21) Dependendo da causa que provoca variações na concentração sérica do ferro, verifica-se que a TIBC se comporta de forma característica dependendo da causa (Tabela III). (3)

Tabela III - Parâmetros importantes no estudo do metabolismo do ferro e as suas alterações associadas a determinadas patologias. (3)

	Deficiência de Ferro	Inflamação crónica ou malignidade	Anemia sideroblástica
VCM	Reduzido	Normal ou baixa redução	Baixo no tipo hereditário, mas frequentemente aumentado no tipo adquirido
Ferro sérico	Reduzido	Reduzido	Aumentado
TIBC	Aumentado	Reduzido	Normal
Ferritina sérica	Reduzida	Normal/Aumentada	Aumentada
Recetores de transferrina séricos	Aumentado	Normal	Normal/Aumentado
Reservas de ferro na medula óssea	Ausente	Presente	Presente
Ferro eritroblastos	Ausente	Ausente	Forma de anel

3.2.5. Avaliação do metabolismo mineral ósseo

O sistema esquelético é o depósito de 99% do cálcio do corpo, contendo também a maior parte do fosfato (85%) e muito do magnésio (55%) do corpo. A concentração destes iões no plasma depende da deposição e reabsorção mineral óssea, absorção intestinal e excreção renal. A paratormona (PTH) e a 1,25-(OH)₂-vitamina D (calcitriol) são as principais hormonas que regulam esses processos. (16)

O osso é um tecido vivo que está constantemente a ser remodelado pela degradação de tecido antigo e sua substituição por nova matriz óssea. O osso é composto por uma matriz extracelular constituída principalmente por colagénio (cerca de 90%) que forma uma rede de fibras flexíveis, cuja mineralização ocorre através da deposição de cálcio e fosfato inorgânico e permite formar um esqueleto rígido. (16) O cálcio, fosfato, magnésio, PTH e calcitriol são parâmetros determinados no SPC da ULS da Guarda.

Cálcio e PTH

No sangue, o cálcio (Ca²⁺) pode ser encontrado em três estados físico-químicos, existindo aproximadamente 50% na forma livre (ionizado), 40% ligado às proteínas plasmáticas, principalmente albumina, e 10% complexado com pequenos aniões. A fração livre de cálcio é a forma biologicamente ativa. A sua concentração no plasma é fortemente regulada pelas hormonas reguladoras do cálcio, a PTH e o calcitriol. O cálcio possui vários papéis críticos como na sinalização intracelular, na contração muscular, na mineralização óssea e no controlo da função de proteínas extracelulares, como as da cascata de coagulação. (16)

A PTH é uma hormona libertada pelas glândulas paratiroides em resposta à hipocalcemia (baixas concentrações de cálcio) com o objetivo de aumentar o cálcio no sangue, ao estimular a reabsorção óssea, a absorção renal de cálcio e a síntese de calcitriol, que por sua vez atua no intestino e aumenta a absorção intestinal de cálcio e fosfato.

A hipocalcemia pode ocorrer devido a uma redução do cálcio ligado à albumina ou da fração livre de cálcio, ou ambos. A hipoalbuminemia (baixas concentrações de albumina) é a causa mais comum de cálcio total diminuído associada a concentrações de cálcio livre normal. A insuficiência renal crónica é uma outra condição clínica que contribui para a hipocalcemia, através da hipoproteinemia; da hiperfosfatemia, uma vez que elevadas concentrações de fosfato uma ação inibitória sobre a enzima que realiza a hidroxilação da 25-OH vitamina D e como consequência diminuem os níveis de vitamina D ativa (calcitriol); e da redução da síntese renal, que causa também uma redução dos níveis de calcitriol com consequente diminuição da absorção intestinal de cálcio. A hipercalcemia (elevadas concentrações de cálcio) pode resultar do aumento da absorção intestinal, retenção renal, reabsorção óssea ou uma combinação de mecanismos. O hiperparatiroidismo primário é a causa mais comum da hipercalcemia em indivíduos de ambulatório, enquanto a malignidade a nível da paratiroide é a causa mais comum em indivíduos hospitalizados. (16)

Fosfato

O fosfato (PO_4^{3-}) apresenta duas formas, a orgânica e inorgânica sendo esta última a fração determinada na clínica. No plasma, o fosfato inorgânico existe na forma de aniões fosfatos monovalentes e divalentes. No sangue, o fosfato orgânico encontra-se principalmente dentro das células e incorporado em ácidos nucleicos, fosfolipídios, proteínas e compostos de alta energia, como a adenosina trifosfato (ATP). (16)

A hipofosfatemia (baixas concentrações de fosfato) pode ser causada por uma mudança de fosfato do espaço extracelular para o intracelular como aquando da injeção de insulina ou estimulação da secreção de insulina induzida por hidratos de carbono que aumentam o transporte de fosfato e glicose para as células; perda ou eliminação renal em excesso de fosfato, como nos casos de hiperparatiroidismo primário; e diminuição da absorção intestinal. A hiperfosfatemia (elevadas concentrações de fosfato) pode ser causada por incapacidade de os rins excretarem fosfato, como na insuficiência renal; por níveis baixos de PTH, como no hipoparatiroidismo primário; e por resistência à PTH, como no hiperparatiroidismo secundário. (16)

Magnésio

O magnésio (Mg^{2+}) é o quarto catião mais abundante no corpo, sendo que 55% do magnésio total encontra-se no esqueleto e 45% no espaço intracelular. Dentro da célula, a maior parte do magnésio encontra-se ligada a proteínas e moléculas carregadas negativamente, principalmente ATP. O magnésio extracelular representa cerca de 1% do conteúdo total de magnésio do corpo, sendo que cerca de 55% do magnésio plasmático encontra-se na forma livre (ionizada). Este catião é um cofator de muitas enzimas. (16)

