

**Mestrado em Análises Clínicas**  
**Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**  
**2009-2011**

**Maria Graciete dos Santos Costa**

Serviço de Patologia Clínica  
Hospitais da Universidade de Coimbra

Áreas: Microbiologia  
Hematologia  
Bioquímica de Urgência  
Autoimunidade

Período de Estágio: Outubro de 2010 a Junho de 2011

Diretora de Serviço: Sra. Dra. Graça Ribeiro  
Orientadora: Sra. Dra. Rosário Cunha

## ÍNDICE

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES.....	6
ABREVIATURAS .....	7
RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	11
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. CARACTERIZAÇÃO DO SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA DOS HOSPITAIS DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA (HUC).....	14
2.1. Microbiologia.....	15
2.2. Hematologia .....	16
2.3. Laboratório de Urgência.....	16
2.4. Autoimunidade .....	17
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS .....	19
3.1. Bioquímica .....	19
3.1.1. Laboratório de Urgência.....	20
3.2. Imunologia.....	36
3.2.1. Autoimunidade.....	37
4. CONCLUSÃO .....	58
5. BIBLIOGRAFIA .....	59

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1 - PRINCIPAIS ANTICORPOS ANTINUCLEARES E ANTI-CITOPLASMÁTICOS.....	40
TABELA 2 - PRINCIPAIS ANTICORPOS NAS DOENÇAS ESPECÍFICAS DE ÓRGÃO .....	51
FIGURA 1 – IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) .....	41
FIGURA 2 – IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA - MAGO®, 4.....	44
FIGURA 3 – MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA “AXIO SCOPE.AI” .....	45
FIGURA 4 – POÇOS REVESTIDOS COM ANTIGÊNIO PURIFICADOS .....	45
FIGURA 5 – EUROIMMUN ANALYSER I, ELISA.....	46
FIGURA 6 – EUROBLOTMASTER DA EUROIMMUN; IMUNOBLOTTING – (ANA PROFILE 3®) – IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES E ANTI-CITOPLASMÁTICOS .....	46
FIGURA 7 – WALLAC 1470 WIZARD® GAMMA COUNTER .....	47
DIAGRAMA DE INTERPRETAÇÃO I - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA PESQUISA DOS PRINCIPAIS ANTICORPOS ANTINUCLEARES E ANTICITOPLASMÁTICOS E RESPECTIVAS METODOLOGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO. ....	42
DIAGRAMA DE INTERPRETAÇÃO II - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA PESQUISA DOS PRINCIPAIS ANTICORPOS ANTINUCLEARES E ANTICITOPLASMÁTICOS E RESPECTIVAS METODOLOGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO. ....	43
DIAGRAMA DE INTERPRETAÇÃO III - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA PESQUISA DOS PRINCIPAIS ANTICORPOS ANTINUCLEARES E ANTICITOPLASMÁTICOS E RESPECTIVAS METODOLOGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO. ....	43
DIAGRAMA DE INTERPRETAÇÃO IV - RELACIONA O PADRÃO DE FLUORESCÊNCIA COM OS ANTICORPOS ANTINUCLEARES E ANTI- CITOPLASMÁTICOS E A SUA ASSOCIAÇÃO COM AS PATOLOGIAS AUTOIMUNES. ....	48

**ABREVIATURAS**

κ	Kapa
λ	Lambda
AAI	Anticorpos anti-insulina
ALT	Alanina Aminotransferase
AMA-M2	Anticorpos anti-mitocondriais M2
ANA	Anticorpo Antinuclear
ANCA	Anticorpo Citoplasmático anti-neutrófilo
ANP	Peptido Natriurético Auricular
AR	Artrite Reumatóide
ASO	Anti- Estreptolisina O
AST	Aspartato Aminotransferase
BLOT	Imunoblotting
BNP	Peptido Natriurético tipo B
BUN	Ureia
Ca	Cálcio
Ca <sup>++</sup>	Cálcio ionizado
CBP	Cirrose Biliar Primária
CENP	Centromere protein
CHE	Colinesterases
CK	Creatina Quinase
CKMB	Creatina Quinase MB
Cl <sup>-</sup>	Cloro
CNP	Péptido Natriurético tipo C
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CQ	Controlo de Qualidade
CREST	Syndrome of calcinosis, Raynaud's phenomenon, oesophageal dysmotility, sclerodactyly and telangiectasias
CT	Calcitonina
ctO <sub>2</sub>	Concentração do Oxigénio
DMID	Diabetes Mellitus Insulinodependente
DMNID	Diabetes Mellitus Não Insulino-Dependente
DMTC	Doença Mista do Tecido Conjuntivo
dsDNA	double stranded DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAM	Enfarte Agudo do Miocárdio
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked immunosorbent assay
FR	Fator Reumatóide

G-6-PDH	Glucose-6-fosfato desidrogenase
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD 65	Descarboxilase do ácido glutâmico de 65kDa
GAD 67	Descarboxilase do ácido glutâmico de 67kDa
GGT	Gama-Glutamil Transferase
GOT	Glutamato Oxaloacetato Transaminase
Gp210	Glicoproteína de 210kDa
GPT	Glutamato Piruvato Transaminase
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Ácido Carbónico
HAI 1	Hepatite Autoimune Tipo 1
HAI 2	Hepatite Autoimune Tipo 2
HCl	Ácido clorídrico
HEp2	Human epitelial cell line: type 2
HK	Hexoquinase
HUC	Hospitais da Universidade de Coimbra
IA-2	Anticorpos anti-IA-2
ICA	Anticorpos anti-ilhéus de Langherans
IFI	Imunofluorescência indirecta
Ig	Imunoglobulina
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
ISE	Eléctrodo seletivo de iões
Jo-1	ENA, histidyl-tRNA synthase
K <sup>+</sup>	Potássio
KDa	Peso molecular em Kilo-Daltons
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LDH	Lactato desidrogenase
LES	Lúpus Eritematoso Sistémico
LKM1	Anticorpos anti-microssomais hepáticos e renais
MPO	Mieloperoxidase
Na <sup>+</sup>	Sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de Sódio
NADH	Dinucleotido de Adenina Nicotinamida
NEQAS	United Kingdom National External Assessment
NOR-90	Nucleolar organising region protein 90kDa
O <sub>2</sub>	Oxigénio
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
pCO <sub>2</sub>	Pressão parcial do Dióxido de Carbono
PCR	Proteína C Reativa

---

PCT	Procalcitonina
PETINIA	Particle Enhanced Turbidimetric Inhibition Immunoassay
PLI2	Alanyl-tRNA synthetase
PL7	Threonyl-tRNA synthetase
PM/DM	Polimiosite-Dermatomiosite
PMScl	Nucleolar Protein Complex
pO <sub>2</sub>	Pressão parcial do oxigénio
PR3	Proteinase 3
RIA	Radioimunoensaio
RIQAS	Randox International Quality Assessment
RNP	Ribonucleoproteína
RNP	Ácido Ribonucleico
SCL	Esclerodermia
Scl70	Scleroderma antigen-70kDa
Sm	Smith ENA
sO <sub>2</sub>	Saturação do Oxigénio
Sp100	Soluble acidic protein of 100 kDa
SS	Síndrome Sjögren
SSA	Sjögren's Syndrome- antigen A
SSB	Sjögren's Syndrome- antigen B
TNI	Troponina I
TnT	Troponina T
TRACE	Time-Resolved Amplified Cryptate Emission
VS	Velocidade de Sedimentação
WR	Waalser-Rose



## **RESUMO**

Este relatório tem como objetivo abordar as atividades desenvolvidas pela mestranda no estágio de análises clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, efetuado no Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC). O estágio decorreu de Outubro de 2010 a Junho de 2011. Será caracterizada a organização e o funcionamento dos laboratórios onde decorreu esta formação, bem como a tecnologia que dispõem. É feita referência a todas as áreas onde estagiou, assim como as principais atividades aí desenvolvidas.

A sua descrição está contudo centrada nas duas áreas selecionadas: Laboratório de Urgência e Autoimunidade. Aborda com detalhe os parâmetros requisitados com mais frequência, as situações clínicas que motivam o seu pedido, a metodologia utilizada e o tipo de amostra para ensaio e a interpretação dos resultados laboratoriais. Será também dado ênfase ao controlo de qualidade interno e à avaliação externa da qualidade das áreas aprofundadas.

## **ABSTRACT**

This report aims to approach the activities carried on stage by a graduate student in clinical analysis of the Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, performed at the Department of Pathology of the University Hospitals of Coimbra (UHC). The stage began in October 2010 and ended in June 2011. Will be characterized the organization and functioning of the laboratories where this training took place and the technology available. Reference is made to all areas in which an intern as well as key activities.

Her description is, however, focused on two selected areas: Biochemistry of Urgency and Autoimmunity. Discusses in detail the parameters requests more often, the clinical situations that motivate its request, the methodology, the type of sample for the further assay and the interpretation of laboratory results. Will also be emphasis on internal quality control and external quality evaluation of the detailed areas.





## I. INTRODUÇÃO

O Laboratório de Análises Clínicas (LAC) desempenha um papel fundamental na medicina moderna. Dispõe de uma admirável quantidade de métodos laboratoriais, apresentando cada um deles, a sua utilidade específica e dificuldades intrínsecas, bem como vantagens e desvantagens. Hoje em dia, as análises clínicas são uma ferramenta imprescindível como meio complementar de diagnóstico. É uma área multidisciplinar, abrangendo várias valências, desde a Bioquímica Clínica, à Hematologia, à Microbiologia, à Imunologia, à Endocrinologia, à Virologia entre outras.

Para consolidar os conhecimentos adquiridos no Mestrado em Análises Clínicas, foi importante a realização de um estágio curricular para preparar a mestranda na rotina laboratorial, adquirir conhecimentos e competências para que na sua atividade profissional, responda aos desafios do futuro. Só com a prática laboratorial é possível entender o propósito da existência de tantas áreas diferenciadas e tão fundamentais, com as suas particularidades e especificidades e ficar apta a executar as diferentes técnicas, a interpretar e validar resultados.

O estágio decorreu no ano letivo 2010/ 2011 e foi dividido em quatro áreas: Microbiologia, Hematologia, Laboratório de Urgência e Autoimunidade. Foi realizado no Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, onde exerce a sua atividade profissional como Técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública. A mestranda apenas irá abordar as atividades desenvolvidas e equipamentos utilizados na Microbiologia e na Hematologia, destacando as valências selecionadas para aprofundamento, Laboratório de Urgência e de Autoimunidade, por estar mais diretamente ligada e por serem áreas da sua preferência.

## **2. CARACTERIZAÇÃO DO SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA DOS HOSPITAIS DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA (HUC)**

O Estágio do Mestrado em Análises Clínicas foi realizado no Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), situado na Av. Bissaya Barreto e Praceta Prof. Mota Pinto, 3000-075 Coimbra.

O Serviço de Patologia Clínica dos HUC tem como Diretora a Dra. Graça Ribeiro, Chefe de Serviço de Patologia Clínica.

Para cumprir um serviço de qualidade e contribuir para a satisfação total do doente, o Serviço possui uma equipa diversificada, constituída atualmente, para além da Diretora, por 17 Médicos, 12 Técnicos Superiores de Saúde, 77 Técnicos de Análises Clínicas, 13 Administrativos e 12 Auxiliares de Ação Médica.

O Serviço é constituído por uma sala de colheitas, laboratório de urgência, área de receção de amostras, áreas administrativas, salas de lavagem, gabinetes de validação e diferentes laboratórios (Hematologia, Microbiologia, Imunoserologia, Bioquímica, Hormonologia e Virologia).

A sala de colheitas está aberta todos os dias úteis, possuindo uma média de 400 utentes diários provenientes da consulta externa dos HUC e dos centros de saúde da região.

O Laboratório de Urgência e o de Hematologia funcionam 24 horas e recebem amostras do Serviço de Urgência dos HUC, bem como análises urgentes do internamento. A partir das 16h00 horas, no Laboratório de Urgência é efetuada a receção e cultura de diferentes amostras biológicas para estudo microbiológico. No dia seguinte estas amostras são enviadas ao laboratório de Microbiologia, para avaliação do resultado da cultura, eventual identificação e interpretação dos níveis das sensibilidades aos antibióticos. A receção destas amostras no laboratório de urgência, é vantajosa na medida em que os resultados do seu estudo são mais céleres, permitindo a instituição mais rápida da terapêutica, poupando-se assim no tempo de internamento.

Este Serviço recebe também amostras de outros Hospitais, especialmente distritais, como Castelo Branco e Aveiro para as análises que pela especificidade e pela raridade com que são pedidas, os laboratórios destes hospitais não possuem equipamentos ou reagentes para as efetuar. O mesmo se verifica no Serviço de Patologia Clínica dos HUC, em que existem algumas análises que por serem pedidas esporadicamente, não justifica ao

laboratório possuir o reagente ou equipamento para as realizar, assim, são enviadas para o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) e para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT).

O Serviço de Patologia Clínica está informatizado com um sistema integrado de gestão laboratorial - Clinidata-Maxdata - que permite integrar em suporte informático os diferentes laboratórios e todos os resultados analíticos gerados, possibilitando um acesso rápido, simples e geral das análises de um dado utente no momento, bem como o seu historial analítico.

Este sistema de gestão de laboratório traduz-se numa maior eficiência, com uma consequente otimização dos diversos processos laboratoriais e redução de custos. O sistema permite um tratamento informático de todos os parâmetros estudados, tendo em conta com o seguinte:

- Registo das análises pedidas incluindo dados demográficos e clínicos do utente;
- Identificação da amostra mediante leitura ótica de códigos de barra;
- Elaboração de listas de trabalho, com as técnicas a efetuar;
- Visualização de resultados analíticos transmitidos pelos equipamentos onde foram efetuadas as análises;
- Processar a faturação aos sub-sistemas dos utentes e a execução de diversos mapas estatísticos.

