



Mariana Jordão Nunes

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Mario João Roque e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Mariana Jordão Nunes

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Dezembro 2014 a Maio 2015

Orientadores:

Orientador Externo: Dr. Mário João Roque

Orientador Interno da Faculdade de Farmácia: Professora Doutora Armanda Emanuela Castro e Santos



Índice

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABELAS.....	V
ABREVIATURAS.....	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT.....	IX
INTRODUÇÃO	1
I. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	2
1.1. Hematologia.....	2
1.2. Bioquímica e Imunologia.....	3
1.3. Toxicologia	3
1.4. Microbiologia.....	4
2. CONTROLO DE QUALIDADE	5
2.1. Avaliação Interna da Qualidade	5
2.2. Avaliação Externa da Qualidade	5
3. HEMATOLOGIA	6
3.1. Equipamento e seu Funcionamento	6
3.2. Realização do Hemograma	10
3.3. Preparação do Esfregaço Sanguíneo.....	17
3.4. Anomalias Eritrocitárias.....	19
3.5. Determinação da Velocidade de Sedimentação	24
3.6. Determinação das Provas de Coagulação.....	24
3.7. Imunohematologia	28
4. BIOQUÍMICA.....	31

4.1. Equipamento e seu Funcionamento	31
4.2. Parâmetros Analisados e Utilidade Clínica	32
4.2.1. Eletrólitos	32
4.2.2. Glicémia e Diagnóstico da Diabetes	36
4.2.3. Avaliação do Metabolismo Lipídico	39
4.2.4. Avaliação da Função Renal	41
4.2.5. Avaliação da Função Hepática	45
4.2.6. Marcadores de Lise Muscular	51
4.2.7. Marcadores de Lesão Cardíaca	51
4.2.8. Avaliação do Metabolismo do Ferro	53
4.2.9. Marcadores de Inflamação	56
4.2.10. Avaliação da Função Pancreática	57
5. CONCLUSÃO	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	65
Anexo I - Valores de referência dos parâmetros analisados no setor de Hematologia.	65
Anexo II - Parâmetros analisados no setor de bioquímica, metodologia de detecção e fundamento da técnica.....	67
Anexo III - Valores de referência dos parâmetros analisados no setor de Bioquímica.	69

Índice de Figuras

Figura 1: <i>Cell-Dyn Ruby</i> da <i>Abbott Diagnostics</i>	6
Figura 2: Exemplo de <i>Light Scatter</i>	7
Figura 3: <i>Option 4 Plus</i> da <i>Biomerieux</i>	9
Figura 4: <i>Sedi-15</i> da <i>Becton Dickinson</i>	10
Figura 5: Neutrófilo segmentado. (THEML, Herald; DIEM, Heinz. - <i>Color Atlas of Hematology, Practical Microscopic and Clinical Diagnosis</i> . Thieme, Stuttgart, New York, 2th Ed. (2004))	15
Figura 6: Eosinófilo. (THEML, Herald; DIEM, Heinz. - <i>Color Atlas of Hematology, Practical Microscopic and Clinical Diagnosis</i> . Thieme, Stuttgart, New York, 2th Ed. (2004))	15
Figura 7: Basófilo. (THEML, Herald; DIEM, Heinz. - <i>Color Atlas of Hematology, Practical Microscopic and Clinical Diagnosis</i> . Thieme, Stuttgart, New York, 2th Ed. (2004))	15
Figura 8: Monócito. (BAIN Barbara J.; BATES, Imelda; LAFFAN, Michael A.; LEWIS S. Mitchell. <i>Dacie and Lewis Practical Haematology</i> , Elsevier Limited, Churchill Livingstone, 11 th Ed. (2011))	16
Figura 9: Linfócito. (THEML, Herald; DIEM, Heinz. - <i>Color Atlas of Hematology, Practical Microscopic and Clinical Diagnosis</i> . Thieme, Stuttgart, New York, 2th Ed. (2004))	16
Figura 10: Macrocitose. (MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.. <i>Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods</i> , Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 22th Ed. (2011))	19
Figura 11: Microcitose. (MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.. <i>Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods</i> , Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 22th Ed. (2011))	20
Figura 12: Poiquilocitose. (MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.. <i>Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods</i> , Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 22th Ed. (2011))	20
Figura 13: Esferócito. (MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.. <i>Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods</i> , Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 22th Ed. (2011))	20
Figura 14: Esquizócito. (MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.. <i>Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods</i> , Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 22th Ed. (2011))	20
Figura 15: Acantócito. (MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.. <i>Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods</i> , Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 22th Ed. (2011))	21
Figura 16: Equinócito. (MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.. <i>Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods</i> , Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 22th Ed. (2011))	21
Figura 17: Célula-alvo. (MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.. <i>Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods</i> , Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 22th Ed. (2011))	21

Figura 18: Drepanócito. (BAIN Barbara J.; BATES, Imelda; LAFFAN, Michael A.; LEWIS S. Mitchell. <i>Dacie and Lewis Practical Haematology</i> , Elsevier Limited, Churchill Livingstone, 11 th Ed. (2011))	21
Figura 19: Dracriócito. (BAIN, Barbara J - <i>Blood cells, a practical guide</i> , Blackwell Publishing, Australia, 4 th Ed. (2006))	22
Figura 20: Leptócito. (BAIN Barbara J.; BATES, Imelda; LAFFAN, Michael A.; LEWIS S. Mitchell. <i>Dacie and Lewis Practical Haematology</i> , Elsevier Limited, Churchill Livingstone, 11 th Ed. (2011))	22
Figura 21: Estomatócito. . (BAIN, Barbara J - <i>Blood cells, a practical guide</i> , Blackwell Publishing, Australia, 4 th Ed. (2006))	22
Figura 22: Pontuado basófilo. (MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.. <i>Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods</i> , Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 22 th Ed. (2011))	23
Figura 23: Eritrócito nucleado. (MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.. <i>Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods</i> , Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 22 th Ed. (2011))	23
Figura 24: Cascata de coagulação. (Ferreira C. [et al.] - O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações, <i>Revista brasileira de hematologia e hemoterapia</i> (2010) 416-421)	26
Figura 25: Architect Ci8200 da Abbott Diagnostics	31
Figura 26: ADAMS AIC – HA-8160 da Arkray	32

Índice de Tabelas

<u>Tabela 1:</u> Tabela dos diferentes equipamentos presentes em cada setor, com a sua funcionalidade	4
<u>Tabela 2:</u> Anticorpos presentes nos diferentes grupos sanguíneos	30

Abreviaturas

ALT – Alanina Transaminase

ALP - Fosfatase Alcalina

AMP – Adenosina Monofosfato

AST – Aspartato Transaminase

ATP – Adenosina trifosfato

CID – Coagulação Intravascular Disseminada

CK – Creatina Cinase

CK-BB – Creatina Cinase, *brain type*

CK-MB – Creatinina Cinase, *muscle-brain type*

CK-MM – Creatina Cinase, *muscle type*

CHGM – Concentração de Hemoglobina Globular Média

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

DMTI – Transportador de Metal Divalente I (*divalent metal transporter 1*)

GFR – Taxa de filtração glomerular (*glomerular filtration rate*)

HbA1c – Hemoglobina Glicada A1c

HBV – Vírus da Hepatite B

HCT – Hematócrito (*hematocrit*)

HCV – Vírus da Hepatite C (*Hepatitis C Virus*)

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade (*high-density lipoprotein*)

HGB – Hemoglobina

HGM – Hemoglobina Globular Média

HIV – Vírus de Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

INR – Índice Internacional normalizado (*International Normalized Ratio*)

ISI – Índice de Sensibilidade Internacional

LDH – Lactato Desidrogenase (*lactate dehydrogenase*)

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade (*low-density lipoprotein*)

LED – Díodo Emissor de Luz (*Light Emitting Diode*)

MPV – Volume Médio Plaquetar (*Mean platelet volume*)

NAD – Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (*Nicotinamide adenine dinucleotide*)

PCR – Proteína C Reativa

PDW – Distribuição do tamanho plaquetar (*Platelet distribution width*)

PLT – Plaquetas

PT – Tempo de Protrombina (*prothrombin time*)

PTGO – Prova de Tolerância à Glucose Oral

PTH – Hormona Paratiróide (*parathyroid hormone*)

RBC – Eritrócitos (*Red blood cells*)

RDW – Amplitude de Distribuição Eritrocitária (*Red Cell Distribution Width*)

RIQAS – Programa de Avaliação de Qualidade International Randox (*Randox International Quality Assessment Scheme*)

RNA – Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

TIBC – Capacidade total de ligação do ferro (*Total Iron Binding Capacity*)

TfRl – Recetor de transferrina I (*Transferrin receptor I*)

PTTa – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

PNAEQ – Programa Nacional de Avaliação Externa de Qualidade

UIBC – Capacidade de ligação do ferro insaturado (*Unsaturated Iron Biding Capacity*)

VGM – Volume Globular Médio

VLDL – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (*very-low-density lipoprotein*)

WBC – Leucócitos (*white blood cells*)

Resumo

O presente trabalho apresenta as atividades desenvolvidas no âmbito do estágio curricular, inserido no Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O referido estágio realizou-se no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, de Dezembro de 2014 a Maio de 2015, sob a orientação do Dr. Mário João Roque.