A deficiência de magnésio, hipomagnesemia, deve-se geralmente a perdas de magnésio no trato gastrointestinal ou nos rins. Este déficit pode causar um aumento da excitabilidade neuromuscular, uma vez que o magnésio inibe competitivamente a entrada de cálcio nos neurónios; prejudicar a secreção de PTH e causar resistência do órgão-alvo à PTH, o que pode causar hipocalcemia e hiperfosfatemia. A hipermagnesemia pode ocorrer devido a excesso de ingestão ou diminuição da excreção, no entanto a intoxicação por magnésio não é comum. (16)

3.2.6. Avaliação do equilíbrio hidroeletrolítico

A manutenção da homeostase da água é primordial para a vida de todos os organismos e depende, principalmente, de quatro eletrólitos: sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-). Estes apresentam-se principalmente como iões livres e com um papel importante no equilíbrio ácido-base, na função muscular e na atividade de enzimas. Concentrações anormais destes eletrólitos podem causar alterações no equilíbrio hidroeletrolítico e serem a origem ou a consequência de uma variedade de alterações fisiológicas. (16)

O Na^+ , o K^+ e o Cl^- são iões que constituem o ionograma e são determinados no SPC da ULS da Guarda por potenciometria através de eléctrodos seletivos para cada ião. A temperatura e os lípidos são fatores que interferem na condutividade e, por consequência, na determinação das concentrações destes iões, pelo que é necessário ter-se em atenção à lipemia da amostra e, se for relevante, introduzir um comentário no pedido da amostra.

Sódio

O Na^+ é o principal catião extracelular ao representar aproximadamente 90% dos catiões no plasma, pelo que é responsável por quase metade da força osmótica do plasma. O Na^+ presente na dieta é quase completamente absorvido pelo trato gastrointestinal e reabsorvido após filtração glomerular. O Na^+ em excesso é excretado pelos rins, num processo regulado pela aldosterona que estimula a reabsorção tubular de Na^+ e Cl^- , a excreção tubular de K^+ e conseqüentemente a retenção de água devido à pressão osmótica criada; e pela hormona antidiurética (ADH) que estimula a reabsorção de água a nível do túbulo coletor, sendo a formação de ambas estimulada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona. Este sistema é estimulado pela diminuição da perfusão renal que estimula a renina que, por sua vez, estimula a angiotensina que leva à libertação da aldosterona e ADH. Assim, uma saída desregulada de Na^+ gera perda de água nos rins, resultando num desequilíbrio significativo da concentração deste eletrólito e do volume de água no organismo. (16)

O intervalo de referência típico deste catião é 136-145 mmol/L para adultos. As amostras hemolisadas que são analisadas não apresentam erros significativos nos valores de Na^+ sérico determinados, uma vez que os eritrócitos contêm apenas um décimo do Na^+ presente no plasma. (16) A hiponatremia (baixas concentrações de Na^+) pode ser causada por situações que resultam na perda de Na^+ como vômitos, diarreia, hemorragias; ou que impedem a reabsorção de Na^+ como uso prolongado de diuréticos; ou que resultam numa deficiência na reabsorção a nível tubular como a necrose tubular e doença renal; ou que causam um aumento na síntese ou sensibilidade à ADH gerando uma maior retenção de água e conseqüente efeito de diluição. A hipernatremia (elevadas concentrações de Na^+) é mais rara que a hiponatremia e indica quase sempre um défice de água que pode ser causada por desidratação severa, excesso de perda de água através da pele e pulmões ou deficiência/insensibilidade à ADH, mas também pode ser causada por excesso de Na^+ na dieta. (17)

Potássio

O K^+ é o principal catião intracelular, sendo as suas altas concentrações intracelulares mantidas através da bomba Na^+/K^+ ATPase que transporta K^+ para dentro das células contra um gradiente de concentração, à custa de ATP. A diminuição da atividade da bomba resulta numa difusão de K^+ para o fluido extracelular e plasma. O K^+ é obtido através da dieta,

absorvido pelo trato gastrointestinal e rapidamente distribuído, sendo uma pequena quantidade absorvida pelas células e a maioria excretada pelos rins. (16)

O intervalo de referência para o K^+ no soro é 3,5-5,1 mmol/L para adultos. A determinação de K^+ no soro de amostras hemolisadas originam concentrações de K^+ falsamente aumentadas, pelo que é importante durante a validação da concentração de K^+ ter-se a informação se amostra se encontrar ligeiramente, moderadamente ou excessivamente hemolisada. Em contraste, amostras armazenadas a temperaturas elevadas, como $37^{\circ}C$, que não diminuem a glicólise, originam concentrações de K^+ falsamente diminuídas. (16) A hipocaliemia (baixas concentrações de K^+) pode ser causada pelo uso de diuréticos que aumentam a excreção de K^+ ; por aumento da secreção de aldosterona; por déficit de K^+ na dieta ou por perda gastrointestinal. A hiperkaliemia (elevadas concentrações de K^+) pode ser causada por diminuição na excreção de K^+ devido, por exemplo, a deficiência em aldosterona, a medicamentos, a insuficiência ou falha renal; por aumento da libertação de K^+ pelas células ou por excesso de K^+ na dieta. (17)

Cloreto

O Cl^- é o principal anião extracelular e tal como o Na^+ encontra-se significativamente envolvido na manutenção da distribuição da água e equilíbrio anião-catião no fluido extracelular. Os iões cloreto são quase completamente absorvidos pelo trato gastrointestinal e excretados pelos rins após filtração glomerular. (16)

Os intervalos de referência para o Cl^- no soro variam de 98-107 mmol/L a 100-108 mmol/L. Tal como o Na^+ , os valores de Cl^- determinados não são significativamente afetados em amostras hemolisadas, uma vez que a sua concentração eritrocitária é aproximadamente metade da concentração sérica. O Na^+ e o Cl^- funcionam como contra-íon um do outro pelo que se movimentam no mesmo sentido, contribuindo para a pressão osmótica no mesmo sentido. (17) Desta forma, a hipocloremia (baixas concentrações de Cl^-) e a hiperclorémia (elevadas concentrações de Cl^-) apresentam causas semelhantes à hiponatremia e hipernatremia, respetivamente, e durante a análise do ionograma é de esperar que o Na^+ e o Cl^- sofram alterações no mesmo sentido.