O Serviço de Patologia Clínica abrange uma vasta área de conhecimentos e técnicas laboratoriais. Ao longo deste estágio a mestranda teve oportunidade de contactar com várias valências e com diversos equipamentos automáticos utilizados para a realização das diversas análises, destacando os que se seguem.

## **2.1. Microbiologia**

VITEK2, bioMérieux – Equipamento automático que identifica e determina a suscetibilidade antimicrobiana dos microrganismos, utilizando o método turbidimétrico.

MiniApi, bioMérieux – Equipamento que permite identificar microrganismos pela realização de um antibiograma. As galerias API, utilizam o método colorimétrico e as galerias ATB, utilizam o método turbidimétrico/ nefelométrico.

BacT/ ALERT 3D, bioMérieux – Equipamento automático que incuba, agita e realiza leituras periódicas dos frascos de hemocultura. As hemoculturas possuem um sensor colorimétrico que muda de cor na presença de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>), resultante da multiplicação bacteriana. O equipamento deteta a mudança de cor, medindo a luz refletida que é transmitida a um computador.

Câmara de Anaerobiose – Permite a realização de procedimentos bacteriológicos para isolar e identificar bactérias anaeróbias.

## **2.2. Hematologia**

COULTER LH 780, BECKMAN COULTER Inc. – Autoanalisador de Hematologia para realização de hemogramas. Utiliza o método de Impedância.

Pentra DX120, Horiba – Equipamento que efetua lâminas de esfregaços de sangue periférico e posterior coloração. Método de May-Grunwald-Giemsa.

ACL Top – Autoanalisador da Coagulação para determinação dos tempos de coagulação. Utiliza o método Fotométrico.

Alifax Test I BCL – Equipamento para determinação da Velocidade de Sedimentação (VS).

Microscópio Zeiss “AXIOSKOP 2 plus” – Microscópio ótico, utilizado para observação de esfregaços de sangue periférico.

Cytomics Fc 500, Beckman Coulter – Equipamento destinado à citometria de fluxo.

## **2.3. Laboratório de Urgência**

RAPIDLAB I200, SIEMENS Diagnostics – Equipamento automático para determinação de pH e gases, eletrólitos e lactatos no sangue arterial que utiliza o método elétrico seletivo de íons em comparação com o elétrico de referência.

ARCHITECT c SYSTEMS I6000, Abbott – Autoanalisador para determinação dos perfis 1, 2 e 3, Proteína C Reativa (PCR), Amilase, Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>), Fósforo, Magnésio e Colinesterases no soro. Utiliza os métodos Potenciometria Indireta para

determinação do ionograma e Espectrofotometria – Colorimetria - para os restantes parâmetros bioquímicos.

StreamLab, Worcell SIEMENS – Com centrífuga e dois módulos de Dimension® RxL Max, SIEMENS integrados. Este sistema possui função pré e pós-analítica, centrifuga, descapsula e distribui os diferentes tubos das amostras para suportes, referentes aos respetivos aparelhos.

Dimension® RxL Max, SIEMENS – Equipamento automático que permite a execução de ensaios imunoenzimáticos, baseado no método de “sandwich”, para doseamento no sangue dos marcadores de necrose do miocárdio, fármacos, álcool e amónia.

ADVIA Centaur CP, SIEMENS – Utilizado no diagnóstico *in vitro* para a determinação quantitativa do péptido natriurético tipo B (BNP) em plasma humano. É um imunoenensaio totalmente automatizado do tipo “sandwich” efetuado em dois locais que recorre à quimioluminiscência direta e que utiliza quantidades constantes de dois anticorpos monoclonais.

B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact – consiste num sistema totalmente automatizado para diagnóstico *in vitro*. O fundamento deste equipamento baseia-se na tecnologia TRACE (Time-Resolved Amplified Cryptate Emission), que mede o sinal emitido a partir de um imunocomplexo em atraso. Utilizado para o doseamento da Procalcitonina (PCT) no soro.

Microscópio Zeiss “AXIOSKOP 40” – Microscópio ótico, utilizado para a visualização de exames diretos após coloração e exames a fresco em fundo claro ou em fundo escuro.

LABCONCO, Purifier Class II Biosafety Cabinet, Delta Series – Câmara de fluxo laminar, utilizada para manipulação e tratamento de amostras biológicas.

Beckman Coulter – Centrifuga utilizada na centrifugação de amostras biológicas.

## **2.4. Autoimunidade**

Mago®, 4 ISODER – Equipamento automático que utiliza o método Imunoenzimático (ELISA) e Imunofluorescência Indireta (IFI) para pesquisa e identificação de autoanticorpos.

EUROIMMUN Analyser I – Equipamento automático concebido para determinação de anticorpos, visando o diagnóstico de doenças infecciosas e autoimunes pelo método imunoenzimático (ELISA).

IMUNOCAP 250 EliA™ well, Phadia – Equipamento automático que utiliza o método Fluorimunoensaio, para diagnóstico de doenças autoimunes.

EUROBLOTMaster EUROIMMUN US – Equipamento automatizado para a execução de técnicas de imunoblotting para identificação de autoanticorpos.

WALLAC 1470 WIZARD® Gamma Counter, PerkinElmer Life Sciences – Contador automático de radiações gamma das diferentes técnicas que utilizam a metodologia de Radioimunoensaio (RIA).

Microscópio Zeiss “AXIO SCOPE.AI” – Microscópio de Imunofluorescência Indireta (IFI).

Centra GP8R Thermo IEC – Centrífuga refrigerada utilizada na execução das técnicas de RIA.

Trabalhar com qualidade, sempre foi e será o lema do Serviço de Patologia Clínica. O controlo de qualidade é efetuado diariamente para minimizar qualquer erro que possa existir, utilizando controlos das respetivas casas comerciais, de modo a garantir que cada equipamento e reagente estejam em condições ótimas para a rotina laboratorial. Para além de possuir controlos internos, o laboratório participa regularmente em programas de avaliação externa da qualidade, nomeadamente da “Randox International Quality Assessment Scheme” (**RIQAS**), da “United Kingdom National External Assessment Service” (**NEQAS**) e da **Digital PT**, permitindo com a avaliação dos resultados, a identificação de erros e a implementação de medidas preventivas e corretivas capazes de melhorar o desempenho da técnica.

#### **Avaliação Externa da Qualidade:**

- **RIQAS** – Therapeutic Drugs- periodicidade quinzenal; Liquid Cardiac – periodicidade mensal.
- **NEQAS** – Clinical Chemistry – periodicidade quinzenal.
- **Digital PT** – Blood Gases and Electrolytes – periodicidade três vezes ao ano.

### 3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Como já foi referido, a mestranda estagiou e desenvolveu atividades nas seguintes áreas:

- Microbiologia: cultura de produtos biológicos (urinas, fezes, LCR, exsudatos (zaragatoas), expetorações, aspirados brônquicos, líquidos ascíticos e pleurais, cateteres, entre outros) em meios de cultura apropriados e respetivo exame direto, isolamentos, identificação e eventual antibiograma.
- Hematologia: hemograma e respetivo esfregaço de sangue periférico, contagem de plaquetas e reticulócitos, determinação do tempo de protrombina, do tempo de tromboplastina parcial ativada, fibrinogénio e velocidade de sedimentação (VS).
- Imunologia: Doseamento das imunoglobulinas (Ig) A, G, M e E, cadeias leves Kapa ( $\kappa$ ) e lambda ( $\lambda$ ), Fator Reumatóide (FR), Anti-Estreptolisina O (ASO), realização da técnica de Waaler-Rose (WR), electroforese de proteínas, imunofixação sérica e urinária.
- Bioquímica de Urgência e Autoimunidade: As duas áreas que selecionou para descrever com maior detalhe dedicando mais tempo às mesmas, aprofundando conhecimentos e adquirindo autonomia.

#### 3.1. Bioquímica

O sangue transporta um grande número de substâncias químicas por todo o organismo, entre os órgãos e para os tecidos. Essas substâncias refletem os processos metabólicos e os estados patológicos. As alterações nas concentrações dessas substâncias são frequentemente úteis para o diagnóstico de diferentes patologias e para a instituição da terapêutica<sup>1</sup>.

A Bioquímica Clínica é uma área multidisciplinar que tem como objetivo a determinação de parâmetros bioquímicos e é utilizada no diagnóstico, tratamento, monitorização ou prevenção da doença. Esta disciplina engloba duas vertentes, analítica e interpretativa, e pode compreender a determinação e monitorização de vários parâmetros.



### 3.1.1. Laboratório de Urgência

O Laboratório de Urgência é um espaço amplo com uma área de recepção de amostras, onde se efetua a sua integração informática (requisição online) e orientação, para o respetivo processamento. Dispõe de equipamentos necessários à realização de todas as análises bioquímicas de urgência já mencionados anteriormente.

Este laboratório funciona 24 horas e está de serviço à urgência e ao internamento dos HUC. Recebe vários tipos de amostras, desde sangue, urina, líquidos ascíticos, pleurais e cefalorraquídeo (LCR), bem como amostras biológicas para estudo microbiológico.

Durante o estágio de Bioquímica, a mestranda acompanhou todo o percurso dos diferentes tipos de amostras e respetivos pedidos, desde a sua recepção, registo, centrifugação, processamento e validação do resultado. Participou diariamente na manutenção dos diferentes equipamentos e no controlo de qualidade dos mesmos, bem como na execução de todo o trabalho técnico.

O controlo interno de qualidade é composto por três níveis: nível 1 (Baixo), nível 2 (Médio) e o nível 3 (Alto) e é efetuado 4 vezes em 24 horas a todos os parâmetros bioquímicos. No caso dos fármacos e marcadores de necrose do miocárdio o controlo de qualidade (CQ) é efetuado de 12 em 12 horas. Caso algum dos parâmetros não esteja dentro dos limites de confiança do CQ, não se poderá prosseguir com o processamento. Primeiro analisa-se o que poderá estar a acontecer (CQ ou reagente podem estar a terminar, apresentar eventual contaminação, entre outras) e implementam-se as medidas corretivas (calibração, mudança de reagente e nova embalagem de CQ, entre outras) necessárias com o objetivo de resolver o problema, prosseguindo posteriormente com o normal processamento das amostras.

Durante o estágio teve a oportunidade de verificar que a diversidade de pedidos é enorme, embora alguns se destaquem pela sua objetividade e urgência.

No laboratório de urgência, as análises bioquímicas urgentes são divididas por perfis 1, 2 e 3, Proteína C Reativa (PCR), Amilase, Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>), Fósforo, Magnésio, Colinesterases, Amónia, Álcool (Etanol), Marcadores de necrose do miocárdio e Fármacos. Segue-se Peptídeo Natriurético tipo B (BNP), Procalcitonina (PCT), Eletrólitos, Cálcio ionizado (Ca<sup>++</sup>), pH e gases.

### 3.1.1.1 PERFIL I

Avalia o estado geral do doente: Equilíbrio hidro-eletrolítico, função renal e os estados metabólico e nutricional. Engloba a Glicose, Ureia, Creatinina, Sódio, Potássio, Cloro, Cálcio, Osmolalidade, Proteínas Totais e Albumina.

#### a) Glicose

A glicose é a fonte primária de energia para o corpo humano<sup>2</sup>. A determinação da glicose no sangue constitui o procedimento químico laboratorial mais utilizado como auxiliar no diagnóstico e tratamento da diabetes. Níveis elevados de glicose (hiperglicemia) também podem ocorrer em casos de neoplasia pancreática, hipertiroidismo, bem como em outras patologias. Níveis de glicose reduzidos (hipoglicemia) podem ser secundárias a insuficiência renal, a cirurgia gástrica, a metástases hepáticas e à terapêutica excessiva com insulina<sup>2</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (Hexoquinase / G-6-PDH)

**Tipo de amostra:** soro, urina, LCR

#### b) Ureia

A ureia é um composto sintetizado pelo fígado a partir do amoníaco, que resulta do catabolismo das proteínas e dos aminoácidos.

Assim, nos doentes renais crónicos a ureia apresenta valores elevados, sendo essa elevação proporcional ao grau de insuficiência renal. Outras situações, em que este composto apresenta concentrações elevadas, são: dieta rica em proteínas e atividade muscular intensa (desportistas ou caso de fome severa). A restrição da ingestão de proteínas, a gravidez, a desidratação, doenças hepáticas graves ou a diminuição da síntese, geram valores séricos diminuídos.

Os valores de ureia no soro são utilizados no diagnóstico de determinadas doenças renais e metabólicas, sendo utilizados para avaliação da função renal. Este parâmetro bioquímico é requisitado simultaneamente com o doseamento da creatinina sérica para diagnóstico diferencial das hiperurémias pré-renais (descompensação cardíaca, depleção hídrica, aumento do catabolismo de proteínas), renais (glomerulonefrite, nefrite crónica, rim poliquístico, necrose tubular) e pós-renais (obstruções do trato urinário)<sup>2</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (Urease)

**Tipo de amostra:** soro e urina

### c) Creatinina

Catabólito da creatina muscular, a creatinina é eliminada exclusivamente pelo rim por filtração glomerular, não sendo nem secretada nem reabsorvida pelo túbulo<sup>3</sup>. A produção de creatinina é proporcional à massa muscular do indivíduo e não apresenta grandes variações diárias. A produção diária de creatinina mantém-se relativamente constante, exceto nos casos de lesão por esmagamento ou de doenças degenerativas que produzem dano muscular extenso.