Neste relatório serão apresentados os métodos usados na execução das análises, a sua importância clínica, a organização diária e o sistema de gestão de qualidade implementado no laboratório. Serão desenvolvidos de modo mais detalhado os sectores de hematologia e bioquímica.

Abstract

The present work exposes the activities developed in the internship within the context, of the Master's degree of Clinical Analysis, of the Faculty of Pharmacy, University of Coimbra. The training was performed at the Clinical Analysis Laboratory of Centro de Saúde Militar of Coimbra, from December to May 2015, under the supervision of Dr. Mario João Roque.

In this report will be present the methods used in the execution of laboratorial assays, the clinical interest of the laboratory test, the daily organization and quality management system implemented in the laboratory. This report presents a more detailed description of the hematology and biochemistry sectors.

Introdução

O estágio curricular realizado no decorrer do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra tem como principal objetivo a iniciação profissional como técnico superior de Análises Clínicas, colocando em prática os conhecimentos adquiridos durante a formação académica.

Este estágio apresenta uma componente laboratorial de modo a conferir competência para a realização e validação de técnicas laboratoriais aplicadas à prevenção, diagnóstico e monitorização da doença.

O presente relatório descreve as atividades laboratoriais realizadas no estágio, nas valências de Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia.

Este estágio realizou-se no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, sob a orientação do Dr. Mário João Roque, com uma duração de 600 horas. O estágio decorreu todos os dias da semana, de acordo com o horário do laboratório, permitindo acompanhar todo o dia-a-dia nas várias áreas.

O tempo de estágio foi dividido de modo a que fosse possível permanecer durante aproximadamente um mês em cada valência e um último mês nas duas valências com maior interesse, para aprofundar conhecimentos nessas áreas.

O objetivo do relatório a seguir apresentado é descrever, as principais atividades desenvolvidas ao longo do estágio, dando especial ênfase às áreas de Hematologia e Bioquímica.

I. Caracterização do laboratório

O estágio foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra. Este serviço encontra-se sob a direção do Dr. Mário João Roque, Tenente-Coronel, farmacêutico especialista em Análises Clínicas e Mestre em Saúde Pública. O serviço dispõe de várias áreas bem equipadas e funcionais de modo a garantir um correto funcionamento do laboratório e um atendimento adequado. Apresenta uma sala de atendimento/secretariado, uma sala de colheitas e uma sala de arrumos. Para além destes espaços o laboratório encontra-se dividido em 3 setores: setor de Hematologia, setor de Bioquímica e Imunologia e setor de Microbiologia. Estes setores encontram-se praticamente todos automatizados e informatizados.

O laboratório é composto por 3 técnicos de análises clínicas e 2 administrativas. Os utentes que frequentam este laboratório são essencialmente militares, ex-militares, familiares de militares, GNR e PSP.

O serviço tem em média 30 a 40 utentes por dia, mas em situações pontuais pode apresentar um fluxo de amostras aumentado, de cerca de 50 a 100 amostras, devido à realização de análises para as Provas de Aptidão Física.

Na rotina do laboratório é realizado o registo na receção onde é atribuído um número interno associado a um código de barras registadas num programa interno (SISLAB), posteriormente é realizada a colheita, onde as amostras são futuramente encaminhadas para os diferentes setores onde são processadas. Após o processamento, os resultados são disponibilizados no sistema informático, para que possam ser avaliados e validados pelo especialista. Por fim, a parte administrativa pode facultar os resultados das análises aos utentes.

I.1. Hematologia

Este setor ocupa uma sala devidamente equipada com os aparelhos necessários à realização dos testes hematológicos (Tabela I).

Neste setor são realizados:

- Hemogramas;
- Provas de coagulação;
- Velocidade de sedimentação;
- Determinação de hemoglobina glicada;
- Coloração de May-Grundwald Giemsa;
- Observação ao microscópio ótico.

Neste setor são determinados os mais diversos parâmetros hematológicos, no sangue total ou plasma. As análises efetuadas no laboratório de Hematologia executam-se na sua maioria de forma automatizada, com exceção dos testes de coagulação que envolvem a realização de técnicas semi-automáticas.

1.2. Bioquímica e Imunologia

Neste setor são efetuados os doseamentos de hormonas, marcadores tumorais, proteínas e efetua-se ainda o estudo de parâmetros bioquímicos, que permitem avaliar o estado funcional de vários órgãos e vias metabólicas.

As amostras chegam ao setor em tubos apropriados associados a etiquetas com código de barras. O Laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra apresenta os aparelhos necessários para a realização dos vários testes bioquímicos e imunológicos (Tabela I).

Alguns testes pouco usuais, que não são realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, são enviados para um laboratório externo, com o qual o laboratório estabeleceu protocolo.

1.3. Toxicologia

No Laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra são realizadas várias análises toxicológicas, na sua maioria para pesquisar o consumo de drogas de abuso no âmbito do programa de Controlo do Alcoolismo e Toxicodependência nas Forças Armadas. As substâncias doseadas em amostras de urina, são anfetaminas, canabinóides, cocaína e opiáceos. Estes testes são realizados em caso de suspeita ou para controlar o uso de drogas de abuso. A sua colheita é feita sob vigilância e em duplicado. No caso de a amostra

apresentar resultado positivo a segunda amostra colhida é enviada para o Laboratório de Toxicologia da Direção de Saúde do Exército em Lisboa, para confirmação do resultado.

I.4. Microbiologia

Neste setor são realizados estudos microbiológicos, parasitológicos ou micológicos dos mais variados produtos biológicos (urina, fezes, exsudatos, entre outros), sendo o mais usual o estudo bioquímico da urina (Urina Tipo II).

A urina tipo II consiste numa análise às características físicas e químicas da urina seguida de um exame microscópico ao sedimento urinário.

As amostras de urina devem ser analisadas o mais rápido possível num intervalo de tempo máximo de duas horas, entre o tempo de colheita e o tempo da análise, para não falsear alguns resultados. No laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra este tempo é bastante reduzido uma vez que as amostras provenientes da sala de colheitas vão quase imediatamente para o setor de Microbiologia.

Os equipamentos usados neste laboratório encontram-se indicados na seguinte tabela:

Tabela I. Tabela dos diferentes equipamentos presentes em cada setor, com a sua funcionalidade.

Secção	Equipamento	Funcionalidade
Bioquímica e Imunologia	<u>Architect Ci8200</u>	Análise de parâmetros bioquímicos e imunológicos.
	<u>ADAMS A1c HA-8160</u>	Determinação de Hemoglobina Glicada.
	<u>Mini-Vidas</u>	Análise de parâmetros imunológicos.
Hematologia	<u>Option 4 plus, Biomérieux</u>	Testes de Coagulação.
	<u>BD Sedi-15</u>	Velocidade de Sedimentação.
	<u>Cell Dyn Ruby</u>	Hemogramas.
Microbiologia	<u>Câmara de fluxo laminar</u>	Tratamento e manipulação de amostras em ambiente assético.
	<u>URIT, Uritest-300</u>	Análise de parâmetros bioquímicos na urina.

2. Controlo de qualidade

A qualidade dos procedimentos está associada a 3 fases principais no laboratório, a fase pré-analítica, fase analítica e a fase pós-analítica. Os controlos de qualidade no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra estão mais focados para o controlo da fase analítica, não sendo comumente realizados controlos para as fases pré-analítica e pós-analítica. Estudos mostraram que a maioria dos erros ocorre na fase pré-analítica, sendo os erros mais importantes, erros na colheita dos produtos biológicos, no seu transporte e manuseamento. Neste laboratório, o controlo de qualidade da fase analítica é assegurado pela realização de controlos internos e controlo externo ^[1].

2.1. Avaliação Interna da Qualidade

O **controlo interno de qualidade** consiste numa análise de amostras padrão que permite avaliar a precisão dos ensaios com base nos valores de parâmetros conhecidos. Assim, podemos avaliar o funcionamento eficaz das técnicas laboratoriais realizadas, facultando resultados válidos aos clínicos. Este controlo tem como objetivo garantir a reprodutibilidade dos valores, verificar a calibração e indicar quando é necessário promover ações corretivas ou preventivas devido a não conformidades que possam ocorrer ^[2].

No laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra o controlo interno é realizado todos os dias ou semanalmente, dependendo do tipo de equipamento, sendo este fornecido por casas comerciais como a *Biorad*. É necessário a obtenção de resultados aceitáveis nos controlos internos para se prosseguir com a validação dos resultados obtidos.

2.2. Avaliação Externa da Qualidade

O **controlo externo da qualidade** é um controlo inter-laboratorial que visa comparar a exatidão dos testes do laboratório com a do universo dos outros participantes, sendo analisadas amostras do mesmo material, de concentrações desconhecidas, fornecidas por laboratórios independentes ^[2].

No caso dos valores obtidos no controlo de qualidade externa surgirem alterados são aplicadas medidas corretivas. No Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde

Militar de Coimbra inicialmente são verificados os valores dos controlos internos, de modo a determinar a presença de alterações, e posteriormente é repetida a amostra, de modo a tentar identificar e eliminar possíveis erros.

O controlo externo é realizado quinzenalmente. A avaliação externa deste laboratório é proporcionada pelo laboratório de referência nacional, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge através do Programa Nacional de Avaliação Externa de Qualidade (PNAEQ) e pelo laboratório internacional através do programa *Randox International Quality Assessment Scheme*, (RIQAS).

