



Jorge Miguel Freitas Rodrigues Paiva

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Mário João Roque e pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa, e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho, 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Jorge Miguel Freitas Rodrigues Paiva

Relatório de Estágio em Análises Clínicas

*Relatório de Estágio realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra*

Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra

Orientadores:

Dr. Mário João Roque

Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa

Julho, 2014

Universidade de Coimbra

É com muito agrado que início este relatório agradecendo a todas as pessoas que me acompanharam durante este ano de trabalho. A oportunidade de realizar este estágio de final do Mestrado em Análises Clínicas constituiu uma importante mais valia para a minha formação profissional e pessoal. Deste modo agradeço ao Dr. Mário João Roque e à Dr.ª Cristiana Canha por possibilitarem a realização do estágio, assim como pelo acompanhamento, disponibilidade e apoio sempre prestados. Agradeço também à Professora Doutora Leonor Almeida pela preocupação constante e pelo seu esforço em me oferecer o melhor estágio possível.

Índice

<i>Abreviaturas</i>	IV
<i>Resumo</i>	VI
<i>Abstract</i>	VII
Introdução	I
Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra	2
Estágio	5
Hematologia	9
Hematopoiese.....	9
Caracterização dos Elementos Celulares.....	15
Hemostase: Coagulação e Fibrinólise.....	21
Procedimentos de Rotina em Hematologia.....	25
Bioquímica	38
Doseamento de Iões.....	38
Glicémia e Diagnóstico da Diabetes.....	42
Estudo do Metabolismo dos Lípidos.....	45
Avaliação da Função Renal.....	48
Avaliação da Função Hepática.....	51
Marcadores de Lise Muscular.....	54
Estudo do Metabolismo do Ferro.....	56
Avaliação de Marcadores de Inflamação.....	59
Outros Parâmetros Analíticos de Interesse.....	61
Conclusão	63
Bibliografia	64

Abreviaturas

ADP – Adenosina difosfato
AFP – Alfa feto-proteína
ALT – Alanina Transaminase
APTT – Tempo de Activação Parcial de Tromboplastina
AST – Aspartato Transaminase
ATP – Adenosina trifosfato
CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
CID – Coagulação Intravascular Disseminada
CK – Creatina Cinase
CSF-Meg – *Megacaryocyte Colony Stimulating Factor*
DNA – *Deoxyribonucleic Acid*
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
FSH – *Follicle Stimulating Hormone*
GS – Gelose de Sangue
HbA1c – Hemoglobina Glicada A1c
HBG – Hemoglobina
HCT – Hematócrito
HDL – *High Density Lipoprotein*
HIV – *Human Immunodeficiency Virus*
HMWK – *High Molecular Weight Kininogen*
INR – *International Normalized Ratio*
ISI – Índice de Sensibilidade Internacional
LDH – Lactato Desidrogenase
LDL – *Low Density Lipoprotein*
LH – *Luteinizing Hormone*
MBP – *Major Basic Protein*
MCH – Hemoglobina Corpuscular Média
MCHC – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
MCV – Volume Médio Curpusclar
MPV – Volume Médio Plaquetar
NAD – Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
PCR – Proteína C-Reactiva

PDW – *Platelet Distribution Width*
PLT – *Platelets*
PT – *Tempo de Protrombina*
PTGO – *Prova de Tolerância à Glucose Oral*
RBC – *Red Blood Cell*
RDW – *Red Cell Distribution Width*
RNA – *Ribonucleic Acid*
TIBC – *Total Iron Binding Capacity*
TSH – *Thyroid Stimulating Hormone*
UIBC – *Unsaturated Iron Binding Capacity*
VLDL – *Very Low Density Lipoprotein*
WBC – *White Blood Cell*

Resumo

Neste relatório serão descritas todas as atividades realizadas durante o estágio curricular do último ano do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

O estágio incluiu a integração nos sectores de Hematologia e Bioquímica e Imunologia do Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, sob orientação do Dr. Mário João Roque, e no sector de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), sob orientação da Dr.^a Cristiana Canha.

O estágio no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra iniciou-se a 7 de Outubro de 2013 e terminou a 30 de Abril de 2014. O estágio no CHUC iniciou-se a 12 de Maio de 2014 e terminou a 16 de Junho de 2014.

Em termos estruturais, o relatório inclui uma breve caracterização do Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra e da experiência aí adquirida, assim como do sector de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do CHUC e do trabalho realizado durante esse estágio. Em seguida apresenta-se uma descrição mais detalhada do trabalho desenvolvido nos sectores de Hematologia e Bioquímica.

Abstract

In the following paper will be described the activities developed in the curricular internship of the last year of the Master degree in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of University of Coimbra.

The internship included the integration in Hematology and Biochemistry and Immunology sectors of the Clinical Analysis Laboratory of the Centro de Saúde Militar of Coimbra, oriented by Dr. Mário Roque, and in the Microbiology sector of the Clinical Pathology Laboratory of the Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), under the guidance of Dr.^a Cristiana Canha.

The internship at the Clinical Analysis Laboratory of the Centro de Saúde Militar of Coimbra took place between October 7 of 2013 and April 30 of 2014. The internship at CHUC began on May 12 of 2014 and ended on June 16 of 2014.

This paper includes a brief description of the Clinical Analysis Laboratory of the Centro de Saúde Militar of Coimbra and of the acquired experience during that period, and also of the Microbiology sector of the Clinical Pathology Laboratory of the CHUC and the work done there. This initial description is followed by a more detailed characterization of the work developed in Hematology and Biochemistry sector.

Introdução

No segundo e último ano do Mestrado de Análises Clínicas os alunos têm que realizar um estágio curricular com a duração de 600 horas. Após um primeiro ano de várias unidades curriculares que proporcionam as noções básicas de todas as áreas científicas inerentes a um laboratório de análises clínicas, surge então a oportunidade de passar a teoria à prática consolidando todo o conhecimento adquirido ao longo do mestrado.

Assim, surgiu a oportunidade de estagiar no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra. Este estágio iniciou-se a 7 de Outubro de 2013 e tinha como objectivo o maior envolvimento possível no trabalho diário do laboratório. Começou por se acompanhar o processo de integração da informação do doente no sistema informático do laboratório e a colheita e recepção de amostras. Depois seguiram-se cerca de 8 meses a trabalhar nos sectores de Hematologia e Bioquímica e Imunologia. Durante este período o objectivo fundamental foi aprender todo o processamento das amostras para a determinação dos vários parâmetros analíticos.

Em relação à formação na Microbiologia abriu-se uma excepção. Uma vez que no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar não há um fluxo nem uma variedade de amostras muito grande nesta área, esta componente do estágio foi realizada no sector de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra durante os meses de Maio e Junho.

No relatório de estágio é proposto aos alunos que aprofundem a descrição de duas áreas científicas onde trabalharam. Assim, vão ser focadas as áreas de Hematologia e de Bioquímica.

Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra

O Centro de Saúde Militar de Coimbra tem como principal objectivo o apoio a várias unidades militares, bem como às forças de segurança e os seus familiares directos. O Laboratório de Análises Clínicas é responsável pela recepção e colheita das amostras e determinação dos parâmetros pretendidos/requisitados. O fluxo de amostras diário é de 30 a 40 amostras mas ao longo do ano existem dias específicos em que o número de amostras aumenta significativamente. Momentos como a realização das Provas de Aptidão Física ou análises a uma determinada unidade militar elevam o fluxo para números entre as 100 e as 200 amostras. Assim, este é um laboratório que para além do seu trabalho diário normal, precisa de ter uma capacidade de resposta aumentada quando necessário.

Estrutura Física e Recursos Humanos

O Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra está dividido em três sectores principais: Hematologia, Bioquímica e Imunologia e Microbiologia. Qualquer um destes sectores funciona em espaços físicos independentes, sendo dotados de todo o equipamento necessário à realização das diversas provas analíticas.

Sector de Hematologia

Neste sector, que ocupa uma sala, são realizados hemogramas, provas de coagulação, determinação de velocidade de sedimentação globular, doseamento de hemoglobina glicosilada, coloração e observação ao microscópio do esfregaço de sangue periférico e outras técnicas.

Sector de Bioquímica e Imunologia

Este sector ocupa uma sala com um aparelho automático, o *Architect ci8200* da *Abbott Diagnostics*, que possui dois módulos distintos: um correspondente aos testes bioquímicos e outro correspondente aos testes imunológicos. São também realizadas análises toxicológicas e outras técnicas manuais. Numa sala anexa existe também um *mini VIDAS* da *bioMérieux* para a determinação de diversos parâmetros relacionados com alergologia.

Sector de Microbiologia

Este sector, que ocupa uma sala, recebe e analisa produtos biológicos de diferentes natureza para exame bacteriológico, parasitológico ou micológico, conforme o produto ou o pedido. Neste sector são também realizadas as sumárias de urina e a observação do sedimento urinário.

O laboratório inclui ainda uma série de outros espaços:

- × Sala Administrativa;
- × Sala de Espera;
- × Sala de Colheitas;
- × Sala de Esterilização e Lavagem de Material;
- × Gabinete do Director Técnico;
- × Sala de Reuniões;
- × Divisões para arrumação de material.

Recursos Humanos

Em termos de recursos humanos, o Laboratório é constituído por um especialista responsável, o Tenente-Coronel Farmacêutico Dr. Mário João Roque, Mestre em Saúde Pública, especialista de Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos, técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública, funcionários administrativos e auxiliares.

Aspectos Organizacionais

A cada utente corresponde um folha de requisição de análises, que dá a conhecer aos técnicos de Análises Clínicas o tipo de amostra e as condições de colheita adequadas. Após a colheita, as folhas de requisição dos utentes são levadas para o Sector de Bioquímica e Imunologia para que os técnicos verifiquem se é necessário enviar alguma alíquota para outro laboratório. Isto acontece quando surgem análises mais raras que não são realizadas no laboratório.

Os tubos e contentores de colheita para recolha e armazenamento da amostra a analisar chegam a cada sector devidamente identificados com um número e um código de barras, atribuído de acordo com a ordem de admissão dos utentes.

Cada exame a efectuar fica registado no sistema informático do laboratório, SISLAB, desde os computadores da sala administrativa, onde o doente é admitido, até ao sector onde o teste é realizado. Após a obtenção dos resultados estes são disponibilizados no sistema informático para que posteriormente possam ser avaliados e validados pelo director técnico, consoante determinados critérios. De seguida, é então possível à parte administrativa facultar os resultados das análises aos utentes.

Controlo de Qualidade

No Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra existe uma preocupação constante com a qualidade dos serviços prestados, nomeadamente dos exames realizados e resultados obtidos. Deste modo são efectuadas avaliações regulares, sistemáticas e rigorosas da boa execução das técnicas e avaliações periódicas da exactidão dos resultados. A avaliação das técnicas e do respectivo modo de execução é levada a cabo por equipas especializadas na área, que dispõem de manuais de procedimento para a correcta execução de técnicas, relativas a cada sector.

As avaliações periódicas da precisão e exactidão dos resultados baseiam-se no uso de controlos internos e externos. O controlo interno é efectuado diariamente ou semanalmente, dependendo do aparelho automático ou do teste em causa, no início dos trabalhos do dia, com amostras estabilizadas fornecidas por laboratórios de referência. As amostras fornecidas apresentam longos períodos de estabilidade e referem normalmente três níveis distintos: um nível alto, um nível médio e um nível baixo, com os valores respectivos bem definidos. A realização deste controlo interno permite avaliar a precisão, dos resultados obtidos, sendo estes diariamente compilados e comparados com os valores de referência do controlo usado. A obtenção de resultados aceitáveis para estes controlos internos é condição necessária para a validação dos resultados da análise das amostras processadas.

O controlo externo executado neste laboratório permite avaliar a exactidão dos seus resultados e é fornecido pelo laboratório de referência nacional, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge ou pelo laboratório de referência internacional, RIQAS. As amostras daí originárias para os parâmetros a controlar apresentam valores que são desconhecidos no laboratório, sendo tratadas como qualquer amostra de um doente. Os resultados obtidos são enviados de volta para o laboratório de referência, no qual são avaliados e devolvidos ao laboratório permitindo assim uma avaliação da qualidade dos resultados fornecidos.

Estágio

O estágio iniciou-se a 7 de Outubro de 2013. Na primeira semana de estágio o principal objectivo foi observar todo o processo pré-analítico, desde o momento do atendimento, passando pela introdução de todos os dados do utente no sistema informático até à colheita. Na semana seguinte teve início o trabalho no sector de Bioquímica e Imunologia, até ao dia 13 de Dezembro de 2013. No dia 6 de Janeiro de 2014 começou o estágio no sector de Hematologia que durou até ao dia 4 de Abril de 2014. O restante mês de Abril foi passado no sector de Bioquímica e Imunologia para recordar tudo o que foi aprendido nos primeiros dois meses de estágio.

Devido ao pouco fluxo e pouca variedade de amostras no que toca à área da Microbiologia no laboratório, esta componente foi realizada no Laboratório de Microbiologia Serviço de Patologia Clínica do Hospital Universitário de Coimbra, entre os dias 12 de Maio e 13 de Junho de 2014.

No relatório irão ser aprofundadas as áreas da Hematologia e da Bioquímica.

Imunologia

Na imunologia o trabalho consistiu principalmente nas provas analíticas realizadas pelo módulo da imunologia do *Architect ci8200* da *Abbott Diagnostics*. Neste módulo determinavam-se os parâmetros analíticos abaixo indicadas.

1. Marcadores Tumorais
 - 1.1. Alfa-feto proteína (AFP);
 - 1.2. PSA livre e total.
2. Marcadores da Tiroide
 - 2.1. Anti-Tg;
 - 2.2. Anti-TPO;
 - 2.3. T3 livre e total;
 - 2.4. T4 livre e total;
 - 2.5. TSH.
3. Marcadores Metabólicos
 - 3.1. Vitamina B12;
 - 3.2. Folato.
4. Imunoglobulinas
 - 4.1. IgG
 - 4.2. IgM
 - 4.3. IgA
 - 4.4. IgE
5. Marcadores Hormonais
 - 5.1. FSH;
 - 5.2. LH;
 - 5.3. Prolactina.
6. Marcadores Virais
 - 6.1. Hepatite A - Anticorpos IgG e IgM.;
 - 6.2. Hepatite B - Anti-HBs, Anti-HBc e Anti-HBe, Antígeno HBs e Antígeno HBe;
 - 6.3. Hepatite C – Anti-HCV;
 - 6.4. HIV – Antígeno e Anticorpos;
 - 6.5. Citomegalovirus – Anticorpos IgG e IgM.
7. Outros Marcadores de Doenças Infecciosas
 - 7.1. Sífilis.

Toxicologia

O Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra possui também uma componente de análises de parâmetros toxicológicos/drogas de abuso. Os parâmetros analíticos doseados, em amostras de urina, são anfetaminas, canabinóides, cocaína e opiáceos. Estas análises, cujas amostras eram maioritariamente provenientes de unidades militares, servem para controlar o consumo de drogas de abuso. As amostras são sempre colhidas em duplicado e qualquer amostra com resultado positivo é enviada para o Laboratório de Toxicologia da Direcção de Saúde do Exército em Lisboa, para confirmação do resultado.

Microbiologia

Como referido anteriormente este estágio foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Universitário de Coimbra tendo a duração de 5 semanas. Neste laboratório é possível identificar quatro áreas de trabalho: Bacteriologia, Micologia, Tuberculose e Parasitologia. Em todas as áreas existe um grande número de técnicas e procedimentos realizados e, portanto, um mês de estágio não é suficiente para ter contacto com tudo isto. Assim, de seguida, será descrito resumidamente o trabalho diário em cada área e também algumas técnicas realizadas.

Bacteriologia

Na Bacteriologia o principal objectivo é purificar e identificar colónias de bactérias ou leveduras semeadas em meios de cultura a partir de diversos tipo de amostras que incluem catéteres, hemoculturas, secreções brônquicas, liquido cefalorraquidiano, exsudados vaginais, biópsias, fezes, urinas e outros produtos líquidos como os líquidos peritoneais, pleurais, pericárdicos e sinoviais. Quando as amostras são recebidas no laboratório, são semeadas nos meios de cultura seleccionados e é feita uma lâmina com coloração de gram para a observação ao microscópio. Esta observação permite uma pesquisa orientada das colónias nos meios de cultura.

Os vários meios de cultura têm características únicas que permitem a obtenção das colónias puras das bactérias responsáveis pelas infecções. Como ponto de partida para a maior parte das amostras usa-se a *Gelose de Sangue (GS)* onde crescem a maior parte das

bactérias e depois, dependendo da morfologia da colônia e da observação do gram, fazem-se repicagens para o meio *CLED*, no caso de serem bacilos, meio *CNA* se forem cocos, meio *HAE*, *PolyViteX* ou *Chocolate* se há suspeita de hemófilos. Muitas vezes a observação do gram associada ao pouco crescimento na *GS* orienta a pesquisa no sentido das bactérias anaeróbias. Neste caso são utilizados os meios *CDC* e *KV*. Em situações de pouco crescimento, independentemente do tipo de bactérias presentes, são também usados meios de enriquecimento como o *Brain-Heart* ou o *Cooked Meat*.

Nas amostras de fezes o meio utilizado para a cultura primária é o *Hektoen*, para a pesquisa de *Salmonella* e *Shigella*. As hemoculturas recebidas são incubadas num *Bact Alert 3D* da *BioMérieux* durante 5 dias ou até positivarem. Só depois de positivarem é que são realizados o gram e a *GS*.

São também utilizados meios como o *STREPB*, para a pesquisa de *Streptococcus* do grupo B, o *YER*, para a pesquisa de *Yersinia*, entre outros. Todos estes meios são colocados na estufa a 37°C, no mínimo 24 horas.

A partir do momento em que é isolada uma colônia pura parte-se para a identificação que é feita a partir nos aparelhos automáticos *VITEK.2* ou *VITEK.MS* da *BioMérieux*. São também realizados testes rápidos que permitem diferenciar gêneros e espécies de bactérias, como o teste da coagulase e da catalase.

Depois de identificada a espécie responsável pela infecção é feito o antibiograma. No *VITEK.2* é feito o antibiograma automático mas pode ser necessário realizar a técnica manual para confirmar determinadas resistências ou em situações em que a técnica automática não obtenha resultados. Nestes casos são realizados E-Testes e testes de Difusão em Disco.

Por fim, a espécie identificada e o antibiograma correspondente, são reportadas através do sistema informático.

Micologia

Na Micologia é feita a identificação e isolamento de fungos usando o meio *Sabouraud* que é semeado muitas vezes por repicagem de uma *GS* em que se desconfia que a colônia presente seja um fungo. Os mais comuns são as espécies de *Candida sp.* Também é feita a identificação e isolamento de outros tipos de fungos (fungos filamentosos, por exemplo).

A pesquisa de fungos é feita principalmente recorrendo a kits comerciais, como o Kit de imunofluorescência para a detecção de *Pneumocystis jirovecii* da *BIORAD*, que consiste na marcação dos quistos de *Pneumocystis jirovecii* com anticorpos que vão emitir fluorescência quando observados ao microscópio de fluorescência.

Tuberculose

Esta área dedica-se à pesquisa de micobactérias. O trabalho diário consiste essencialmente na realização da técnica de homogeneização das amostras com o objectivo de as homogeneizar, concentrar e purificar. As amostras recebidas são muito diversificadas mas as principais são as expectorações, os aspirados brônquicos e os lavados bronco-alveolares. A técnica termina com a inoculação no meio *Lowenstein-Jensen* e no meio *MGIT* e a preparação de uma lâmina com a coloração *Tan Thiam Hok*.