A diminuição da função renal resulta no aumento da concentração de creatinina no soro. A determinação da creatinina no soro é o melhor critério de avaliação da filtração glomerular e na monitorização da diálise renal<sup>3</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (Picrato alcalino)

**Tipo de amostra:** Soro e urina

### d) Ionograma sérico (Sódio, Potássio, Cloro)

O Sódio ( $\text{Na}^+$ ) é o catião mais importante do líquido extracelular (plasma sanguíneo e espaço intersticial) e desempenha um papel essencial na regulação do volume de líquidos corporais, na manutenção do potencial elétrico nas células musculares e no controlo da permeabilidade das membranas celulares. A diminuição dos valores de Sódio pode ser devida ao uso excessivo de diuréticos, vômitos prolongados, diminuição da ingestão de sódio na dieta e na acidose metabólica, o seu aumento pode estar presente na Síndrome de Cushing, em casos de desidratação severa ou devido à ingestão excessiva de sal sem o fornecimento adequado de água<sup>2</sup>.

O Potássio ( $\text{K}^+$ ) é o principal catião do fluido intracelular sendo a sua concentração nos eritrócitos, vinte e três vezes superior ao do soro. Por esta razão, não se podem utilizar amostras de soro hemolisado.

A diminuição da ingestão de potássio na dieta, uma redistribuição do potássio extracelular e um aumento da perda de fluidos ricos em potássio podem ser as causas da diminuição dos níveis de potássio, que pode ser caracterizada por fadiga muscular, irritabilidade, paralesia, taquicardia e eventual Enfarte Agudo do Miocárdio (EAM). Níveis anormalmente elevados de potássio extracelular, conduzem a confusão mental, fadiga geral, bradicardia, e eventual colapso do sistema vascular periférico e EAM. Causas do aumento

dos níveis de potássio podem estar ligadas a inapropriada terapia intravenosa, a desidratação, a choque, a cetoacidose diabética e a queimaduras severas<sup>2</sup>.

O Cloro (Cl<sup>-</sup>) é o principal anião extracelular. A maioria do cloro ingerido é absorvido e o excesso é excretado com outros iões pela urina. Níveis baixos de cloro são observados em casos de vômitos prolongados acompanhados por perda de ácido clorídrico (HCL), em alguns casos de acidose metabólica na qual há um aumento da acumulação de aniões orgânicos e em casos críticos de doença de Addison. Níveis elevados de cloro são observados na acidose metabólica associada a diarreia prolongada com perda de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)<sup>2</sup>.

**Método:** Potenciometria Indireta

**Tipo de amostra:** soro e urina

#### e) **Cálcio (Ca)**

A quase totalidade do cálcio (99%) encontra-se na forma de cristais, como fosfato tricálcico extracelular na massa óssea<sup>4</sup>. Mas embora o cálcio plasmático represente apenas uma fração mínima do total de Ca, intervém como efetor de numerosas enzimas, e, nessa qualidade, desempenha um papel importante. Por exemplo os iões Ca estão diminuídos na excitabilidade neuromuscular e participam na coagulação do sangue. A sua concentração é mantida fixa pela ação conjunta da paratormona, da vitamina D e da calcitonina<sup>3</sup>.

O hiperparatireoidismo, a hipervitaminose D, o mieloma múltiplo e algumas neoplasias ósseas são causas de hipercalcémia<sup>2</sup>.

A hipocalcémia pode resultar de hipoparatiroidismo, hipoalbuminémia, insuficiência renal e pancreatite<sup>2</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (Arsenazo III)

**Tipo de amostra:** soro e urina

#### f) **Osmolalidade**

Quando o homem é sujeito a privação da ingestão de água, há um aumento na osmolaridade plasmática, o qual é detetado por células especializadas osmossensíveis localizadas no hipotálamo anterior.

A concentração de soluto no plasma e no soro determina a osmolalidade e interfere com o movimento do fluido através das membranas corporais. A osmolaridade dos fluidos é

mais facilmente determinada em laboratório através da depressão do ponto de congelamento induzida na água por partículas de soluto osmoticamente ativas.

No Homem saudável, a osmolalidade plasmática é mantida dentro de limites fisiológicos muito estreitos, entre 280 – 295mosm/KgH<sub>2</sub>O, pela integração com sucesso, da ingestão e excreção de água, sendo a última controlada principalmente pelas ações anti-diuréticas da hormona de origem neurohipofisária, a vasopressina e determinada principalmente pelo sódio, cloro, bicarbonato, pela glicose e pela ureia<sup>1</sup>.

Uma fórmula simples, mas razoavelmente precisa para o cálculo da osmolalidade no soro (baseada nos pesos moleculares da glicose e da ureia mais o peso da contribuição do sódio e dos seus aniões circulantes) é<sup>1</sup>:

$$\text{Osmolalidade} = 2 \times [\text{Na}^+] + \text{Glicose} / 20 + \text{BUN} / 3$$

**Método:** Cálculo automático

**Tipo de amostra:** soro

### g) Proteínas Totais

As proteínas plasmáticas são a Albumina e as Globulinas e, na sua maioria, são sintetizadas no fígado, gânglios linfáticos, baço e medula óssea. A sua concentração pode encontrar-se alterada em inúmeras situações clínicas, como: Síndrome nefrótico, hemorragias, desidratação e mieloma múltiplo.

A determinação das proteínas totais é importante para o diagnóstico e avaliação de alterações metabólicas, estados nutricionais e doenças hepáticas, renais, da medula óssea, entre outras patologias<sup>2</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (Biureto)

**Tipo de amostra:** soro e urina

### h) Albumina

A albumina é a principal proteína do soro em indivíduos normais. Normalmente, níveis séricos elevados de albumina (hiperalbúminemia) resultam da desidratação, enquanto níveis baixos de albumina (hipoalbuminemia) ocorrem em diversas patologias, incluindo doença renal, hepática, má absorção, desnutrição, queimaduras graves, infeções e cancro<sup>2</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (Púrpura de bromocresol)

**Tipo de amostra:** soro e urina

### 3.1.1.2. PERFIL 2

Avalia a função hepática. Fazem parte deste perfil as bilirrubinas total e direta, a Alanina Aminotransferase (ALT), a Gama-Glutamil Transferase (GGT) e a Fosfatase Alcalina.

#### a) Bilirrubina

A bilirrubina é formada através da degradação das moléculas de hemoglobina pelo sistema reticuloendotelial. A bilirrubina recém-formada (não conjugada) circula no sangue ligada à albumina sérica. É transportada para o fígado, onde é captada por células parenquimatosas hepáticas e conjugada<sup>5</sup>. É posteriormente excretada pelas vias biliares no intestino<sup>3</sup>.

A bilirrubina total é a soma das frações conjugada e não conjugada. A sua concentração está elevada na hepatite, na cirrose, em doenças hemolíticas, nalgumas deficiências enzimáticas hereditárias e em situações que causam obstrução hepática.

A bilirrubina direta é a soma das frações conjugadas. Está elevada em situações que causam obstrução hepática, na hepatite, na cirrose, nalgumas deficiências enzimáticas hereditárias e em defeitos herdados nos canalículos biliares<sup>2</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (Sal de Diazónio)

**Tipo de amostra:** soro

#### b) Alanina Aminotransferase (ALT)

A Alanina Aminotransferase (ALT), também referida como Glutamato Piruvato Transaminase (GPT), é uma enzima envolvida no metabolismo dos aminoácidos. Esta enzima está presente em muitos tecidos, mas níveis elevados são encontrados em tecido hepático e renal, após lesão. A destruição destes tecidos leva à libertação da enzima intracelular na circulação sanguínea<sup>2</sup>.

Níveis séricos de ALT significativamente elevados podem ser observados numa variedade de doenças que envolvem o fígado, como a hepatite, a mononucleose e cirrose. Assim sendo, a ALT é considerada um bom auxiliar de diagnóstico de doenças hepáticas<sup>2</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (NADH)

**Tipo de amostra:** soro

### c) Gama-Glutamil Transferase (GGT)

A enzima GGT catalisa a transferência de aminoácidos de um péptido para outro. É uma enzima que está presente em todas as células do organismo - a nível da membrana celular - à exceção das células musculares. A enzima que circula no soro tem origem sobretudo no sistema hepatobiliar.

O aumento da GGT ocorre também nas seguintes patologias: hepatite infecciosa, esteatose hepática, pancreatite aguda e crónica.

A GGT é desde há muito considerada como marcador de doença hepatobiliar e do consumo ou abuso do álcool<sup>2</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (Substrato L-Gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida)

**Tipo de amostra:** soro

### d) Fosfatase Alcalina

A determinação da concentração desta enzima é útil no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas e ósseas, da paratiroide e do intestino. Aparece elevada em todas as formas de colestase, no raquitismo, na osteomalácia, fraturas e tumores malignos. Contudo, há situações não patológicas em que os valores estão acima do normal, é o caso das crianças, em que há uma intensa atividade osteoblástica de remodelação óssea e nas mulheres pós menopausa, devido à osteoporose<sup>2</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (Paranitrofenil fosfato)

**Tipo de amostra:** soro

### 3.1.1.3. PERFIL 3

Existem certas enzimas no músculo cardíaco que são libertadas quando ocorre necrose tecidual. Apresentam-se elevadas, de acordo com a literatura, em cerca de 90-95% dos pacientes com EAM<sup>5</sup>.

Fazem parte deste perfil as enzimas Aspartato Aminotransferase (AST), a Lactato Desidrogenase (LDH) e a Creatina Quinase (CK).

### a) **Aspartato Aminotransferase (AST)**

A Aspartato Amino Transferase (AST), também referida como GOT- Glutamato Oxaloacetato Transaminase, é uma das enzimas que catalisa a interconversão de aminoácidos e de  $\alpha$ -cetoácidos através da transferência de grupos amina.

As concentrações mais elevadas de AST são encontradas nos tecidos do coração, fígado, músculos e rim. Danos nestes tecidos podem aumentar significativamente os níveis séricos de AST, nomeadamente em situações de hepatites aguda e tóxica, necrose hepática, cirrose e no EAM<sup>2</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (NADH)

**Tipo de amostra:** soro

### b) **Lactato Desidrogenase (LDH)**

A LDH é uma enzima encontrada nas células de vários tecidos, incluindo o coração, músculo esquelético, eritrócitos e em menores concentrações no fígado, rim, cérebro, e pulmões<sup>5</sup>. É responsável pela conversão do lactato muscular em piruvato, passo essencial na produção de energia muscular.

Esta enzima é utilizada em diagnósticos diferenciais da anemia hemolítica e como marcador tumoral em algumas neoplasias tais como nos tumores das células germinativas.

A LDH apresenta níveis elevados no soro, nas hepatites, na nefrite glomerular, na embolia pulmonar, em doenças musculares, em muitas leucemias e linfomas.

Como a LDH é um marcador não específico, é usado em combinação com outros marcadores no diagnóstico e tratamento<sup>2</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (Reação Lactato  $\rightarrow$  Piruvato)

**Tipo de amostra:** soro e LCR

### c) **Creatina Quinase (CK)**

A CK encontra-se no músculo cardíaco, no músculo esquelético e no cérebro. A enzima apresenta-se elevada em cerca de 90-93% dos pacientes com EAM.

Os níveis de CK são afetados por um número considerável de condições clínicas associadas a lesão muscular aguda ou esforço muscular intenso, por isso, os principais inconvenientes na CK total no diagnóstico do EAM incluem: (1) o período de tempo relativamente curto durante o qual a enzima se encontra elevada após o início do enfarte e



(2) o problema de elevações falso-positivas em consequência de lesão do músculo esquelético (sobretudo por injeções intramusculares)<sup>5</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (N-acetil-L-cisteína)

**Tipo de amostra:** soro

#### 3.1.1.4. Proteína C Reativa (PCR)

A PCR é uma proteína de fase aguda, cuja concentração aumenta inespecificamente em resposta a uma inflamação, sobretudo na resposta a uma infecção pneumocócica, doença histolítica entre outros estados patológicos.

É usada como um marcador ou um indicador de diagnóstico geral de infecção ou de inflamação, além de servir para monitorizar a resposta terapêutica e cirúrgica<sup>2</sup>.

**Método:** Turbidimetria

**Tipo de amostra:** soro

#### 3.1.1.5. Amilase

A amilase é uma enzima digestiva que normalmente atua no espaço extracelular, clivando o amido em pequenos grupos de oligossacarídeos e, finalmente, em monossacarídeos. As glândulas salivares e o pâncreas são as principais fontes orgânicas da amilase. O soro normal contém as formas salivar e pancreática da amilase, embora a forma salivar geralmente seja a predominante.

A inflamação do pâncreas produz a libertação de amilase e de outras enzimas pancreáticas na circulação.