3. Hematologia

O sangue é o constituinte mais fácil e menos invasivo de ser colhido. Como tal, o sangue representa uma biópsia a partir de uma pequena punção venosa, permitindo estudar os elementos figurados do sangue e as doenças a este associadas ^[3].

Na rotina diária deste laboratório, para o equipamento *Cell-Dyn Ruby*, responsável pela realização de hemogramas, é efetuado o controlo de qualidade interno diariamente, antes do processamento das amostras. São usados três níveis de controlo (alto, normal e baixo), sendo realizados alternadamente, dois por dia.

No caso do *Option Plus*, responsável pela realização das provas de coagulação são realizados controlos semanais.

3.1. Equipamento e seu Funcionamento

3.1.1. Cell-Dyn Ruby

Para a realização de hemogramas e contagem de reticulócitos, no laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra é usado o *Cell-Dyn Ruby*. O princípio de funcionamento do *Cell-Dyn Ruby* baseia-se na citometria de fluxo. A citometria de fluxo permite uma análise quantitativa e qualitativa rápida, exata e precisa, de um grande número de amostras ^[3].



Figura 1: *Cell-Dyn Ruby* da *Abbott Diagnostics*.

Esta técnica usa a tecnologia laser para a determinação de glóbulos brancos, plaquetas e eritrócitos. Para a determinação da concentração de hemoglobina é usada a tecnologia LED (*Light Emitting Diode*).

No caso da tecnologia laser, a amostra é iluminada e as células separadas de acordo com os sinais:

- *Forward scatter* - indica o volume celular;
- *Side scatter* - determina o conteúdo celular, como o núcleo e grânulos.

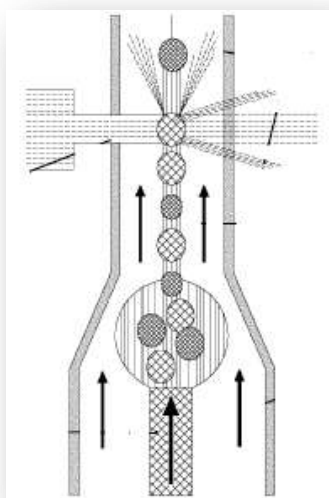


Figura 2: Exemplo de *Light Scatter*.

As amostras para a realização de hemogramas são colhidas em tubos com EDTA (ácido etilendiaminotetracético) que permite uma estabilidade morfológica dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas até 24 horas. O EDTA atua como quelante para o cálcio, impedindo a coagulação.

Contagem diferencial de eritrócitos e plaquetas

O *Cell-Dyn Ruby* usa a focagem hidrodinâmica para a contagem de eritrócitos e plaquetas. Neste método as partículas, sob uma ligeira pressão, são injetadas a partir de uma abertura formando um feixe de partículas. Esta pressão obriga a um alinhamento partícula a partícula que ao atravessar uma fonte de luz, leva à sua dispersão pela passagem de células. Esta dispersão é posteriormente detetada e convertida num impulso elétrico, permitindo a contagem de células [4].

Podem ser determinados os seguintes parâmetros:

- Em relação aos eritrócitos:
 - VGM
 - HGM
 - CHGM
 - RDW
- Em relação às plaquetas:
 - MPV
 - PDW

A contagem de plaquetas tem de ser vigiada para assegurar a sua precisão. Como tal, sempre que a contagem esteja em causa, o esfregaço sanguíneo deve ser realizado para corroborar a contagem ou detetar anomalias plaquetares.

Um dos erros mais comuns é a presença de plaquetas falsamente diminuídas. Este fenómeno parece estar relacionado com o EDTA, levando a uma agregação plaquetar que leva a uma pseudotrombocitopenia. Para evitar este fenómeno, pode ser usado o citrato como anticoagulante, em vez do EDTA ^[4].

Contagem de reticulócitos

A automatização da contagem de reticulócitos aumentou a precisão da contagem em comparação com a contagem manual em microscópio ótico. Para a contagem dos reticulócitos são usados os sinais *forward* e *side scatter* que detetam eritrócitos com RNA corado, usando o corante azul de cresil brilhante, que leva à precipitação de RNA como um complexo entre o corante e as proteínas de RNA ^[4].

O *Cell-Dyn Ruby* permite além da contagem de reticulócitos determinar a razão de reticulócitos imaturos (IFR). A fração de reticulócitos imaturos descreve quantitativamente os reticulócitos mais jovens com uma maior intensidade de coloração. Este parâmetro permite uma deteção mais inicial de um aumento da resposta eritropoiética, que é importante na determinação da resposta da medula óssea. O IFR pode ser usado em conjunto com o número absoluto de reticulócitos para classificar anemias ^[5].

Doseamento de hemoglobina

A contagem da hemoglobina é feita usando ensaios espectrofotométricos. Os eritrócitos sofrem lise sob a ação de um lisante que é adicionado à amostra. Posteriormente, há medição da absorvância através de um LED de baixa energia ^[4].

Contagem diferencial de leucócitos

Para a contagem de leucócitos, o *Cell-Dyn Ruby* usa os sinais *forward* e *side scatter*. Por análise da dispersão da luz causada pelas partículas é possível diferenciar o tamanho, morfologia e granularidade dos leucócitos e assim identificar os diferentes leucócitos presentes.

A contagem diferencial permite distinguir os leucócitos em 5 populações normais diferentes: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos. Esta técnica permite a contagem em termos percentuais e também em valores absolutos ^[4].

3.1.2. Option 4 Plus

Neste laboratório os testes de coagulação são realizados no **Option 4 Plus** (Figura 3). Este aparelho baseia-se na detecção ótica do coágulo com agitação magnética constante do meio reacional.

Para a realização dos testes de coagulação é usado como anticoagulante o citrato de sódio (9 partes de sangue para 1 parte de citrato de sódio), que funciona como um agente quelante reversível de cálcio, prevenindo a ativação de proteínas coagulantes.



Figura 3: Option 4 Plus da Biomerieux.

3.1.3. Sedi-15 da Becton Dickinson

No laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra a velocidade de sedimentação é realizada no **Sedi-15 da Becton Dickinson** (Figura 4). Este parâmetro mede a distância que os eritrócitos percorrem depois de um determinado tempo de espera, numa coluna vertical de sangue não coagulado, sob a influência da gravidade.

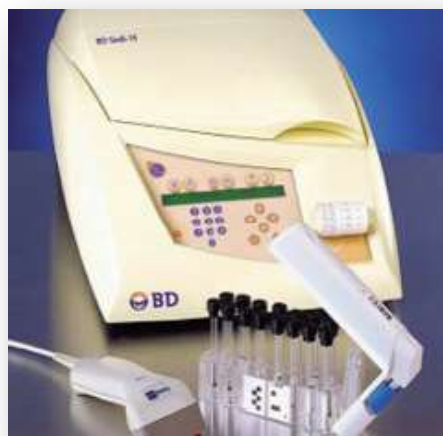


Figura 4: Sedi-15 da Becton Dickinson.

A velocidade de sedimentação será por isso, a velocidade à qual os eritrócitos agregam, em condições laboratoriais controladas, sendo o espaço medido em milímetros, expresso em mm/h. Para este teste a amostra é colhida em citrato trissódico (4 partes de sangue para 1 parte de citrato de sódio).

3.2. Realização do Hemograma

3.2.1. Fundamento do Método e Utilidade Clínica do Hemograma

O hemograma é o exame laboratorial mais requisitado e mais completo em hematologia. Este exame fornece-nos um conjunto de informações hematológicas quer quantitativas quer qualitativas, sendo usado pelos clínicos para triagem e diagnóstico de diversas patologias e monitorização terapêutica.

O hemograma abrange a contagem de leucócitos, eritrócitos, plaquetas e reticulócitos (quando pedido especificamente pelo clínico). Além disto, oferece informação não só sobre o número de células presentes mas também sobre o tamanho, forma e grau de hemoglobinização dos eritrócitos, e identifica também os tipos morfológicos dos leucócitos [3].

O hemograma deve ser prescrito tendo em conta a situação clínica do doente, como no caso de eritrocitopatias, de trombocitopatias, de leucopatias, entre outras situações. Deve também ser prescrito independentemente da situação clínica do doente, no caso de grávidas (estudos demonstram que em condições normais, as grávidas apresentam uma redução de hemoglobina a partir do segundo trimestre), idosos institucionalizados (é comum os idosos apresentarem anemia), em situações de pré-operatório, entre outras [6].

3.2.2. Hemograma - Parâmetros

○ **Eritrócitos (RBC):** é o número total de eritrócitos por unidade de volume de sangue total, expresso em $10^6/\mu\text{L}$.

A sua principal função é o transporte da hemoglobina, cuja função é o transporte do oxigênio e do dióxido de carbono, mantendo-a no seu estado funcional.

A contagem de eritrócitos é influenciada por vários fatores como a hora de colheita, postura, variação mensal e diurna, exercício, altitude e o tabaco.

Uma diminuição de eritrócitos (eritrocitopenia) pode estar associada a uma disfunção da medula óssea, a hemorragias ou a hemólise. O aumento de eritrócitos (eritrocitose) pode estar associado a um aumento de eritropoietina ou à policitemia vera ^[4].

○ **Hematócrito (Hct):** Determina o volume sanguíneo ocupado pela massa dos eritrócitos, expresso em percentagem (%).