Os meios permitem o crescimento das micobactérias inibindo o crescimento de outras bactérias. No *Lowenstein-Jensen* as colónias de micobactérias têm um aspecto tipo couve-flor. O meio *MGIT* é um meio líquido colocado a incubar num *Bactec MGIT 960* da *Becton Dickinson*, que detecta o consumo de oxigénio devido ao crescimento das micobactérias. Quando há um positivo faz-se uma inoculação em GS para rejeitar a possibilidade de contaminação e prepara-se uma lâmina com a coloração *Tan Thiam Hok* para confirmar a presença de micobactérias por observação ao microscópio. Ambos os meios são incubados durante 6 semanas, verificando-se se há crescimento todos os dias. Se ao final de 6 semanas não houver crescimento de micobactérias a amostra é reportada como negativa.

Em determinadas situações pode também ser realizada uma técnica de PCR através da extracção do DNA directamente da amostra.

Parasitologia

A Parasitologia ocupa-se da pesquisa e identificação de parasitas. Este trabalho é realizado recorrendo a Kits de testes rápidos e a observação de lâminas ao microscópio.

Um dos exemplos mais recorrentes no laboratório é a pesquisa de *Plasmodium* no sangue. Esta pesquisa é feita através do Kit *Malaria Pan/Pv/Pf* da *Core Diagnostics* que é um teste de imunocromatografia que permite a detecção de *P. falciparum* e *P. vivax*. Em associação ao teste, independentemente do resultado, é feita uma lâmina para observar ao microscópio e confirmar a presença ou ausência do *Plasmodium*.

No laboratório de Parasitologia, frequentemente, são preparadas lâminas de fezes concentradas pelo método de Ritchie para a pesquisa de ovos e quistos de diversos parasitas. São também realizadas técnicas de westernblot e imunofluorescência para a pesquisa de cisticercose, quisto hidático, leishmaniose, fasciolose e amebiose.

Hematologia

Durante o estágio realizado no sector de Hematologia foi possível executar uma série de técnicas e operar com uma série de aparelhos automáticos.

- Determinação de Hemograma
- Contagem de Reticulócitos
- Determinação da Velocidade de Sedimentação Globular
- Realização de Provas Laboratoriais de Coagulação
 - Tempo de protrombina
 - Tempo de activação parcial de tromboplastina
 - Quantificação de fibrinogénio
- Observação de Esfregaços de Sangue Periférico
 - Realização do Esfregaço
 - Coloração de May-Grunwald-Giemsa
 - Determinação da Fórmula Leucocitária
- Determinação de Grupos Sanguíneos

O sangue, cujo volume total num ser humano adulto ronda os 5,5 L, apresenta duas componentes distintas, uma celular e uma fluida. A primeira, correspondente a cerca de 45% da constituição do sangue, é composta por eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A segunda, correspondente a cerca de 55%, inclui sobretudo água (cerca de 50%) e também proteínas, hidratos de carbono, vitaminas, hormonas, enzimas, lípidos e sais.

A porção fluida do sangue é denominada plasma, em condições de não coagulação, e contém fibrinogénio e factores de coagulação. Se ocorre coagulação a porção líquida obtida não contém fibrinogénio e é denominada soro.^[1]

Hematopoiese

A hematopoiese é o processo de formação e maturação de células sanguíneas. Os três elementos celulares encontrados no sangue são eritrócitos, leucócitos e plaquetas.

Num indivíduo saudável a maturação completa das células sanguíneas ocorre na medula óssea, não se detectando células imaturas na circulação periférica. Em determinadas

situações patológicas são facilmente detectados níveis anormais de células sanguíneas imaturas no sangue periférico do indivíduo.

As células sanguíneas têm origem numa célula estaminal pluripotente presente na medula óssea, que tem a capacidade de originar uma célula estaminal linfóide ou uma célula estaminal mielóide, podendo estas células dividir-se e diferenciar-se. Deste modo esta célula estaminal pluripotente pode, dependendo dos vários estímulos recebidos, originar qualquer tipo de célula sanguínea conforme a necessidade do indivíduo no momento em causa. Estas células estaminais representam menos de 1% da população celular da medula óssea.

A célula estaminal mielóide é considerada o precursor comum para eritrócitos, granulócitos, monócitos e megacariócitos e a célula estaminal linfóide quando formada abandona a medula óssea diferenciando-se nos nódulos linfáticos em linfócitos B e no timo em linfócitos T. [2]

De seguida está representado um diagrama da hemotapose (Figura I.1).

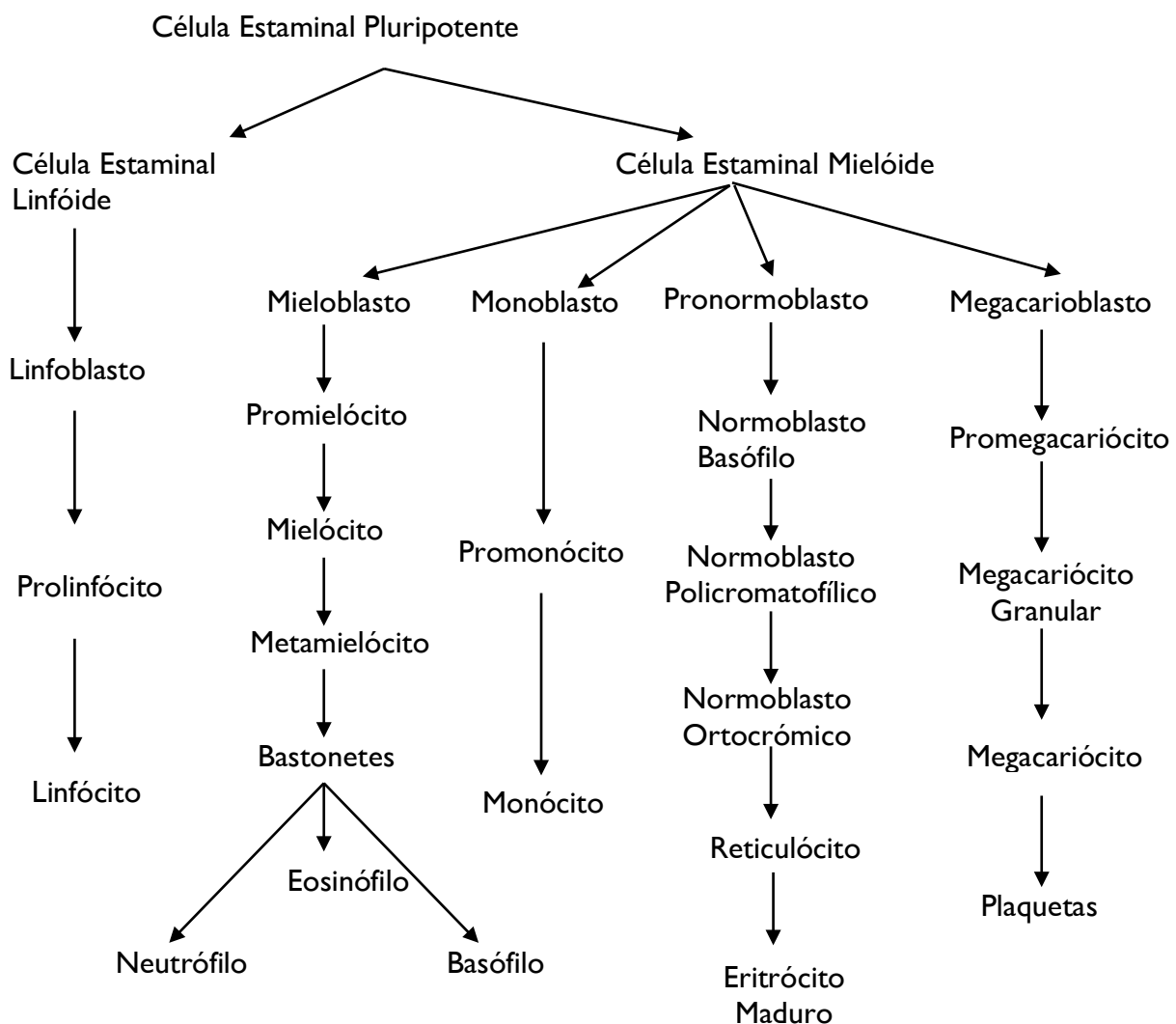


Figura I.1 – Diagrama representativo da origem das células sanguíneas.

Maturação dos Eritrócitos

A primeira célula na sequência de maturação do eritrócito, diferenciada da célula estaminal mielóide responde ao estímulo da eritropoietina. A condição estimuladora do aumento de produção de eritropoietina nos rins relaciona-se com o aparecimento de níveis anormalmente baixos de hemoglobina, que implicam a redução do oxigénio no sangue e redução da tensão deste composto nos rins. Esta condição de hipóxia induz o aumento da produção de eritropoietina pelos rins que, depois de lançada na corrente sanguínea, estimula a eritropoiese na medula óssea com vista à reposição dos níveis de hemoglobina.

Até ao eritrócito maduro são detectadas várias fases de maturação segundo a ordem Pronormoblasto (Figura 1.2) – Normoblasto Basófilo (Figura 1.3) – Normoblasto Policromatofílico (Figura 1.4) – Normoblasto Ortocrómico (Figura 1.5) – Reticulócito (Figura 1.6) – Eritrócito Maduro (Figura 1.7).^[3]

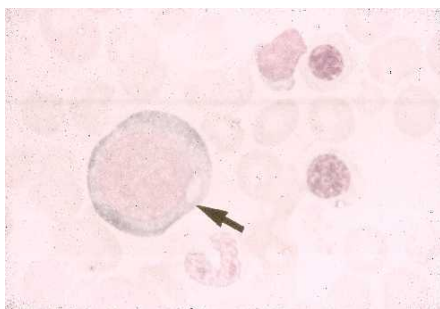


Figura 1.2 – Pronormoblasto.

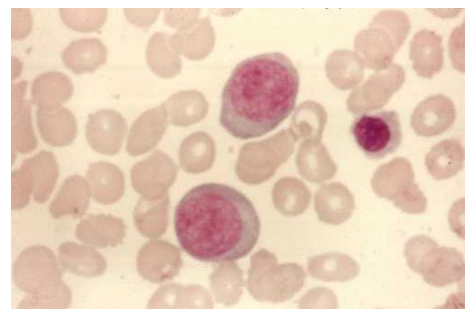
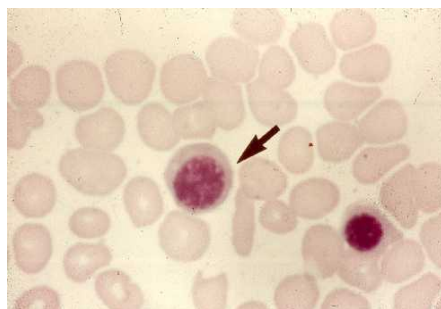


Figura 1.3 – Normoblasto Basófilo.



1.4 – Normoblasto Policromatofílico

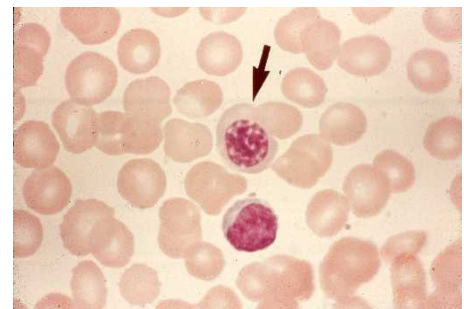


Figura 1.5 – Normoblasto Ortocrómico.

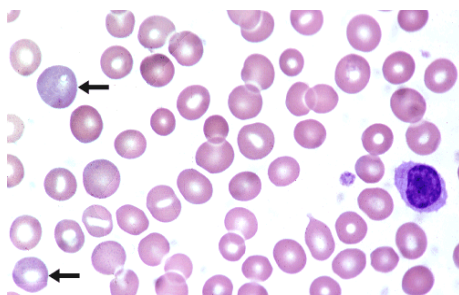


Figura 1.6 – Reticulócito.

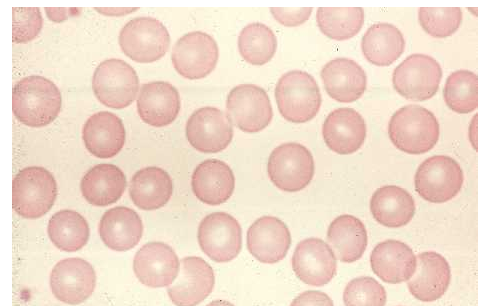


Figura 1.7 – Eritrócito Maduro.

Maturação de Granulócitos

A célula estaminal mielóide pode diferenciar-se de variadas formas originando granulócitos, monócitos e plaquetas, para além dos eritrócitos já mencionados. A maturação em basófilo, eosinófilo ou neutrófilo (granulócitos) é muito semelhante. Em geral, à medida que os granulócitos sofrem o processo de maturação a cromatina nuclear torna-se mais condensada, os nucléolos desaparecem e o citoplasma basófilo abundante com grânulos não específicos torna-se mais escasso e passa a conter grânulos específicos de eosinófilos, basófilos ou neutrófilos. O núcleo torna-se segmentado e o tamanho celular diminui.

Em termos dos vários estadios identificados durante o desenvolvimento da célula detectam-se, pela seguinte ordem, Mieloblasto (Figura 1.8) – Promielócito (Figura 1.9) – Mielócito (Figura 1.10) – Metamielócito (Figura 1.11) – Bastonete (Figura 1.12) – Célula Madura (Figura 1.13).^[4]

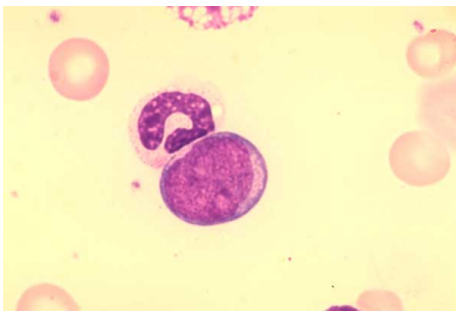


Figura 1.8 – Mieloblasto.

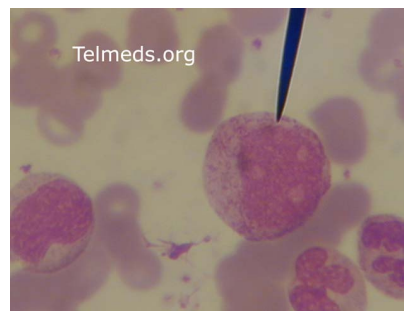


Figura 1.9 – Promielócito.

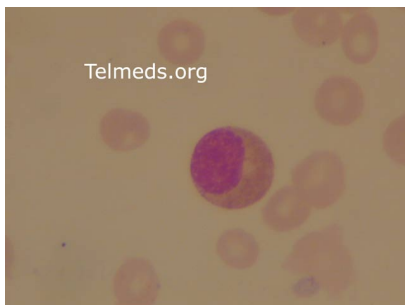


Figura 1.10 – Mielócito.

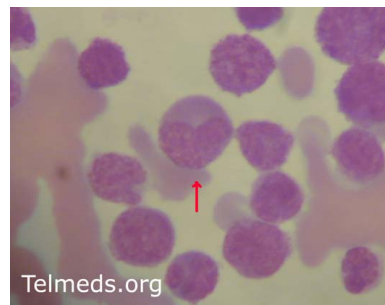


Figura 1.11 – Metamielócito.

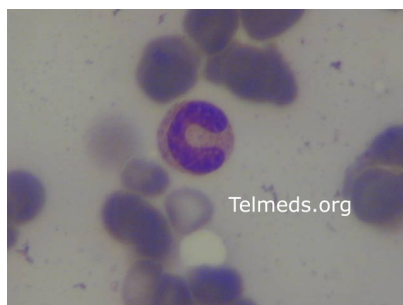


Figura 1.12 – Bastonete.

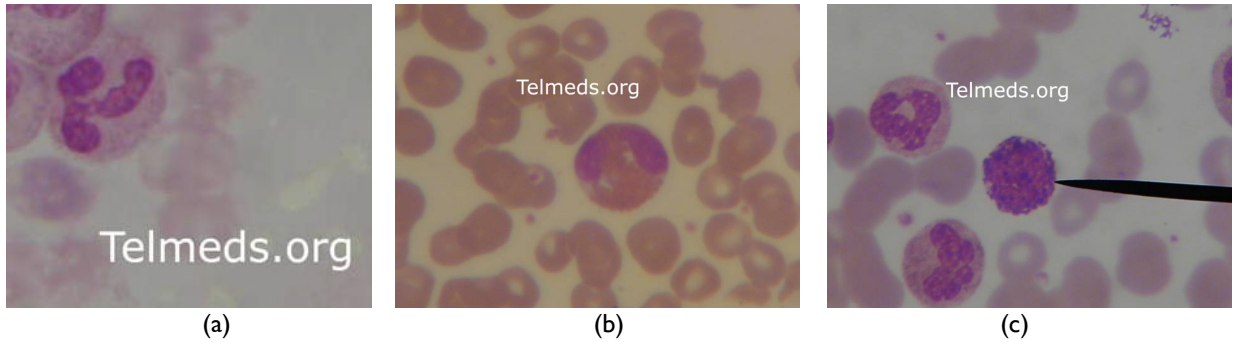


Figura 1.13 – (a) Neutr3f3lo. (b) Eosin3f3lo. (c) Bas3f3lo.

Maturac3o dos Mon3citos

O mon3cito (Figura 1.14) sofre o processo de maturac3o, tamb3m na medula 3ssea, a partir da diferenciac3o da c3lula estaminal miel3ide. Os estadios identific3veis durante a maturac3o do mon3cito s3o Monoblasto – Promon3cito – Mon3cito Maduro.^[5]

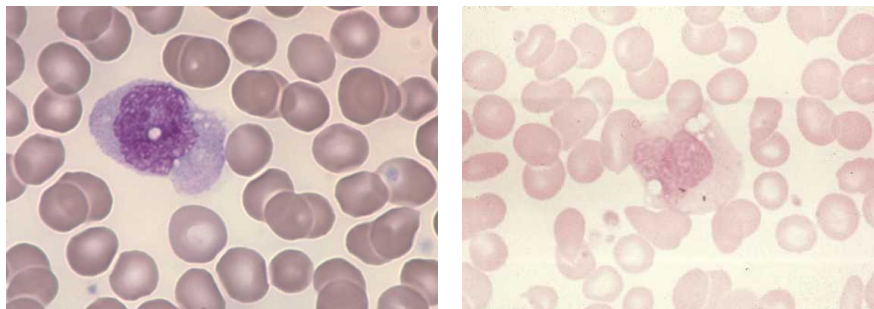


Figura 1.14 – Dois exemplos de mon3citos normais.