3.2.7. Avaliação da Função hepática

O fígado apresenta um papel central e crítico no metabolismo, digestão, desintoxicação e eliminação de substâncias do corpo. (16)

As funções hepáticas podem ser avaliadas através da determinação de vários parâmetros no soro que, apesar de alguns não serem exclusivos do fígado, quando são avaliados em conjunto auxiliam na avaliação de alterações da função hepática, conhecidos como testes de função hepática. No entanto, o fígado apresenta-se como um órgão com grande capacidade de reserva o que leva a que, em muitos casos, indivíduos com doença hepática apresentem uma função normal apesar de existir um dano hepático extenso. Nesses casos, a lesão hepatocelular é comumente avaliada através da determinação de enzimas que são encontradas nas células do fígado. Desta forma, a avaliação hepática inclui testes da função hepática e de lesão hepatocelular, que compreende hepatócitos, canalículos e ductos biliares. (16)

Função Excretora – Bilirrubina

A bilirrubina é um pigmento produzido principalmente a partir da degradação dos eritrócitos maduros, sendo depois cerca de 15% produzida a partir do catabolismo de outras proteínas contendo o grupo heme, como mioglobina, citocromos e catalases. (16)

Durante a metabolização do grupo heme, o ferro e a globina são removidos e reutilizados e a partir do anel de profirina forma-se a biliverdina. Esta é reduzida e forma a bilirrubina não conjugada ou indireta que é insolúvel em água, pelo que precisa ligar-se à albumina de forma a ser transportada até ao fígado, onde depois se dissocia da albumina. Uma vez no fígado, é conjugada com o ácido glucurónico formando a bilirrubina conjugada ou direta. Esta já é solúvel em água e é secretada nos canalículos biliares e excretada no intestino, sendo um dos constituintes da bÍlis. Uma vez no intestino, não é absorvida devido ao seu elevado tamanho molecular. A nível do íleo terminal, as enzimas bacterianas atuam sobre a molécula e formam o urobilinogénio, parte do qual é excretado nas fezes conferindo-lhes cor. O restante é absorvido no íleo terminal, sendo que parte passa para o fígado através da circulação entero-hepática e é excretado novamente com a bÍlis e outra parte entra na circulação e é filtrado nos rins e excretado na urina. (17)

O aumento de bilirrubina não conjugada pode indicar situações de superprodução de bilirrubina, geralmente causada por excesso de hemólise que origina grandes quantidades de grupo heme para ser metabolizado; de diminuição do metabolismo do fígado, principalmente

devido a defeitos congénitos envolvendo enzimas responsáveis pelo processo de conjugação; ou de diminuição do transporte de bilirrubina para o fígado (hipertensão portal). (16)

O aumento de bilirrubina conjugada no sangue resulta geralmente de hepatite aguda, processo inflamatório agudo a nível hepático; ou de colestase, obstrução biliar que impede a excreção da bilirrubina até ao intestino. Este aumento leva a que a bilirrubina conjugada comece a ser filtrada a nível dos rins e a ser eliminada na urina, tornando-se esta mais escura, podendo também começar a depositar-se na pele e nas membranas mucosas dando origem a um sinal clínico designado por icterícia. Se a causa do aumento for um processo colestático, para além de aparecer bilirrubina na urina, as fezes também não apresentam cor, uma vez que não chega bilirrubina ao intestino e o urobilinogénio não se forma. (16)

Função sintética – Albumina e tempo de trombina

O fígado é o principal local de síntese de todas as proteínas da circulação (com exceção das γ -globulinas) e de todos os fatores envolvidos na coagulação. (17) A relação entre a albumina, proteína mais abundante, e o tempo de trombina permite avaliar a função hepática de síntese. Deste modo, se uma hipoalbuminemia (baixas concentrações de albumina) estiver associada a um tempo de trombina aumentado pode indicar que existe uma diminuição da função hepática de síntese, uma vez que é afetada tanto a síntese de albumina como a síntese dos fatores envolvidos na coagulação. Pelo contrário, se existir uma hipoalbuminemia associada a um tempo de trombina normal pode indicar que a albumina se encontra a ser degradada de forma rápida ou a ser perdida em excesso através do rim ou intestino.

No SPC da ULS da Guarda, a albumina é determinada diretamente no soro da amostra pelo autoanalisador por espectrofotometria, ao formar um complexo com o verde de bromocresol que absorve a 628 nm, sendo a absorção a 628 nm proporcional à concentração de albumina na amostra.

Função de desintoxicação – Amónia

Durante a degradação dos aminoácidos existe a produção de amónia. Em condições normais, a maior parte da amónia é convertida em ureia no fígado através do ciclo da ureia, uma vez que é nos hepatócitos que se encontram as enzimas envolvidos no ciclo, e excretada pelos rins na urina. (17)

A função hepática de desintoxicação é bastante importante, uma vez que situações de hiperamonémia (elevadas concentrações de amónia) resultam na acumulação de amónia no cérebro que exerce efeitos tóxicos no sistema nervoso central, causando encefalopatia hepática. A hiperamonémia pode ser de causa hereditária ou adquirida. As deficiências hereditárias das enzimas que fazem parte do ciclo da ureia são a principal causa de hiperamonémia, nomeadamente em lactentes. Dentro das causas adquiridas de hiperamonémia encontram-se a doença hepática avançada, a insuficiência renal e a toma de fármacos que interferiram com as enzimas envolvidas no ciclo da ureia. (16)

Ao contrário da maioria das determinações na área de Bioquímica do SPC da ULS da Guarda que são realizadas no soro, a determinação das concentrações de amónia é realizada numa alíquota de plasma obtida após centrifugação do sangue colhido num tubo de EDTA, à semelhança da monitorização de BNP. A determinação é realizada pelo autoanalisador por espectrofotometria através da diminuição da absorção a 340 nm, uma vez que a amónia desencadeia uma série de reações que acabam por envolver a oxidação de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina reduzido (NADH) a Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (NAD) e o NADH absorve a 340 nm.