Na pancreatite aguda, os níveis séricos de amilase aumentam. Em função do seu baixo peso molecular, a amilase é rapidamente eliminada na urina, onde pode permanecer elevada por vários dias devido ao depuramento prolongado, mesmo quando os níveis séricos já estão normalizados. A amilase pode estar também moderadamente aumentada no carcinoma da cabeça do pâncreas (manifestação tardia), na inflamação das glândulas salivares (parotidite) e na úlcera péptica perfurada<sup>1</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (Substrato de CNPG3)

**Tipo de amostra:** soro e urina

### 3.1.1.6. Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>)

A determinação no soro de dióxido de carbono total (CO<sub>2</sub>) associada a outras informações clínicas e laboratoriais, é necessária para a avaliação do equilíbrio ácido-base. Um valor elevado de CO<sub>2</sub> pode ser observado numa acidose respiratória e alcalose metabólica compensada. Um valor baixo de CO<sub>2</sub> pode ser observado numa alcalose respiratória e acidose metabólica compensada. Outras determinações laboratoriais permitem uma diferenciação entre uma situação metabólica ou respiratória<sup>2</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (PEP carboxilase)

**Tipo de amostra:** soro

### 3.1.1.7. Fósforo

A maioria do fósforo no organismo (80 a 85%) está presente nos ossos como hidroxiapatite. O restante fosfato está presente como fósforo inorgânico e ésteres de fosfatos. O cálcio e o fósforo no soro apresentam geralmente uma relação de reciprocidade. Um aumento de fósforo sérico pode ocorrer na hipervitaminose D, no hipoparatiroidismo e insuficiência renal. Níveis séricos baixos são observados em casos de raquitismo (deficiência de vitamina D), no hiperparatiroidismo e na síndrome de Fanconi<sup>2</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (Fosfomolibdato)

**Tipo de amostra:** soro e urina

### 3.1.1.8. Magnésio

O magnésio é um nutriente essencial que está envolvido em muitas funções bioquímicas. Desempenha um papel estrutural nos ácidos nucleicos e partículas ribossomais, é necessário como ativador de muitas enzimas e participa na fosforilação oxidativa para produção de energia.

A hipomagnesémia tem como consequência, a perturbação da função neuromuscular, pode causar diarreia prolongada grave, síndromes de má absorção, hiperaldosteronismo. A hipomagnesémia por excesso de perda urinária pode ocorrer do uso de diuréticos (terapêutica diurética). A hipermagnesémia foi identificada em casos de insuficiência renal glomerular e coma diabético<sup>2</sup>.

**Método:** Espectrofotometria (Arsenazo)

**Tipo de amostra:** soro e urina

### 3.1.1.9. Colinesterases (CHE)

A pseudocolinesterase (CHE), também conhecida como acetilcolina acilhidrolase encontra-se no soro, fígado, pâncreas, coração e substância branca do cérebro. A determinação da colinesterase sérica é útil no diagnóstico de doenças hepáticas, hepatite, cirrose, carcinoma metastizado. A CHE encontra-se gravemente diminuída na intoxicação por inseticidas organofosforados, atuando como um índice sensível da exposição a esses agentes<sup>1</sup>. Os níveis de CHE no soro diminuem, em todas as doenças supra citadas<sup>2</sup>.

**Método:** Cinético colorimétrico (butiriltilcolina como substrato específico)

**Tipo de amostra:** soro

### 3.1.1.10. Amónia

A amónia é produzida principalmente no intestino e deveria ser transformada em ureia (ou glutamina, a partir de glutamato) pelo fígado e eliminada pelas fezes e urina. Essa amónia em excesso no cérebro, afeta os neurotransmissores e portanto o funcionamento cerebral.

As determinações da Amónia são frequentemente utilizadas no acompanhamento da evolução da encefalopatia hepática<sup>2</sup>.

**Método:** Enzimático (Glutamato desidrogenase)

**Tipo de amostra:** plasma (Heparina)

### 3.1.1.11. Álcool (Etanol)

O Etanol é uma substância química amplamente usada e o seu uso abusivo é frequente<sup>2</sup>.

O álcool é responsável por intoxicações agudas que estão longe de serem sempre evidentes. Pelo contrário, diversas situações – como a hipoglicémia e a hemorragia meníngea – simulam a intoxicação alcoólica aguda. O doseamento do etanol é pois de um grande interesse na prática médica de urgência<sup>3</sup>. Os resultados de etanol podem ser utilizados para o diagnóstico e monitorização de intoxicação e envenenamento<sup>2</sup>.

**Método:** Enzimático (Álcool desidrogenase)

**Tipo de amostra:** soro

### 3.1.1.12. Marcadores de Necrose do Miocárdio (Mioglobina, Troponina I, CKMBMassa)

A **Mioglobina** é a hemeproteína que se encontra no músculo cardíaco e esquelético e é libertada no soro quando ocorre uma lesão nas células desses músculos. Os níveis de mioglobina têm vindo a ser usados como marcadores precoces do EAM na ausência de traumatismo do músculo esquelético ou de outros fatores associados a um aumento de origem não cardíaco da mioglobina circulante. Após necrose do miocárdio associada a EAM, a mioglobina é um dos primeiros marcadores a aumentar sendo a sua determinação útil no diagnóstico de EAM<sup>2</sup>.

A **Troponina I** é uma proteína que pertence ao complexo do aparelho contrátil miofibrilar do músculo estriado, que regula a força e rapidez da sua contração. O complexo das troponinas comporta três proteínas, T, I e C e várias isoformas. As troponinas T (TnT) e I (TnI) têm, cada uma uma isoforma cardíaca (TnTc e TnIc) diferentes das isoformas musculares. Quando ocorre uma isquémia do miocárdio, a destruição da membrana do miócito permite a sua passagem para o sangue. Por isso, elas constituem um dos melhores marcadores de enfarte<sup>3</sup>. Segundo a literatura a Troponina I é libertada no sangue poucas horas após o início dos sintomas de EAM e permanece elevada por vários dias pós-enfarte<sup>2</sup>.

A quantificação dos níveis de Troponina-I, revela ser uma determinação sensível e específica de lesão do miocárdio<sup>2</sup>.

A isoenzima creatina quinase MB (**CKMB**) encontra-se primariamente no tecido cardíaco e em concentrações francamente mais baixas no músculo esquelético. A quantificação da CKMB faz parte do conjunto de análises, utilizada no diagnóstico de EAM. As concentrações de CKMB têm sido úteis na avaliação da extensão do EAM e subsequente repetição. A sensibilidade de diagnóstico, a especificidade e eficácia da CKMB Massa é superior a outras isoenzimas<sup>2</sup>.

**Método:** Imunoenzimático

**Tipo de amostra:** soro

### 3.1.1.13. Fármacos

Fármaco por definição, designa uma substância química conhecida e de estrutura química definida dotada de propriedade farmacológica, ou pelo menos com interesse médico. O ensaio de níveis séricos dos fármacos é útil para estabelecer a dosagem de

manutenção, para determinar o cumprimento do tratamento e para avaliar possíveis efeitos colaterais tóxicos<sup>6</sup>.

Assim, os fármacos habitualmente pedidos e doseados no laboratório de urgência são:

- Antibióticos (Tobramicina, Gentamicina, Amicacina, Vancomicina);
- Digitálicos (Digoxina);
- Anti-epiléticos e Anticonvulsivantes (Fenobarbital, Fenitoína e Ácido valpróico, Carbamazepina, respetivamente);
- Anti-asmáticos (Teofilina);
- Analgésico e Antipirético (Acetaminofeno).

#### a) Antibióticos

Usados no tratamento das infeções bacterianas:

- Tobramicina, Gentamicina, Amicacina - Antibiótico aminoglicosídeo;
- Vancomicina - Antibiótico glicopeptídico.

**Método:** Imunoturbidimetria (PETINIA)

**Tipo de amostra:** soro

#### b) Digitálicos

Usados como agente antiarrítmico isolado ou em conjugação com outros fármacos:

- Digoxina - Glicosídeo cardíaco

**Método:** Imunoensaio ( $\beta$ -galactosidase)

**Tipo de amostra:** soro

#### c) Anti-epiléticos e Anticonvulsivantes

- Fenobarbital - Fármaco anti-epilético e sedativo-hipnótico.
- Fenitoína - Fármaco anti-epilético. A fenitoína é amplamente utilizada e é eficaz para todos os tipos de crises convulsivas, excepto, crises de ausência.
- Ácido valpróico - Fármaco anticonvulsivo. O ácido valpróico é utilizado isoladamente ou em conjunto com outros anticonvulsivos na gestão profilática de convulsões epiléticas.

- Carbamazepina - Fármaco anticonvulsivo. A carbamazepina é um fármaco útil no controlo de determinados tipos de epilepsia.

**Método:** Imunoturbidimetria (PETINIA)

**Tipo de amostra:** soro

#### **d) Anti-Asmáticos**

- Teofilina - É uma dimetilxantina relacionada com a cafeína, que está presente no chá. É usada como broncodilatador na doença pulmonar obstrutiva crónica.

**Método:** Imunoturbidimetria (PETINIA)

**Tipo de amostra:** soro

#### **e) Analgésico e Antipirético**

- Acetaminofeno - Analgésico e antipirético.

**Método:** Enzimático (Amidase)

**Tipo de amostra:** soro

### **3.1.1.14. Péptido Natriurético tipo B (BNP)**

O sistema do péptido natriurético é uma família de péptidos estruturalmente semelhantes, mas geneticamente distintos, que inclui o péptido natriurético auricular (ANP) e o péptido natriurético tipo B (BNP) com origem nas células do miocárdio e o péptido natriurético tipo C (CNP) com origem nas células endoteliais. Os péptidos natriuréticos cardíacos são os antagonistas naturais do sistema renina – angiotensina - aldosterona e do sistema nervoso simpático. Promovem a natriurese e a diurese, agem como vasodilatadores e exercem efeitos antimiotogénicos nos tecidos cardiovasculares. O ANP e o BNP são segregados pelo coração em resposta ao stress hemodinâmico. Os níveis elevados de BNP são basicamente produzidos como resposta à distensão da parede ventricular esquerda e à sobrecarga de volume.

O sistema de péptidos natriuréticos cardíacos é ativado no seu grau mais elevado com a disfunção ventricular e tem um papel importante na manutenção do estado compensado da insuficiência cardíaca assintomática e no atraso da progressão da doença. O BNP é sintetizado como uma preprohormona (preproBNP) de 134 aminoácidos, dos quais derivam uma prehormona (proBNP) de 108 aminoácidos e um péptido sinal de 32 aminoácidos.

O doseamento de BNP no plasma demonstrou interesse no diagnóstico e na avaliação da gravidade da insuficiência cardíaca. Este teste, em conjunto com outros fatores de risco conhecidos, pode ser utilizado para prever a sobrevivência em doentes após a ocorrência de EAM<sup>7</sup>.

**Método:** Quimioluminescência

**Tipo de amostra:** plasma (EDTA)

### 3.1.1.15. Procalcitonina (PCT)

Em 1996 a investigação no campo dos parâmetros laboratoriais para o diagnóstico das patologias inflamatórias, conduziu à revelação de uma nova molécula e da sua utilidade nestes casos. A partir de estudos efetuados sobre a calcitonina (CT), detetou-se que esta é biosintetizada a partir de uma pró-hormona de maior tamanho, a Procalcitonina (PCT). A PCT encontra-se entre os mais recentes marcadores biológicos para o diagnóstico, monitorização terapêutica e avaliação do prognóstico de processos inflamatórios sistémicos de etiologia infecciosa, embora também tenha sido descrita a sua utilidade para outras etiologias que não as infecciosas<sup>2</sup>.

**Método:** TRACE (Time-Resolved Amplified Cryptate Emission – mede o sinal emitido a partir de um imunocomplexo com atraso)

**Tipo de amostra:** soro

### 3.1.1.16. pH e gases

Para a avaliação do equilíbrio ácido-base, os valores de pH e de pCO<sub>2</sub> são os parâmetros mensuráveis mais importantes. Também muito significativos são o desequilíbrio de base (B.E.) que permite o cálculo da quantidade de tampão que deve ser infundida no doente com perturbação do equilíbrio ácido-base e o bicarbonato atual (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) como medida da capacidade de tamponamento do sangue<sup>4</sup>.

**Valor de pH** – O valor de pH indica a atividade dos iões de hidrogénio (H<sup>+</sup>) de uma solução, na forma do logaritmo negativo da concentração dos iões de hidrogénio (pH= - log H<sup>+</sup>). O metabolismo celular necessita de um ambiente em que a concentração dos iões H<sup>+</sup> esteja dentro de limites bem definidos<sup>4</sup>.

Os pulmões e os rins são responsáveis pela regulação do equilíbrio.

A respiração influencia a concentração de CO<sub>2</sub>, reagindo em poucos minutos às alterações na concentração de iões H<sup>+</sup>:

- Se o valor de pH desce, sobe a concentração de  $\text{CO}_2$ ;
- Se o valor de pH sobe, desce a concentração de  $\text{CO}_2$ .

Assim, o valor de pH serve para a detecção de perturbações de ácido-base que assentam em verdadeiras causas patológicas, como perturbações nas vias respiratórias e insuficiência renal ou gastrointestinal<sup>4</sup>.

Valores mais elevados estão presentes na Alcalose respiratória e na Alcalose metabólica.

Valores mais baixos estão presentes na Acidose respiratória e na Acidose metabólica.

**pCO<sub>2</sub>** – O dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) é um produto do metabolismo celular e é transportado através do sangue para os rins e pulmões sob a forma de  $\text{CO}_2$  dissolvido, de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e de ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ).

A pressão parcial do dióxido de carbono ( $\text{pCO}_2$ ) depende principalmente do funcionamento dos pulmões e da eliminação de  $\text{CO}_2$ . As alterações de  $\text{pCO}_2$  permitem inferir uma alteração do estado respiratório<sup>4</sup>.

Valores mais elevados, estão presentes quando há sinais de troca gasosa deficitária nos pulmões.

Valores mais baixos, estão presentes quando há sinais de uma respiração demasiado rápida ou profunda e na compensação de uma acidose metabólica.

O oxigénio ( $\text{O}_2$ ) desempenha um papel fundamental na vitalidade das células corporais e, assim, no potencial vital do organismo humano.

Para a avaliação de um fornecimento suficiente de oxigénio e com ele o perfeito funcionamento do organismo, estão à disposição os seguintes parâmetros: pressão parcial do oxigénio ( $\text{pO}_2$ ) como indicador da absorção de oxigénio nos pulmões, saturação do oxigénio ( $\text{sO}_2$ ) indicador do transporte do oxigénio e concentração do oxigénio ( $\text{ctO}_2$ ) indicador do fornecimento do oxigénio<sup>4</sup>.