Maturac3o de Linf3citos

Os linf3citos (Figuras 1.15 e 1.16) s3o produzidos nos n3dulos linf3ticos, baço, timo e medula 3ssea. Estas c3lulas aparecem na circulac3o perif3rica com tamanhos vari3veis, sendo caracterizados como pequenos, m3dios ou grandes. Podem ainda ser observados linf3citos ativados onde 3 poss3vel observar extens3es do citoplasma. 3 medida que ocorre a maturac3o do linf3cito, podem ser detectados tr3s estadios, Linfoblasto – Prolinf3cito – Linf3cito.^[6]

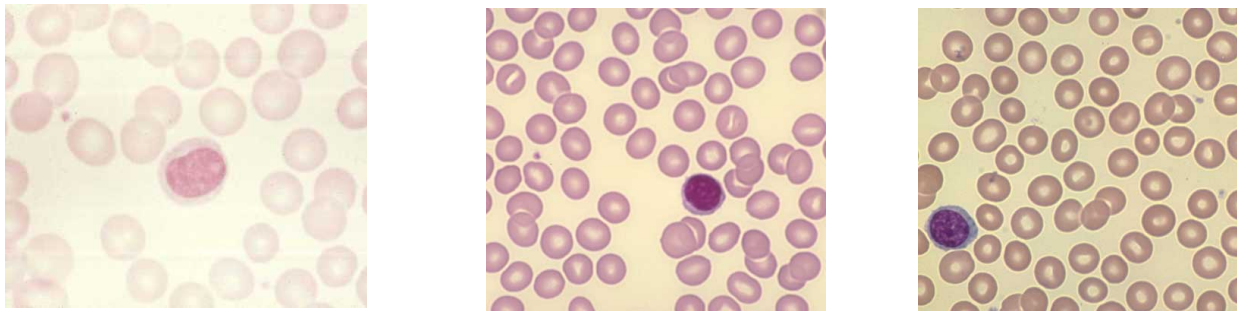


Figura I.15 – Três exemplos de linfócitos normais.

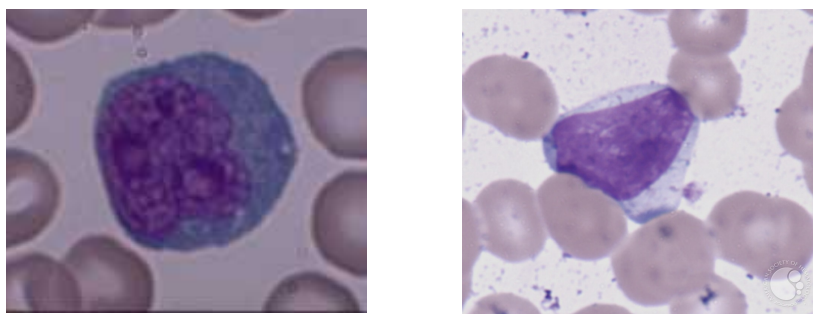


Figura I.16 – Dois exemplos de linfócitos activados.

Maturação e formação de plaquetas

As plaquetas surgem da maturação do megacariócito a partir do megacarioblasto (Megacarioblasto – Promegacariócito – Megacariócito Granular – Megacariócito Maduro (Figura I.17, a e b) – Plaquetas).

O megacarioblasto surge da mesma célula estaminal que pode originar a linha eritróide ou mielóide. Este processo de maturação é influenciado pela acção de dois factores, o CSF-Meg (megacaryocyte colony stimulating factor) e a trombopoietina.

As plaquetas (Figura I.17, c) resultam directamente do citoplasma do megacariócito, que sofre fragmentação em plaquetas que são libertadas para a circulação periférica. Cada megacariócito produz entre 2,000 a 4,000 plaquetas.

A maior parte da produção de plaquetas ocorre na medula óssea, onde os megacariócitos representam menos de 1% da população de células nucleadas presentes.^[7]

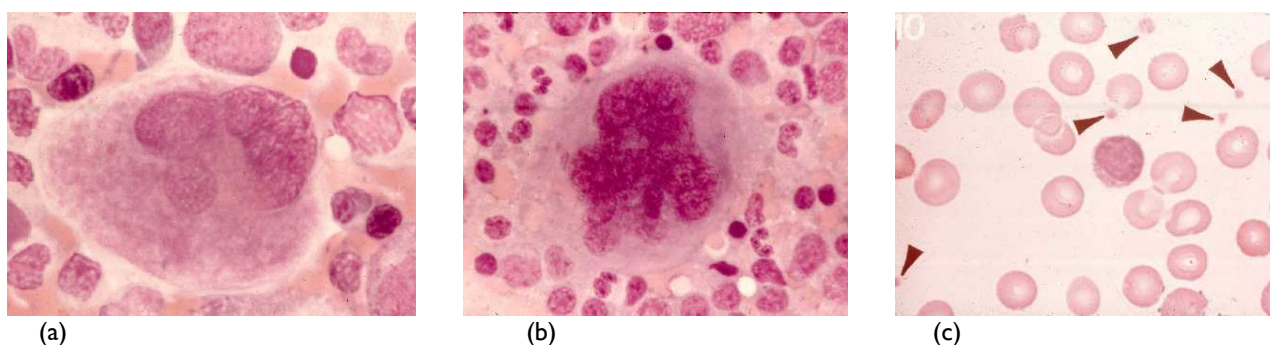


Figura I.17 – Em (a) e (b) podem ver-se dois megacariócitos e em (c) estão indicadas plaquetas.

Caracterização dos elementos celulares

Eritrócitos

Os eritrócitos completamente desenvolvidos são células de diâmetro médio entre 6 e 8 μm , anucleados, com forma de disco bicôncavo, sendo a depressão central mais pálida em relação ao tom vermelho do resto da célula. O tempo de vida destas células na circulação sanguínea é de aproximadamente 120 dias \pm 20 dias. Um eritrócito maduro consiste sobretudo em hemoglobina, que corresponde a 90% do peso seco da célula.

O eritrócito, no processo de maturação, perde o núcleo, os ribossomas e as mitocôndrias, o que implica a perda de capacidade de divisão celular, síntese proteica e fosforilação oxidativa. Como consequência é a via anaeróbia a principal forma de obtenção de energia sendo esta a via glicolítica de degradação de 90% da glicose. Os restantes 10% da glicose seguem a via aeróbia.

A molécula de hemoglobina é composta por quatro subunidades cada uma contendo um grupo heme ligado à estrutura proteica correspondente à globina. O íon de ferro encontra-se no centro da estrutura, ligando ao oxigénio quando no estado ferroso (Fe^{2+}). As características das cadeias polipeptídicas constituintes da molécula de hemoglobina variam, podendo aparecer cadeias do tipo α , β , δ ou γ . Num indivíduo adulto normal cerca de 96% de hemoglobina encontrada é de tipo A (constituído por duas cadeias α e duas cadeias β). Outros tipos de hemoglobina encontrados são o tipo F ($2\alpha + 2\gamma$) e o tipo A_2 ($2\alpha + 2\delta$).

Os eritrócitos de um indivíduo em determinadas condições patológicas, nomeadamente anemias, podem apresentar variações significativas em determinadas características.^[8]

Variação da Forma

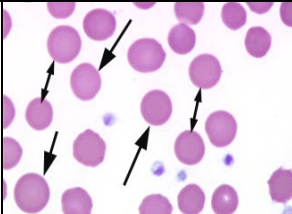
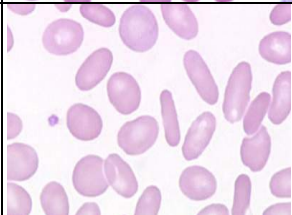
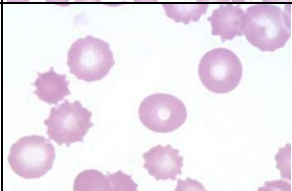
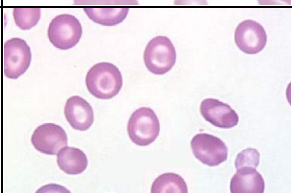
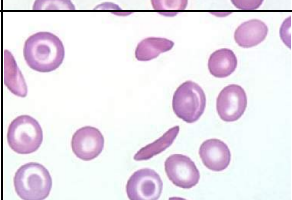
Podem ser detectadas, em estados patológicos, várias formas anormais de glóbulos vermelhos, que são indicadas na tabela apresentada abaixo (Tabela 1.4).

Podem também ser detectados na corrente sanguínea, em situações como anemias hemolíticas, nomeadamente aquelas causadas por agentes físicos como a CID (Coagulação Intravascular Disseminada), fragmentos de glóbulos vermelhos.

O factor que se refere às variações de formas de eritrócitos detectados numa amostra é a poiquilocitose sendo que esta anomalia aparece por vezes em anemias megaloblásticas.^[9]

De seguida na Tabela 1.1 estão descritas várias formas anormais de glóbulos vermelhos que se podem encontrar.

Tabela 1.1 – Formas anormais possíveis para os glóbulos vermelhos.

	Características	Patologias	Imagem
Esferócitos	Forma praticamente esférica, não apresentam a zona central pálida. Nalguns casos de deficiências enzimáticas hereditárias podem apresentar	Aparecem em esferocitoses hereditárias, anemias hemolíticas e doença hemolítica AB0.	
Eliptócitos	Forma elíptica (por vezes com formato de cigarro).	Aparecem em eliptocitoses hereditárias.	
Acantócitos	Células com pequenas projecções na membrana (espículas). Estas células têm menor tempo de vida	Aparecem em abetalipoproteinémias e certos distúrbios do fígado e do metabolismo de lípidos.	
Células em Alvo	Apresentam uma área central corada, um anel sem cor e a zona terminal novamente corada.	Aparecem em doenças do fígado e certas hemoglobinopatias como anemia falciforme.	
Células Falciformes	Apresentam a forma de foice, com extremos pontiagudos, devido à formação de polímeros de hemoglobina S na célula.	Aparecem associadas à hemoglobina S, nomeadamente na anemia falciforme.	

Variação do Tamanho

O tamanho dos eritrócitos pode variar apresentando-se estes demasiado grandes, macrocitose (Figura 1.19, a), ou demasiado pequenos, microcitose (Figura 1.19, b). O factor que avalia a variação do tamanho dos eritrócitos detectados numa amostra é a anisocitose (Figura 1.19, c)

A microcitose pode surgir em anemias associadas a deficiência de ferro ou talassémias e a macrocitose pode ser detectada em anemias megaloblásticas, por exemplo.^[9]

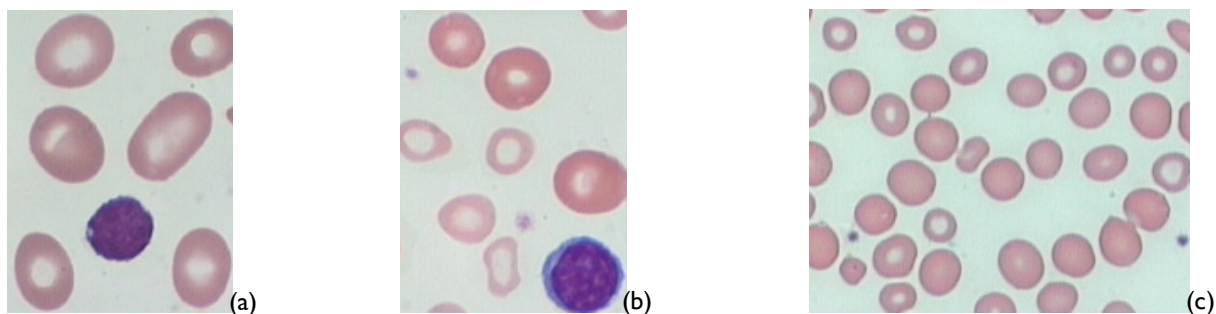


Figura 1.19 - (a)Eritrócitos Macrocíticos; (b) Eritrócitos Microcíticos; (c) Esfregaço apresentando anisocitose.

Variações Estruturais

Diferentes estruturas podem ser detectadas numa dada amostra quando existem determinadas situações patológicas. Pode detectar-se um pontuado basófilo, composto por muitos pequenos grânulos que resultam da agregação de ribossomas e aparecem por exemplo em anemias megaloblásticas (Figura 1.20).

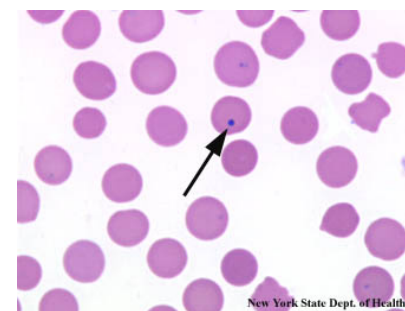


Figura 1.20 – Eritrócitos com pontuado basófilo.

Podem ainda ser detectados eritrócitos em rouleaux ou também aglutinados (Figura 1.21). A formação em rouleaux ou “pilhas de moedas”, na qual aparecem os eritrócitos em rolos ou pilhas, pode dever-se à presença de altas concentrações de globulinas anormais ou fibrinogénio, e é encontrada em casos de mieloma múltiplo ou macroglobulinémia. A aglutinação de eritrócitos encontra-se em pacientes com “aglutininas frias” ou anemia hemolítica auto-imune e apresenta-se como amontoados de eritrócitos.^[9]



Figura 1.21 – Eritrócitos em “rouleaux”.

Variação no conteúdo de hemoglobina

O conteúdo de hemoglobina presente nos eritrócitos pode também variar, dependendo, por exemplo, da quantidade de ferro disponível. Deste modo os eritrócitos podem ser hipocrómicos (Figura 1.22) (menor quantidade de hemoglobina) ou normocrómicos (quantidade normal de hemoglobina).^[9]

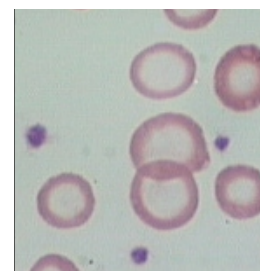


Figura 1.22 – Eritrócitos Hipocrómicos.

Leucócitos

Os leucócitos englobam um conjunto de células cuja função se encontra relacionada com a defesa do organismo sendo estas células parte integrante do sistema imunitário do indivíduo. Os vários leucócitos podem subdividir-se em dois grupos – os granulócitos e os não granulócitos – sendo os primeiros os neutrófilos, eosinófilos e basófilos e os segundos os linfócitos e os monócitos.

Neutrófilos

A produção e maturação de neutrófilos ocorre na medula óssea e as células completamente desenvolvidas distribuem-se pelos pulmões, baço e fígado a partir da circulação sanguínea periférica, e depois pelos tecidos onde executam a sua função de eliminação de microrganismos invasores. Os neutrófilos são metabolicamente activos, sendo capazes de realizar glicólise aeróbia ou anaeróbia como fonte de energia. Cerca de 50% das células circulam livremente, sendo que os outros 50% aderem às paredes capilares.

Os grânulos primários não específicos presentes nos neutrófilos são lisossomas ligados às membranas e contêm fosfatase ácida, peroxidase, esterase, β -galactosidase, lisosima e outras proteínas básicas. Os grânulos secundários específicos contêm aminopeptidase, collagenase, muramidase, lisosima, entre outras proteínas. No neutrófilo maduro a razão entre grânulos específicos e não específicos é 3:1, sendo estes grânulos libertados do aparelho de Golgi.

O neutrófilo tem normalmente uma forma esférica, e em contacto com uma superfície assume uma alteração de forma com aparecimento de pseudópodes que permitem a sua locomoção e a endocitose de agentes invasores. Estes glóbulos brancos viajam para os tecidos ou cavidades do organismo atravessando as paredes dos vasos capilares pelo espaço entre as células por um movimento denominado diapedese. A deslocação organizada de neutrófilos para zonas de infecção ou inflamação é conseguida através de factores citoquímicos como secreções libertadas por linfócitos ou macrófagos activados ou produtos bacterianos como endotoxinas.

Em algumas situações patológicas podem ocorrer alterações da quantidade de neutrófilos presentes na circulação sanguínea de um indivíduo, podendo ocorrer um aumento do número de células, neutrofilia, ou uma diminuição, neutropenia. A neutrofilia pode ocorrer devido à administração de certos medicamentos ou em situações de infecção de causa bacteriana. A neutropenia pode ser devido a medicação, pela diminuição de

factores de crescimento e a consequente diminuição da produção de neutrófilos na medula óssea (por causas congénitas, drogas citotóxicas ou anemia aplásica) ou ainda por aumento da destruição de neutrófilos (situações de esplenomegalia).^[10]

Eosinófilos

Os eosinófilos são células sobretudo presentes nos tecidos, sendo que uma vez libertados na corrente sanguínea, são aleatoriamente removidos para os tecidos. Estas células localizam-se em áreas expostas ao ambiente externo, nomeadamente membranas nasais, pulmões e tracto gastrointestinal, controlando os mecanismos associados com as alergias e asma. Também são responsáveis pela defesa do organismo contra os parasitas e são células bastante móveis, capazes de locomoção de forma semelhante aos neutrófilos, sendo metabolicamente mais activos que estes.

Os eosinófilos maduros contêm dois tipos de grânulos, uns maiores e mais numerosos e outros mais pequenos e que podem aparecer apenas na fase de mielócito. Os grânulos maiores contêm sobretudo uma proteína tóxica (*MBP – major basic protein*), incluindo também enzimas como a peroxidase, fosfolipase, fosfatase ácida entre outras.^[11]

Basófilos

Uma vez libertados no sangue periférico, os basófilos mantêm-se em circulação durante algum tempo antes de se moverem para os vários tecidos nomeadamente pulmões, timo e baço. O núcleo nos basófilos não se encontra tão segmentado como no neutrófilo e a cromatina encontra-se mais condensada. Os basófilos apresentam alguma actividade fagocítica e quimiotóxica. Estas células participam nas reacções imunitárias de hipersensibilidade.^[12]

Monócito

O monócito maduro presente na circulação periférica apresenta aparelho de Golgi e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidos, assim como numerosas mitocôndrias e quantidades variáveis de ribossomas e polirribossomas. Os grânulos presentes no citoplasma dos monócitos são produzidos no aparelho de Golgi e são lisossomas que contêm fosfatase ácida e arilsulfatase, assim como actividade de esterase. O monócito, assim como o macrófago resultante, são células com elevada mobilidade, capazes de atravessar paredes de

vasos capilares e migrar para zonas de inflamação, podendo também estender vários pseudópodes.^[13]

Linfócitos

A maioria dos linfócitos têm longos períodos de vida, com um tempo de vida de cerca de quatro anos, sendo que alguns podem durar até dez anos e outros apenas três ou quatro dias. Os linfócitos presentes na circulação sanguínea encontram-se normalmente em deslocação de um tecido linfático para outro ou para locais de inflamação.

Existem duas sub-populações principais de linfócitos, os linfócitos B e T, que são morfológicamente semelhantes.

A função principal dos linfócitos é permitir o reconhecimento e eliminação de agentes estranhos, como patogénios, proteínas ou células alteradas, de modo a garantir a resistência do organismo a estes agentes. Os linfócitos B são responsáveis pela imunidade humoral, ou seja por produção de anticorpos específicos, e as células T promovem a imunidade mediada por células, nomeadamente por acção dos linfócitos T citotóxicos.^[14]

Plaquetas

As plaquetas são uma porção do citoplasma do megacariócito pelo que não têm núcleo. O tempo de vida das plaquetas, uma vez libertadas para a circulação periférica é de 9 a 12 dias. As plaquetas mais recentes são maiores e menos densas que as plaquetas mais velhas, e também metabolicamente mais activas e mais eficazes na hemostase. As plaquetas danificadas ou não funcionais são removidas da circulação principalmente por macrófagos no baço.