Função Metabólica – Glicose e Lípidos

A hemostase da glucose e a manutenção dos seus níveis no sangue é também uma função importante do fígado. Em situações de jejum, a glucose no sangue é mantida pela libertação de glucose pelo fígado através da quebra do glicogénio (glicogenólise), uma vez que o fígado armazena grandes quantidades de glicogénio; ou da síntese de nova glucose (gliconeogénese) através de precursores de glucose, como o lactato, piruvato, aminoácidos e glicerol proveniente da lipólise das reservas de gordura. Nas situações mais prolongadas de jejum, os corpos cetónicos e os ácidos gordos são também usados como precursores alternativos para a síntese de glucose. (17) Nos casos em que o fígado apresenta uma incapacidade nas suas funções de regular os níveis de glucose, os indivíduos em causa apresentam-se com hipoglicémia e aumento na concentração dos precursores da glucose, incluindo corpos cetónicos e ácidos gordos. Assim, desenvolve-se um estado de hipoglicémia com acidose, devido às propriedades ácidas de alguns precursores, que é incompatível com o funcionamento das células e pode culminar na falha generalizada dos órgãos.

No SPC da ULS da Guarda, este parâmetro é determinado diretamente no soro da amostra pelo autoanalisador por espectrofotometria. No autoanalisador, a glucose permite

desencadear uma série de reações que acabam por envolver a redução de NAD a NADH. O NADH absorve a 340 nm e o aumento da absorção a este comprimento de onda é proporcional à concentração de glicose no plasma.

As gorduras são transportadas no plasma na forma de lipoproteínas. (17) Quando o fígado apresenta uma diminuição na sua capacidade de síntese que leva a uma menor síntese proteica, também o metabolismo lípidos sofre alterações uma vez que a síntese de lipoproteínas necessita de proteínas. Consequentemente, a síntese de lipoproteínas é menor e não ocorre transporte dos lípidos resultando num aumento das concentrações de TG e colesterol total em circulação.

Lesão Hepatocelular

As cinco enzimas que são comumente determinadas para avaliar lesão das células hepáticas incluem a aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), γ -glutamilttransferase (γ -GT) e a lactato desidrogenase (LDH), sendo todas elas determinadas no SPC da ULS da Guarda.

A AST é uma enzima principalmente mitocondrial e encontra-se presente no fígado, músculo cardíaco e esquelético e nos eritrócitos. Concentrações elevadas desta enzima são observadas em situações de necrose hepática, enfarte do miocárdio, lesão muscular e insuficiência cardíaca congestiva. A ALT é uma enzima do citosol e é mais específica para o fígado, pelo que concentrações aumentadas desta enzima encontram-se muito relacionadas com lesão hepática. (16, 17) A LDH apresenta uma ampla distribuição nos tecidos e pelo facto de não ser específica de um só tipo de célula é definida como um marcador de lesão celular generalizada. (16)

Desta forma a AST, a ALT e a LDH são enzimas libertadas quando existe qualquer tipo de lesão celular e aparecem no plasma de forma relativamente rápida, pelo que não são específicas de lesão dos hepatócitos apesar de a ALT se relacionar mais com a lesão hepática que as restantes. Os eritrócitos contêm aproximadamente 3 a 4 vezes mais ALT e 40 vezes mais AST a nível intracelular do que o soro e apresentam uma atividade de LDH 150 vezes superior à atividade de LDH no soro, pelo que amostras hemolisadas apresentam desde logo concentrações aumentadas destas enzimas. Pelo que, quando se analisam os resultados, é necessário ter-se em atenção o estado da amostra em que estas enzimas foram determinadas. Para além disto, para se relacionar as alterações nos níveis destas enzimas com lesão a nível do fígado, é necessário relacionar as alterações com alguma função específica do fígado como

a metabolização da bilirrubina. Assim, se a lesão celular for a nível dos hepatócitos, a capacidade de o fígado metabolizar a bilirrubina diminui e a acompanhar o aumento das enzimas existe também um aumento da bilirrubina total sérica, devido sobretudo a aumento de bilirrubina não conjugada. (16)

Em contraste, a ALP e γ -GT são enzimas glicoproteicas ligadas à membrana. A localização mais importante de ambas as enzimas é na membrana canalicular dos hepatócitos, refletindo dano nos canalículos. Podem também ser encontradas noutros locais e situações como é o caso da ALP a nível dos ossos e da γ -GT ao ser induzida pelo álcool. (16, 17)

Na prática clínica, se a ALP e a γ -GT se encontram aumentadas presume-se que têm origem nos canalículos hepáticos, indicando um processo colestático a nível dos canalículos com consequente destruição. No entanto, casos com γ -GT aumentada e ALP normal podem ser indicativos de ingestão de álcool, pelo que, para se associar os seus aumentos a um processo colestático com lesão nos canalículos, é necessário avaliar em conjunto outros parâmetros, como a bilirrubina. Nas situações de colestase a γ -GT aumenta em paralelo com a ALP. Como consequência da colestase, a bilirrubina conjugada não é secretada para os canalículos biliares nem excretada para o intestino, o que leva a um aumento da bilirrubina total, sobretudo devido a aumento de bilirrubina conjugada. O processo colestático pode ser intra-hepático ou extra-hepático. Quando este é intra-hepático, a destruição dos canalículos biliares é acompanhada de um aumento precoce dos níveis da ALT uma vez que, ao ser intra-hepático, a bilirrubina começa a difundir para os hepatócitos induzindo mais cedo processos necróticos nas células, que resultam no aumento da ALT que é mais específica para o fígado que a AST. (17)

Estes parâmetros são determinados diretamente no soro da amostra pelo autoanalisador por espectrofotometria. No autoanalisador, estas enzimas catalisam diferentes reações das quais resultam compostos que diminuem ou aumentam a absorção detetada a um comprimento de onda específico, sendo essa variação proporcional à concentração de enzima presente na amostra.