**Método:** Potenciometria, Eléctrodo Seletivo de Iões “ISE” em combinação com o eléctrodo de referência, forma uma célula eletroquímica.

**Tipo de amostra:** sangue arterial (heparina de lítio)

### 3.1.1.17. Eletrólitos

A manutenção da homeostase da água é essencial para a vida de todos os organismos. Nos mamíferos, a manutenção da pressão osmótica e distribuição da água nos



vários compartimentos de fluídos corporais é primariamente uma função dos quatro principais **eletrólitos**: sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), desempenhando um papel importante: (1) na manutenção do pH, (2) na função apropriada do coração e músculos, (3) nas reações de oxidação-redução e (4) como cofatores para enzimas. Na verdade, quase não existem processos metabólicos que sejam independentes dos eletrólitos ou que não sejam afetados por eles. As concentrações anormais de eletrólitos podem ser a causa ou a consequência de vários distúrbios. Assim, a determinação das concentrações dos eletrólitos é uma das funções mais importantes de um laboratório clínico<sup>2</sup>.

As determinações dos vários eletrólitos são também efetuadas pela maioria dos sistemas de análises de gases no sangue, no entanto, não fazem parte do equilíbrio ácido-base clássico<sup>4</sup>.

**Método:** Potenciometria, “ISE”

**Tipo de amostra:** sangue arterial (heparina de lítio)

### 3.1.1.18. Cálcio Ionizado ( $\text{Ca}^{++}$ )

A determinação do cálcio ionizado mede a concentração do íon cálcio livre no sangue total arterial, venoso ou capilar.

Embora a maior parte do cálcio no sangue esteja ligada a proteínas ou complexada com substâncias aniônicas mais pequenas, a fração biologicamente ativa de cálcio é o cálcio ionizado livre. Através do seu papel em várias reações enzimáticas e em mecanismos de transporte membranar, o cálcio ionizado tem uma importância vital na coagulação do sangue, na condução nervosa, na transmissão neuromuscular e na contração muscular<sup>2</sup>.

**Método:** Potenciometria, “ISE”.

**Tipo de amostra:** sangue arterial, venoso ou capilar (heparina de lítio)

## 3.2. Imunologia

A Imunologia é a ciência que estuda o conjunto de mecanismos integrados (o sistema imunológico) que tem na discriminação entre o “próprio” e o “alheio” uma das suas funções.

O seu desenvolvimento e posterior conquista do estatuto de ciência autónoma deve-se, sobretudo, à introdução de metodologias que permitiram o esclarecimento e a caracterização dos diferentes antígenos e anticorpos, etapa essencial à sua futura e explosiva evolução<sup>8</sup>.

Por ser uma área da imunologia intensamente estudada mas que muitos desconhecem, a mestranda optou neste estágio por aprofundar os seus conhecimentos numa das suas sub-especialidades, a Autoimunidade e as suas aplicações laboratoriais.

### **3.2.1. Autoimunidade**

A partir de meados do século XX, a identificação de autoanticorpos que reagem com componentes dos órgãos envolvidos em diferentes doenças humanas levou ao reconhecimento de que o sistema imunológico pode ser auto-agressivo e à identificação das doenças autoimunes<sup>8</sup>.

Durante muito tempo considerada como uma situação rara, o aparecimento de fenómenos autoimunes é atualmente considerado como sendo o mecanismo de um número importante de doenças. As doenças autoimunes afetam 5 a 7% da população em geral e constituirão o 3º grande processo patológico depois das doenças cardiovasculares e dos carcinomas. A cada ano, as doenças mais ou menos bem compreendidas vêm-se explicadas pela descoberta de uma anomalia autoimune<sup>9</sup>.

As doenças autoimunes são um conjunto de patologias cujo estudo tem tido uma enorme expansão nos últimos anos. Embora os mecanismos fisiopatológicos que levam ao aparecimento das doenças autoimunes ainda não sejam bem conhecidos, o número de autoanticorpos detetados é cada vez maior<sup>9</sup>.

Os autoanticorpos podem ser classificados em duas categorias: os autoanticorpos naturais que estão presentes no soro de indivíduos sãos e pré-existem em todas as imunizações sendo essencialmente anticorpos do tipo IgM, mais raramente IgG ou IgA e os autoanticorpos patológicos que são produzidos em resposta a uma estimulação antigénica persistente, em que a sua concentração é elevada e que são geralmente da classe IgG, por vezes IgA<sup>9</sup>.

Os trabalhos levados a cabo nos últimos anos levaram à melhoria das técnicas de pesquisa dos autoanticorpos e caracterização dos antígenos por eles reconhecidos tendo em muitos casos estabelecido o seu significado clínico. Existem porém, outros autoanticorpos que apesar de já identificados, não se conhece, o seu significado clínico ou mesmo se o têm.

A necessidade da deteção precoce dos autoanticorpos leva ao desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e mais específicas. É em todo o caso uma tarefa complexa, pois todas

as moléculas do nosso organismo desde que tenham dimensões suficientes podem comportar-se como autoantigénios e dar lugar a uma reação autoimune.

Durante o estágio de Autoimunidade a mestranda acompanhou todo o percurso das amostras e respetivos pedidos, desde a sua receção, registo, centrifugação, tratamento, processamento até à validação do resultado. Participou diariamente na manutenção dos diferentes equipamentos, bem como na execução de todo o trabalho técnico.

Em Autoimunidade é muito importante a realização do controlo de qualidade no sentido de standardizar todos os procedimentos, assim, a mestranda teve a oportunidade de verificar que o Laboratório de Autoimunidade participa regularmente no programa internacional de avaliação externa da qualidade, nomeadamente da “United Kingdom National External Assessment Service” (**NEQAS**), do Institute of Quality Assurance-**EUROIMMUN** e do Medical and Biological Laboratories (**MBL**) Quality Control Survey of the Autoantibodies, permitindo com a avaliação dos resultados, a identificação de erros e a implementação de medidas preventivas e corretivas capazes de melhorar o desempenho da técnica e a qualidade dos resultados.

#### **Avaliação Externa da Qualidade:**

##### ➤ **NEQAS**

- Antibodies to Nuclear and Related Antigens – Anticorpos antinucleares (ANA), anticorpos anti-ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla (dsDNA), Centrómero, Antígenos Nucleares solúveis (ENA) – periodicidade seis vezes ao ano
- Acetyl Choline Receptor Antibodies (Ach) – periodicidade quatro vezes ao ano
- Neutrophil Cytoplasmic Antibody (ANCA-c-ANCA, p-ANCA) and Glomerular Basement Membrane Antibodies (GBM), Proteinase 3 (PR3), Mieloperoxidase (MPO) – periodicidade seis vezes ao ano.
- Antibodies in Coeliac Disease (Glutina IgA e IgG, Endomísio IgA, Transglutaminase IgA) - periodicidade seis vezes ao ano.
- General Autoimmune Serology (Anti-mitocondriais M2) – periodicidade seis vezes ao ano.

##### ➤ Institute of Quality Assurance – **EUROIMMUN**

- Autoantibodies against granulocytes (c-ANCA, p-ANCA), Proteinase 3 (PR3), Mieloperoxidase (MPO) – periodicidade anual

- Antibodies against tissue Transglutaminase and Gliadin (Transglutaminase IgA e IgG Giladina IgA e IgG, Endomísio IgG e IgA,) – periodicidade anual
- Autoantibodies against cell nuclei (ANA, dsDNA, SSA, SSB, Sm, RNP, Scl70, Jo1, PMScl, Centrômero) – periodicidade anual

➤ **MBL**

- ANA, dsDNA, ENA, Mitocondriais, Músculo liso – periodicidade anual

### **3.2.1.1. DOENÇAS AUTOIMUNES SISTÉMICAS**

As doenças autoimunes sistêmicas caracterizam-se pelo aparecimento de autoanticorpos dirigidos contra componentes celulares que se encontram distribuídos por todo o organismo, ou seja, têm uma expressão multifocal<sup>9</sup>. Estas doenças comportam essencialmente as conectivites ou doenças do tecido conjuntivo e algumas vasculites.

#### **3.2.1.1.1. Doenças do Tecido Conjuntivo:**

- Artrite Reumatóide-AR
- Lúpus Eritematoso Sistémico-LES
- Esclerodermia-SCL
- Doença Mista do Tecido conjuntivo-DMTC
- Síndrome Sjögren-SS
- Polimiosite-Dermatomiosite-PM/DM

Apesar das suas diferentes expressões clínicas, as doenças do tecido conjuntivo apresentam sintomas e sinais comuns que dificultam o seu diagnóstico. A pesquisa e a identificação de anticorpos antinucleares e anti-citoplasmáticos são importantes auxiliares no diagnóstico diferencial destas patologias. Geralmente, estes anticorpos surgem precocemente no desenvolvimento da doença, numa altura em que a clínica é pobre e pouco específica. Pode-se considerar para alguns anticorpos antinucleares a existência duma relação direta entre o seu título e a evolução da doença, bem como com a resposta à terapêutica instituída. Os anticorpos antinucleares constituem um vasto grupo de autoanticorpos, de diferentes especificidades e que reconhecem os diferentes constituintes celulares. Alguns dos autoanticorpos pesquisados e identificados no Laboratório de Autoimunidade e as respetivas doenças associadas estão representados na seguinte tabela. (Tabela I)

Tabela 1 - Principais anticorpos antinucleares e anti-citoplasmáticos

Localização celular	Especificidade	Patologias associadas
Matriz nuclear	RNP A1 RNP A2 RNP I	Artrite Reumatóide Esclerodermia
Membrana nuclear	Laminas	Hepatite, LES
Cromatina	DNA Histonas	LES LES e Lúpus latrogénico
Nucleoplasma (ENA)	Sm/RNP SS-A SS-B PCNA Scl 70	LES, S. Sjögren e Lúpus Cutâneo S. Sjögren LES Esclerodermia
Centrómero	CENP-A, CENP-B e CENP-C	Síndrome de CREST
Aparelho mitótico	Centríolo Tubulina	Diversas patologias Infecções virusais
Citoplasma	Mitocôndrias Filamentos de actina Filamentos de vimentina Ribossomas	Cirrose Biliar Primária Hepatite auto-imune tipo I Doenças inflamatórias LES

### 3.2.1.1.1. Metodologia para pesquisa, identificação e doseamento de anticorpos antinucleares e anticitoplasmáticos

No Laboratório de Autoimunidade, todas as amostras, após centrifugação são separadas em duas alíquotas (soro) utilizando como substância conservante a Azida de Sódio a 0,2%. Uma das alíquotas (armazenada 2 a 8°C) é integrada na rotina diária do laboratório de acordo com os pedidos efetuados pelo clínico e após rastreio e seleção dos mesmos. A outra alíquota armazenada como amostra reserva a -70°C, é utilizada na eventual confirmação de resultados e quando novos pedidos são solicitados para a mesma amostra. A mestranda verificou que este laboratório possui uma seroteca de soros de doentes com diversos autoanticorpos identificados e que são utilizados como soros controlo positivo na execução das diferentes metodologias.

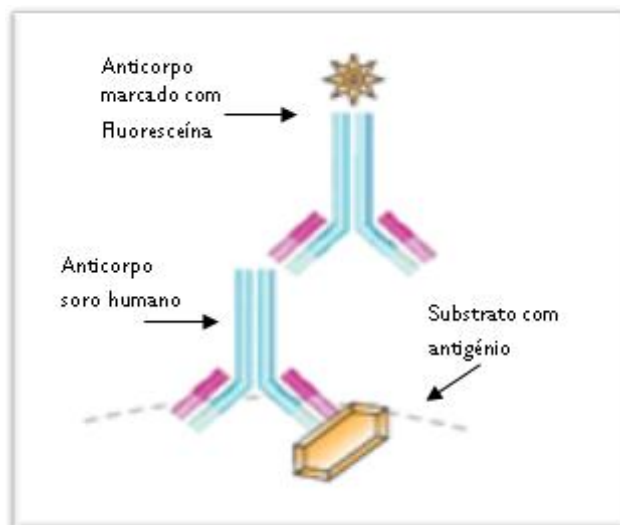
Verificou ao longo do estágio que os métodos de pesquisa e identificação deverão ser adaptados e diferentes consoante os casos. As metodologias utilizadas em autoimunidade são:

- Imunofluorescência Indireta (IFI)
- Ensaio Imunoenzimático (ELISA)
- Immunoblotting
- Radioimunoensaio (RIA)

### a) Imunofluorescência Indireta (IFI)

A Imunofluorescência Indireta (Figura 1) é a metodologia de screening na pesquisa de autoanticorpos, no entanto, existem alguns cuja identificação é apenas efetuada por esta metodologia, dado que o seu padrão de fluorescência é característico.

Figura 1 – Imunofluorescência Indireta (IFI)



A descoberta das células (*human epithelioma type 2 cells* - HEp2) - células epiteliais neoplásicas provenientes de um carcinoma da laringe – veio dar um enorme contributo na pesquisa dos antinucleares (ANA), bem como na deteção de certo tipo de anticorpos anti-citoplasmáticos impossíveis de avaliar em cortes de tecidos. Estas células de proliferação rápida mantêm-se facilmente em cultura, podendo permanecer num estado de repouso e em várias fases da mitose. Devido às características destas células a sua utilização na pesquisa de anticorpos antinucleares e anti-citoplasmáticos, apresenta vantagens:

- Alta sensibilidade e especificidade;
- Dimensões do núcleo – presença de vários nucléolos;

- Presença de células em mitose;
- Homogeneidade de distribuição dos antígenos de célula para célula;
- Identificação de autoanticorpos não visíveis em cortes de tecidos;

Com a IFI, avalia-se a ausência ou presença de fluorescência e suas características nos diferentes constituintes celulares (núcleo, nucléolos e citoplasma), visando a identificação de padrões de fluorescência característicos de determinados autoanticorpos.