As plaquetas são geralmente esféricas na forma, com 1 a 4 µm de diâmetro e 6 a 7,5 fl de volume. As plaquetas são constituídas por 60% de proteína, 30% de lípido, 8% de hidratos de carbono, vários minerais, água e nucleótidos; conseguindo sintetizar aminoácidos, proteínas, ácidos gordos e fosfolípidos. Têm ainda um metabolismo muito activo, usando glucose como fonte de energia. A função principal das plaquetas é a manutenção da hemostase e da integridade dos capilares.^[15]

Hemostase: Coagulação e Fibrinólise

Hemostase refere-se ao processo de retenção do sangue nos vasos sanguíneos em situações de lesão, localizando as reacções existentes nesse local e reparando a referida lesão. Este é portanto um sistema baseado em equilíbrios dinâmicos, sendo que a inexistência deste referido equilíbrio pode levar a hemorragias descontroladas ou formação excessiva de coágulos (tromboes).

Os processos de hemostase requerem a interacção entre vários componentes nomeadamente vasos sanguíneos, endotélio, plaquetas, factores de coagulação, inibidores e substâncias fibrinolíticas; sendo portanto um mecanismo extremamente complexo onde várias reacções ocorrem simultaneamente.

O complexo mecanismo é normalmente dividido em hemostase primária e hemostase secundária, referindo-se a primeira à constrição do vaso lesado e formação de um trombo plaquetário e a segunda à acção de factores de coagulação e formação da rede de fibrina (coagulação propriamente dita). Após formação do coágulo e reparação da lesão ocorre a remoção deste trombo e normalização da circulação sanguínea no vaso afectado por um processo de fibrinólise.

Na hemostase primária, após lesão de um vaso sanguíneo, ocorre vasoconstrição, por activação da enervação das paredes vasculares e por libertação de serotonina por plaquetas. As plaquetas, atraídas para o local da lesão pelas fibras de colagénio (sub-endotelial), aderem umas às outras – adesão plaquetar. Esta adesão entre plaquetas depende também de uma fracção do factor de coagulação VIII presente no plasma e colagénio sub-endotelial. As plaquetas acumuladas no local da lesão libertam ADP (adenosina-di-fosfato) e outros factores plaquetários que promovem o seu aumento de volume e agregação plaquetar. Fosfolipases da membrana plaquetar vão sendo activadas. Nomeadamente por colagénio, promovendo a libertação de ácido araquidónico, que é então metabolizado a um endoperóxido, posteriormente convertido a tromboxano A_2 . Esta substância é um vasoconstritor e um agente agregante. Neste processo são também libertadas pelas plaquetas outras substâncias nomeadamente serotonina, adrenalina e fibrinogénio que motivam a agregação plaquetar.

Parte do ácido araquidónico obtido é convertido, por acção da prostaciclina sintetase, em prostaciclina ou prostaglandina, sendo este componente um forte vasodilatador e antiagregante plaquetar que limita a formação do trombo ao local onde ocorreu lesão.

Inicia-se então a hemostase secundária. ^[16]

Coagulação

Dos vários intervenientes no mecanismo de coagulação referido são distinguidos componentes tecidulares (vasos sanguíneos e produtos tecidulares), componentes trombocitários (plaquetas) e componentes humorais (factores de coagulação – activadores e inibidores).

Este mecanismo baseia-se numa série de reacções em cascata envolvendo activação de enzimas a partir dos seus precursores (zimogénios ou proenzimas e procoagulantes), visto que a maioria dos intervenientes neste mecanismo se encontra em circulação numa forma inerte ou inactiva. Deste modo, assim que uma enzima é formada, torna-se capaz de converter o próximo zimogénio na sua forma activa, culminando este processo em cascata na formação de uma rede de fibrina e portanto num coágulo. Para além das proenzimas já referidas também cofactores proteicos, fosfolípidos membranares superficiais e iões de cálcio têm um papel activo na formação do coágulo de fibrina.

Os doze factores de coagulação são referenciados por um número romano ou em alguns casos pelo seu nome, sendo que quando um factor se encontra activado é denominado pelo respectivo número seguido da letra “a”. Alguns componentes deste mecanismo recentemente descobertos não foram numerados. Seguidamente apresenta-se a Tabela 1.2 que enumera os vários factores de coagulação.

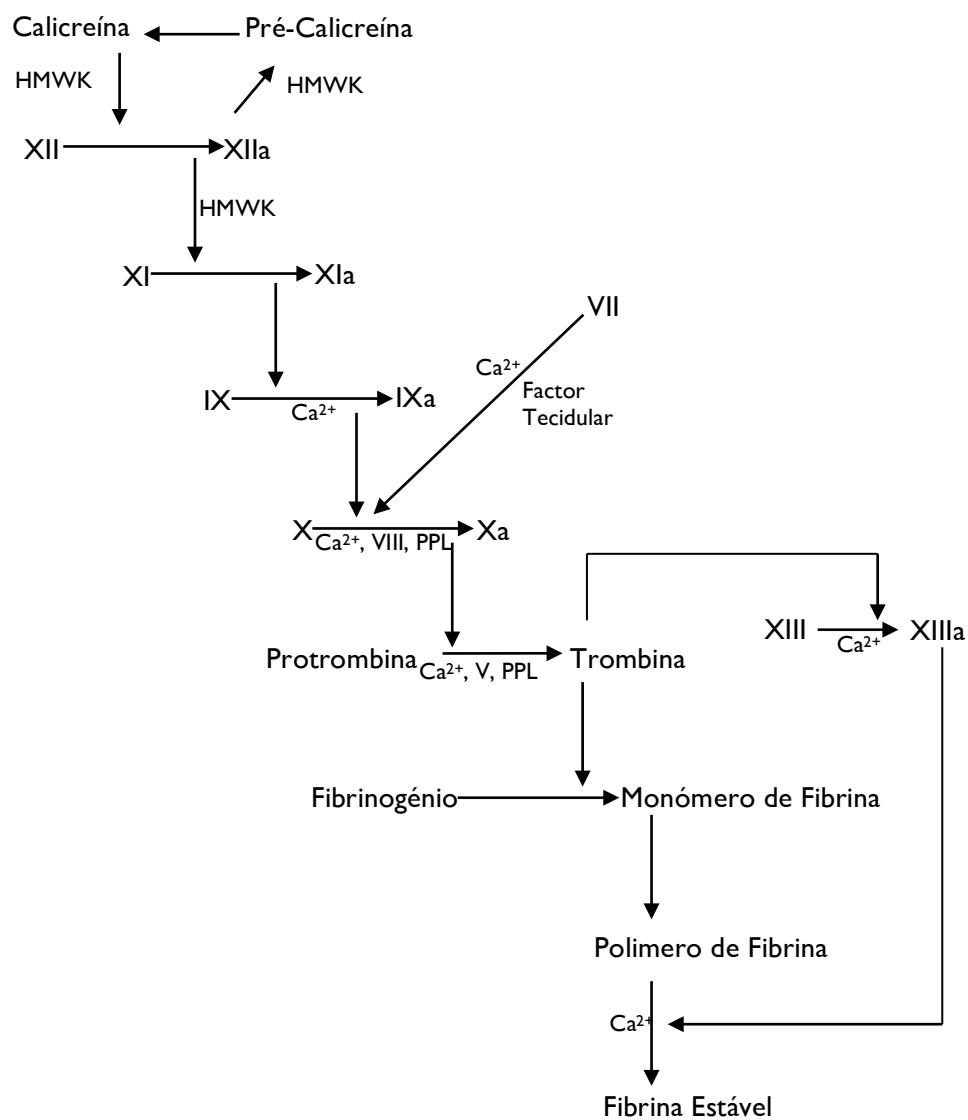
Tabela 1.2 – Factores de coagulação

Factor	Nome	Vida média	Actuação sistema intrínseco/extrínseco	Local de produção
I	Fibrinogénio	36-90 Horas	Intrínseco e Extrínseco	Fígado
II	Protrombina	60-70 Horas	Intrínseco e Extrínseco	Fígado Depende Vit. K
III	Factor tecidular		Extrínseco	Muitos tecidos
IV	Cálcio		Intrínseco e Extrínseco	
V	Proacelerina	12-36 Horas	Intrínseco e Extrínseco	Fígado
VII	Proconvertina	7 H	Extrínseco	Fígado Depende Vit. K
VIII	Factor anti-hemofílico A	10-12 Horas	Intrínseco	Vários, inclui endotélio
IX	Factor anti-hemofílico B	24 Horas	Intrínseco	Fígado Depende Vit. K
X	Factor Stuart-Prower	48 Horas	Intrínseco e Extrínseco	Fígado Depende Vit. K
XI	Factor anti-hemofílico C	60 Horas	Intrínseco	-
XII	Factor Hageman ou contacto		Intrínseco	-
XIII	Factor estabilizante de fibrina	3-4 Dias	Intrínseco e Extrínseco	Fígado

A coagulação foi dividida em dois sistemas: sistema intrínseco e sistema extrínseco (Figura 1.23). No sistema intrínseco todos os componentes necessários à ocorrência de coagulação se encontram presentes no sangue. No sistema extrínseco é necessária a presença do factor tecidual dos tecidos danificados para que se inicie o processo de coagulação. Em termos da cascata de coagulação estes sistemas diferem na forma como é activado o factor X, sendo que deste ponto para a frente todas as reacções são comuns a ambos os sistemas.

Estes dois sistemas mencionados (intrínseco e extrínseco) actuam simultaneamente no organismo e não são substituíveis, mas sim interactuantes.

Existem várias substâncias cuja função é a de inibir a coagulação com vista ao controlo deste processo, sendo os principais inibidores as antitrombinas. Por exemplo, o excesso de trombina é neutralizado por antitrombinas.^[17]



Figura

1.23 – Diagrama representativo da cascata de coagulação.

Fibrinólise

A função principal da fibrinólise é degradar os coágulos de fibrina à medida que estes se formam de modo a evitar a obstrução dos vasos sanguíneos por deposições de fibrina.

Este processo degradativo é catalizado por uma enzima proteolítica – a plasmina, resultante da activação do zimogénio plasminogénio. Este precursor é produzido no fígado e tem uma vida média de 2,2 dias. A activação do plasminogénio depende de activadores que podem ser intrínsecos (factor XIIIa, calicreína e HMWK – *High Molecular Weight Kininogen*) ou extrínsecos (activador tecidual do plasminogénio). Os activadores de plasminogénio são libertados devido a vários estímulos, nomeadamente pela trombina. Esta libertação leva à activação do plasminogénio com formação de plasmina e consequente degradação do coágulo, por lise do factor XIIIa ligado à fibrina, originando então produtos da fibrinólise nomeadamente os D-dímeros. A plasmina actua também sobre o fibrinogénio não produzindo no entanto D-dímeros. Por degradação da fibrina ou do fibrinogénio formam-se os produtos de degradação do fibrinogénio e da fibrina.

Com vista ao controlo deste processo degradativo existem inibidores da fibrinólise, sendo o principal a antiplasmina.

Os produtos da degradação descrita têm efeitos fisiológicos importantes visto que actuam como anticoagulantes, atrasam a polimerização da fibrina, inibem a agregação plaquetária e digerem os factores V e VIII. Estes produtos podem ainda interpor-se entre os polímeros de fibrina levando à formação de um coágulo fraco e desorganizado.^[18]

Procedimentos de Rotina em Hematologia

No sector de Hematologia os exames laboratoriais são executados com sangue periférico total, essencialmente venoso, ou plasma. Os anticoagulantes usados são diferentes conforme o teste a realizar. Para realização das provas de coagulação é usado sangue com uma solução aquosa 3,8% de citrato de sódio, numa proporção de 1/9 com o sangue, pois esta forma complexos solúveis com iões Ca^{2+} existentes no sangue e protege alguns procoagulantes (conserva os factores II e VIII). Para realização das contagens celulares, estudos morfológicos e contagem de plaquetas é usado o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) pois evita a sua agregação, visto que é um quelante de iões Ca^{2+} , que deixam de se encontrar disponíveis para a cascata de coagulação. São utilizadas concentrações entre 1 a 2 mg/ml de sangue.

Noutras situações, quando se pretendem realizar outros testes, em soro, é adicionado um agente que facilita a coagulação para que a recolha de soro seja possível mais rapidamente. Noutros sectores como Bioquímica e Imunologia é usado soro para a maioria dos testes.

Hemograma

O hemograma inclui a determinação, contagem, análise e relação de diversos parâmetros hematológicos. Os parâmetros incluídos relativamente a leucócitos são a contagem total (WBC – *White Blood Cell*), a contagem de neutrófilos (NEU), linfócitos (LYM), monócitos (MONO), eosinófilos (EOS) e basófilos (BASO). Em relação aos eritrócitos são determinados a contagem total (RBC – *Red Blood Cell*), a hemoglobina (HBG), o hematócrito (HCT), o volume médio corpuscular (MCV), a hemoglobina corpuscular média (MCH), a concentração de hemoglobina média corpuscular (MCHC) e a heterogeneidade da população de eritrócitos (RDW). Quanto às plaquetas os parâmetros apresentados incluem a contagem total (PLT – *Platelets*), o volume médio plaquetário (MPV) e a heterogeneidade da população de plaquetas (PDW). O hemograma inclui histogramas onde aparecem representadas as população de glóbulos brancos, granulócitos, glóbulos vermelhos e plaquetas.

Funcionamento base do Cell-Dyn Ruby

No Laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra foi possível trabalhar com o aparelho automático *Cell-Dyn Ruby* da *Abbott Diagnostics* (Figura 1.24) na elaboração de hemogramas e na contagem de reticulócitos.



Figura 1.24 – *Cell-Dyn Ruby* da *Abbott Diagnostics*.

O funcionamento do *Cell-Dyn Ruby* para analisar as populações de eritrócitos, plaquetas e leucócitos, tem como base a citometria de fluxo. A citometria de fluxo é um processo segundo o qual as células individuais ou outras partículas biológicas numa passagem única produzida por um fluxo líquido são conduzidas através de um feixe de luz. Um sensor ou sensores medem, pela perda ou dispersão de luz, as características físicas ou químicas das células ou partículas.

A citometria de fluxo permite a inspeção rápida de grandes quantidades de amostra e proporciona a análise quantitativa das células a um nível individual. A amostra é transferida para uma câmara de fluxo em que as células são forçadas a alinharem-se numa fila única. Quando as células entram na componente de visualização, estas interceptam-se com o feixe laser. Os diferentes tipos de células dispersam a luz laser em ângulos diferentes, gerando informação sobre o tamanho, a estrutura interna, a granularidade e morfologia da superfície da célula. Os sinais ópticos que as células geram são detectados e convertidos em impulsos eléctricos que são, então, armazenados e analisados pelos computador.

Geralmente os citómetros de fluxo medem dois ângulos de dispersão: o *forward scatter*, que mede o tamanho das células, e o *side scatter*, que mede a superfície e a estrutura interna da célula, mas principalmente mede a granularidade interna. A combinação da informação das duas medidas de dispersão permite a diferenciação mais exacta entre as populações de células.^[19]

Contagem de Eritrócitos e Plaquetas

A contagem de eritrócitos é medida directamente e expressa em número de eritrócitos contados $\times 10^6/\text{ul}$. A contagem de plaquetas também é medida directamente e é expressa em número de plaquetas contadas $\times 10^3/\text{ul}$.

A informação acerca do número e tamanho dos eritrócitos e plaquetas é usada para criar os respectivos histogramas (tamanho vs. contagem) assim como para determinar alguns dos parâmetros relacionados com os eritrócitos (RDW, MCV, MCH, MCHC) ou com as plaquetas (MPV, PDW).

Contagens alteradas do número de eritrócitos assim como do número de plaquetas podem dever-se a várias causas, por exemplo, a existência de plaquetas gigantes (valor falsamente aumentado de eritrócitos) ou de eritrócitos microcíticos (valor de eritrócitos falsamente diminuído ou valor de plaquetas falsamente aumentado) ou ainda de agregação plaquetária (valor de plaquetas falsamente diminuído).^[19]

Contagem e identificação diferencial de leucócitos

O citómetro consegue analisar as características físicas das células que passam pelo sensor onde interagem com um feixe de luz. Por análise da luz dispersa pelas partículas em questão pode recolher-se informação acerca do tamanho, morfologia e granularidade dos leucócitos e assim diferenciar e distribuir os leucócitos pelos diferentes tipos de células (neutrófilo, linfócito, monócito, eosinófilo e basófilo). Antes da análise dos leucócitos a amostra isolada pelo aparelho é misturada com um reagente que mantém a integridade dos leucócitos e provoca a lise dos eritrócitos.

A contagem de leucócitos é expressa em número de leucócitos contados $\times 10^3/\text{ul}$.

Vários factores podem afectar a exactidão da contagem de leucócitos pelo aparelho, nomeadamente, a presença de células jovens da série eritroblástica (células nucleadas), uma lise deficiente dos eritrócitos (eritrócitos resistentes) que pode levar a contagens superiores à realidade e a presença de coágulos.^[19]

Determinação de Hemoglobina

Esta determinação é feita com base numa técnica espectrofotométrico. A amostra de sangue sofre uma diluição com um reagente que provoca a lise dos eritrócitos e a consequente libertação da hemoglobina. Quando a acção lisante está concluída, um LED de

baixa energia, com um comprimento de onda de 555 nm, mede a absorvância, que é proporcional à concentração de hemoglobina. Este valor é expresso em g/dl.

Descrição dos parâmetros presentes no Hemograma

Tabela 1.3 – Descrição dos parâmetros presentes num hemograma.

Parâmetro	Determinação	Valores de Referência	Unidades
WBC – Leucócitos	Citometria de fluxo	4,0 – 11,0	10 ³ /ul
NEU – Neutrófilos	-	2,5 – 7,5	10 ³ /ul
		45 – 70	%
LYM – Linfócitos	-	1,5 – 3,5	10 ³ /ul
		20 – 40	%
MONO – Monócitos	-	0,2 – 0,8	10 ³ /ul
		3 – 10	%
EOS – Eosinófilos	-	0,04 – 0,4	10 ³ /ul
		1 – 5	%
BASO – Basófilos	-	0,01 – 0,1	10 ³ /ul
		0 - 2	%
RBC – Eritrócitos	Citometria de fluxo	4,0 – 5,5	10 ⁶ /ul
HGB – Hemoglobina	Método espectrofotométrico	12 – 16 (mulheres) 13 – 18 (homens)	g/dl
HCT – Hematócrito	(RCB×MCV)/10	35 – 47 (mulheres) 40 – 54 (homens)	%
MCV - volume médio corpuscular	Citometria de fluxo	85 - 95	fl
MCH - hemoglobina corpuscular média	(HGB/RBC)× 10	27 - 32	pg
MCHC - concentração de hemoglobina media corpuscular	(HGB/HCT)×100	32 - 36	%
RDW - heterogeneidade da população de células	Citometria de fluxo	-	%
PLT – Plaquetas	Citometria de fluxo	150 - 450	10 ³ /ul
MPV - volume médio plaquetário	Citometria de fluxo	-	fL
PDW - heterogeneidade da população de plaquetas	Citometria de fluxo	-	%

Descrição dos Histogramas

São apresentados quatro histogramas que revelam informação acerca dos vários componentes celulares. Os dois superiores permitem analisar os grupos dos leucócitos, nomeadamente os granulócitos, permitindo avaliar a população destas células presentes no indivíduo.

Os dois restantes gráficos apresentam a população de eritrócitos, sendo que a análise do pico relativo a estes permite avaliar a homogeneidade ou heterogeneidade da mesma; e a

população de plaquetas, cujas características de homogeneidade podem ser também avaliadas pela análise destes dados.