4. Imunologia

No setor de Imunologia, do SPC da ULS da Guarda, é realizado um conjunto de determinações que possibilitam o diagnóstico e monitorização de várias patologias. Dada a diversidade de parâmetros determinados neste setor e, na impossibilidade de os abordar todos, é apresentada a descrição de dois equipamentos utilizados nalguns dos estudos, o EUROBlotOne e o ImmunoCAP 250, bem como os métodos por eles utilizados. A maioria das determinações em Imunologia são realizadas em amostras de soro, que são separadas em alíquotas no setor de Bioquímica a partir do tubo sem anticoagulante.

O EUROBlotOne é um equipamento que realiza o processamento completo de immunoblots, ou seja, imunoensaios que permitem detetar numa amostra de soro a presença de Acs tipo IgG contra Antígenos (Ags) específicos. Para tal, são utilizadas tiras de teste revestidas com linhas paralelas de Ags altamente purificados. Caso estejam presentes os Acs específicos na amostra, estes ligam-se aos Ags e formam imunocomplexos que são, posteriormente, incubados com um conjugado enzimático. No final, é adicionado um substrato sobre o qual a enzima do conjugado enzimático atua e catalisa uma reação que gera cor, permitindo assim revelar a presença dos Acs. Isto permite diagnosticar e monitorizar várias doenças autoimunes como, por exemplo, doenças hepáticas autoimunes. Neste caso, é utilizada uma tira de teste com 9 Ags diferentes e, de acordo com o painel de Acs detetados, é possível fazer um diagnóstico e a distinção entre hepatite autoimune e cirrose biliar primária.

O ImmunoCAP 250 é um equipamento que utiliza o método FEIA (*Fluorescence Enzymatic Immunoassay*), que consiste na deteção de Acs numa amostra através da emissão de fluorescência. Para tal, a amostra é incubada com um Ag específico e, caso existam Acs na amostra contra esse Ag, forma-se um imunocomplexo, que é posteriormente incubado com um conjugado enzimático. Este complexo final, é incubado com um agente de desenvolvimento sobre o qual a enzima atua e resulta emissão de fluorescência. Esta emissão é parada através da adição de uma solução *stop* e no final é medida a fluorescência, que quanto maior for maior serão as concentrações de Ac presentes na amostra. O ImmunoCAP 250 é utilizado no diagnóstico e monitorização de alergias e doenças autoimunes; como por exemplo, na determinação de calprotectina em amostras de fezes (previamente processadas em Microbiologia) nas doenças inflamatórias intestinais, uma vez que nestas doenças é encontrada em concentrações elevadas em amostras de fezes devido a ser uma proteína libertada por neutrófilos que se deslocam para o trato gastrointestinal quando existe inflamação no intestino.

5. Microbiologia

No setor de Microbiologia, do SPC da ULS da Guarda, são realizadas análises bacteriológicas, parasitológicas e micológicas de diversos produtos biológicos, como urinas, fezes, sangue total para hemoculturas, produtos do trato respiratório (como as secreções, aspirados), exsudados (como o vaginal, uretal, orofaríngeo, vaginal/retal, lesões purulentas), LCR, líquidos orgânicos (como o ascítico, pleural) e outros produtos biológicos (como biópsias cirúrgicas, gástricas, cateteres e material de próteses).

O principal objetivo deste setor é a identificação dos microrganismos responsáveis pela infeção num indivíduo e a obtenção do respetivo perfil de suscetibilidade aos antibióticos sempre que necessário e possível, uma vez que existem situações em que é necessário saber qual o antibiótico a instituir, ou porque os indivíduos em causa desenvolvem reações perante um determinado antibiótico ou porque os microrganismos em causa podem apresentar resistências já conhecidas a determinado antibiótico. Para que este objetivo possa ser cumprido, é importante que todo o percurso da amostra desde a requisição, colheita, acondicionamento, transporte e processamento cumpra os requisitos estabelecidos pelo serviço. Um requisito importante é as amostras serem colhidas em recipientes estéreis, de forma a garantir que os microrganismos que se identificam são da própria amostra e não o resultado de uma contaminação da amostra.

A Microbiologia constitui um setor com muito trabalho manual, desde as sementeiras dos produtos, à preparação de lâminas e a sua coloração, à observação ao microscópio e aos testes de identificação. No estudo bacteriológico, as amostras são recebidas e semeadas em meios de cultura selecionados e são preparadas lâminas para coloração de Leishman e de Gram. A sua observação ao microscópio, juntamente com o crescimento nos vários meios de cultura selecionados, permite direcionar os próximos passos na identificação do microrganismo, que podem incluir preparar novas lâminas ou realizar sementeiras em meios específicos para isolar determinadas colónias. Quando é isolada uma colónia pura, procede-se à identificação e à realização do antibiograma no equipamento automático VITEK, sendo antes realizados testes bioquímicos de identificação sobre as colónias puras. Estes permitem escolher a galeria de identificação e antibiograma a utilizar para aquela colónia em específico, uma vez que existe uma galeria, por exemplo, para bactérias gram-positivas, outra para gram-negativas e outra para leveduras.

Durante o estágio, existiu a oportunidade de observar o processamento de amostras para a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilos ácido-álcool resistentes (BAARs), nas quais podem ser realizadas coloração de Leishman, Ziehl Neelsen e Auramina.

6. Casos Clínicos

6.1. Caso Clínico I

História Clínica

Uma mulher de 35 anos queixa-se de cansaço extremo e astenia, que tem vindo a evoluir ao longo do último ano. Nas últimas semanas, apresentou dispneia de esforço e dor nos membros inferiores com marcha. Refere também cefaleias e perda de memória. Sem antecedentes e sem morbilidades anteriores, não toma medicação e refere que faz uma alimentação variada. Não existe registo de doenças familiares.

Exame Físico

Apresenta conjuntivas pálidas, pulso de 97/min regular e pressão arterial 142/73 mmHg. O eletrocardiograma, auscultação e palpação abdominal são normais.

Resultados Laboratoriais

Tabela IV - Resultados laboratoriais caso clínico I.