Este parâmetro reflete a concentração de eritrócitos e não a sua massa total. O hematócrito depende maioritariamente do número de eritrócitos, mas também do efeito do seu tamanho médio. Correlaciona-se com a viscosidade sanguínea ^[4].

○ **Volume Globular Médio (VGM):** é o volume médio dos eritrócitos expresso em fentolitros (fl):

$$VGM = \frac{HCT \times 10}{RBC} \quad (\text{fl})$$

É um parâmetro muito útil na classificação de anemias, permitindo uma avaliação do tipo de anemia presente: macrocítica (VGM aumentado), microcítica (VGM diminuído) ou normocítica (VGM normal).

As principais causas de macrocitose são deficiência em ácido fólico, deficiência na vitamina B12 e alcoolismo. As principais causas associadas à microcitose são a deficiência de ferro e talassemia ^[4].

○ Hemoglobina Globular Média (HCM): representa o conteúdo de hemoglobina presente no eritrócito, expresso em picogramas (pg):

$$HCM = \frac{HGB \times 10}{RBC} \quad (\text{pg})$$

A HCM é influenciada pelo tamanho dos eritrócitos.^[4]

○ Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM): razão entre a quantidade de hemoglobina e o volume total de eritrócitos:

$$CHGM = \frac{HGB \times 100}{HCT} \quad (\text{g/dl})$$

Estima a concentração de hemoglobina média contida em cada eritrócito. A CHGM depende da relação entre a quantidade de hemoglobina e o volume do eritrócito. Permite classificar as anemias de acordo com a concentração em hemoglobina: hipocrômica (CHGM diminuído) e normocrômica (CHGM normal).

Os eritrócitos mais maduros apresentam uma área de superfície mais pequena e logo um aumento da CHGM, quando comparado com eritrócitos mais jovens^[4].

○ Red Cell Distribution Width (RDW): é o coeficiente de variação da distribuição dos volumes eritrocitários individuais.

Permite avaliar a heterogeneidade da população dos eritrócitos e é expresso em percentagem (%).

Um RDW aumentado é sinónimo de deficiência de ferro, de fragmentação de eritrócitos e também está associado a hemoglobinopatias homozigóticas. Em talassemia e anemia por doenças crónicas o RDW pode apresentar valores normais^[4].

Como teste auxiliar pode ser determinado o **Índice de Mentzer** que permite distinguir a talassemia da deficiência de ferro. Este teste é realizado dividindo o volume globular médio pela contagem de eritrócitos:

$$\text{Índice de Mentzer} = \frac{VGM}{RBC}$$

Valores superiores a 13 são sugestivos de anemia por deficiência de ferro e valores inferiores a 13 de talassemia.

○ Hemoglobina (HGB): A hemoglobina é diretamente medida e é expressa em g/dl., A hemoglobina é uma proteína essencial encontrada nos eritrócitos. Esta é constituída por dois pares de cadeias polipeptídicas, denominadas globulinas ($\alpha_2\beta_2$), e quatro grupos prostéticos heme, cada um contendo um átomo de ferro ferroso.

A principal função da hemoglobina é o transporte do oxigénio para os tecidos. Existem três tipos diferentes de hemoglobinas presentes no adulto: hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$), mais dominante, hemoglobina A2 ($\delta_2\alpha_2$) e a hemoglobina F ($\gamma_2\alpha_2$), menos comuns.

A sua diminuição permite o diagnóstico de anemia, patologia mais frequentemente detetada pelos laboratórios de hematologia, e normalmente é acompanhada de uma diminuição da contagem de eritrócitos e do hematócrito.

Uma das maiores causas de anemia é a deficiência de ferro, mas também pode estar associado a hemólise, a hemorragia aguda, doença crónica, entre outras causas ^[5].

○ Plaquetas (PLT): A contagem de plaquetas é expressa em $10^3/\mu\text{l}$. As plaquetas são fragmentos celulares anucleados derivados do megacariócito. Estas têm corpos irregulares com grânulos vermelhos finos que podem encontrar-se dispersos ou centralizados. Podem circular durante 6 a 8 dias na corrente sanguínea, sendo depois destruídas pelo baço.

As principais funções das plaquetas são manter a integridade dos vasos sanguíneos, a formação de tampões hemostáticos de modo a parar a perda sanguínea e promover a coagulação.

Um aumento na contagem de plaquetas (trombocitose) pode ser de origem inflamatória, idiopática, induzida por drogas, entre outras causas. A diminuição de plaquetas (trombocitopenia) pode estar associada a uma diminuição da produção de plaquetas (como no caso da deficiência da medula óssea), a um aumento do consumo de plaquetas (como no caso de doenças auto-imunes e causas idiopáticas) ou a uma distribuição anormal de plaquetas (como retenção de plaquetas no baço). Pode ocorrer também trombocitopenia induzida por fármacos ou devido a distúrbios hereditários ^[5,7].

○ Volume Plaquetar Médio (MPV): vantajoso na avaliação do tamanho e morfologia das plaquetas.

○ Dispersão do Volume Plaquetar (PDW): traduz o índice de variação do tamanho plaquetar. Um PDW elevado indica aumento da heterogeneidade do volume plaquetário enquanto um PDW baixo é observado em populações plaquetárias homogêneas [5].

○ Reticulócitos: São eritrócitos imaturos não nucleados com RNA remanescente. Os reticulócitos são maiores que os eritrócitos e permanecem na medula 1 a 2 dia antes de serem libertados para o sangue. Em situações de hipóxia, os reticulócitos presentes na medula óssea podem ser libertados.

A contagem de reticulócitos é dada em percentagem (%) de eritrócitos. É feita para avaliar a capacidade de produção de eritrócitos pela medula óssea e distinguir anemias relacionadas com perda sanguínea, por destruição excessiva de eritrócitos ou anemia por diminuição de produção de eritrócitos.

A falta de elevação da contagem de reticulócitos em pacientes anémicos sugere a diminuição da função da medula óssea ou falta de estímulo eritropoetínico.

Apresentam-se aumentados em caso de anemia hemolítica, após hemorragia aguda, na talassemia, entre outras causas. A sua diminuição está associada a eritropoiese ineficaz (como ocorre na deficiência de ferro e ácido fólico) na anemia crónica, na anemia aplástica, na síndrome mielodisplásica, na fibrose, entre outras causas. Os reticulócitos permitem também monitorizar a resposta da medula óssea após quimioterapia, transplante de medula óssea ou tratamento de anemias [4,5].

○ Leucograma: Os leucócitos são constituídos por polimorfonucleares ou granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e por mononucleares (linfócitos e monócitos).

A principal função dos leucócitos é proteger o organismo contra infeções. Os leucócitos atuam com componentes proteicos de resposta imune (como interleucinas), imunoglobulinas e com o complemento.

As anomalias na contagem dos leucócitos podem estar associadas a diversas patologias. Ao aumento do número de leucócitos designa-se leucocitose, enquanto à diminuição designa-se leucopenia.

○ **Neutrófilos:** Em adultos normais os neutrófilos representam mais de metade dos leucócitos em circulação.

Normalmente, têm um tamanho uniforme com núcleo segmentado com 3, 4 a 5 lóbulos. Na coloração May-Grunwald Giemsa mostram uma tonalidade rosa no citoplasma e uma granulação fina (Figura 5).

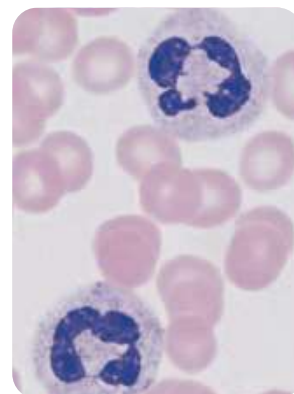


Figura 5: Neutrófilo segmentado.

Apresentam como principal função a fagocitose e são extremamente importante na defesa contra infecções bacterianas e em doenças infecciosas.

O aumento de neutrófilos (neutrófilia) está presente em infecções bacterianas, inflamação, necrose muscular aguda, tabagismo, entre outras causas. A diminuição (neutropenia) pode estar associada a medicamentos ou tóxicos, situações de auto-imunidade, anemia aplástica, entre outras [8].

○ **Eosinófilos:** o seu diâmetro é um pouco maior que os neutrófilos.

Normalmente apresentam 2 lóbulos nucleares e o citoplasma apresenta grânulos com coloração laranja-avermelhada, quando coradas com May-Grunwald Giemsa (Figura 6).

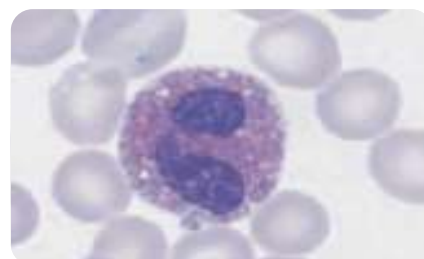


Figura 6: Eosinófilo.

Os eosinófilos são fagócitos e modulam a resposta inflamatória. Apresenta como principais funções a atividade parasitária (apresentam ação citotóxica direta contra parasitas), a fagocitose, a resposta alérgica e a diminuição de reações inflamatórias.

O aumento do número de eosinófilos (eosinofilia) pode estar associado a alergias e a infecções com parasita [8].

○ **Basófilos:** são os leucócitos mais raros a circular na corrente sanguínea.