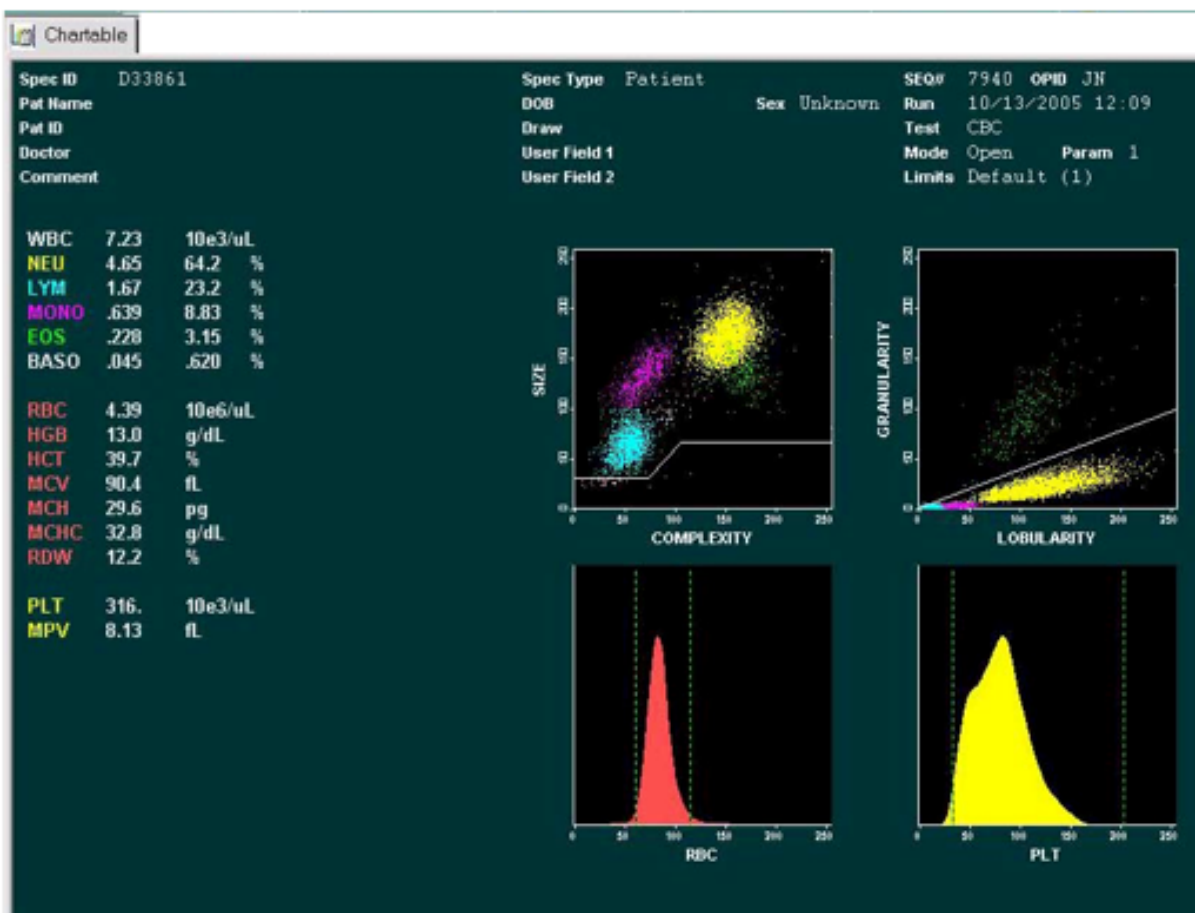


Figura 1.25 – Exemplo de representação do hemograma e dos histogramas do *Cell-Dyn Ruby*.

Contagem de Reticulócitos

No *Cell-Dyn Ruby* é ainda possível realizar uma contagem de reticulócitos. Os reticulócitos são células da série eritoblástica, já anucleadas, que contém ainda RNA ribossomal. A sua contagem é um importante instrumento de diagnóstico, reflectindo a produção de eritrócitos maduros na medula óssea avaliando a sua capacidade de resposta num situação de anemia.

Na contagem de reticulócitos a amostra usada é sangue total com EDTA como anticoagulante. A amostra é homogeneizada e são retirados 20 ul para um tubo previamente preparado pelo fabricante. Este tubo contém azul de metileno que vai corar as estruturas intracelulares dos reticulócitos permitindo ao aparelho realizar uma contagem destas células. Os valores são dados em percentagem e o equipamento consegue calcular o valor absoluto se lhe for dado um valor de concentração de eritrócitos da mesma amostra.^[19]

Velocidade de Sedimentação Globular

A velocidade de sedimentação é um parâmetro não específico usado para detectar e



monitorizar processos inflamatórios de resposta a danos a tecidos, devidos aos quais ocorrem alterações da concentração plasmática de várias proteínas. No Laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra é usado o aparelho *Sedi-15* da *Becton Dickinson* (Figura 1.26) para a determinação da velocidade de sedimentação.

Figura 1.26 – *Sedi-15* da *Becton Dickinson*

Este aparelho baseia-se na automatização do método de Westergren

O procedimento é extremamente simples e consiste em deixar o sangue repousar numa posição vertical por um período de tempo. O espaço em milímetros em que há visível sedimentação de eritrócitos durante um determinado tempo é a velocidade de sedimentação e é dado em mm/h.

A velocidade de sedimentação é afectada por alterações na componente eritrocitária, alterações na componente plasmática ou factores técnicos.

Um dos factores mais importantes neste parâmetro é o tamanho ou massa dos eritrócitos, visto que quanto maior o eritrócito maior a velocidade de sedimentação, ou seja macrócitos tendem a sedimentar mais rapidamente que micrócitos. No sangue de um indivíduo normal os eritrócitos mantêm-se afastados devido ao facto de serem negativamente carregados. Em certas patologias ocorrem alterações da concentração de algumas proteínas plasmáticas que promovem uma redução da carga negativa em torno dos eritrócitos de modo que permitem a aproximação entre várias células e a formação de agregados em *rouleaux*. Isto leva ao aumento da velocidade de sedimentação. A aglutinação entre eritrócitos pode também dever-se a alterações na superfície das células que levem à diminuição da carga destas e conseqüentemente a um aumento da velocidade de sedimentação.

A composição do plasma é o factor determinante da velocidade de sedimentação, visto que a formação de *rouleaux* e a agregação de eritrócitos influenciadas pelos níveis de proteínas no plasma, nomeadamente do fibrinogénio e de certas globulinas. O aumento da

concentração de proteínas no plasma faz aumentar a sua viscosidade, o que levaria a uma diminuição da velocidade de sedimentação mas, como leva ao aumento da agregação de eritrócitos acaba por provocar um aumento deste parâmetro.

A velocidade de sedimentação globular reflecte alterações que acompanham normalmente a maioria das infecções crónicas, tumores e doenças degenerativas. Pode também ser útil no acompanhamento de doenças como a tuberculose e a artrite reumatóide. A variação da velocidade de sedimentação permite notar a presença de infecção ou doença mas não tem relação com a sua gravidade.

Os valores normais deste parâmetro aumentam com o aumento da idade do indivíduo, de uma forma mais notória depois dos 60 anos, além disto apresentam também uma variação para os dois sexos, apresentando-se como valores de referência 0-19 mm/h para as mulheres e 0-15 mm/h para os homens.^[20]

Provas de Coagulação

A realização de provas de coagulação é determinante no diagnóstico de doenças relacionadas com o sistema hemostático, sendo também de extrema importância no acompanhamento de terapêuticas, nomeadamente de terapias anticoagulantes.

No sector de Hematologia do Laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra realizam-se as seguintes provas: tempo de activação parcial de tromboplastina (APTT); tempo de protrombina (PT); quantificação do fibrinogénio.

As provas mencionadas são realizadas no aparelho semi-automático *Option 4*. Neste aparelho a determinação dos tempos das provas é automática, sendo que é necessária a colocação da amostra e adição de reagentes de acordo com o teste que se pretende realizar.^[21]

Tempo de Protrombina (PT)

Esta prova de coagulação é um procedimento útil para detectar anomalias na via extrínseca da coagulação.

A prova consiste na determinação do tempo de coagulação duma amostra de plasma sem cálcio, a 37°C, na presença de um excesso de tromboplastina tecidular, à qual é adicionada cálcio. O tempo de coagulação do plasma da amostra está relacionado com a presença dos factores da via extrínseca (factores II, V, VII, X, fibrinogénio).^[21]

Este parâmetro pode encontrar-se elevado em situações de deficiência de vitamina K, em certas doenças do fígado, em deficiências específicas de coagulação e em determinadas terapias anticoagulantes à base de varfarina.

O resultado deste parâmetro pode ser apresentado, assim como o tempo de controlo, em segundos, em percentagem (protrombinémia) ou em INR (*International Normalized Ratio*). O INR possibilita uma comparação do tempo de protrombina independentemente do local onde é feita a análise.

$$INR = (\text{Tempo de Protrombina da Amostra/Tempo do Controlo})^{ISI}$$

ISI – Índice de Sensibilidade Internacional (fornecido pelo fabricante)

Os valores obtidos para o tempo de protrombina devem sempre ser analisados em relação ao tempo do controlo realizado.^[21]

Tempo de Activação Parcial de Tromboplastina (APTT)

A determinação deste parâmetro é útil para detectar anomalias na via intrínseca de coagulação, além disso é usada para monitorizar terapias coagulantes à base de heparina. Permite avaliar a presença de todos os factores da via intrínseca excepto das plaquetas e do factor XIII.

A amostra estudada é plasma em citrato, de modo que não apresenta cálcio ou plaquetas e contém todos os outros factores de coagulação da via intrínseca. São adicionados ao plasma cálcio, um fosfolípido substituto de plaquetas e um activador, determinando-se então o tempo que o plasma demora a coagular.

O APTT pode encontrar-se prolongado devido à deficiência de um dos factores de coagulação da via intrínseca (factores XII, XI, IX, VIII, X, V, II e fibrinogénio) ou presença de um inibidor.

Os valores obtidos para este parâmetro devem ser analisados em função do controlo, pois o resultado pode variar bastante com a alteração dos reagentes em uso.^[21]

Quantificação do Fibrinogénio

A determinação da quantidade de fibrinogénio é útil no diagnóstico de patologias como afibrinogenemia congénita, hipofibrinogenemia, coagulação intravascular disseminada (CID), fibrinólise ou hepatopatias.

A amostra usada nesta prova é plasma em citrato ao qual é adicionado um excesso de trombina sendo depois medido o tempo de formação de coágulo. A concentração de fibrinogénio da amostra é determinada por comparação com resultados de tempos de coagulação de amostras com quantidades conhecidas de fibrinogénio. O tempo de coagulação de uma amostra é inversamente proporcional à quantidade de fibrinogénio da amostra.

Valores elevados de fibrinogénio podem aparecer em estados pré-trombóticos ou hipercoaguláveis e pacientes com trombozes.

Os valores de referência para este parâmetro são 150 a 350 mg/dl.^[21]

Observação de Esfregaços de Sangue Periférico

A observação de lâminas com esfregaços de sangue periférico, corados mediante determinadas técnicas permitem a confirmação de dados fornecidos por aparelhos automáticos e em muitos casos a obtenção de informação importante para diagnóstico de determinadas patologias. A observação dos esfregaços preparados permite avaliar a morfologia das células presentes (leucócitos, eritrócitos e plaquetas) e a deteção de certas anomalias nas mesmas. As lâminas pretendidas para estudo e observação da morfologia das células sanguíneas e para elaboração de fórmula leucocitária são normalmente coradas pelas colorações de *Wright* ou *May-Grunwald-Giemsa*.

No Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra a coloração utilizada é a coloração de *May-Grunwald-Giemsa* e as lâminas só são preparadas se o hemograma obedecer pelo menos um dos seguintes critérios:

- Inversão de fórmula igual ou superior a 10%;
- Monócitos superiores a 14%;
- Basófilos superiores a 2%;
- RDW superior a 15;
- RDW superior a 14 se constantes eritrocitárias alteradas;
- Plaquetas inferiores a $150 \times 10^3 / \mu\text{L}$.
- E outras situações nomeadamente, alarmes do aparelho ou Leucocitoses elevadas.

Realização do Esfregaço de Sangue Periférico

A preparação do esfregaço de sangue periférico é muito importante pois depende desta técnica a boa observação das células sanguíneas. Devem preparar-se pelo menos dois esfregaços de uma amostra a observar, seguido o mesmo procedimento, para garantir uma boa observação.

Esta técnica é descrita seguidamente.

1 – Recorre-se a uma lâmina devidamente limpa e uma lamela ou lâmina com os cantos arredondados, para permitir uma melhor distribuição da amostra pela lâmina.

2 – Coloca-se, cuidadosamente, uma pequena gota de sangue (cerca de 10 µl) no eixo central da lâmina a cerca de 1 cm de uma das suas extremidades.

3 – Coloca-se a extremidade da lamela ou da segunda lâmina em contacto com a primeira lâmina, que deve estar apoiada numa superfície horizontal, um pouco à frente da gota de sangue, criando um ângulo de 30° a 40° entre as duas.

4 – Faz-se retroceder a lâmina ou lamela até que entre em contacto com a gota de sangue e este flua rapidamente por todo o comprimento da zona de contacto entre as duas lâminas (ou lâmina e lamela).

5 – Apoiando a lamela ou segunda lâmina sobre a lâmina horizontal com um ângulo de cerca de 30°, faz-se avançar esta rapidamente ao longo de todo o comprimento da lâmina horizontal.

6 – O esfregaço seca rapidamente ao ar, procedendo-se seguidamente à coloração do mesmo.

Coloração de May-Grunwald-Giemsa

1. Preparação da Solução Corante:

1 Vol. de Giemsa + 2 Vol. de May-Grunwald + 3 Vol. Água Tamponada
(preparada todos os dias)

2. Coloração:

- a. Cobrir a lâmina com metanol e esperar 3 minutos.
- b. Remover o metanol.
- c. Cobrir a lâmina com solução corante e esperar 2 minutos.
- d. Lavar com água destilada para finalizar.

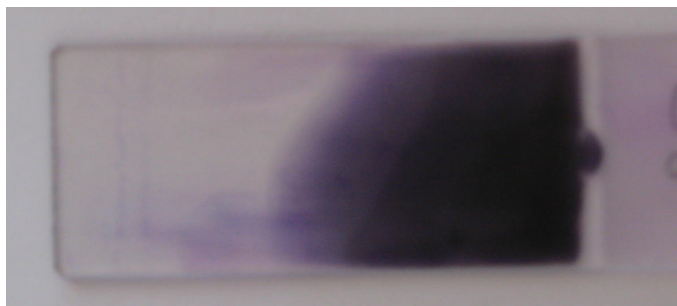


Figura 1.27 – Imagem de um esfregaço corado pelo método de *May-Grunwald-Giemsa*.

Fórmula Leucocitária

A fórmula leucocitária permite apresentar a relação percentual de cada tipo de glóbulo branco presente na amostra. Em certas situações como leucocitoses (aumento do número total de leucócitos) ou leucopenias (diminuição do número total de leucócitos) a determinação da fórmula leucocitária é extremamente útil para reconhecer qual o tipo ou os tipos de leucócitos que apresentam o seu número alterado.

A determinação da fórmula é feita por observação do esfregaço corado ao microscópio óptico, de preferência em campos não localizados nos extremos da lâmina e onde não ocorra agregação celular, mas sim uma camada fina de células. Podem contar-se 100 leucócitos para determinação da fórmula, sendo no entanto recomendada a contagem de 200 ou 250 com vista a minorar os erros. É usado um contador manual que emite um sinal sonoro quando atinge as 100 células registadas e fornece uma leitura fácil do resultado da contagem em termos percentuais.

Tabela 1.4 – Valores de referência da fórmula leucocitária

Tipo de Leucócito	Valor Relativo em % (Adulto)
Neutrófilos	Segmentados 50-65
Linfócitos	25-40
Monócitos	4-10
Eosinófilos	1-3
Basófilos	0-1

Imunohematologia: Grupos Sanguíneos

O sangue de cada indivíduo é classificado em grupos de acordo com a presença de antígenos específicos nos eritrócitos. O conhecimento do grupo sanguíneo de um indivíduo

e de uma determinada unidade de sangue é essencial para a realização de transfusões sanguíneas com maior grau de segurança.

Sistema AB0

Este sistema refere-se a um conjunto de antígenos que podem estar ou não presentes na membrana de glóbulos vermelhos. A presença destes antígenos e dos potentes anticorpos a eles relativos leva a que, de entre os vários sistemas sanguíneos, o sistema AB0 seja de especial importância em processos de transfusões sanguíneas e de transplantes de órgãos. O aparecimento dos antígenos AB0, como de outros antígenos eritrocitários, resulta da expressão de genes herdados dos progenitores que definem um determinado fenótipo, que neste caso pode ser A, B, AB ou 0.

Os anticorpos do sistema AB0, anti-A e anti-B, estão normalmente presentes nos soros de indivíduos que não têm os antígenos correspondentes na superfície dos seus eritrócitos. Estes anticorpos são do tipo IgM aglutinantes, não atravessam a placenta, reagem à temperatura do organismo, à temperatura ambiente ou a temperaturas baixas (anticorpos “frios”) aglutinando os eritrócitos.

Os vários fenótipos do sistema AB0 são apresentados na tabela seguinte.

Tabela 1.5 – Fenótipos do sistema AB0.

Fenótipo	Antígenos Eritrocitários	Anticorpos
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A e B	-
0	-	Anti-A e Anti-B

Sistema Rhesus

O sistema *Rhesus* ou factor Rh é um outro sistema de antígenos identificado nas células sanguíneas capaz de provocar reacções de incompatibilidade. Os antígenos deste sistema encontram-se localizados na membrana de eritrócitos e os mais comuns são os seguintes: C, D, E, c e e. Dos antígenos o mais imunogénico é o D, sendo também o mais comum na população. Cerca de 85% da população apresenta o antígeno D, e nesse caso são considerados indivíduos com sangue Rh(D)+ em que na presença do anticorpo anti-D se

observa aglutinação. Os restantes 15% da população não possuem estes antígeno pertencendo ao grupo Rh(D)- , não se observando aglutinação na presença do anticorpo anti-D.

Determinação de Grupos Sanguíneos

A combinação do sistema AB0 com o sistema Rhesus permite classificar os indivíduos em vários grupos conforme o tipo de sangue. No Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra esta determinação é efectuada pela prova celular. Esta prova consiste na adição de células do utente com anti-soros comerciais anti-A, anti-B e anti-D. A mistura reage à temperatura ambiente e a obtenção ou não de aglutinação visível, conforme o tipo de célula e anticorpo conhecido, permite classificar o sangue do utente.

Bioquímica

No Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra as análises bioquímicas, à excepção da hemoglobina glicada A1c (HbA1c), são todas realizadas recorrendo ao aparelho automático *Architect ci8200* da *Abbott Diagnostics* que está dividido em dois módulos, o da bioquímica *c8000* e o da imunologia *i2000SR*. No módulo da bioquímica são realizados diversos ensaios que serão agrupados de forma a facilitar a sua descrição e compreensão. Esta divisão é meramente académica e pessoal, outros critérios podem ser escolhidos para agrupar as análises uma vez que a maior parte dos analitos se relacionam de várias maneiras.



Figura 2.1– *Architect ci8200* da *Abbott Diagnostics*.

Doseamento de Iões

Os fluídos biológicos contêm Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , H_2PO_4^- , $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$, SO_4^{2-} e alguns aniões orgânicos como o lactato.