Hemograma	Resultado	Valor de referência
Leucócitos	4,5	5,0 - 10,0 ($10^3/\mu\text{L}$)
Eritrócitos	3,01	4,0 - 5,2 ($10^{12}/\text{L}$)
Hemoglobina	11,0	12,0 - 16,0 g/dL
Hematócrito	33,4	36,0 - 46,0%
Volume Corpuscular Médio (VCM)	111,0	80,0 - 100,0 fL
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM))	36,5	26,0 - 34,0 pg
Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)	32,9	31,0 - 37,0 g/dL
RDW (Distribuição do diâmetro dos eritrócitos)	12,8	11,9 - 14,5%
Plaquetas	130	150 - 440 ($10^3/\mu\text{L}$)
Esfregaço de sangue periférico: Observamos Macrositose, Trombocitopenia, Neutrófilos hipersegmentados, Fragmentos de eritrócitos, Acantócitos e Eritrócitos em lágrima.		
Bioquímica	Resultado	Valor de referência
Glucose	85	<100 mg/dL
Creatinina	0,82	0,57 - 1,11 mg/dL
Ureia	22	21 - 43 mg/dL
Sódio	144	136 - 145 mmol/L
Potássio	3,80	3,50 - 5,10 mmol/L
Ferro	90	50 - 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Ácido fólico	4,2	3,1 - 20,5 ng/mL
Vitamina B12	<83,0	187 - 883 pg/mL
Tiroxina ou Tetraiodotironina (T4) livre	0,9	0,7 - 1,5 ng/dL
Hormona Estimulante da Tireoide (TSH)	1,53	0,35 - 4,94 $\mu\text{UI}/\text{mL}$
Lactato Desidrogenase (LDH)	190	125 - 220 U/L
Bilirrubina Total	0,46	0,20 - 1,29 mg/dL
Aspartato Animotransferase (AST)	32	5 - 34 U/L
Alanina Animotransferase (ALT)	33	< 55 U/L
Homocisteína	15,22	4,44 - 13,56 $\mu\text{mol}/\text{L}$

Imunologia	Resultado
Anticorpo anti-Fator Intrínseco (FI)	Positivo
Anticorpo anti-célula parietais gástricas	Negativo

Medulograma: Observamos megaloblastos.

Interpretação dos Resultados

O valor de hemoglobina abaixo do valor mínimo do intervalo de referência indica anemia e explica o cansaço extremo, a astenia e as conjuntivas pálidas; esta anemia é classificada como macrocítica (VCM=111,0 fL). Existe trombocitopenia e leucocitopenia. Estas interpretações são suportadas pela observação no esfregaço de sangue periférico de macrocitose e trombocitopenia.

A anemia macrocítica pode ser causada por hipotiroidismo, no entanto esta hipótese é descartada uma vez que os valores de T4 livre e TSH se encontram dentro dos valores de referência e não existe registo de doenças familiares nem na doente.

Verifica-se que o valor de vitamina B12 se encontra diminuído e o valor de ácido fólico normal. Esta diminuição pode justificar a existência de anemia macrocítica, leucocitopenia, trombocitopenia e a observação de neutrófilos hipersegmentados uma vez que a vitamina B12 é um fator importante e limitante na síntese de ADN, limitando a síntese de novas células. A deficiência de vitamina B12 pode justificar os sinais neurológicos, dado que é necessária na síntese de S-adenosil metionina, um componente envolvido na síntese de neurotransmissores.

O valor de homocisteína encontra-se aumentado, o que vai de encontro ao facto de a vitamina B12 se revelar diminuída, uma vez que a vitamina B12 é uma coenzima da reação de conversão da homocisteína em metionina. Dado que a doente refere uma dieta equilibrada, para esclarecer a deficiência em vitamina B12 o clínico solicitou a pesquisa de anticorpos anti-FI e anticorpos anti-célula parietais gástricas. Verifica-se que existe um resultado positivo para o anticorpo anti-FI, o que indica que a diminuição da vitamina B12 se deve a uma resposta auto-imune contra o FI que é essencial para a absorção da vitamina B12 a nível do intestino.

Sugere-se como diagnóstico uma anemia macrocítica por défice de vitamina B12 causada por anticorpos anti-FI. Esta situação é comumente designada por anemia perniciosa. O clínico encaminhou a doente para o Hospital de Dia para realizar um medulograma, onde foi possível evidenciar a presença de megaloblastos. Perante esta observação, a anemia é classificada como uma anemia megaloblástica, o que vai de encontro ao diagnóstico proposto uma vez que uma anemia perniciosa é uma anemia megaloblástica.

6.2. Caso Clínico 2

História Clínica

Um doente, género masculino, com 78 anos, foi submetido a uma cirurgia para remoção de um adenocarcinoma intestinal. Após a cirurgia, permaneceu 24 horas na enfermaria de recobro e transferido para o internamento no serviço de cirurgia. Após 4 dias de internamento apresenta agravamento do estado clínico, com febre (38,4°C), hipotensão (90/70 mmHg), taquicardia (pulso de 100/min), taquipneia (> 20 inspiração/expirações/minuto), sudorese com alteração no estado de vigília. Fez antibioterapia preventiva com amoxicilina e após a cirurgia começou uma terapêutica anticoagulante com heparina. O doente tem colocado um cateter venoso central (CVC) de 4 lúmens na veia subclávica para administração de fluidos e fármacos e um saco coletor de fezes.

Resultados Laboratoriais

Tabela V - Resultados laboratoriais caso clínico II.