Apresentam um núcleo denso, compacto e irregular e um citoplasma com grânulos purpura ou azuis-escuros, que vão escurecer o citoplasma, quando coradas com May-Grunwald Giemsa (Figura 7). Estes grânulos são ricos em



Figura 7: Basófilo.

histamina, serotonina e heparina. Estas substâncias levam a um aumento da permeabilidade vascular no local de atividade de agentes patogênicos levando a um recrutamento de células inflamatórias.

Os basófilos estão associados a reações de hipersensibilidade imediata e algumas reações de hipersensibilidade retardada.

O aumento de basófilos (basofilia) é frequentemente encontrado na leucemia mielóide crônica, policitemia vera ou na varicela. Podem estar também aumentados noutras doenças mieloproliferativas e ocasionalmente em alguns tumores [8].

○ Monócitos: São os leucócitos circulantes de maior tamanho na corrente sanguínea.

Apresentam um citoplasma cinzento-azulado que contém um número variável de grânulos finos avermelhados, quando coradas com May-Grunwald Giemsa. O núcleo é grande e curvado, apresentado normalmente em forma de ferradura ou em forma reniforme (Figura 8). A cromatina é fina e distribuída mais uniformemente do que no neutrófilo. Os monócitos apresentam como principal função a fagocitose, processamento de antígenos, imunidade mediada por células e são relevantes na defesa contra bactérias, fungos, vírus e corpos estranhos.



Figura 8: Monócito.

Um aumento de monócitos (monocitose) pode estar relacionado com infecções crônicas, leucemia mielóide crônica e leucemias agudas [8].

○ Linfócitos: Os linfócitos são células mononucleares com grânulos citoplasmáticos específicos. A maioria dos linfócitos circulantes são células pequenas com uma margem de citoplasma reduzida e um núcleo bem definido com cromatina condensada. O núcleo apresenta-se com tamanho uniforme e com cromatina homogênea, quando coradas com May-Grunwald Giemsa (Figura 9).

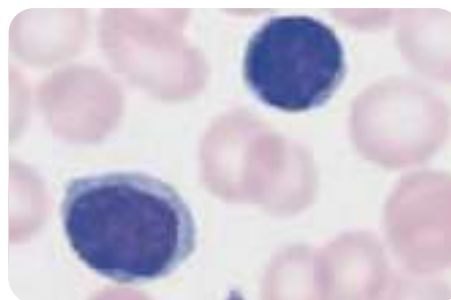


Figura 9: Linfócito.

Os linfócitos estão divididos em de acordo com a sua função em linfócitos T, linfócitos B e NK.

Os linfócitos T sofrem maturação no timo, representam cerca de 70% dos linfócitos circulantes, permitem uma defesa local contra antígenos de corpos orgânicos e inorgânicos estranhos. Estes são divididos em células de ajuda e células citotóxicas. As células T estão associadas à imunidade mediada por células, que envolve reações de hipersensibilidade retardada, a rejeição de enxerto, a defesa contra organismos intracelulares (como o bacilo da tuberculose), e defesa contra neoplasias.

Outro grupo são os linfócitos B, sofrem maturação na medula óssea, perfazem cerca de 20% dos linfócitos circulantes. Estas células podem depois da interação com antígenos diferenciar-se em plasmócitos, células efectoras, produtoras de imunoglobulinas. São responsáveis pela defesa humoral contra vírus, bactérias, fungos, parasitas e alérgenos.

As células que não apresentam características nem de linfócitos T nem de linfócitos B são designadas de células Natural Killer (NK). Estas células são orientadas a inativar células alvo que tenham baixo nível de expressão de moléculas HLA classe I, que estão associadas normalmente a infeções virais ou a células malignas.

Um aumento de linfócitos (linfocitose) está associado doenças infecciosas, bactérias (como a tuberculose), a infeções virais, a leucemia linfocítica, a mononucleose infecciosa (presença de linfócitos atípicos), entre outras. A diminuição do número absoluto de linfócitos (linfopenia) pode estar associada a insuficiência grave da medula óssea, tratamento com corticosteroides, a origem idiopática, em doenças auto-imunes (Lupus Eritematoso Sistémico e Miastenia Graves) e SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) [5].

3.3. Preparação do Esfregaço Sanguíneo

O esfregaço sanguíneo é uma ferramenta importante para determinar e confirmar diagnósticos. Este permite avaliar o tamanho e morfologia dos eritrócitos, dos leucócitos, das plaquetas e detetar artefactos e parasitas presentes no sangue.

Os esfregaços de sangue periférico foram preparados a partir de sangue com anticoagulante, neste caso com EDTA.

As lâminas são preparadas se no hemograma estiver pelo menos um dos seguintes critérios presente:

- Inversão de fórmula igual ou superior a 10%;
- Ou houver inversão de fórmula, se os leucócitos forem superiores a $8.0 \times 10^3/L$;
- Monócitos superiores a 15%;
- Leucocitoses elevadas;
- Basófilos superiores a 2%;
- RDW superior a 15;
- RDW superior a 14 se as constantes eritrocitárias se encontrarem alteradas;
- Plaquetas inferiores a $150 \times 10^3/\mu l$;
- Plaquetas superiores a $300 \times 10^3/\mu l$.

E outras situações nomeadamente, alarmes do aparelho *Cell Dyn Ruby*.

3.3.1. Metodologia Usada

3.3.1.1. Coloração May-Grunwald-Giemsa

Para a observação ao microscópio ótico do esfregaço e para detetar possíveis alterações morfológicas é realizada uma coloração de May-Grunwald-Giemsa.

Esta coloração é do tipo Romanowsky, consiste numa combinação das colorações de Grunwald e Giemsa, sendo a mistura de dois corantes que contêm eosina e derivados de azul-de-metilo.

Esta permite que moléculas como os ácidos nucleicos e proteínas que têm afinidade para o corante básico, o azul-de metilo, apresentem uma coloração azulada. No caso das moléculas de hemoglobina, estas têm afinidade para corantes ácidos, a eosina, apresentando colorações mais avermelhadas. Com esta coloração os leucócitos apresentam uma cor azul pálida, sendo o citoplasma muito claro ou incolor. No caso dos eritrócitos, devido à presença da hemoglobina, vão apresentar uma coloração mais avermelhada ^[15].

3.3.1.2. Observação ao microscópio ótico

A observação de esfregaços sanguíneos é realizada num microscópio ótico. Esta observação deve começar pela objetiva mais baixa e aumentar progressivamente até chegar à ampliação maior.

Na objetiva de **10x** e **20x** é possível determinar:

- A qualidade da preparação;
- Aglutinação de eritrócitos, aglutinação de plaquetas e presença de eritrócitos em pilha de moedas;
- Coloração dos leucócitos;
- Densidade celular;
- A área mais favorável para a observação do esfregaço. Esta área deve ser aquela onde os eritrócitos se encontram uniformemente distribuídos e não distorcidos.

Na objetiva de **40x** e **60x** é possível avaliar a variação do tamanho celular, forma e coloração.

Para a observação com a objetiva de **100x** é usado imersão de óleo. Esta permite uma observação mais detalhada da morfologia das células sanguíneas ^[5].

3.4. Anomalias Eritrocitárias

3.4.1. Variação da Morfologia

A anisocitose e poiquilocitose são as características não específicas mais presentes na maioria das desordens sanguíneas. Estes dois termos implicam uma maior variabilidade em forma e tamanho do que normalmente está presente ^[4].

3.7.1.1. Alterações no tamanho

A **anisocitose** consiste numa variação de tamanho.

- **Macrocitose:** Eritrócitos com tamanho superior ao normal (Figura 10). Encontrado normalmente em anemia megaloblástica, em síndromes mielodisplásicas, em doentes com consumo de álcool e em doentes com hepatite crónica ^[8].

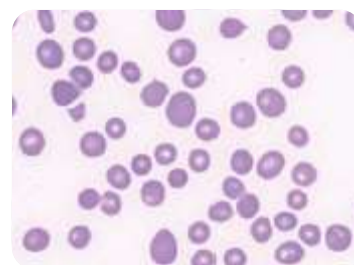


Figura 10: Macrocitose.

- **Microcitose:** Apresentam um volume inferior ao normal (Figura 11). Associado a defeitos na formação da hemoglobina. Característico de anemia por deficiência de ferro, vários tipos de talassemia e casos severos de anemia crônica. Casos mais raros estão associados a anemia sideroblástica adquirida e congênita [8].



Figura 11: Microcitose.

3.4.1.2. Alterações na forma

Pode ocorrer a presença:

- A **poiquilocitose** consiste numa variação da forma dos eritrócitos (Figura 12) e está presente em vários tipos de eritropoiese anormal, como na anemia megaloblástica, deficiência de ferro, talassemia, mielofibrose e síndrome mielodisplásica. Esta encontra-se também na anemia hemolítica congênita causada por deficiências na membrana do eritrócito [8].

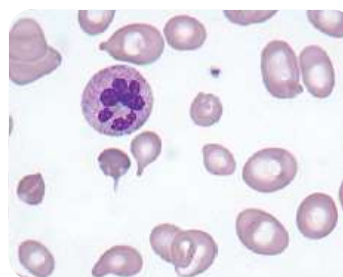


Figura 12: Poiquilocitose.