Neste capítulo vão-se discutir os parâmetros sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-) e ainda osmolalidade, inseridos na questão do Equilíbrio Hidro-Electrolítico e também o Ca^{2+} , o Mg^{2+} e o fósforo nas suas diferentes formas.

Avaliação do Equilíbrio Hidro-Electrolítico

A manutenção da pressão osmótica e da distribuição da água nos diferentes compartimentos do corpo é uma das principais funções de quatro electrólitos: Na^+ , K^+ , Cl^- e bicarbonato (HCO_3^-). Estes electrólitos existem no nosso organismo principalmente na forma de iões livres. Num laboratório de análises clínicas, o doseamento de Na^+ , K^+ e Cl^- (ionograma) são umas das análises de rotina mais frequentemente pedidas.

Para complementar a caracterização de qualquer alteração a nível do equilíbrio hidro-electrolítico também se pode fazer a determinação da osmolalidade.^[22]

Sódio (Na^+)

O sódio é o principal catião do fluído extracelular representando cerca de 90% dos aproximadamente 154 mmol de catiões inorgânicos por litro de plasma. Assim, o sódio tem um papel fundamental na manutenção da normal distribuição da água e da pressão osmótica nos fluídos extracelulares. Na dieta diária normal consomem-se cerca de 8 a 15g (130 a 260 mmol) de NaCl que são absorvidas no tracto gastrointestinal quase na sua totalidade. Apesar da quantidade ingerida, o nosso organismo necessita apenas de 1 a 2 mmol por dia sendo o excesso excretado pelos rins. O Na^+ é filtrado no glomérulo e posteriormente, cerca de 70% a 80% é activamente reabsorvido nos túbulos proximais com o Cl^- . Esta movimentação do sódio é acompanhada, passivamente, pela água. Na ansa de Henle 20 a 25% são reabsorvidos também com o Cl^- juntamente com água. Nos túbulos distais a interacção com a aldosterona vai determinar a reabsorção da restante porção de Na^+ filtrada, em troca com o K^+ , e assim definir qual a quantidade de sódio que é excretada na urina.

Situações de hiponatrémia podem acontecer com uso excessivo de diuréticos, situação de vómitos prolongada, uma ingestão diminuída na dieta e acidose metabólica. Já a hipernatrémia pode-se verificar em desidratação severa ou um consumo elevado de sal sem a ingestão de água e em determinadas patologias como o síndrome de Cushing.

Os valores de referência para este parâmetro situam-se entre 135 e 145 mmol/L.^[22]

Cloreto (Cl^-)

O ião cloreto é o principal anião extracelular no organismo, sendo que a maioria do cloro ingerido é absorvido e apenas o excesso excretado na urina. A absorção do cloro ingerido ocorre no tubo digestivo e é removido da circulação sanguínea por filtração glomerular, reabsorvido nos túbulos proximais dos nefrónios e excretado apenas o excesso.

Este componente tem papéis fundamentais em vários mecanismos nomeadamente na distribuição de água, na regulação da pressão osmótica e na manutenção de gradientes eléctricos.

Os valores de cloreto sérico podem encontrar-se aumentados em casos de permeabilidade renal insuficiente, necrose, desidratação ou alimentação incluindo um excesso de cloretos. Pode também ocorrer uma diminuição dos valores de cloreto no soro devido a pielonefrites crónicas, acidose metabólica e vómitos prolongados.

Os valores de referência para este parâmetro situam-se entre 96 e 110 mmol/L.^[22]

Potássio (K⁺)

O potássio é o principal catião intracelular. A concentração de potássio nos eritrócitos é aproximadamente 23 vezes superior à concentração do plasma. Por esta razão não se podem usar amostras hemolisadas na sua quantificação.

Na dieta diária ingerem-se cerca de 50 a 150 mmol de K⁺ que são absorvidos no tracto gastrointestinal e rapidamente distribuídos pelo organismo, sendo o excesso excretado pelos rins. O K⁺ filtrado pelo glomérulo é quase completamente reabsorvido nos túbulos proximais e é depois secretado nos túbulos distais em troca com o Na⁺, sob a influência da aldosterona.

Os valores K⁺ podem estar alterados em situações de fraqueza muscular e principalmente problemas cardíacos. A terapêutica prolongada com diuréticos pode levar também à depleção de K⁺

Os valores de referência para este parâmetro situam-se entre 3,5 e 5,0 mmol/L.

No *Architect ci8200* o Na⁺, o K⁺ e o Cl⁻ são quantificados por potenciometria. São usados eléctrodos selectivos que utilizam membranas selectivas a cada um dos iões.^[22]

Osmolalidade

A osmolalidade é um parâmetro calculado que determina a concentração de solutos que contribuem para a pressão osmótica de uma solução. Assim, a osmolalidade no plasma é calculada recorrendo à seguinte fórmula,

$$\text{Osmolalidade (mOsm/kg)} = (1,86 \times [\text{Na}^+] \text{ mmol/L}) + [\text{Glucose}] \text{ mmol/L} + [\text{Azoto Ureico}] \text{ mmol/L} + 9$$

em que os 9 mOsm/kg adicionados representam a contribuição de outras substâncias osmoticamente activas no plasma como o potássio, o cálcio, e as proteínas. A constante 1,86 reflecte a contribuição do sódio e do cloro.

O intervalo de referência para a osmolalidade do plasma é entre 275 e 300 mOsm/kg.^[22]

Cálcio, Magnésio e Fósforo

Cálcio (Ca^{2+})

O cálcio, ião de extrema importância no organismo humano, desempenha papéis primordiais em vários mecanismos fisiológicos nomeadamente na contracção muscular, na transmissão nervosa, em processos de activação enzimática e na coagulação. Tem também uma grande importância na estrutura óssea e dentária do corpo humano.

O cálcio pode encontrar-se na corrente sanguínea sob duas formas; na forma ionizada ou ligado a proteínas. Na forma ionizada o cálcio pode difundir através do endotélio capilar. A ligação a proteínas verifica-se sobretudo com a albumina. Este ião pode ser eliminado do organismo pelas fezes ou pela urina sob a forma de sais solúveis.

Pode detectar-se um aumento dos valores normais de cálcio no soro (hipercalcémia) nomeadamente em situações de tumores ósseos ou hiperparatiroidismo. Noutras situações pode surgir hipocalcémia (redução da quantidade de cálcio no soro) nomeadamente em casos de insuficiência renal ou hipoparatiroidismo.

Os valores de referência para o cálcio estão entre 2,10 e 2,55 mmol/L.

O método utilizado para determinar a concentração de cálcio baseia-se na reacção do corante arsenazo-III com o cálcio, numa solução ácida formando o complexo azul/roxo. De seguida é feita uma medição a 660 nm em que a intensidade da cor é proporcional à concentração de cálcio na amostra. ^[23]

Magnésio (Mg^{2+})

Este ião é o quarto catião mais abundante no corpo, sendo essencial em vários processos físico-químicos do organismo, nomeadamente na preservação da estrutura do DNA, RNA e ribossomas e na activação de enzimas como fosfatases, pirofosfatases, cinases e carboxilases. Cerca de 50% do magnésio presente no organismo encontra-se nos ossos e praticamente os outros 50% nos tecidos moles, sendo que apenas cerca de 1% do magnésio total se encontra no sangue, ligado à albumina, como ião livre ou em complexos iónicos.

Este elemento encontra-se presente numa grande variedade de alimentos, sendo por isto raras as situações de deficiência de magnésio em indivíduos com dietas normais, excepto em casos de má absorção.

O doseamento deste catião tem por base uma reacção entre o magnésio e o arsenazo, donde ocorre formação de um complexo corado, cuja absorvância a 572 nm é

proporcional à concentração de magnésio na amostra. A interferência do cálcio neste doseamento é eliminada pela adição de um agente quelante de cálcio.

O valor de referência para este elemento no soro é de 1,6 a 2,6 mg/dl. [23]

Fósforo

O fósforo é um componente essencial dos organismos vivos encontrando-se associado a moléculas e estruturas orgânicas essenciais como os ácidos nucléicos, fosfolípidos e co-factores enzimáticos. O facto de ser constituinte também de uma outra série de moléculas como radicais metafosfato, grupos fosforilo e ATP, torna este ião essencial para a função metabólica.

O fósforo é absorvido no tracto gastro-intestinal com uma eficácia superior à de outros iões como magnésio e cálcio, e é principalmente excretado na urina e nas fezes.

O fósforo é encontrado no soro nas suas formas inorgânicas, nomeadamente H_2PO_4^- e $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$, dependendo do pH.

A reacção de doseamento baseia-se no facto do fosfato inorgânico reagir com molibdato de amónio, formando um complexo de fosfomolibdato cuja absorvância a 340 nm é proporcional à concentração de fósforo na amostra de soro.

Os níveis séricos normais para o fósforo são 2,5 a 5 mg/100 ml, podendo estes valores encontrar-se aumentados em fases de crescimento. [23]

Glicémia e Diagnóstico da Diabetes

As determinações da glicémia e da HbA1c são, talvez, as análises mais frequentemente realizadas em qualquer laboratório de análises clínicas e são usadas principalmente como ajuda ao diagnóstico e controlo da diabetes.

Glicémia

Nas determinações da glicémia há a registar dois tipos de parâmetros: a glicémia em jejum e a prova de tolerância à glicose oral (PTGO). Esta prova consiste em analisar a glicémia em jejum e após a ingestão de uma solução de 200 mL com 75g de glicose.

No *Architect ci8200* a glicose é determinada pelo método da hexocinase. Após fosforilação pela hexocinase formando-se glucose-6-fosfato, esta é oxidada pela glucose-6-

fosfato-desidrogenase produzindo 6-fosfogluconato. O 6-fosfogluconato reduz o NAD^+ a NADH, portanto, cada mole de NADH formada, corresponde a uma mole de glicose. Por fim é feita a leitura da absorvância a 340 nm.^[24]

Hemoglobina Glicada A1c

Num indivíduo adulto normal existem mais que um tipo de hemoglobina, que diferem entre si nas cadeias polipeptídicas que as constituem, sendo identificadas pela menos três: HbA ($\alpha_2\beta_2$), HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) e HbF ($\alpha_2\gamma_2$). Dos três tipos de hemoglobinas referidas a HbA é o tipo predominante, constituindo cerca de 97% da hemoglobina total encontrada nos eritrócitos. A HbA apresenta também uma grande heterogeneidade de fracções, nomeadamente a fracção HbA₁ (A_{1a}, A_{1a2}, A_{1δ} e A_{1c}) também denominada hemoglobina glicada que constitui cerca de 7% da hemoglobina HbA presente no organismo. A maior fracção das hemoglobinas glicosiladas corresponde à fracção HbA_{1c}, que apresenta uma molécula de glicose ligada ao terminal valina de uma ou das duas cadeias β da hemoglobina A.

Visto que a membrana dos eritrócitos é permeável à glicose, a ligação desta à hemoglobina ocorre dentro das células e reflecte a quantidade média de glicose no sangue durante os 3 ou 4 meses antes da colheita, correspondentes ao de tempo de vida dos eritrócitos. Por isto, a determinação da HbA_{1c} pode ser útil no acompanhamento e monitorização de pacientes diabéticos controlados e no diagnóstico de *diabetes mellitus* não tratada.

A HbA_{1c} é excepção em relação aos outros parâmetros bioquímicos que são realizados no *Arquitect*. Esta análise é realizada em sangue total, no aparelho da *Arkray, Adams A1C – HA-8160* que efectua as medições por cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC).^[25]

Diagnóstico da Diabetes

Segundo a Norma da Direcção-Geral da Saúde para o Diagnóstico e Classificação da Diabettes Mellitus^[26], o diagnóstico da diabetes é feito com base nos seguintes parâmetros e valores para plasma venoso na população em geral:

- a) Glicémia em jejum ≥ 126 mg/dL;
- b) Sintomas clássicos + glicemia ocasional ≥ 200 mg/dL;
- c) Glicémia ≥ 200 mg/dL às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75g de glicose;
- d) Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$.

O diagnóstico de diabetes numa pessoa assintomática não deve ser realizado na base de um único valor anormal de glicémia em jejum ou da HbA1c, devendo ser confirmado numa segunda análise, após uma ou duas semanas. É também aconselhável usar um só parâmetro para o diagnóstico da diabetes. No entanto, se houver avaliação simultânea da glicémia em jejum e da HbA1c, e se ambos forem valores de diagnóstico, este fica confirmado. Se um dos valores for discordante, o parâmetro anormal deve ser repetido numa segunda análise.

Nas análises da glicémia podem também ser identificadas hiperglicémias anómalas e tolerâncias diminuídas à glicose que são condições de risco aumentado para diabetes. Estes casos são identificados por glicémias em jejum ≥ 110 mg/dL e < 126 mg/dL e glicémias às 2 horas na PTGO ≥ 140 mg/dL e < 200 mg/dL.

Em situações de gravidez é feito o despiste da diabetes gestacional. Este diagnóstico é de extrema importância para evitar complicações e é feito com base nos seguintes valores para plasma venoso:

- a) Glicémia em jejum, a realizar na 1ª consulta de gravidez, ≥ 92 mg/dL e < 126 mg/dL;
- b) Se glicémia em jejum < 92 mg/dL, realiza-se a PTGO com 75g de glicose, às 24-48 semanas de gestação. É critério para diagnóstico da diabetes gestacional, a confirmação de um ou mais valores:
 - 1. Às 0 horas, glicémia ≥ 92 mg/dL;
 - 2. À 1 horas, glicémia ≥ 180 mg/dL;
 - 3. Às 2 horas, glicémia ≥ 153 mg/dL.^[26]

Estudo do Metabolismo dos Lípidos

A determinação quantitativa dos vários parâmetros da ficha lípidica no soro é de extrema importância, podendo evidenciar a presença de dislipidémias num determinado indivíduo. As funções desempenhadas pelos lípidos são várias e de crucial importância, sendo componentes estruturais e funcionais de todas as membranas biológicas, fonte de energia e modo de armazenamento desta e tendo um papel importantíssimo na síntese de variadas hormonas.

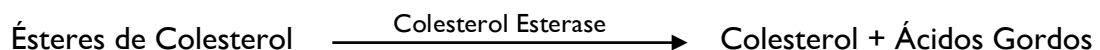
Os variados lípidos são transportados na corrente sanguínea em complexos proteicos que, dependendo das suas dimensões e densidade, são classificados como quilomícrons, VLDL (Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade), LDL (Lipoproteínas de Baixa Densidade) e HDL (Lipoproteínas de Alta Densidade).

Num laboratório de análises clínicas o estudo do metabolismo dos lípidos envolve principalmente os seguintes parâmetros: Colesterol Total, Colesterol-HDL, Colesterol-LDL e Triglicéridos.^[27]

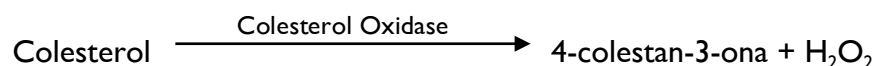
Colesterol Total

O colesterol é um álcool do grupo dos esteróis que é precursor ou parte integrante de sais biliares, hormonas, membranas plasmáticas e outras moléculas ou estruturas especializadas. O principal local de síntese do colesterol é o fígado, apesar da sua síntese poder ocorrer noutros locais, sendo que é também neste órgão que decorre a principal via de excreção deste composto.

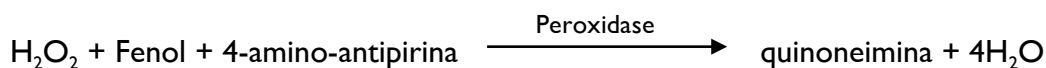
Para o doseamento do colesterol total tem de incluir-se o colesterol livre e o colesterol esterificado pelo que o primeiro passo da técnica consiste exactamente na reversão da esterificação do colesterol. Deste modo é promovida a hidrólise dos ésteres de colesterol por acção da enzima colesterol esterase.



O colesterol presente na amostra, entretanto todo livre, sofre uma reacção de oxidação catalisada pela colesterol oxidase, obtendo-se peróxido de hidrogénio.



O peróxido de hidrogénio reage com dois compostos contidos no reagente formando-se quinoneimina, numa reacção catalisada por uma peroxidase. A quinoneimina é detectada espectrofotometricamente por leitura da absorvância a 500 nm, sendo este valor proporcional à quantidade de colesterol presente na amostra.



A concentração recomendada para este parâmetro é até 200 mg/dL.^[27]

HDL e LDL

O principal papel das HDL é o transporte do colesterol para o fígado num processo conhecido como transporte reverso do colesterol. Existe uma relação inversa entre a quantidade de HDL, presente na corrente sanguínea e a probabilidade de incidência de doenças cardiovasculares.

O método de quantificação consiste na aceleração da reacção da colesterol oxidase usando um detergente específico. É recomendado que este parâmetro tenha uma concentração superior a 40 mg/dL.

As LDL são responsáveis, principalmente, pelo transporte do colesterol para os tecidos. As células possuem receptores específicos para as LDL nas suas membranas, sendo que, o aumento das LDL na circulação muitas vezes está associado à diminuição desses receptores. Esta acumulação de colesterol LDL em circulação está directamente associada a um maior risco de aterosclerose.

A quantificação das LDL pode ser feita por método indirecto, recorrendo à equação de Friedwald,

$$\text{Colesterol-LDL} = \text{Colesterol Total} - [\text{Colesterol-HDL}] - [\text{Triglicerídeos}/5]$$

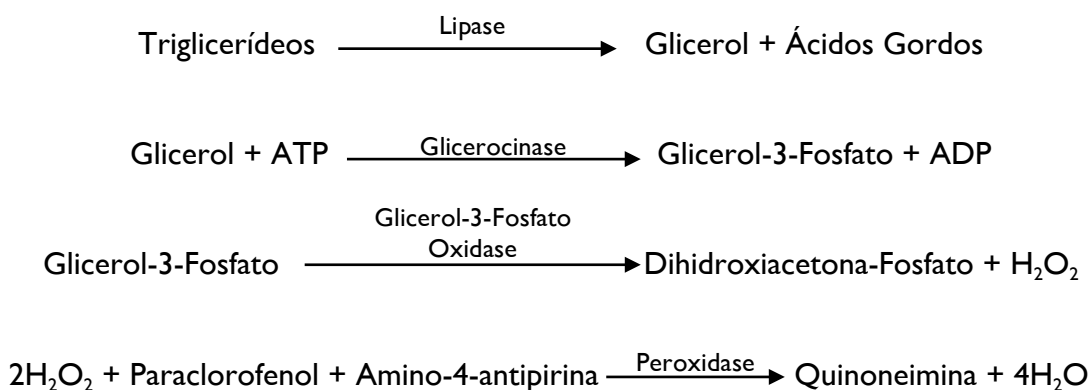
onde $[\text{Triglicerídeos}/5]$ é uma estimativa da concentração do colesterol VLDL. Esta estimativa só pode ser usada em valores de triglicerídeos menores que 400 mg/dL uma vez que em valores superiores esta proporção deixa de ser válida. É recomendado que este parâmetro tenha uma concentração inferior a 100 mg/dL.^[27]

Triglicerídeos

Os triglicerídeos são moléculas insolúveis em água que são transportadas no plasma em lipoproteínas e armazenadas no tecido adiposo. Estas moléculas são constituídas por três ácidos gordos ligados a um glicerol, representando uma grande reserva energética para o organismo devido à possibilidade de degradação dos ácidos gordos.