Hemograma	Resultado	Valor de referência
Leucócitos	12,27	5,0 - 10,0 ($10^3/\mu\text{L}$)
Neutrófilos	11,57	1,8 - 7,0 ($10^3/\mu\text{L}$)
Eosinófilos	0,03	0,0 - 0,6 ($10^3/\mu\text{L}$)
Basófilos	0,01	0,0 - 0,2 ($10^3/\mu\text{L}$)
Linfócitos	0,28	1,0 - 5,0 ($10^3/\mu\text{L}$)
Monócitos	0,38	0,08 - 1,2 ($10^3/\mu\text{L}$)
Eritrócitos	2,92	4,5 - 5,9 ($10^{12}/\text{L}$)
Hemoglobina	9,1	13,5 - 17,5 g/dL
Hematócrito	27,6	41,0 - 53,0%
Volume Corpuscular Médio (VCM)	94,5	80,0 - 100,0 fL
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	31,2	26,0 - 34,0 pg
Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)	33,0	31,0 - 37,0 g/dL
Distribuição do diâmetro dos eritrócitos (RDW)	13,9	11,9 - 14,5%
Plaquetas	95	140 - 400 ($10^3/\mu\text{L}$)
Plaquetócrito (PCT)	0,10	0,16 - 0,35%
Distribuição do Diâmetro das Plaquetas (PDW)	12,8	9,8 - 16,1 fL
Volume Plaquetar Médio (VPM)	11,0	9,4 - 12,6 fL
Esfregaço de sangue periférico: Não se observaram agregados plaquetares. A trombocitopenia foi comprovada numa amostra com anticoagulante diferente de EDTA.		
Hemostase	Resultado	Valor de referência
Tempo de Protrombina (TP)	22,6	10,0 - 14,0 seg
Tempo de Tromboplastina Parcial ativado (TTPa)	58,4	25,1 - 36,5 seg
D-Dímeros	20601	< 500 ng/mL
Bioquímica	Resultado	Valor de referência
Glucose	110	< 115 mg/dL
Ureia	98	18 - 55 mg/dL
Creatinina	3,75	0,57 - 1,11 mg/dL
Sódio	134	136 - 145 mmol/L

Potássio	4,50	3,50 - 5,10 mmol/L
Bilirrubina total	4,69	0,20 - 1,20 mg/dL
Bilirrubina direta	3,61	0,00 - 0,50 mg/dL
Lactato Desidrogenase (LDH)	1869	125 - 220 U/L
Aspartato Animotransferase (AST)	2122	5 -34 U/L
Alanina Animotransferase (ALT)	1268	< 55 U/L
Proteína C Reativa (PCR)	30,90	< 0,50 mg/dL
Lactato	37	4 - 20 mg/dL
Peptídeo Natriurético Tipo B (BNP)	2560	< 266 pg/mL
Endocrinologia		
Procalcitonina	Resultado	Valor de referência
	87,6	< 0,5 ng/mL

Com o agravamento do quadro clínico foram pedidas três Hemoculturas (duas Aeróbias e uma Anaeróbia). Duas garrafas apresentaram crescimento bacteriano após um período de incubação de 6 horas e uma após um período de incubação de 12h. Foi realizado um exame direto (exame de Gram) das hemoculturas onde se observaram muitos bacilos Gram negativos. Foi realizada cultura em gelose de sangue e gelose de chocolate e isolada e identificada uma *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*, produtora de carbapenemases tipo KPC, com perfil de suscetibilidade a: Ceftazidima/Avibactam, Meropenem, Colistina.

Interpretação dos Resultados

O valor de hemoglobina abaixo do valor mínimo do intervalo de referência indica anemia, classificada como normocítica e normocrômica (VCM=94,5 fL, HCM=31,2 pg). Este tipo de anemia pode ser causado por hemorragias consequentes a uma cirurgia. A leucocitose com neutrofilia correlaciona-se com uma cirurgia, mas também com uma infecção. A trombocitopenia é confirmada pela ausência de agregados plaquetares no esfregaço de sangue periférico. Uma possível causa da trombocitopenia é a destruição periférica de plaquetas, que pode ocorrer durante a resposta a uma infecção grave. O TTPa encontra-se aumentado devido à terapêutica com heparina. A heparina é um anticoagulante que aumenta a atividade da antitrombina que inibe fatores da coagulação, principalmente da via intrínseca da cascata de coagulação. O TTPa é o parâmetro que permite avaliar a via intrínseca e como a ativação desta via encontra-se diminuída devido à heparina, o valor de TTPa aumenta. Desta forma, existe uma menor capacidade de coagulação e, conseqüentemente, um maior risco hemorrágico que pode contribuir para a anemia registada. Este risco é agravado pela trombocitopenia.

Os valores aumentados de D-Dímeros e PCR indicam que existe um processo inflamatório. Os D-Dímeros também se encontram aumentados devido à terapêutica com heparina, porque a heparina é um agente fibrinolítico e os D-Dímeros são o resultado da sua ação. A hiperlactemia indica que existe uma situação de hipoxia nos tecidos que causa um aumento de metabolismo anaeróbio. A hipótese de hipoxia é sustentada pelo facto de o indivíduo apresentar hipotensão que causa uma hipoperfusão dos órgãos e,

consequentemente, uma menor quantidade de oxigênio. O elevado valor de Procalcitonina indica que existe um quadro clínico de sépsis, com elevada probabilidade de progredir para choque séptico. O valor elevado de BNP indica uma insuficiência cardíaca grave, como resultado do processo inflamatório e da hipotensão que causa uma hipoperfusão do coração.

O valor aumentado de creatinina indica insuficiência renal. Esta insuficiência é compatível com um quadro clínico de sépsis, uma vez que se trata de uma disfunção multiorgânica. A disfunção a nível do rim pode justificar a hiponatremia e hiperuremia, bem como contribuir para a anemia por diminuição de síntese de eritropoietina. Os valores aumentados de LDH, de AST e principalmente de ALT indicam que existe destruição celular hepática. A hiperbilirrubinémia, quer por aumento da fração conjugada como não conjugada, deve-se à destruição de eritrócitos no baço que ocorre devido ao processo inflamatório, mas também da insuficiência hepática.

Os fatores de riscos como a idade, a intervenção cirúrgica a colocação de um CVC e saco coletor de fezes; um quadro clínico com hipotensão, febre, taquipneia e taquicardia; com resultados laboratoriais que apresentam leucocitose, trombocitopenia, PCR e creatinina aumentadas, hiperbilirrubinémia, hiperlactemia, hemoculturas positiva com um microrganismo isolado e identificado; e com valores de Proclacitonina aumentados, sugere o diagnóstico de bacteriemia com evolução para sépsis, com um foco no CVC colocado após a cirurgia ou à manipulação indevida do saco coletor de fezes instituída em doentes com cirurgia do intestino até anastomose cirúrgica definitiva.