No laboratório de autoimunidade dos HUC a IFI é o método de referência para o rastreamento e determinação semi-quantitativa dos ANA e anticorpos anti-citoplasmáticos no soro humano. (Diagrama de interpretação I,II e III)

Diagrama de Interpretação I – Imunofluorescência indireta para pesquisa dos principais anticorpos antinucleares e anti-citoplasmáticos e respectivas metodologias para identificação.

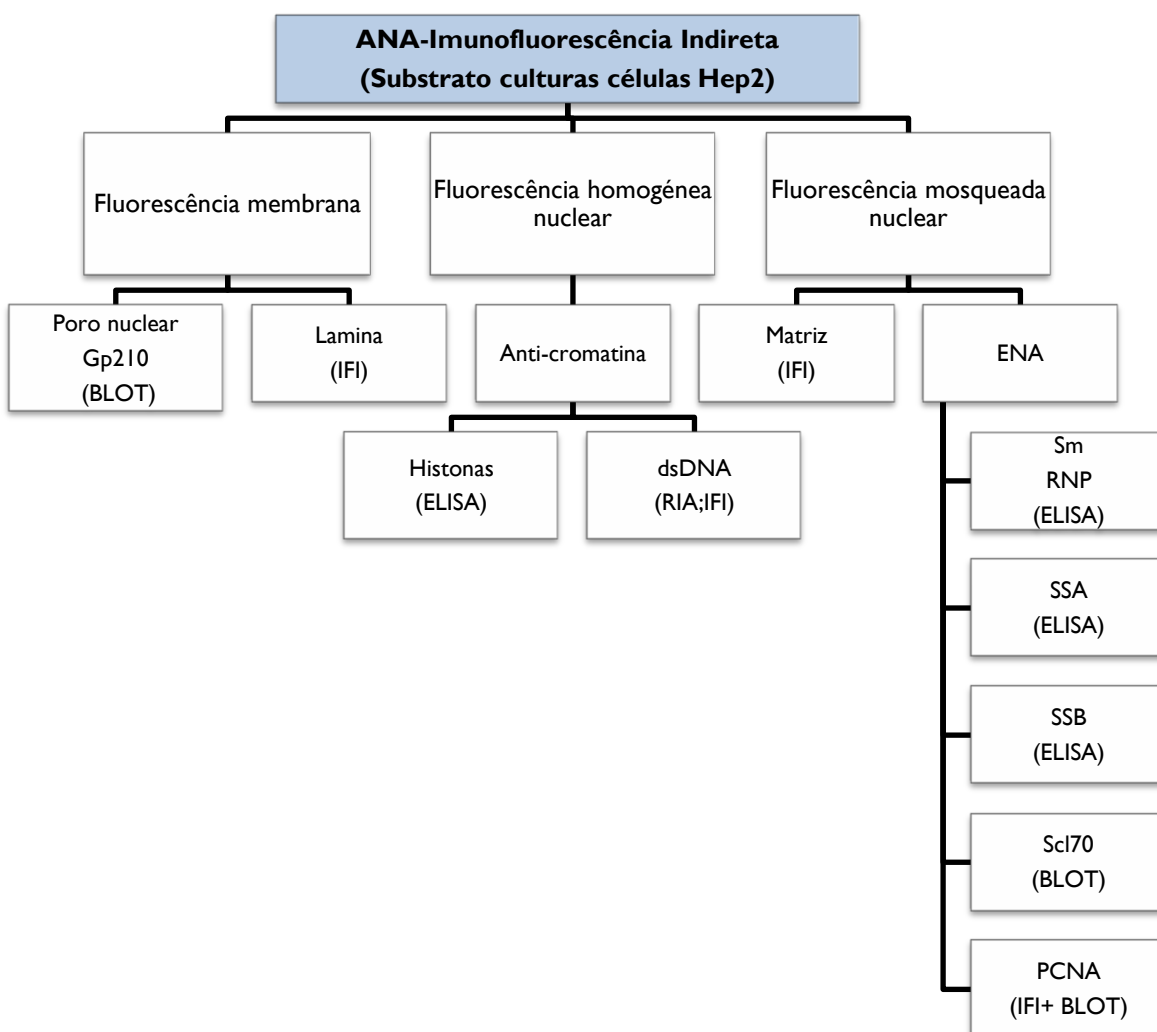


Diagrama de Interpretação II – Imunofluorescência indireta para pesquisa dos principais anticorpos antinucleares e anti-citoplasmáticos e respectivas metodologias para identificação.

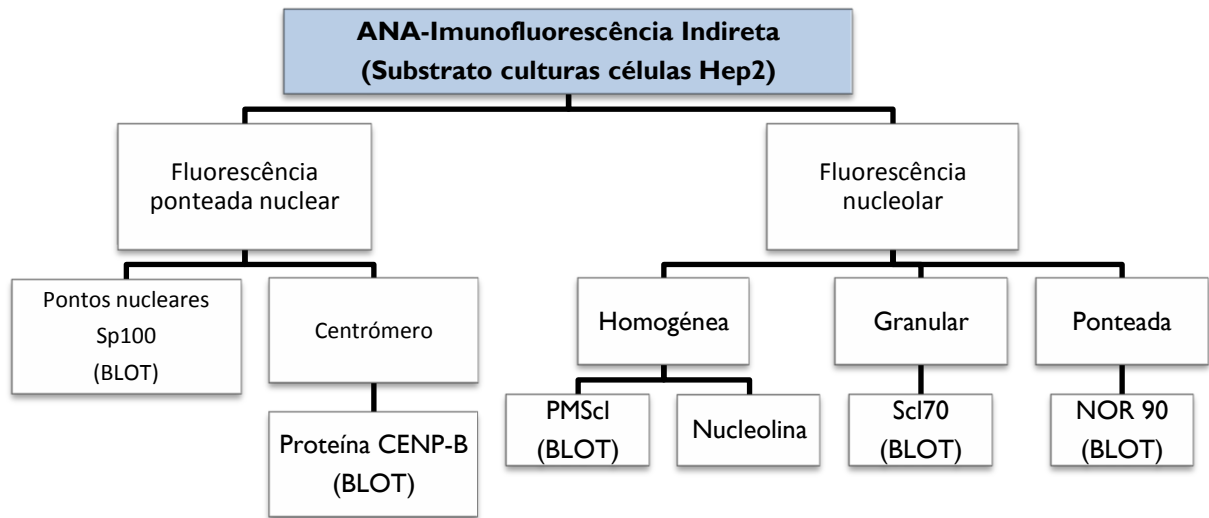
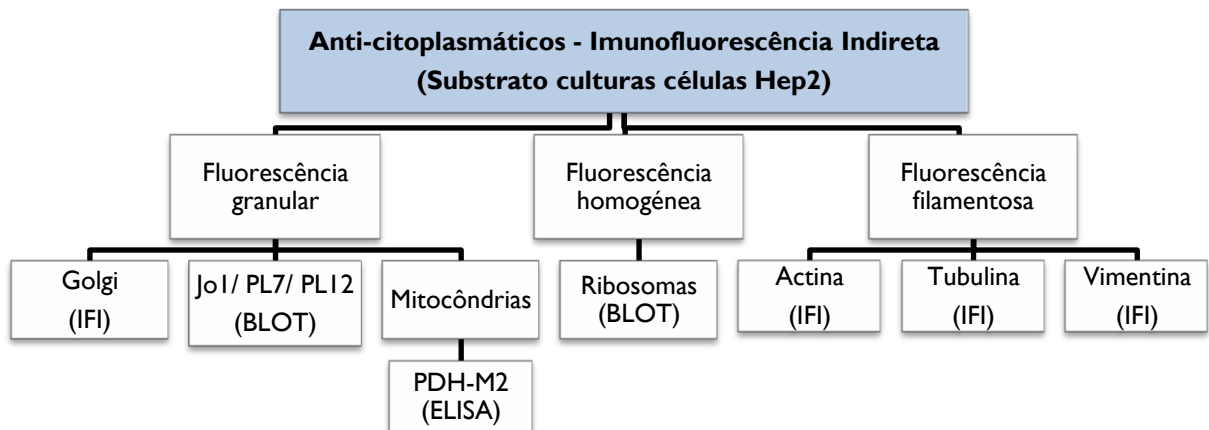


Diagrama de Interpretação III – Imunofluorescência indireta para pesquisa dos principais anticorpos anti-citoplasmáticos e respectivas metodologias para identificação.



Os autoanticorpos dão origem a padrões de fluorescência característicos cuja análise depende do conhecimento e da interpretação subjectiva do investigador, existindo assim uma elevada variabilidade intra e inter laboratorial sendo este o maior problema no diagnóstico das doenças autoimunes.



O incremento de trabalho e a necessidade de standardizar e realizar uma avaliação reprodutível dos testes baseados no método de IFI conduziram o Laboratório de Autoimunidade no sentido da automatização. Devido ao elevado número de amostras manuseadas neste laboratório, a técnica de IFI é automatizada sendo executada no equipamento Mago®, 4 (Figura 2).

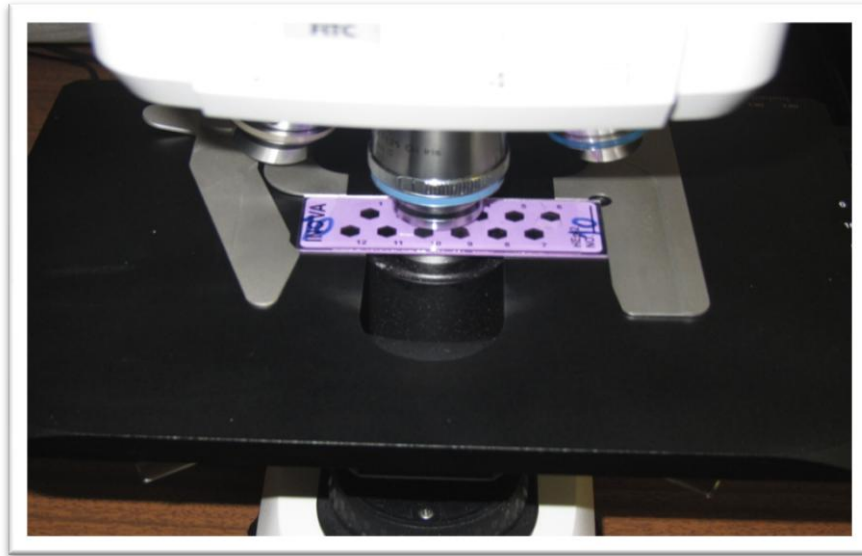
Figura 2 – Imunofluorescência Indireta - Mago®, 4



O **controlo de qualidade** das lâminas é efetuado reservando o poço 1 da primeira lâmina para um controlo positivo (soro controlo com padrão de fluorescência homogéneo com titulação igual ou superior a 1280) e o poço 2 para o controlo negativo (soro controlo negativo para autoanticorpos). Permite a avaliação da qualidade de todo o procedimento, avaliando a qualidade da suspensão celular e do conjugado (anticorpo marcado com fluoresceína), comparando a sua intensidade com os diferentes padrões de fluorescência (se presentes) identificados nos diferentes poços das lâminas.

A observação das lâminas é feita num microscópio de fluorescência “AXIO SCOPE.A1” com a objetiva de imersão 63x (Figura 3).

Figura 3 – Microscópio de fluorescência “AXIO SCOPE.AI”



O padrão de fluorescência orienta para a presença de um determinado tipo de autoanticorpo, havendo necessidade de o confirmar ou identificar por outras metodologias.

#### a) Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Todas as amostras com pedidos de anticorpos antinucleares e anti-citoplasmáticos são submetidas a IFI e paralelamente, a uma técnica imunoenzimática (ELISA), Anti-ENA PoolPlus (ENA Screening - Antígenos Nucleares Solúveis Screening) efetuada no equipamento **Euroimmun Analyser I**, (Figura 5) em que os poços da microplaca de poliestireno estão revestidos com uma *pool* de seis antígenos purificados<sup>10</sup> diferentes: SSA, SSB, Sm, RNP, Scl-70 e Jo-1 (Figura 4). As amostras positivas são submetidas a outra técnica de ELISA, para identificação dos autoanticorpos (ENA) presentes nessas amostras. Nesta técnica utilizam-se tiras de poliestireno adsorvidas com os antígenos específicos, para os autoanticorpos SSA, SSB, Sm e RNP

Figura 4 – Poços revestidos com antígenos purificados

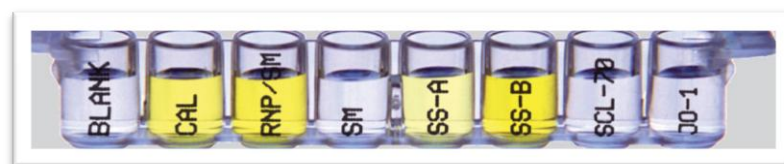


Figura 5 – EUROIMMUN Analyser I, ELISA



### b) Imunoblotting

As amostras que são negativas para SSA, SSB, Sm, RNP, e que se apresentam positivas no teste ENA Screening deve-se à presença de autoanticorpos Jo-1 ou Scl-70, sendo a sua posterior identificação efetuada por Imunoblotting (**ANA Profile 3 EUROLINE®**) no equipamento EUROBlotMASTER da Euroimmun, tendo sempre em consideração o aspeto da fluorescência.