Na avaliação dos triglicerídeos é de grande importância que haja um jejum prolongado. Isto deve-se ao facto da ingestão de alimentos provocar um aumento dos triglicerídeos em circulação principalmente associada à fracção dos quilomicrons fazendo com que o valor determinado tenha um erro por excesso.

A determinação enzimática dos níveis de triglicerídeos no soro baseia-se numa cadeia de reacções que se inicia com a sua hidrólise em glicerol e ácidos gordos pela acção da lipase. O glicerol obtido é transformado em glicerol-3-fosfato pela acção da glicerocinase, seguindo-se a conversão deste em dihidroxiacetona-fosfato e H_2O_2 por acção da glicerol-3-fosfato oxidase. O peróxido de hidrogénio obtido reage com 4-clorofenol e amino-4-antipirina, numa reacção catalisada por uma peroxidase, originando quinoneimina e H_2O . A formação do produto quinoneimina é detectada por leitura de absorvância a 505 nm, e o valor obtido é proporcional à quantidade de triglicerídeos presentes no soro.



Os valores de referência para este parâmetro no soro encontram-se nos intervalos de 40 a 140 mg/dl, para as mulheres, e de 60 a 160 mg/dL, para os homens.^[27]

Avaliação da Função Renal

A avaliação da função renal é de extrema importância no controlo e diagnóstico de diversas patologias. Num laboratório de análises os parâmetros mais determinados associados à função renal são a creatinina, a ureia, o ácido úrico e a microalbuminúria ou albumina de baixa concentração.

Creatinina

A creatinina resulta da reacção entre creatina e fosfocreatina, durante o metabolismo muscular, sendo normalmente eliminada livremente pela filtração glomerular nos rins. A determinação deste parâmetro é útil no diagnóstico e monitorização de distúrbios renais crónicos e agudos, assim como seguimento da diálise.

A determinação da creatinina numa amostra baseia-se na reacção da creatinina com o ácido pícrico num pH alcalino formando o complexo creatinina-picrato. O aumento da absorvância a 500 nm devido à formação do complexo é directamente proporcional à concentração de creatinina na amostra.

Os valores de referência para este parâmetro no sangue, soro ou plasma, são 0,7 a 1,3 mg/dl nos homens, e 0,6 a 1,1 mg/dl nas mulheres.

Para além da creatinina no soro é usual a determinação da depuração de creatinina na urina para avaliar a taxa de filtração glomerular. Este parâmetro é calculado recorrendo a uma amostra de urina de 24 horas. A fórmula utilizada é a seguinte:

$$\text{Clearance da Creatinina (ml/min)} = \frac{[\text{creatinina urina}]}{[\text{creatinina soro}]} \times V$$

,em que V é o volume de urina em 24 horas. Para que seja totalmente rigoroso, o cálculo da depuração da creatinina deve ter em conta a área corporal e sexo do indivíduo uma vez que a creatinina provém do metabolismo muscular. Uma vez que estas variáveis não são fáceis de avaliar no dia-a-dia de um laboratório de análises clínicas é feita apenas uma estimativa recorrendo à fórmula anteriormente apresentada.^[28]

Ureia

O catabolismo das proteínas e dos aminoácidos resulta na formação de ureia, que é predominantemente eliminada do organismo pelos rins. A ureia ($\text{CO}[\text{NH}_2]_2$) é o principalmente composto que permite ao organismo eliminar o azoto proveniente do catabolismo das proteínas no ciclo da ureia.

Uma vez que 90% da ureia é excretada a nível renal esta tem sido usada como um marcador da função renal mas actualmente é reconhecido que a creatinina é um marcador mais fiável uma vez que existem muitas situações que não dependem da função renal para o aumento da ureia. Uma das principais é o aumento das proteínas totais com o consequente aumento do seu catabolismo, provoca um aumento da ureia em que a função renal não está comprometida.

A determinação da concentração da ureia é realizada por reacções enzimáticas combinadas. Inicialmente a ureia na amostra é hidrolisada pela urease e numa segunda reacção vai haver a oxidação de NADH a NAD^+ . Duas moles de NADH são oxidadas por cada mole de ureia presente. É feita uma leitura da absorvância a 340 nm.

Os valores de referência para este parâmetro variam entre 9 e 20 mg/dL. ^[28]

Ácido Úrico

O ácido úrico é o principal produto do metabolismo das purinas, sendo formado a partir da xantina por acção da xantina oxidase. Este composto é um ácido fraco presente nos fluídos corporais na forma de anião urato. A origem deste composto deve-se portanto ao catabolismo de nucleoproteínas ingeridas, de nucleoproteínas endógenas e nucleótidos de purinas endógenos provenientes da renovação celular fisiológica.

A excreção de ácido úrico ocorre através das secreções biliar, pancreática e gastrointestinal, sendo posteriormente degradado pela flora intestinal.

Podem ser detectadas variações dos valores normais de urato sérico, surgindo aumentos da quantidade de uratos – hiperuricémia, ou diminuições desses valores – hipouricémia. A hiperuricémia tem um valor clínico mais acentuado que a hipouricémia. A hiperuricémia acompanha normalmente situações de gota, obesidade, aterosclerose, *diabetes mellitus* ou hipertensão. Patologias como linfomas, leucemias e neuroblastomas promovem um aumento da produção e catabolismo de nucleoproteínas promovendo também um aumento dos níveis de urato no sangue. A ingestão de dietas ricas em purinas (carne,

vísceras e leguminosas) pode também levar ao aparecimento de hiperuricémia assim como aumento da excreção de urato na urina. A hiperuricémia favorece o aparecimento de nefropatias e falha renal por acumulação de uratos nos túbulos renais.

A determinação enzimática do ácido úrico no soro baseia-se na reacção de conversão do ácido úrico a alantoína e peróxido de hidrogénio por acção da enzima uricase. O peróxido de hidrogénio reage com outros dois compostos (ácido 2,4,6-tribromo-3-hidroxibenzeno e 4-amino-antipirina) na presença de uma peroxidase, formando-se quinoneimina. A quantidade de quinoneimina (composto detectado espectrofotometricamente) é proporcional à quantidade de ácido úrico presente na amostra e é determinada por leitura espectrofotométrica a 548 nm.

Os valores de referência para este parâmetro são, para os homens, 3,5 a 7,2 mg/dl, e para as mulheres, 2,60 a 6,0 mg/dL.^[28]

Microalbuminúria

Outro parâmetro de extrema importância no controlo e previsão das complicações da função renal é a microalbuminúria ou albumina de baixa concentração. A microalbuminúria consiste na determinação de baixos níveis de concentração de albumina na excreção urinária e é um marcador prematuro da falha da função renal. Em patologias como a diabetes é essencial o controlo deste parâmetro para que se possa agir a tempo de evitar uma das maiores complicações da diabetes. A nefropatia diabética é uma das principais causas de morte em diabéticos. Uma vez que é acompanhada de danos irreversíveis nos rins e de proteinúria persistente, é um factor decisivo no que respeita ao início de hemodiálise.

O princípio do método de quantificação da microalbuminúria consiste na utilização de anticorpos policlonais contra albumina humana num imunoensaio turbidimétrico. Quando uma amostra é misturada com os reagentes, a albumina presente na amostra combina-se com o anticorpo anti-albumina humana no reagente para se obter um agregado insolúvel que provoca um aumento da turvação na solução. O grau de turvação é proporcional à concentração de albumina presente na amostra e pode ser medido opticamente.

Em relação a valores de referência, o esperado é que a albuminúria seja sempre <30 mg/24h.^[29]

Avaliação da Função Hepática

O fígado tem um papel fulcral no organismo sendo responsável pelo metabolismo de substâncias endógenas e exógenas. Assim, o controlo da função hepática é feito frequentemente em diversas patologias. Este controlo é feito através de parâmetros como a bilirrubina, e diversas enzimas, como a fosfatase alcalina ou a γ -glutamyl-transferase.

Bilirrubina Total e Directa

A maior parte da bilirrubina é o produto da lise normal e anormal de eritrócitos no sistema reticulo-endotelial, na fígado, baço e medula óssea, sendo o seu doseamento um importante parâmetro de análise da função hepática. Cerca de 85% da bilirrubina provém da degradação dos grupos heme da hemoglobina e a restante porção provém da degradação de citocromos, mioglobina, peroxidases e catalases.

A bilirrubina, depois de formada, é transportada através da corrente sanguínea, ligada à albumina, até ao fígado, sendo aqui conjugada com ácido glucorónico. Esta porção corresponde à bilirrubina conjugada ou directa, sendo esta a porção que pode ser excretada pelos rins por ser solúvel em água. A bilirrubina que não se encontra conjugada é insolúvel em água e encontra-se no soro ligada a proteínas séricas, sendo correspondente à porção de bilirrubina indirecta.

A bilirrubina directa é eliminada também na bÍlis, atingindo o duodeno, onde sofre acção enzimática de bactérias da flora intestinal, sendo transformada em vários produtos nomeadamente em urobilinogénio.

O doseamento deste parâmetro no soro pretende determinar a intensidade e progresso de uma condição de icterícia. O doseamento da concentração sérica de cada uma das porções de bilirrubina permite o diagnóstico diferencial da icterícia. A icterícia pode dever-se a hiperbilirrubinémia não conjugada ou conjugada. A primeira situação é pré-hepática (por hemólise excessiva) ou hepática (eliminação defeituosa de bilirrubina no sangue ou conjugação com ácido glucorónico ineficaz). Nestas situações é detectado um aumento da bilirrubina total no soro devido ao aumento da fracção de bilirrubina não conjugada. A segunda situação referida, hiperbilirrubinémia conjugada, pode ter origem hepática ou pós-hepática, sendo que nestas situações há, normalmente, obstrução dos vasos hepáticos (icterícia obstrutiva).

A determinação da bilirrubina é baseada na reacção da bilirrubina com um sal diazónio na presença de ácido sulfâmico formando azobilirrubina, um composto corado. O aumento da absorvância a 548 nm é directamente proporcional à concentração de bilirrubina presente na amostra.

Os intervalos de referência para estes parâmetros são, num indivíduo adulto, <0,5 mg/dl para a bilirrubina directa e 0,2 a 1,2 mg/dl para a bilirrubina total.^[30]

Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina catalisa a hidrólise alcalina de uma grande variedade de substratos. A actividade desta enzima está presente na maior parte dos órgãos do corpo e está especialmente associada a membranas e superfícies celulares localizadas no fígado e no osso. Assim, o aumento da sua actividade no soro é relevante na investigação de patologias hepatobiliares, situações de colestase e patologias ósseas associadas com o aumento da actividade osteoblástica.

A determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina baseia-se numa reacção catalisada pela mesma, na qual a hidrólise de *p*-nitrofenil fosfato (composto sem cor) forma *p*-nitrofenil (composto amarelo a pH alcalino) e fosfato inorgânico. O aumento da absorvância a 404 nm é directamente proporcional a actividade da fosfatase alcalina presente na amostra.

O intervalo de referência deste parâmetro é, a 37°C, 40 a 150 U/l.^[31]

Alanina Transaminase (ALT)

Esta enzima também pertence ao grupo das transaminases que catalisam a conversão dos aminoácidos em α -cetoácidos e a reacção inversa. Actividade elevada desta enzima é detectada no fígado, sendo no entanto detectada actividade enzimática da ALT nos rins, coração, músculo-esquelético, pâncreas, baço e pulmão. Na célula esta enzima encontra-se apenas no citoplasma.

Actividades elevadas da ALT no soro sugerem com alguma especificidade doença parenquimal do fígado, podendo também ser detectadas em enfarte do miocárdio, doença hepática, distrofia muscular ou lesões de órgãos.

A determinação da actividade enzimática da ALT baseia-se numa reacção catalisada pela mesma, na qual o grupo amina da *L*-Alanina é transferido para o 2-Oxoglutarato,

formando piruvato. O piruvato na presença de NADH e lactato desidrogenase é reduzido a L-lactato. Nesta reacção o NADH é oxidado formando-se NAD^+ . A reacção é monitorizada medindo o decréscimo da absorvância a 340 nm devido a oxidação do NADH.

O intervalo de referência deste parâmetro é, a 37°C, <55 U/l. [31]

Aspartato Transaminase (AST)

Esta enzima pertence ao grupo das transaminases que catalisam a conversão dos aminoácidos nos α -cetoácidos, e também a reacção inversa, por transferência dos amino grupos. A AST é detectável em vários tecidos do corpo, ocorrendo actividades significativas no miocárdio, cérebro, fígado, sistema gastro-intestinal, tecidos gordos, músculo-esquelético e rins. Em termos celulares esta enzima encontra-se tanto no citoplasma como nas mitocôndrias. Após lesão celular ocorre libertação de AST, sendo que quanto mais profunda a lesão maior a quantidade de AST no soro e maior o aumento da actividade sérica desta enzima.

O doseamento da actividade da AST tem aplicações no diagnóstico e controlo terapêutica de doenças hepáticas. Pode também ser usada para o diagnóstico e controlo de doenças cardíacas.

A determinação da actividade desta enzima baseia-se numa reacção catalisada pela mesma, na qual o grupo amina da L-Aspartato é transferido para o 2-Oxoglutarato, formando oxaloacetato. O oxaloacetato na presença de NADH e malato desidrogenase é reduzido a L-malato. Nesta reacção o NADH é oxidado formando-se NAD^+ . A reacção é monitorizada medindo o decréscimo da absorvância a 340 nm devido a oxidação do NADH. O intervalo de referência deste parâmetro é, a 37°C, 5 a 34 U/l. [31]

γ -GT (γ - Glutamyl-Transferase)

Esta é uma enzima predominantemente ligada à membrana, em células de determinados tecidos, como rins, pâncreas, fígado, baço e intestino delgado.

A determinação da sua actividade é útil no diagnóstico e monitorização de doenças do fígado e do tracto biliar, sendo também usada como teste de rastreio sensível para detecção do alcoolismo não declarado. É de notar que níveis elevados deste parâmetro podem ser detectados em doentes com medicação de drogas a longo prazo, como por exemplo o fenobarbital e a fenitoína.

A detecção da actividade desta enzima tem por base uma reacção catalisada pela própria, na qual o γ -glutamil-3-carboxi-1,4-fenilenodiamina reage com a glicilglicina, originando os produtos 3-carboxi-1,4-fenilenodiamina e γ -glutamilglicina. Na reacção subsequente o hexacianoferrato de potássio oxida a 3-carboxi-1,4-fenilenodiamina numa substância azul-esverdeada na presença de ácido N-metilantrálico. O composto corado é detectado, a 37°C, por leitura a 642 nm.

O intervalo de referência deste parâmetro é, a 37°C, 12 a 64 U/l, para os homens, e 9 a 36 U/l, para as mulheres.^[31]

Lactato Desidrogenase (LDH)

A LDH é uma enzima que catalisa a oxidação de L-lactato com a formação de piruvato, numa reacção mediada por NAD^+ . A sua actividade verifica-se na maioria dos tecidos do organismo. Os níveis de actividade enzimática da LDH aumentam numa grande variedade de patologias sendo portanto um parâmetro muito pouco específico. Ainda assim é um parâmetro muito utilizado na investigação de patologias hepáticas e também cardíacas.

A detecção da actividade desta enzima tem por base uma reacção catalisada pela própria, na qual o lactato e o NAD^+ são convertidos a piruvato e NADH. O NADH absorve luz fortemente a 340 nm enquanto que o NAD^+ não. O aumento da absorvância a 340 nm é directamente proporcional à actividade de LDH na amostra.

O intervalo de referência deste parâmetro é, a 37°C, 125 a 243 U/l.^[31]

Marcadores de Lise Muscular

Os marcadores de lise muscular, como a creatinacina (CK), conseguem detectar situações de fadiga e desgaste muscular. São particularmente importantes na monitorização do músculo cardíaco através da determinação de parâmetros como a CK-MB e a troponina.

Creatinacina (CK)

A creatinacina promove a transferência reversível do grupo fosfato da creatina fosfato para o ADP, formando-se creatina e ATP. As actividades mais elevadas desta enzima são detectadas nos músculos esqueléticos, no tecido cerebral e miocárdio. Os aumentos da actividade da CK no soro são devidos a lesão dos músculos esqueléticos ou do miocárdio,

pois a CK do cérebro não pode passar para o soro uma vez que não atravessa a barreira hematoencefálica. Também é de notar que os valores deste parâmetro são proporcionais à densidade muscular e portanto é natural que em média os homens tenham valores mais elevados que as mulheres.

A determinação da actividade da isoenzima CK-MB (músculo cardíaco) também é realizada com frequência pois é muito útil em suspeita de enfarte de miocárdio. Quando tal acontece, os níveis da actividade da enzima atingem primeiramente um máximo e mantêm-se elevados durante um período de tempo mais longo que as outras enzimas também pesquisadas na confirmação do diagnóstico (LDH).

Na determinação da actividade enzimática, a CK presente na amostra catalisa a transferência de um grupo fosfato da creatina fosfato para o ADP. O ATP produzido nesta reacção é usado para fosforilar glucose formando glucose-6-fosfato (G-6-P) na presença de hexocinase. A G-6-P é então oxidada pela glucose-6-fosfato desidrogenase com a consequente redução de NADP^+ a NADPH. O aumento da formação de NADPH é monitorizado a 340 nm e é proporcional à actividade de CK na amostra.

Os valores de referência para a actividade da CK no soro são, a 37°C, entre 30 a 200 U/L para os homens e entre 29 a 168 U/L, para as mulheres.

A determinação da actividade enzimática da isoenzima CK-MB baseia-se numa reacção semelhante, com a adição de uma mistura de anticorpos monoclonais que inibem a actividade da CK-MM e metade da actividade da CK-MB, uma vez que inibe a subunidade M mas não a B. Realiza-se então o método de determinação da actividade enzimática da CK para as isoenzimas CK-B. A actividade da CK-MB é obtida multiplicando a actividade da CK-B por dois.

Os valores de referência para a actividade da isoenzima CK-MB no soro são, a 37°C, <25 U/L.^[31]

Troponina

A troponina é um complexo composto por três proteínas reguladoras, troponina C, troponina I e troponina T que está associado às células musculares e que é responsável pela sua contracção. A nível cardíaco existe um isómero específico da troponina I, a cTnI. Assim, numa situação de lesão do músculo cardíaco há libertação imediata de cTnI para a circulação, que pode ser quantificada de modo a identificar rapidamente a lesão cardíaca. Este é um parâmetro usado em situações de urgência.

O teste para o doseamento de cTnI pode ser realizado no soro ou no plasma. Nos tubos para a separação de soro é necessário aguardar pela coagulação do sangue antes da centrifugação. A determinação no plasma revela-se vantajosa uma vez que, não havendo coagulação antes da centrifugação, poupam-se alguns minutos na determinação deste parâmetro.

O ensaio consiste numa cadeia de reacções em que o produto final é medido por quimioluminescência. A reacção final resulta na emissão de luz que varia directamente com a concentração de cTnI na amostra.

Em relação a valores de referência, o esperado é que a troponina seja sempre <30 ug/l.^[32]

Estudo do Metabolismo do Ferro

O ferro é um elemento de extrema importância para o organismo participando em variados processos, nomeadamente no transporte de oxigénio e em metabolismo de oxidação celular. É parte integrante de muitas moléculas essenciais aos processos metabólicos referidos, entre outros.

A homeostasia do ferro é em muito regulada pela absorção intestinal que acontece sobretudo no duodeno e jejuno proximal. Apenas cerca de 10% do ferro ingerido diariamente é absorvido, sendo o resto eliminado nas fezes.