- **Esferócitos:** Células mais esféricas do que o normal (Figura 13). Esta alteração pode estar associada a defeitos genéticos da membrana dos eritrócitos, como a esferocitose hereditária, na anemia hemolítica autoimune e devido á ação de toxinas de bactérias [8].



Figura 13: Esferócito.

- **Esquizócitos:** Também denominados de eritrócitos fragmentados (Figura 14), são encontrados em várias patologias sanguíneas. Os esquizócitos apresentam um tamanho inferior ao normal e variação da forma. Estão associados a doenças genéticas, consequência de *stress* mecânico, queimaduras graves e em deficiências adquiridas na eritropoiese [8].

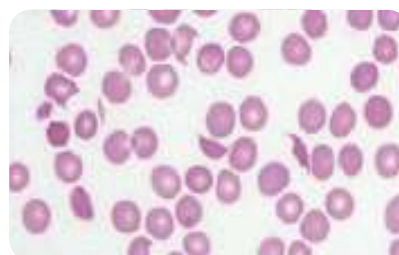


Figura 14: Esquizócito.

- **Acantócito:** Anormalidade dos eritrócitos em que há um pequeno número de espículas de comprimento inconstante, com forma e espessura irregulares (Figura 15). Associado a metabolismo de fosfolípidos anormal ou com alterações das proteínas membranares dos eritrócitos. Pode ocorrer também em caso de doença hepática grave [8].

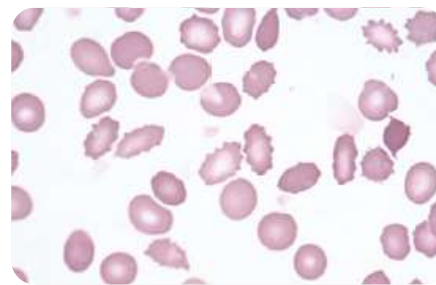


Figura 15: Acantócito.

- **Equinócito:** Eritrócitos desenvolvem numerosas projeções regulares e curtas na sua superfície (Figura 16). Podem aparecer na presença de substâncias gordas na lâmina na qual o esfregaço foi realizado. Pode também ser um artefacto devido a atraso na realização do esfregaço [8].

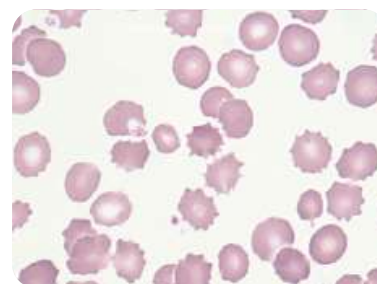


Figura 16: Equinócito.

- **Células-alvo:** Eritrócito que apresenta uma área redonda corada central e uma zona periférica de citoplasma com pouca coloração (Figura 17). Esta alteração resulta destas células apresentarem uma superfície desproporcionalmente longa em comparação com o volume. Associada a doença hepática crónica, em anemia por deficiência de ferro e talassemia. Também presentes em hemoglobinopatias [8].

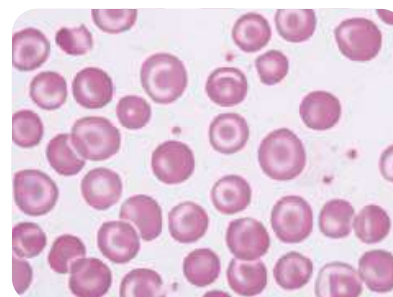


Figura 17: Células-alvo.

- **Drepanócitos:** quase sempre presentes em esfregaços com presença de hemoglobina S. As células em foice podem variar desde forma de barco a forma de foice (Figura 18). Pode estar associado em alguns casos a sangue sujeito a anoxia. Permite o diagnóstico da drepanocitose [8].



Figura 18: Drepanócito.

- **Dacriócitos:** eritrócitos em formato de lágrima (Figura 19). Estas células são características de situações de mielofibrose, mas também podem ocorrer em síndromes mieloproliferativas [8].

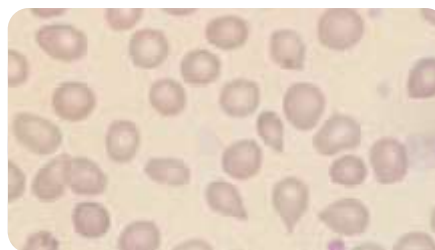


Figura 19: Dacriócito.

- **Leptócitos:** Eritrócitos extremamente finos (Figura 20). Associadas a deficiência de ferro severa, assim como no caso de talassemia e doença hepática [8].

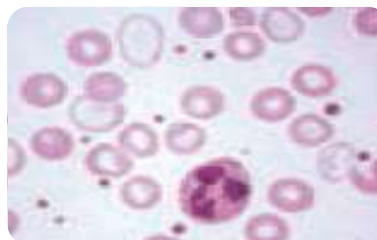


Figura 20: Leptócito.

- **Estomatócitos:** eritrócitos com uma área central bicôncava (Figura 21). Observado em doenças hepáticas, alcoolismo e mais raramente em síndromes mielodisplásicas [8].



Figura 21: Estomatócito.

3.4.2. Variação da Concentração de Hemoglobina

Os eritrócitos podem apresentar uma menor concentração de hemoglobina, apresentando uma coloração mais pálida, denominada **hipocromia**. Nestes casos o CHGM apresenta-se diminuído. O decréscimo da concentração de hemoglobina pode resultar de uma síntese de hemoglobina alterada ou devido a um tamanho anormal dos eritrócitos. A alteração na síntese de hemoglobina pode dever-se a falha na síntese do grupo heme, que tem como principal causa a deficiência em ferro, ou mais raro, por falha na síntese das globulinas, sendo neste caso a causa mais comum a talassemia. Se a causa for devido a um tamanho anormal de eritrócitos pode estar associado a defeito na síntese de hemoglobina ou devido a doença hepática [8].

A anemia também pode ser causada por deficiência em vitamina B12 ou ácido fólico, originando uma anemia megaloblástica. Neste caso, os eritrócitos apresentam-se maiores, apresentando uma coloração mais intensa, levando a um aumento do HCM.

3.4.3. Inclusões Eritrocitárias

Em alguns casos pode estar presente **pontuado basófilo**. Este consiste na presença de numerosos grânulos basofílicos distribuídos por toda a célula (Figura 22). A sua presença está associada a uma eritropoiese alterada. Está presente em situações de talassemia, anemia megaloblástica, infecções, doenças de fígado, envenenamento por chumbo ou outros metais pesados e hemoglobina instável [8].

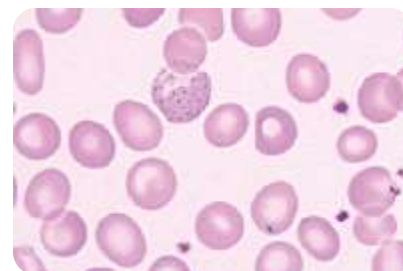


Figura 22: Pontuado basófilo.

Existem outros tipos de inclusões eritrocitárias como os corpos de Howell-Jolly e corpos de Pappenheimer, mas estes não foram possíveis de serem observados durante este estágio. Todos os outros tipos de alterações apresentadas foram possíveis de ser observadas durante o estágio.

3.4.4. Eritrócitos nucleados

Os eritrócitos nucleados são percursoros de eritrócitos maduros (Figura 23). Em situações normais, estas células estão presentes apenas no sangue do feto ou em crianças muito novas. No adulto, estas células estão confinadas á medula óssea, e aparecem na circulação apenas em situação de doença, estando associada a hematopoiese extra-medular ou anemias graves.

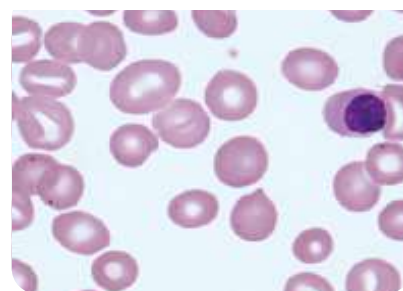


Figura 23: Eritrócito nucleado.

Normalmente, as células nucleadas que aparecem no sangue periférico em caso de doença são normoblastos policromáticos. Um grande número de eritrócitos nucleados é encontrado na doença hemolítica do recém-nascido e na talassemia major [5].

3.5. Determinação da Velocidade de Sedimentação

3.5.1. Fundamento do Método e Utilidade Clínica

A velocidade de sedimentação é um marcador indireto de inflamação que reflete a presença no plasma de proteínas de fase aguda, que leva que os eritrócitos precipitem mais rapidamente.

Este teste continua a ser amplamente usado ainda que a sua utilidade tenha diminuído. Apesar de este parâmetro ser relativamente fácil e barato de determinar, concluiu-se que responde lentamente a estímulos e, conseqüentemente, a alterações na atividade da doença. Adicionalmente foi referido que este parâmetro pode ser influenciado por vários fatores como a idade, anemia, gravidez, presença de infeções, tumores, alterações na forma e tamanho dos eritrócitos, a concentração das proteínas plasmáticas e o valor do hematócrito ^[11].

3.6. Determinação das Provas de Coagulação

3.6.1. Introdução à Coagulação Sanguínea

Hemostase é um processo que mantém a integridade dos vasos sanguíneos após um dano vascular. Danos no vaso ou uma rápida saída de sangue iniciam eventos na parede do vaso para parar a hemorragia. Adicionalmente as plaquetas em circulação são recrutadas para o local do dano, onde começam a formar o trombo.