Utiliza tiras de teste revestidas com antígenos purificados e isolados<sup>10</sup>.

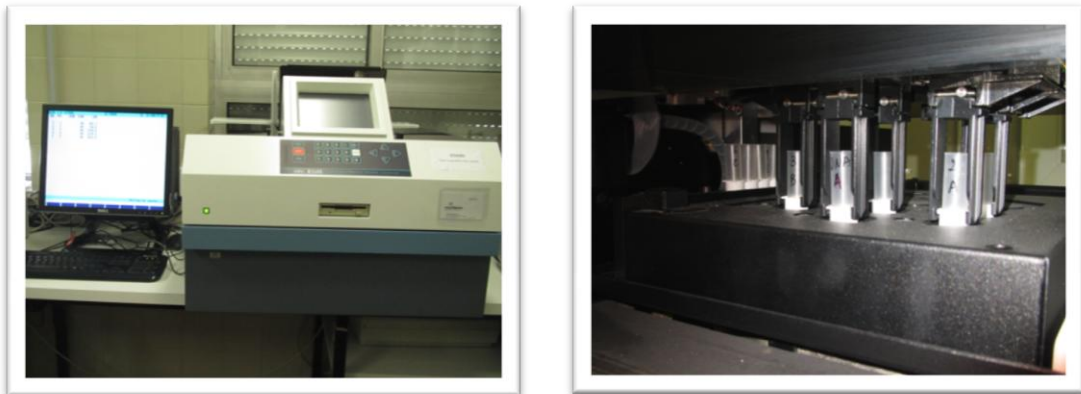
Figura 6 – EUROBlotMASTER da Euroimmun; Imunoblotting – (ANA Profile 3®) – Identificação de anticorpos antinucleares e anti-citoplasmáticos



### c) Radioimunoensaio (RIA)

O Radioimunoensaio clássico fundamenta-se no princípio da ligação competitiva. Este método utiliza, no caso do doseamento de anticorpos anti-ds-DNA, ADN recombinante marcado com  $^{125}\text{I}$  e é concebido para a determinação quantitativa de anticorpos anti-ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla<sup>10</sup>. A radioatividade medida no contador de radiações Gamma (WALLAC 1470 WIZARD® Gamma Counter) será diretamente proporcional ao título de anticorpos presentes no soro (Figura 7).

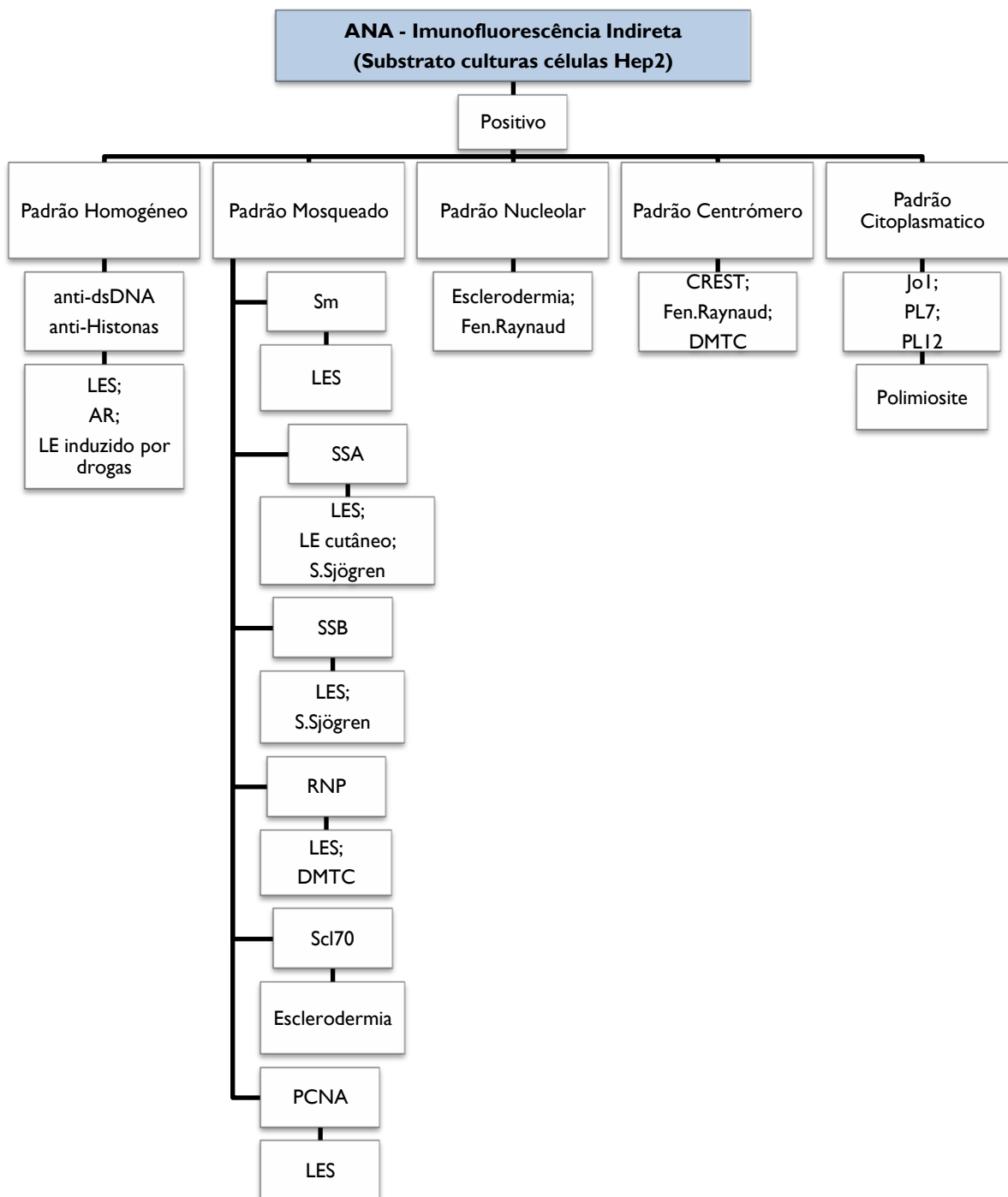
Figura 7 – WALLAC 1470 WIZARD® Gamma Counter



#### 3.2.1.1.1.2. Especificidade dos (ANA) nas doenças do tecido conjuntivo

A avaliação de um doente com suspeita de doença do tecido conjuntivo fundamenta-se na história da doença, no conjunto de sinais e sintomas clínicos e em dados laboratoriais, nomeadamente na pesquisa e identificação de anticorpos antinucleares. Motivado pela existência duma considerável sobreposição dos achados clínicos, bem como pela diversidade dos autoanticorpos presentes, a sistematização do diagnóstico laboratorial nestas alterações contribui para um diagnóstico correto e por vezes mais precoce destas patologias. (Diagrama de interpretação IV)

Diagrama de Interpretação IV - Relaciona o padrão de fluorescência com os anticorpos antinucleares e anti-citoplasmáticos e a sua associação com as patologias autoimunes.



- **SSA (Síndrome de Sjögren's - antígeno A - Ro)** - anticorpos anti-YI-Y5snRNP, duas ribonucleoproteínas de 60 kDa e 52 kDa ;
- **SSB (Síndrome de Sjögren's - antígeno B - La)** - anticorpos que reconhecem uma proteína de 48 kDa associada ao complexo SSA; esta proteína influencia a terminação da transcrição da RNA polimerase III;
- **Sm (Smith)** - Anticorpos dirigidos aos polipeptídeos do complexo Sm-snRNP (pequenas ribonucleoproteínas nucleares) envolvidos na síntese de RNA; auto-anticorpo específico de LES;
- **RNP** - Anticorpos anti-U1-snRNP; pequena ribonucleoproteína nuclear integrante do complexo Sm-snRNP envolvida na síntese de RNA;
- **Scl-70 - Anticorpos anti-DNA-topoisomerase I** - estes anticorpos reconhecem a porção carboxi-terminal da DNA-topoisomerase I, enzima presente no nucleoplasma, nucléolos e na região organizadora nucleolar (NOR). Esta enzima participa na replicação e transcrição do DNA de dupla hélice. Na esclerodermia estes anticorpos aparecem associados com fibrose pulmonar intersticial e envolvimento cutâneo;
- **Jo-I** - Anticorpos anti-histidil-tRNA sintetase;
- **PL7** - Anticorpos anti-threonyl-tRNA sintetase;
- **PL12** - Anticorpos anti-alanyl-tRNA sintetase;
- **dsDNA** - Anticorpos anti-DNA nativo ou de dupla cadeia; doseamento por radioensaio, e confirmação por imunofluorescência indireta utilizando como substrato o hemoflagelado *Crithidia luciliae*. Este protozoário possui um cinetoplasto que contém exclusivamente DNA de dupla cadeia;
- **Centrómero** - estes anticorpos reconhecem três proteínas constituintes do cinetocoro (CENT-B, CENT-A e Cent-C). Aparecem quase que exclusivamente associados com o síndrome de CREST (calcinose, fenómeno de Raynaud, alterações esofágicas, esclerodactilia e telangiectasias).

### 3.2.1.1.2. Vasculites

As vasculites englobam um grupo heterogêneo de patologias caracterizadas por uma inflamação das paredes dos vasos sanguíneos (arteríolas, artérias, capilares, vénulas e veias), com atingimento preferencial dos rins, pulmões e pele, podendo surgir como uma:

- Patologia autoimune primária - vasculites idiopáticas – (Granulomatose de Wegener, Periartrite Nodosa Microscópica, etc);
- Ou associadas a uma doença subjacente - vasculites secundárias.

As vasculites podem resultar da deposição de imunocomplexos na parede vascular, ou serem mediadas pela células –T e/ou pela ligação de autoanticorpos a estruturas da parede dos vasos ou a neutrófilos (vasculites com manifestações pulmonares e renais, associadas aos anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos – ANCA).

#### a) Anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA)

Os ANCA são anticorpos que reagem especificamente com antígenos presentes no citoplasma dos neutrófilos, em particular a Proteinase 3 (PR3) e a Mieloperoxidase (MPO). Distintos padrões de fluorescência correspondentes a especificidades antigénicas diferentes.

Os dois padrões de fluorescência mais comuns são:

##### ➤ Padrão c-ANCA

Caracteriza-se por uma fluorescência granular fina do citoplasma, correspondendo, na maioria dos casos, à presença de anticorpos que reagem com Proteínase 3 e que são específicos da granulomatose de Wegener<sup>9</sup>.

**Método:** IFI (substrato neutrófilos humanos fixados em etanol)

**Tipo de amostra:** soro

##### ➤ Padrão p-ANCA

Caracteriza-se por uma fluorescência de aspeto homogêneo de localização perinuclear, que se deve á presença de anticorpos que podem reagir com diferentes constituintes do citoplasma dos neutrófilos. A maioria reconhece a mieloperoxidase (MPO), uma enzima dos grânulos  $\alpha$ ; a presença destes autoanticorpos caracteriza a periartrite nodosa microscópica<sup>9</sup>.

**Método:** IFI (substrato neutrófilos humanos fixados em etanol)

**Tipo de amostra:** soro

### b) Anticorpos anti-Proteinase 3 (PR3)

Os anticorpos anti-PR3 são sensíveis e específicos para a granulomatose de Wegener. O seu doseamento permite avaliar a fase e a atividade da doença. Apesar da forte associação entre os anticorpos anti-PR3 e a granulomatose de Wegener, existe uma pequena percentagem de doentes com poliangeite microscópica, glomerulonefrite necrosante com anticorpos anti-PR3 positivos<sup>9</sup>.

**Método:** Imunoensaio fluoroenzimático

**Tipo de amostra:** soro

### c) Anticorpos anti-Mieloperoxidase (MPO)

Os anticorpos anti-MPO são detetados em doentes com glomerulonefrite necrosante, em doentes com periarterite microscópica e na granulomatose de Wegener<sup>9</sup>.

**Método:** Imunoensaio fluoroenzimático

**Tipo de amostra:** soro

## 3.2.1.2. DOENÇAS AUTO-IMUNES ESPECÍFICAS DE ÓRGÃO

As doenças específicas de órgão caracterizam-se pelo aparecimento de autoanticorpos dirigidos contra antígenos existentes apenas num determinado órgão ou que provocam patologia apenas em determinado órgão (Tabela 2).

Tabela 2 - Principais anticorpos nas doenças específicas de órgão

Órgão	Anticorpo	Patologias associadas
Fígado	ANA, Actina LKMI AMA-M2 Gp210,Sp 100	HAI tipo I HAI tipo II Cirrose Biliar Primária
Intestino	Endomísio, Transglutaminase IgG e IgA Gliadina IgG e IgA	Doença Celíaca
Pâncreas	ICA, GAD IA2, Insulina	Diabetes Insulinodependente
Músculo	Recetores da Acetilcolina	Miastenia Gravis



A variedade de autoanticorpos associados a estas doenças é imensa. Assim, a mestranda optou por demonstrar alguns dos autoanticorpos e respetivos padrões de fluorescência associados às doenças específicas de órgão mais comuns.

### **3.2.1.2.1. Hepatite autoimune tipo I**

**Anticorpos antinucleares (ANA)** – padrão homogéneo com anticorpos anti-dsDNA negativos.

**Método:** IFI

**Tipo de amostra:** soro

#### **a) Anticorpos anti-músculo liso (anti-ACTINA)**

A actina é uma proteína de 42 KDa presente em todas as células eucariotas. Esta proteína pode apresentar-se sob uma forma monomérica (globular ou G-actina) e uma forma filamentosa (F-actina). Os filamentos de actina são constituídos por duas cadeias de monómeros de G-actina (uniformemente orientados) enroladas sob a forma de uma dupla hélice. Existem diferentes isoformas de actina, sendo a isoforma  $\beta$  a que está presente no músculo liso, ligando-se esta às moléculas de miosina numa proporção de 10 para 1. Nas outras células, a actina representa 5 a 30 % das proteínas do citoplasma, constituindo um suporte mecânico para diversas estruturas e forma com as moléculas de miosina sistemas de contração responsáveis pelos movimentos celulares<sup>9</sup>.