Para além da perda diária de ferro pelo suor, esfoliação das células escamosas, eliminação das enzimas digestivas, eliminação pelo tracto urinário e, menstruação, nas mulheres, o organismo não tem hipóteses de eliminar um possível excesso de ferro por aumento de excreção ou de o armazenar de uma forma inócua.

O ferro é absorvido na forma de ferro ferroso (Fe^{2+}) e é transportado no sangue pela transferrina na forma férrica (Fe^{3+}) até à medula óssea, onde é incorporado na estrutura da hemoglobina, e ao fígado onde pode ser armazenado pela ferritina. Num indivíduo saudável apenas $\frac{1}{3}$ da transferrina se encontra saturada de ferro.

A ferritina encontra-se nas células parenquimatosas do fígado e ainda nas células retículo-endoteliais do fígado, baço e medula óssea. Quando a ferritina se encontra saturada de ferro este pode ainda ser armazenado nos tecidos em pequenos grânulos de óxido de ferro, denominados hemosiderina. Estas duas últimas formas de armazenamento de ferro contêm normalmente 25% do ferro total e representam fontes de reserva de rápida mobilização em caso de necessidade.

O estudo da dinâmica do ferro é útil no diagnóstico de anemias para além de outros estados patológicos.

Tabela 2.1 – Variações dos valores do Ferro, Transferrina e Ferritina consoante algumas patologias.

Patologia	Ferro	Transferrina	Ferritina
Deficiência em Ferro	Baixo	Alto	Baixo
Hemocromatose	Alto	Baixo	Alto
Anemia hemolítica	Alto	Normal/Baixo	Alto
Anemia Sideroblástica	Normal/Alto	Normal/Baixo	Alto
Envenenamento por Ferro	Alto	Normal	Normal

Podem ser detectadas num indivíduo diminuições da quantidade de ferro presente no soro, hiposiderémia, nomeadamente em situações de anemias por carência de ferro que podem ser devidas a ingestão insuficiente, fraca absorção no tracto gastrointestinal ou perdas excessivas.

Podem também surgir casos de hipersiderémia devido a doenças hepáticas (hepatite aguda e cirrose hepática), após múltiplas transfusões e em determinadas anemias (aplásicas, hemolíticas e sideroblásticas).^[33]

Ferro (Fe)

O doseamento deste ião recorre a uma técnica na qual o ferro, em meio ácido, se liberta das suas ligações proteicas, nomeadamente do complexo ferro-transferrina. Então a hidroxilamina presente no reagente reduz ferro férrico a ferroso e este forma um complexo corado com um cromogénio (FERENE), cuja absorvância a 604 nm é proporcional à quantidade de ferro presente na amostra.

Os valores de referência para o ferro sérico são de 31 a 144 ug/dl, para homens, e 25 a 156 ug/dl para mulheres.^[33]

Capacidade Total de Fixação de Ferro

O doseamento de ferro pode ser acompanhado pela determinação de um outro parâmetro – a capacidade total de fixação de ferro (TIBC – *Total Iron Binding Capacity*). Este parâmetro corresponde à quantidade de ferro que poderia estar ligada aos locais de ligação de toda a transferrina em circulação (dois por molécula) caso toda esta estivesse saturada.

Em determinadas situações pode ocorrer diminuição da TIBC, nomeadamente em casos de anemias por infecção ou tumores, onde ocorre também diminuição da siderémia. Em situações como hepatite aguda, anemia perniciosa e hemocromatose ocorre diminuição da TIBC e aumento da siderémia.

Há também situações nas quais ocorre aumento da TIBC, nomeadamente nas anemias ferroprivas por défice de ingestão de ferro ou por perdas hemorrágicas, sendo este aumento acompanhado por uma diminuição da siderémia.

Para determinar este parâmetro procede-se a uma saturação da transferrina na amostra com uma solução de ferro, seguindo-se a adsorção do ferro em excesso por acção de alumina. Seguidamente realiza-se o doseamento de ferro no sobrenadante obtido da mesma forma que é feito o doseamento de ferro sérico determinando-se o valor da capacidade total de fixação de ferro.

Os valores de referência para este parâmetro no soro são 250 a 450 ug/dL.

A diferença entre o valor de TIBC e a siderémia (quantidade de ferro no soro) permite obter o valor da capacidade latente de fixação de ferro (UIBC – *Unsaturated Iron Binding Capacity*).^[33]

Ferritina

O doseamento da ferritina é realizado por quimioluminescência numa reacção a duas fases. Primeiro, combina-se a amostra com micropartículas revestidas com anti-ferritina. A ferritina na amostra vai-se ligar às micropartículas e é feita uma lavagem. Num segundo passo é adicionado acridinium que se vai ligar à anti-ferritina. Este passo final resulta na emissão de luz que é quantificada e que varia directamente com a quantidade de ferritina na amostra.

Os valores de referencia para este parâmetro, nos homens, estão entre 20 e 270 ng/mL e nas mulheres, estão entre 5 e 200 ng/ml.^[33]

Transferrina

O doseamento da transferrina é realizado por imunoturbidimetria. Um anticorpo específico para a transferrina é adicionado à amostra e a formação do complexo insolúvel entre o anticorpo e a transferrina vão aumentar a turvação da amostra. Este aumento de turvação é medido e é directamente proporcional à concentração de transferrina na amostra.

Os valores de referencia para este parâmetro, num adulto, estão entre 175 a 370 mg/dL.

Adicionalmente também pode ser calculada a saturação da transferrina recorrendo à seguinte fórmula:

$$\% \text{ Sat. Transferrina} = (\text{Ferro} \times 100) / \text{TIBC}$$

Este valor indica que quantidade de ferro circulante no soro está ligado à transferrina.^[34]

Avaliação de Marcadores de Inflamação

Numa situação de quadro inflamatório instalado existem três parâmetros importantes para a caracterização analítica da inflamação: Proteína C-Reactiva, Factor Reumatóide e a Velocidade de Sedimentação. A velocidade de sedimentação encontra-se explicada no capítulo de Hematologia.

Proteína C-Reactiva (PCR)

A proteína C-reactiva (PCR) é uma proteína não glicosilada sintetizada no fígado. A concentração desta proteína pode aumentar drasticamente em processos agudos como forma de resposta à presença de citocinas solúveis produzidas sobretudo por monócitos e macrófagos.

Esta proteína tem a propriedade de precipitar com o polissacarídeo C de certos grupos de *Pneumococos*. Deste modo a PCR encontra-se no soro de indivíduos com

pneumonia aguda ou em casos de infecção por bactérias *Gram* negativas ou positivas, ou também em situações de doenças inflamatórias não contagiosas ou tumores malignos.

Uma das acções da PCR presente no soro é estimular a fagocitose de bactérias por leucócitos polimorfonucleares, sendo que a incapacidade de produzir PCR quando necessário confere maior susceptibilidade a infecções bacterianas. A elevação dos níveis séricos da referida proteína não é uma reacção específica, sendo útil apenas como indicador de um processo de resposta aguda.

A detecção da PCR é indicada em situações de febre reumática aguda e artrite reumatóide e também para diferenciação entre algumas infecções virais e bacterianas.

O doseamento de PCR no soro é feita com partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti-PCR. O aparecimento de aglutinação provoca um aumento da absorvância a 572 nm. Este aumento é directamente proporcionalmente à concentração de PCR na amostra.

O valor de referência para este parâmetro é <0.5 mg/dL.^[34]

Factor Reumatóide

Uma amostra de soro de um indivíduo com artrite reumatóide contém anticorpos contra a região Fc das IgG humanas, sendo estes anticorpos denominados como factores reumatóides devido à sua relação com a presença da doença. Os factores reumatóides pertencem essencialmente à classe IgM, e não são detectáveis em patologias como febre reumatóide, gota entre outras, pelo que a especificidade do teste é de grande interesse em termos de diagnóstico.

O método deste teste, para o doseamento de factores reumatóides, baseia-se numa reacção imunológica entre partículas de látex cobertas com IgG humanas e anticorpos de factores reumatóides presentes na amostra. Aglutinação visível aparece quando estão aumentados os níveis de anticorpos na amostra em estudo. Esta aglutinação é medida por turbidimetria.

Resultados de factores reumatóides abaixo de 30 UI/mL são considerados normais. Resultados entre 30 a 50 UI/mL são considerados ligeiramente positivos.

Frequentemente também é feito o teste de Waller-Rose para a detecção de factores reumatóides. Este teste baseia-se numa reacção de aglutinação em carta de hemácias estabilizadas, sensibilizadas com globulinas de coelho anti-hemácias de carneiro, na presença de factores reumatóides.^[35]

Outros Parâmetros Analíticos de Interesse

Fosfatase Ácida Prostática (ACP) e Não Prostática (NPP)

A fosfatase ácida do soro humano provém de diferentes órgãos e elementos, nomeadamente o baço, os rins, os eritrócitos e as plaquetas. Num indivíduo saudável a fracção de fosfatase ácida prostática é mínima. Estas enzimas apresentam grande especificidade e actividade óptima a pH ácido.

Pode aparecer uma elevação da actividade desta enzima no soro, nomeadamente em situações de carcinoma da próstata ou hipertrofia benigna da próstata. De facto a determinação da actividade da fosfatase ácida é normalmente usada como dado adicional no diagnóstico de carcinoma da próstata e no seguimento de terapêutica.

A técnica para determinação da actividade da fosfatase ácida, permite a determinação da actividade da fosfatase ácida total e também a actividade da fosfatase ácida não prostática. Esta técnica baseia-se numa reacção catalisada pela enzima referida segundo a qual o α -naftil fosfato é transformado em α -naftol e fosfato. O α -naftol reage com um outro composto formando-se um corante azóico cuja formação pode ser acompanhada por espectrofotometria com leituras a 405 nm. Para determinar apenas a fracção não prostática procede-se à mesma reacção mas adiciona-se tartarato que vai inibir a fracção prostática. Assim determina-se a actividade da fosfatase ácida prostática total e a da fracção não prostática. A determinação da fosfatase ácida prostática é calculada:

$$\text{Act. Fracção Prostática} = \text{Act. Total} - \text{Act. Fracção Não prostática}$$

Os valores de referência para este parâmetro, a 37°C, é, para a actividade total <6,5 U/L e para a actividade da fracção prostática <3,5 U/L.^[36]

Amilase

Esta enzima catalisa a hidrólise de polissacarídeos como a amilose, a amilopectina e o glicogénio, pela clivagem das ligações 1,4- α -glucosídicas.

Existem dois tipos de α -amilase, o tipo pancreático (tipo P) e o tipo da glândula salivar (tipo S), sendo que o segundo pode ter várias origens e o primeiro é exclusivo do pâncreas.

A determinação da actividade desta enzima tem utilidade no diagnóstico de distúrbios pancreáticos, nomeadamente diagnóstico e monitorização da pancreatite aguda, onde é detectada hiperamilasemia. Este sinal também é detectado na fase inflamatória da pancreatite crónica, na insuficiência renal (filtração glomerular reduzida) ou também em casos de tumores (pulmões ou ovários). Casos de níveis baixos de actividade da α -amilase podem surgir em insuficiência pancreática.

A determinação da actividade da α -amilase baseia-se na hidrólise de 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriose com a formação de 2-cloro-4-nitrofenol. O aumento na formação de 2-cloro-4-nitrofenol é detectado espectrofotometricamente a 404 nm e é directamente proporcional à actividade enzimática da α -amilase na amostra.

Num indivíduo adulto saudável a actividade desta enzima deve ser 25 a 125 U/L.^[37]

Anti-estreptolisina O (ASO)

Os *Streptococcus* beta hemolíticos do grupo A produzem antigénios tóxicos intra e extracelular. Pacientes infectados com *Streptococcus* produzem anticorpos específicos para neutralizar as toxinas, sendo um destes anticorpos, associados a anti-estreptolisina O.

O ensaio baseia-se na reacção imunológica entre estreptolisina O, ligada a partículas de látex e a ASO presente no soro. Aparece uma aglutinação clara quando na amostra se encontram níveis aumentados do anticorpo referido, que é medida por turbidimetria.

Os valores de referência variam bastante consoante a idade mas, para adultos são <200 UI/mL.^[38]

Conclusão

Chegando ao fim, posso afirmar, sem dúvida, que o estágio foi a experiência mais marcante de todo o curso. Tive a sorte desta experiência ser realmente enriquecedora, tendo trabalhado com uma equipa de profissionais sempre a prontos a ensinar-me, fazendo-me querer seguir o seu exemplo. É certo que nem sempre foi perfeito, houve momentos mais difíceis de gerir. Foram surgindo dúvidas, procedimentos mais complexos e técnicas que não consegui realizar com tanta facilidade. Apesar de tudo no decorrer do estágio as inseguranças foram dando lugar à confiança e as dificuldades foram ultrapassadas pela prática e o estudo. Agora o mais importante é saber que aprendi e acredito que daqui para a frente tenho as bases necessárias para ser um bom profissional.

O estágio veio confirmar a minha ideia sobre o trabalho de um laboratório e confirmar como as análises clínicas é uma área fascinante onde tanto se pode aprender e tanto conhecimento se pode aplicar. Estando ciente de que ainda tenho um longo caminho a percorrer e que a aposta na formação tem que ser constante, sinto-me, neste momento, preparado para o desafio da vida profissional com a certeza de que estarei na profissão certa!

Bibliografia

- [¹] Brown, Barbara A. Hematology: Principles and Procedures, Lea & Ferbigier, Malvern, Pennsylvania (1993), pp 1.
- [²] Theml H., Diem H., Haferlach T., Color Atlas of Hematology Practical Microscopic and Clinical Diagnosis, Thieme, Stuttgart, New York, 2nd Ed. (2004), pp 1-8.
- [³] Theml H., Diem H., Haferlach T., Color Atlas of Hematology Practical Microscopic and Clinical Diagnosis, Thieme, Stuttgart, New York, 2nd Ed. (2004), pp 30-32.
- [⁴] Theml H., Diem H., Haferlach T., Color Atlas of Hematology Practical Microscopic and Clinical Diagnosis, Thieme, Stuttgart, New York, 2nd Ed. (2004), pp 34-46.
- [⁵] Theml H., Diem H., Haferlach T., Color Atlas of Hematology Practical Microscopic and Clinical Diagnosis, Thieme, Stuttgart, New York, 2nd Ed. (2004), pp 46-48.
- [⁶] Theml H., Diem H., Haferlach T., Color Atlas of Hematology Practical Microscopic and Clinical Diagnosis, Thieme, Stuttgart, New York, 2nd Ed. (2004), pp 48-50
- [⁷] Theml H., Diem H., Haferlach T., Color Atlas of Hematology Practical Microscopic and Clinical Diagnosis, Thieme, Stuttgart, New York, 2nd Ed. (2004), pp 50-52.
- [⁸] Bain B., Blood cell morphology in health and disease *In* Lewis S., Bain B., Bates I., Dacie And Lewis Practical Haematology, Churchill Livingston Elsevier, Philadelphia, 10th Ed. (2006), pp 79-81.
- [⁹] Bain B., Blood cell morphology in health and disease *In* Lewis S., Bain B., Bates I., Dacie And Lewis Practical Haematology, Churchill Livingston Elsevier, Philadelphia, 10th Ed. (2006), pp 81-101.
- [¹⁰] Bain B., Blood cell morphology in health and disease *In* Lewis S., Bain B., Bates I., Dacie And Lewis Practical Haematology, Churchill Livingston Elsevier, Philadelphia, 10th Ed. (2006), pp 103-107.
- [¹¹] Bain B., Blood cell morphology in health and disease *In* Lewis S., Bain B., Bates I., Dacie And Lewis Practical Haematology, Churchill Livingston Elsevier, Philadelphia, 10th Ed. (2006), pp 107.
- [¹²] Bain B., Blood cell morphology in health and disease *In* Lewis S., Bain B., Bates I., Dacie And Lewis Practical Haematology, Churchill Livingston Elsevier, Philadelphia, 10th Ed. (2006), pp 107-108.
- [¹³] Bain B., Blood cell morphology in health and disease *In* Lewis S., Bain B., Bates I., Dacie And Lewis Practical Haematology, Churchill Livingston Elsevier, Philadelphia, 10th Ed. (2006), pp 108.

- [14] Bain B., Blood cell morphology in health and disease *In* Lewis S., Bain B., Bates I., Dacie And Lewis Practical Haematology, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 10th Ed. (2006), pp 108-110.
- [15] Bain B., Blood cell morphology in health and disease *In* Lewis S., Bain B., Bates I., Dacie And Lewis Practical Haematology, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 10th Ed. (2006), pp 110-112.
- [16] Laffan M. and Manning R., Investigation of haemostasis *In* Lewis S., Bain B., Bates I., Dacie And Lewis Practical Haematology, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 10th Ed. (2006), pp 379-383.
- [17] Laffan M. and Manning R., Investigation of haemostasis *In* Lewis S., Bain B., Bates I., Dacie And Lewis Practical Haematology, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 10th Ed. (2006), pp 383-386.
- [18] Laffan M. and Manning R., Investigation of haemostasis *In* Lewis S., Bain B., Bates I., Dacie And Lewis Practical Haematology, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 10th Ed. (2006), pp 386-387.
- [19] Michael Brown and Carl Wittwer, Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry* 46:8(B) (2000) 1221-1229.
- [20] Brown, Barbara A. *Hematology: Principles and Procedures*, Lea & Febiger, Malvern, Pennsylvania (1993), pp 107-109
- [21] Shannon M. Bates and Jeffrey I. Weitz, Coagulation Assays. *Circulation: Journal of the American Heart Association* (2005) e53-e60.
- [22] Scott M., Le Grys V., Klutts J., Electrolytes and Blood Gases *In* Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 431-440.
- [23] Endres D., Rude R., Disorders of Bone *In* Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 711-721.
- [24] Sacks D., Carbohydrates *In* Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 373-401.
- [25] Higgins T., Beutler E., Dumas B., Hemoglobin, Iron, Bilirubin *In* Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 509-516.
- [26] Norma da Direcção-Geral da Saúde, Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus, N° 002/2011, 14/01/2011.

- [27] Rifai N., Warnick G., Remaley A., Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Other Cardiovascular Risk Factors *In* Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 402-430.
- [28] Lamb E., Price C., Creatinine, Urea, and Uric Acid *In* Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 363-372.
- [29] Orientação da Direcção-Geral da Saúde, Prevenção e Avaliação da Nefropatia Diabética, N° 005/2011, 31/01/2011.
- [30] Higgins T., Beutler E., Doumas B., Hemoglobin, Iron, and Bilirubin *In* Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 520-526.
- [31] Panteghini M., Bais R., Enzymes *In* Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 317-336.
- [32] Apple F., Jaffe A., Cardiovascular Disease *In* Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 614-630.
- [33] Higgins T., Beutler E., Doumas B., Hemoglobin, Iron, Bilirubin *In* Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 516-520.
- [34] Johnson A., Amino Acids and Proteins *In* Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 294-316.
- [35] Burmester G., Pezzuto A., Color Atlas of Immunology, Thieme Stuttgart, New York, 1st Ed. (2003), pp 166-174.
- [36] Kong H., Byun J., Emerging Roles of Human Prostatic Acid Phosphatase. *Biomolecules & Therapeutics* (2013) 10-20.
- [37] Panteghini M., Bais R., Enzymes *In* Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 317-336.
- [38] Hahn R., Knox L., Forman T., Evaluation of Poststreptococcal Illness. *American Family Physician* (2005) 71:1949-54.