A coagulação do sangue é iniciada pelo fator endotelial expresso pelo endotélio que leva à formação de trombina e fibrina. Sob condições normais, os mecanismos regulatórios restringem a formação do trombo tanto em tempo como em espaço. Deste modo, o sistema hemostático consiste num equilíbrio entre mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes ^[12].

Vias de cascata de coagulação

A via de coagulação pode ser ativada por duas vias, a via intrínseca e extrínseca. A via intrínseca pode iniciar-se quando o revestimento endotelial de um vaso sanguíneo é danificado ou quando o sangue entra em contato com certos tipos de superfícies estranhas.

A ativação desta via começa com substâncias que normalmente estão presentes no sangue e como tal é chamada de via intrínseca.

No caso da via extrínseca o iniciador é a tromboplastina, que não é uma molécula normalmente presente no sangue, mas que pode ser libertada pelas células endoteliais ou dos tecidos, quando ocorre dano nas células dos tecidos. As duas vias têm em comum a parte final de formação de fibrina.

A deposição e remoção de fibrina são reguladas pelo sistema fibrinolítico. Apesar de este sistema ser complexo e com múltiplos componentes, com muitos ativadores e inibidores, tudo se centra em torno do fibrinogénio e da fibrina resultante da clivagem do fibrinogénio pela trombina ^[13].

3.6.1.1. Via extrínseca

A tromboplastina tecidular forma um complexo com o fator VII, tornando-o ativo. Este complexo converte o fator X para a sua forma ativa. O fator X ativado em conjunto com a tromboplastina tecidular, com o fator V ativado e na presença de cálcio leva à conversão da protrombina em trombina. A trombina por sua vez vai levar à conversão do fibrinogénio em fibrina. Posteriormente ocorre uma polimerização da fibrina, estabilizada pelo fator XIII permitindo a formação do coágulo (Figura 24) ^[13].

3.6.1.2. Via intrínseca

Esta via está normalmente associada a dano do endotélio com exposição do colagénio. As plaquetas aderem ao colagénio exposto e libertam o fator plaquetar 3 (PF-3), que leva à ativação do fator XII. O fator XII ativado leva à ativação do fator XI que por sua vez ativa o fator IX. Posteriormente há ativação do fator X na presença do fator VIII, de PF-3 e de cálcio. Os restantes passos são iguais aos da via extrínseca, a partir da ativação do fator X (Figura 24) ^[13].

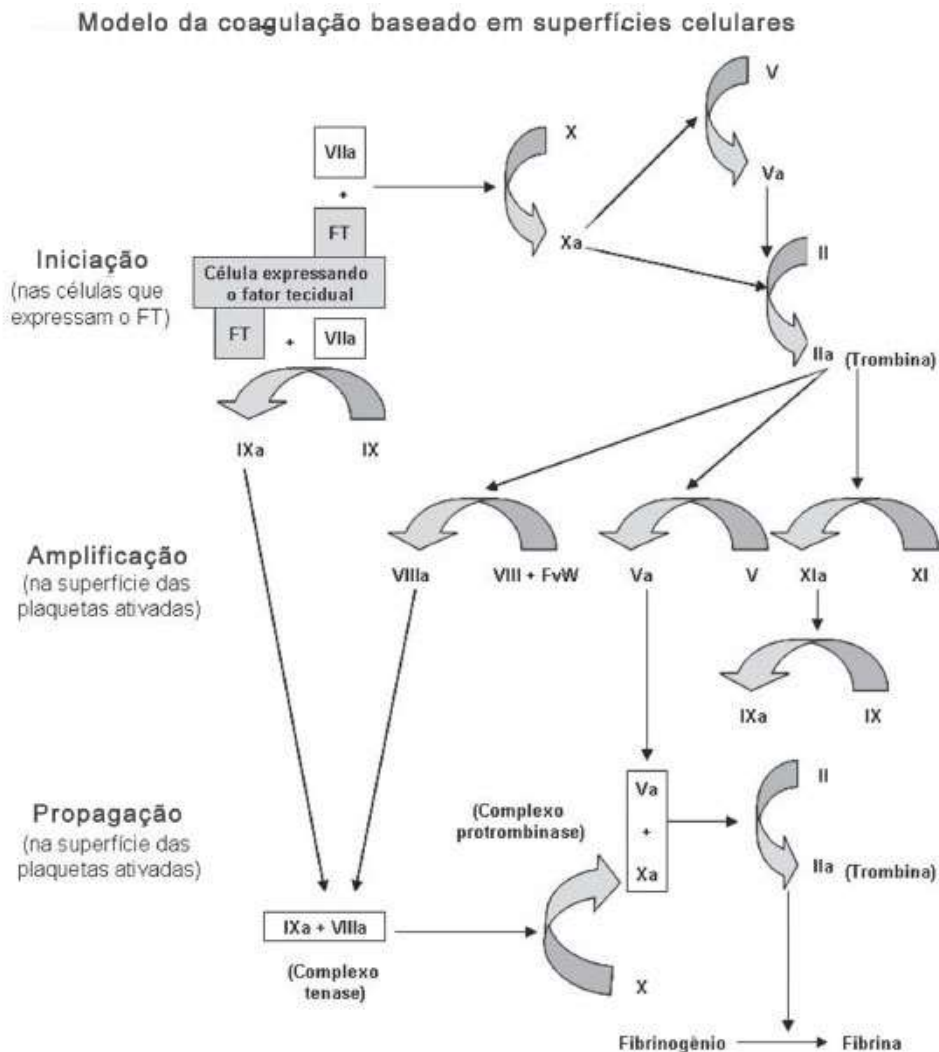


Figura 24: Cascata de coagulação.

3.6.2. Parâmetros Analisados

3.6.2.1. Tempo de protrombina (PT)

Este parâmetro informa sobre a eficiência da via extrínseca. Este teste consiste na medição do tempo de coagulação de plasma após a adição de cálcio na presença de uma concentração ótima de tromboplastina. O tempo de protrombina é expresso em segundos (s). É também determinada a Taxa de Protrombina, em percentagem (%), que permite avaliar a atividade da protrombina em relação a um plasma normal.

O valor de PT determinado serve de base para a determinação da taxa de normalização internacional, o INR. O INR baseia-se na razão entre o PT do doente e um PT de controlo, elevado ao índice de sensibilidade internacional (ISI). O ISI é determinado

através de comparação de cada reagente com uma tromboplastina padrão primária fornecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Este pode ser dado pela fórmula:

$$\text{INR} = \left[\frac{\text{PT Patient}}{\text{PT Reference Plasma}} \right]^{\text{ISI}}$$

Neste caso, a origem da tromboplastina não têm influência na determinação dos valores, permitindo que o valor de INR obtido seja o mesmo em qualquer laboratório do mundo.

O INR é muito usado para a monitorização de pacientes que usam terapias anticoagulantes. Para doentes que se encontrem em terapia anticoagulante, o valor de INR ótimo será próximo de 2-3 [14].

Algumas causas de PT alongados:

- Administração de anticoagulantes orais, como antagonistas da vitamina K;
- Doenças de fígado;
- Deficiências na vitamina K;
- Coagulação intravascular disseminada (DIC);
- Deficiências congénitas num dos fatores VII, X, V ou da protrombina;
- Doença hemorrágica do recém-nascido.

3.6.2.2. Tempo de tromboplastina ativado (PTTa)

Este teste mede o tempo de coagulação do plasma após adição de fatores de contato, de fosfolípidos e CaCl_2 , mas sem adição de tromboplastina. O tempo de tromboplastina ativado é expresso em segundos (s). Este parâmetro permite avaliar a eficiência da via intrínseca.

Algumas causas de PTTa alongado:

- Coagulação intravascular disseminada;
- Doença hepática;
- Administração ou contaminação com heparina ou de alguns anticoagulantes orais;
- Anticoagulantes em circulação;
- Deficiência nos fatores V, VII, IX, X, II e I;
- Anticoncepcionais orais.

Encontra-se moderadamente alongado no caso de deficiências da vitamina K.

Casos de hemofilia ou de outras doenças congénitas levam a um prolongamento isolado do PTTa. Este é o método mais usado para monitorizar a terapêutica com heparina ^[14].

3.6.2.3. Fibrinogénio

O fibrinogénio é uma glicoproteína presente no plasma sintetizada no fígado e nos megacariócitos, que se transforma em fibrina sob a influência da trombina, para a formação do coágulo

Para a determinação do fibrinogénio, o plasma encontra-se diluído e necessita-se de uma solução rica em trombina de modo a que o tempo de coagulação seja independente da sua concentração. O tempo de coagulação será inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio presente na amostra. A sua concentração é expressa em mg/dl.

Esta proteína apresenta um tempo de semi-vida de 3 a 5 dias e é uma proteína de fase aguda, podendo encontrar-se aumentada na inflamação. Um aumento dos níveis de fibrinogénio pode aumentar a agregação dos eritrócitos e a viscosidade do sangue.

O fibrinogénio pode encontrar-se aumentado durante a inflamação, em caso de necrose tecidular ou em doentes com trombozes e diminuído em caso de alteração do metabolismo hepático, de fibrinólise e no DIC ^[14].