**Método:** IFI (substrato cortes de estômago, rim e fígado de rato/células da aorta de rato)

**Tipo de amostra:** soro

### **3.2.1.2.2. Hepatite autoimune tipo II**

#### **a) Anticorpos anti-microssomas hepáticos e renais - LKM1**

Estes anticorpos reconhecem especificamente a isoenzima 2D6 do citocromo monooxidase P450 envolvido no metabolismo de diversas drogas. Esta isoenzima encontra-se especificamente no retículo endoplasmático do hepatócito e das células dos túbulos proximais do rim. Através de técnicas de biologia molecular foi possível identificar os epítomos reconhecidos pelo anti-LKM1<sup>9</sup>.

**Método:** IFI (substrato cortes de estômago, rim e fígado de rato/células da aorta de rato) /Imunoblotting

**Tipo de amostra:** soro

### 3.2.1.2.3. Cirrose Biliar Primária (CBP)

#### a) Anticorpos anti-mitochondriais AMA - M2

Anticorpos anti-mitochondriais (AMA) dirigidos contra o complexo enzimático da piruvato-desidrogenase E2 (PDH-E2 ou M2), estão especificamente associados a cirrose biliar primária (CBP). São detetados em 90-95% dos doentes com CBP e apresentam uma especificidade próxima dos 100%, podendo preceder o aparecimento de sinais clínicos por vários anos. Nem o título de AMA, nem o seu isotipo estão associados com a severidade da doença ou predizem o seu aparecimento. Ocasionalmente podem ser identificados noutras patologias hepáticas, nomeadamente, na hepatite crónica ativa, na hepatite criptogénica e em doentes com clínica sugestiva de patologia hepática, mas sem evidências laboratoriais de doença<sup>9</sup>.

**Método:** IFI (substrato cortes de estômago, rim e fígado de rato/células da aorta de rato) / ELISA (Piruvato-desidrogenase –E2 PDH)

**Tipo de amostra:** soro

#### b) Anticorpos anti-poro nuclear

O complexo do poro nuclear é constituído por um grande número de proteínas específicas, das quais se destaca a Gp210 (Glicoproteína de 210KDa). Esta proteína assegura a ligação do complexo poro nuclear à parede das membranas nucleares. Os anticorpos dirigidos ao poro nuclear demonstram uma associação mais específica com a cirrose biliar primária do que os anti-lamina nuclear. Os anticorpos anti-Gp210 estão associados com um estadio mais avançado da doença e a um prognóstico mais reservado<sup>9</sup>.

**Método:** IFI (substrato de células Hep2) / Imunoblotting

**Tipo de amostra:** soro

### c) Anticorpos anti - múltiplos pontos nucleares

Estes anticorpos presentes em 30 % dos casos de CBP reconhecem uma proteína de 100 KDa (sp100) constituinte dos corpos nucleares. Estes organitos encontram-se no espaço intercromatínico estando o seu número dependente da fase do ciclo celular<sup>9</sup>.

**Método:** IFI (substrato de células Hep2) / Imunoblotting

**Tipo de amostra:** soro

### d) Outros anticorpos antinucleares na CBP

Podem ainda ser identificados outros anticorpos que caracterizam doenças do tecido conjuntivo, frequentemente associadas com a CBP nomeadamente, anticorpos anti-centrómero na síndrome de CREST e anticorpos anti-SSA/SSB na síndrome de Sjögren. A associação da CBP com a Esclerodermia é designada por síndrome de Reynolds<sup>9</sup>.

#### 3.2.1.2.4. Doença celíaca

A doença celíaca é caracterizada clinicamente por malabsorção intestinal após a ingestão de glúten e histologicamente, por atrofia das vilosidades da mucosa do intestino delgado. Está comprovado que estas alterações da mucosa revertem favoravelmente quando se elimina o glúten da dieta.

A doença celíaca é uma doença autoimune na medida em que existe uma resposta humoral e celular à gliadina, após a ingestão de alimentos com glúten<sup>9</sup>.

A pesquisa e o doseamento dos autoanticorpos presentes na doença celíaca são importantes para o seu diagnóstico e monitorização.

### a) Anticorpos anti-endomísio IgA

Os anticorpos anti-endomísio do tipo IgA ligam-se ao tecido conjuntivo que rodeia o músculo liso e produzem um padrão de fluorescência característico. A sua sensibilidade é cerca de 90 % e a especificidade aproxima-se dos 100 %. A pesquisa de anticorpos anti-endomísio é negativa em doentes tratados.

**Método:** IFI (substrato cortes de esófago de primata)

**Tipo de amostra:** soro

**b) Anticorpos anti-transglutaminase IgA e IgG**

Estes anticorpos são os mais sensíveis e específicos para o diagnóstico de doença celíaca. A enzima transglutaminase encontra-se no endomísio e corresponde ao alvo antigénico da doença celíaca<sup>9</sup>.

**Método:** Imunoensaio fluoroenzimático

**Tipo de amostra:** soro

**c) Anticorpos anti-gliadina IgA e IgG**

A gliadina é um componente do glúten. Os níveis de anticorpos anti-gliadina estão geralmente elevados em doentes com doença celíaca não tratada; no entanto, têm uma sensibilidade e especificidade moderadas. O doseamento dos anticorpos anti-gliadina IgG é útil nos pacientes que apresentam deficiência de IgA<sup>9</sup>.

**Método:** Imunoensaio fluoroenzimático

**Tipo de amostra:** soro

**3.2.1.2.5. Diabetes Mellitus Insulino - Dependente (DMID)**

A diabetes *Mellitus* insulino-dependente (DMID) ou diabetes tipo I é uma doença autoimune provocada pela destruição das células  $\beta$  pancreáticas secretoras de insulina. O aparecimento de sinais clínicos de doença é precedido de uma inflamação crónica das células dos ilhéus pancreáticos e destruição das células  $\beta$ . A evidência de sinais clínicos sugestivos de DMID só ocorre após a destruição de 80 a 90 % das células  $\beta$  e este processo pode demorar anos até estar completo. Como reflexo do processo autoimune de destruição das células  $\beta$  e dos ilhéus pancreáticos, podem ser detetados anticorpos dirigidos contra as células  $\beta$  e seus produtos de secreção na fase pré-clínica da doença<sup>9</sup>.

**a) Anticorpos anti-ilhéus de Langherans (ICA)**

Estes anticorpos reconhecem antígenios citoplasmáticos de todas as células dos ilhéus de Langherans, com reatividade mais intensa para as células  $\beta$ . São usados como marcadores de risco de desenvolvimento de DMID para títulos elevados de ICA o valor preditivo aproxima-se de 100% em parentes de primeiro grau de doentes com DMID.

**Método:** IFI (substrato cortes de pâncreas de macaco)

**Tipo de amostra:** soro

### **b) Anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico - GAD 65**

A descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) é uma enzima que promove a formação de ácido gama-aminobutírico (GABA) a partir do glutamato. Foram identificadas duas isoformas, uma com peso molecular de 65 KDa (GAD 65) presente nos ilhéus de Langherans e no cérebro, e outra com peso molecular de 67 KDa (GAD 67) presente exclusivamente no cérebro. Os anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico identificados na DMID reagem com os epítomos do domínio central e C-terminal do GAD 65. Estes anticorpos estão presentes em 70 % dos doentes no momento do diagnóstico, surgindo precocemente antes dos sinais clínicos de doença. Assim sendo, o seu doseamento é utilizado na identificação dos indivíduos que vão desenvolver DMID.

Devido à sua associação com a destruição das células dos ilhéus de Langherans, estes anticorpos podem ser utilizados na diferenciação entre a DMID e a diabetes mellitus não insulino-dependente (DMNID), bem como na identificação dos doentes com DMNID que necessitarão de insulina.

**Método:** RIA

**Tipo de amostra:** soro

### **c) Anticorpos anti-IA-2**

Estes anticorpos reconhecem uma proteína da família das tirosina-fosfatase presente nas células dos ilhéus de Langherans, designada por IA-2. A sua determinação associada às do GAD 65 e dos anticorpos anti-insulina é fundamental no diagnóstico e na confirmação da DMID, demonstrando esta associação um valor preditivo superior ao dos anticorpos anti-ilhéus de Langherans (ICA).

**Método:** RIA

**Tipo de amostra:** soro

### **d) Anticorpos anti-insulina ( AAI)**

Os anticorpos anti-insulina (AAI) constituem um dos marcadores de risco imunológico do desenvolvimento de DMID. O seu doseamento deve ser efetuado antes da instituição da insulino-terapia.

**Método:** RIA

**Tipo de amostra:** soro

### 3.2.1.2.6. Miastenia Gravis

A *Miastenia gravis* é uma patologia neuromuscular caracterizada por fadiga e atrofia dos músculos esqueléticos. Pode afetar indivíduos de todas as idades e de ambos os sexos, com maior incidência na mulher entre os vinte e trinta anos e no homem entre os cinquenta e os sessenta anos.

A alteração fundamental desta patologia é a perturbação da transmissão neuromuscular, aliada a uma diminuição dos recetores de acetilcolina a nível da junção neuromuscular. Na maioria dos casos este processo é mediado por anticorpos dirigidos aos recetores de acetilcolina, impedindo a ligação da acetilcolina libertada pelas terminações nervosas à membrana muscular pós-sináptica, com a consequente alteração da transmissão neuromuscular<sup>9</sup>.

#### a) Anticorpos anti-recetores de acetilcolina

Os recetores da acetilcolina são formados por glicoproteínas membranares reunidas em subunidades. No músculo do indivíduo adulto estes recetores encontram-se presentes unicamente na membrana pós-sináptica.

Existem diferentes tipos de anticorpos anti-recetores da acetilcolina, uns bloqueiam o local de combinação dos recetores com a acetilcolina, outros dirigem-se aos epítomos situados próximos do local de ligação da acetilcolina aos recetores. Na *Miastenia gravis* os anticorpos presentes pertencem essencialmente à segunda categoria ou a ambas, provocando a destruição dos recetores na presença do complemento ou das células “*natural killer*”. Este processo tem como consequência a diminuição do número de recetores na superfície do músculo esquelético<sup>9</sup>.

**Método:** RIA

**Tipo de amostra:** soro

#### 4. CONCLUSÃO

A conclusão mais importante que a mestranda tirou após a realização do estágio foi, sem dúvida, que é uma mais valia aliar a teoria à prática, para uma melhor compreensão, consolidação e aplicação dos conhecimentos adquiridos ao longo do Mestrado em Análises Clínicas. Nesta perspetiva, considera que o mestrado constituiu uma oportunidade única, na medida em que adquiriu uma base sólida que facilita a integração e o desempenho num laboratório de análises clínicas, permitiu um conhecimento mais alargado de várias áreas de atividade e uma melhor compreensão dos fundamentos relativos à metodologia utilizada na rotina laboratorial. Esse conhecimento permite ter a capacidade de análise de resultados necessária à sua validação final.

Sentiu uma enorme responsabilidade sobre o que é trabalhar com amostras de doentes e para o doente, na medida em que há que garantir a qualidade de todo o processo analítico, desde a colheita até à saída do resultado. Concluiu também, que é muito importante trabalhar em equipa e não haver separação de saberes, porque até para executar uma técnica é preciso ter conhecimentos.

A mestranda sugere uma melhor planificação do estágio, em que os mestrandos vindouros possam ter um orientador no local de estágio e na faculdade.

A nível profissional e pessoal, sente que está melhor preparada para o futuro, capaz de responder às exigências do dia-a-dia de um laboratório de análises clínicas.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- [1]. Sacher, Ronald A. ; McPherson, Richard A.; Widman-Interpretação Clínica dos Exames Laboratoriais; 11ª edição-2002; Editora Manole.
- [2]. Burtis, Carl A.; Ashwood, Edward R.; Bruns, David E.; Tietz- Fundamentos de Química Clínica; 6ª edição-2008; Editora Elsevier.
- [3]. Caquet, René; Guia Prático de Análises Clínicas; 1ª edição-2004; Editora Climepsi.
- [4]. Mikulcik, Patrícia; Análise Rápida- gases no sangue e muito mais; 1ª edição-2008; Siemens
- [5]. Ravel, Richard; Laboratório Clínico-Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais; 6ª edição-1997; Editora Guanabara Koogan S.A.
- [6]. L. Nogueira Prista e col., Tecnologia Farmacêutica, vol. 1, 6ª edição, 2003, Fundação Calouste Gulbenkian.
- [7]. Dickstein K; Natriuretic peptides in detection of heart failure; The Lancet; 1998.
- [8]. Arosa, Fernando A.; Cardoso, Elsa M.; Pacheco, Francisco C.; Fundamentos de Imunologia; 1ª Edição-2007; Editora LIDEL.
- [9]. Humbel, René; Auto-Anticorps et Maladies Auto-Immunes; 2ª Edição-1997; Elsevier.
- [10]. Burmester, Gerd-Rudiger; Pezzuto, Antonio; Imunologia – Texto e Atlas; 1ª edição-2005; Editora LIDEL.
- [11]. Bradwell, A.R.; Hughes, R.G.; Harden, E.L.; Atlas of HEp-2 patterns; 2ª edition-2003; Editor British Library.