7. Conclusão

O estágio curricular realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas possibilitou-me entrar e participar na orgânica e na rotina diária de trabalho do laboratório, o que me permitiu consolidar, sedimentar e colocar em prática os conhecimentos adquiridos nas unidades curriculares, bem como aprofundar, desenvolver e adquirir saberes, experiência e competências na execução das mais variadas metodologias existentes num laboratório como também na interpretação crítica dos dados laboratoriais.

É importante que os resultados fornecidos ao clínico pelo laboratório sejam não só o mais verdadeiros possível, sendo de extrema relevância o controlo de qualidade a que os vários ensaios são submetidos constantemente, como também devem ser cedidos ao clínico num intervalo de tempo adequado, de forma a possibilitar num indivíduo uma intervenção adequada e atempada perante os resultados das análises.

Durante a análise dos resultados laboratoriais, é importante relacionar as várias causas que provocam as alterações observadas nos diversos parâmetros analisados, bem como a história clínica, de forma a chegar a uma causa comum e a um diagnóstico. É igualmente importante analisar parâmetros específicos, que acabam por ser marcadores de um determinado quadro clínico e que permitem sedimentar um diagnóstico.

O presente estágio curricular foi uma experiência enriquecedora que, ao me permitir o contacto com o contexto real de trabalho, contribuiu para sedimentar e aumentar a minha experiência laboratorial e colocá-la em prática num contexto profissional, permitindo-me não só iniciar a minha experiência profissional num laboratório de análises clínicas e como também crescer a nível pessoal.

Referências

1. SILVA, Paulo Henrique Da *et al.* - **Hematologia Laboratorial**. Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-260-3.
2. BAIN, Barbara; BATES, Imelda; LAFFAN, Michael - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 12. ed. Elsevier, 2017. ISBN 978-0-7020-6696-2.
3. HOFFBRAND, Allan; MOSS, Paul - **Hoffbrand's Essential Haematology**. 7. ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4.
4. SALVAGNO, Gian Luca *et al.* - **Red blood cell distribution width: A simple parameter with multiple clinical applications**. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 52, 2 (2015), 86-105.
5. CASCIO, Michael J.; DELOUGHERY, Thomas G. - **Anemia: Evaluation and Diagnostic Tests**. *Medical Clinics of North America*. 101, 2 (2017), 263-284.
6. CELLAVISION - **CellAtlas**. [Consultado 27 de julho de 2022]. Disponível em: <https://www.cellavision.com/en/cellavision-cellatlas>
7. AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY - **Image Bank**. [Consultado 27 de julho de 2022]. Disponível em: <https://imagebank.hematology.org>
8. PARENTE, Jason - **Diagnostics for White Blood Cell Abnormalities: Leukocytosis and Leukopenia**. *Physician Assistant Clinics*. 4, 3 (2019), 625-635.
9. ERKURT, Mehmet Ali *et al.* - **Thrombocytopenia in Adults: Review Article**. *Journal of Hematology*. 1, 2-3 (2012), 44-53.
10. APPLEBY, Niamh; ANGELOV, Daniel - **Clinical and laboratory assessment of a patient with thrombocytosis**. *British Journal of Hospital Medicine*. 78, 10 (2017), 558-564.
11. WINTER, William E.; FLAX, Sherri D.; HARRIS, Neil S. - **Coagulation Testing in the Core Laboratory**. *Laboratory Medicine*. 48, 4 (2017), 295-313.
12. MARLAR, RA; GAUSMAN, JN - **Laboratory testing issues for protein C, protein S, and antithrombin**. *International Journal of Laboratory Hematology*. 36, 3 (2014), 289-295.

13. BRAY, Christopher *et al.* - **Erythrocyte Sedimentation Rate and C-reactive Protein Measurements and Their Relevance in Clinical Medicine.** *WMJ.* 115, 6 (2016), 317-321.
14. KRATZ, A. *et al.* - **ICSH recommendations for modified and alternate methods measuring the erythrocyte sedimentation rate.** *International Journal of Laboratory Hematology.* 39, 5 (2017), 448-457.
15. DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE - **Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus (Norma 002/2011).** [Consultado 27 de julho de 2022]. Disponível em: <https://normas.dgs.min-saude.pt/2011/01/14/diagnostico-e-classificacao-da-diabetes-mellitus/>
16. BURTIS, Carl A.; BURNS, David E. - **Tiezt Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.** 7. ed. Elsevier, 2015. ISBN 978-1-4557-4165-6.
17. KUMAR, Parveen; CLARK, Michael - **Kumar and Clark's Clinical Medicine.** 8. ed. Elsevier, 2012. ISBN 978-0-7020-4499-1.
18. JACOB, Rachel; KHAN, Mahmood - **Cardiac Biomarkers: What Is and What Can Be.** *Indian Journal of Cardiovascular Disease in Women - WINCARS.* 3, 4 (2018), 240-244.
19. LEE, Adrian *et al.* - **Clinical use and interpretation of serum protein electrophoresis and adjunct assays.** *British Journal of Hospital Medicine.* 78, 2 (2017), 18–20.
20. O'CONNELL, Theodore X.; HORITA, Timothy J.; KASRAVI, Barsam - **Understanding and Interpreting Serum Protein Electrophoresis.** *American Family Physician.* 71, 1 (2005), 105-112.
21. CHIFMAN, Julia; LAUBENBACHER, Reinhard; TORTI, Suzy V. - **A Systems Biology Approach to Iron Metabolism.** *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 884, (2014), 201-225.
22. BACKE, Marie Balslev *et al.* - **Iron Regulation of Pancreatic Beta-Cell Functions and Oxidative Stress.** *Annual Review of Nutrition.* 36, (2016), 241-273.