3.7. Imunohematologia

3.7.1. Fundamento do método e Utilidade Clínica – Sistema ABO

Os antígenos ABO estão integrados na superfície dos eritrócitos. Estes são expressos a nível da membrana do eritrócito, desempenhando um papel muito importante como antígenos de histocompatibilidade. Estes antígenos estão presentes tanto em células

epiteliais, endoteliais e plaquetas, como de forma solúvel no plasma e noutros fluidos orgânicos. Os grupos sanguíneos de acordo com este sistema podem ser divididos em 4 grupos: A, B, AB e O.

Os anticorpos do sistema ABO, anti-A e anti-B ocorrem no plasma de indivíduos cujos eritrócitos não possuem o antígeno correspondente e que nunca tiveram contato com ele por meio de transfusões ou gestação prévia. Estes anticorpos geralmente são imunoglobulinas M, e a reação com os antígenos correspondentes é ótima a temperaturas baixas, sendo por isso denominados anticorpos frios, apesar de também serem reativos a 37° [10].

3.7.2. Sistema Rh

Formalmente este sistema é conhecido como Sistema de Rhesus, é muito complexo e, por essa razão, classifica-se os indivíduos como Rh positivo e Rh negativo, dependendo da presença ou ausência de Antígeno D.

Os anticorpos do sistema Rh, anti-D são do tipo IgG e reagem otimamente a 37°, sendo por isso denominados de anticorpos quentes. Estes anticorpos raramente ocorrem de forma natural, a maioria ocorre devido à presença de transfusões ou devido a gravidez anterior com imunização feto-materna [10].

3.7.3. Metodologia Usada – Método em Lâmina

O método usado é a aglutinação direta com um reagente que indica a presença do antígeno correspondente. Para a realização deste teste usam-se soros comercializados que contêm anticorpos conhecidos dirigidos contra os respectivos antígenos, que existem à superfície dos eritrócitos. No caso do sistema ABO, coloca-se uma gota de sangue em cada lâmina, às quais se junta uma gota de soro anti-A e uma gota de Anti-B. Seguidamente, observa-se a presença ou ausência de aglutinação. O resultado é positivo se ocorrer aglutinação, sugerindo a presença do antígeno, e negativo na ausência de aglutinação.

Na tabela seguinte são apresentados os anticorpos presentes nos diferentes grupos sanguíneos.

Tabela 2. Anticorpos presentes nos diferentes grupos sanguíneos.

Grupo Sanguíneo	Anti - A	Anti - B
A	+	-
B	-	+
AB	+	+
O	-	-

Para a determinação do Rh a técnica usada é igual ao Sistema ABO, ou seja, a aglutinação. O procedimento é o mesmo e é realizado ao mesmo tempo do ABO [10].

Neste caso, a aglutinação corresponde a Rh positivo (possui o antígeno D) e a sua ausência a Rh negativo (ausência de antígeno D). No laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra, a ausência de aglutinação é confirmada ao microscópio ótico.

4. Bioquímica

No setor de Bioquímica a principal atividade é o doseamento de moléculas biologicamente importantes presentes nos fluidos corporais como eletrólitos, proteínas e lípidos necessários para a monitorização e diagnóstico de diversas patologias.

Neste setor a maioria das análises são realizadas no aparelho *Architect Ci8200*. Todos os dias eram executadas as calibrações e controlos dos parâmetros determinados, com níveis diferentes de controlo, de acordo com o parâmetro analisado.

No caso da hemoglobina glicada, o controlo era realizado apenas uma vez por semana com o uso de dois níveis diferentes, um alto e um baixo.

4.1. Equipamento e seu Funcionamento

No Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra todas as análises bioquímicas, à exceção da hemoglobina glicada (HbA1c), eram realizadas recorrendo ao aparelho automático ***Architect Ci8200*** que está dividido em dois módulos, o da bioquímica e o da imunologia (Figura 25).

No módulo da bioquímica são realizados diversos ensaios importantes para o diagnóstico e monitorização clínica. O *Architect Ci8200* apresenta várias metodologias como a espectrofotometria, turbidimetria, potenciometria e nefelometria.



Figura 25: *Architect Ci8200* da Abbott Diagnostics.

Neste laboratório o doseamento da hemoglobina glicada era realizado no aparelho **ADAMS AIC – HA-8160** (Figura 26). A técnica aplicada é a Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC). Este tipo de cromatografia usa uma coluna composta por resina de troca iónica de carácter catiónico de fase reversa.



Figura 26: ADAMS AIC – HA-8160 da Arkray.

4.2. Parâmetros Analisados e Utilidade Clínica

4.2.1. Eletrólitos

Os eletrólitos são moléculas com baixa massa molecular carregadas positivamente (catiões) ou negativamente (aniões), presentes no plasma. Estas moléculas são encontradas em todos os fluidos, intracelular ou extracelulares.

São responsáveis pela manutenção da pressão osmótica e são importantes em muitos processos metabólicos, na manutenção do pH, em reações de oxidação-redução e como co-fator de várias enzimas ^[16].

Ionograma

Consiste na determinação de sódio, potássio e cloretos, para avaliação do equilíbrio eletroquímico. O ionograma deve ser realizado tendo em conta o contexto clínico, nomeadamente a patologia de base do doente ou a terapêutica instituída. Situações de doentes graves com perda de consciência, doentes renais ou hepáticos, doentes que apresentem terapêutica com determinados fármacos (diuréticos), que apresentem vômitos, diarreia, tonturas, fadiga muscular ou alterações comportamentais devem ser sujeitos a este teste, pois são possíveis de apresentar valores alterados de potássio, cloreto ou sódio ^[16,17].

A quantificação dos iões Na⁺, o K⁺ e o Cl⁻, pelo *Architect ci8200* é realizada por potenciometria, através de eléctrodos seletivos a cada um dos iões.

4.2.1.1. Sódio

O sódio é o principal catião encontrado no fluído extracelular e como tal a regulação do sódio é um fator crítico na manutenção da quantidade de água total. O sódio é livremente filtrado pelo glomérulo, sendo que 70-80% é ativamente reabsorvido no túbulo proximal com o cloreto e água. Dos restantes 20-25%, uma parte é depois reabsorvida pela Ansa de Henle.

Distúrbios na homeostase do sódio podem ocorrer devido a um excesso de perda ou por aumento da retenção de Na^+ ou água. A diminuição do sódio no plasma (Hiponatremia) pode ocorrer em situação de hipoosmolaridade, hiperosmolaridade e isoosmolaridade e como tal a osmolalidade necessita de ser avaliada para determinar o tipo de hiponatremia presente. Destes o mais comum é a hipoosmolaridade. A hiponatremia pode estar associada a vômitos, a diarreia prolongada, a diminuição da reabsorção renal e a retenção excessiva de líquidos.

A concentração de sódio aumentada no plasma (Hipernatremia) está sempre associada a uma hiperosmolaridade, sendo a principal causa a desidratação, que pode ser causada por ingestão insuficiente de água, por aumento da excreção renal de água (como ocorre na diabetes insípida) ou por aumento da perda pelo trato gastrointestinal. Também pode estar relacionada com aldosteronismo secundário, Doença de Cushing, doença cardíaca congestiva, síndrome nefrótica, entre outras causas ^[16,18].

4.2.1.2. Cloreto

O ião cloreto é o anião mais abundante no espaço extracelular. Juntamente com o sódio representa a maioria dos constituintes osmoticamente ativos no plasma. Apresenta funções na manutenção da distribuição da água, na pressão osmótica e no balanço anião-catião no meio extracelular. Este é filtrado pelo glomérulo e reabsorvido passivamente juntamente com o sódio no túbulo proximal.

A diminuição da concentração plasmática de cloreto está associada a acidose metabólica, secreção gástrica persistente e vômito prolongado. O aumento da concentração pode estar relacionado com situações de desidratação, falha renal aguda e acidose metabólica associada a diarreia prolongada ou perda de bicarbonato de sódio ^[16,18].

4.2.1.3. Potássio

O potássio é o principal catião presente no meio intracelular. A manutenção da concentração normal de potássio é essencial para a sobrevivência celular. Cerca de 98% do potássio total do corpo encontra-se no meio intracelular, estando apenas 2% no meio extracelular.

A função renal é o principal mecanismo pelo qual o potássio é regulado, sendo totalmente filtrado pelo glomérulo e praticamente todo reabsorvido pelo túbulo proximal. A alteração na homeostase do potássio tem consequências graves.

A redução da concentração de potássio (hipocaliemia) levam a fraqueza muscular, irritabilidade, paralisia, problemas neuromusculares graves e taquicardia. A hipocaliemia pode ser devida a redistribuição do potássio extracelular ou por défice de potássio devido ao aumento da perda ou diminuição da ingestão. No caso de aumento do potássio (hipercaliemia) associa-se a confusão mental, fraqueza, dormência e fraqueza dos músculos respiratórios. A hipercaliemia pode estar associada a queimaduras graves, cetoacidose diabética e retenção de potássio a nível renal ^[16,18].

4.2.1.4. Osmolalidade

A osmolalidade é uma medida da força osmótica ou do número de iões osmoticamente ativos ou partículas presentes por unidade de solução. Esta consiste na concentração das moléculas expressas em mmol por quilo de solvente.

É um teste não específico, que permite avaliar o grau de hidratação do doente. Pode ser calculada pela seguinte fórmula ^[19]:

$$\text{Osmolalidade (mOsm/kg)} = (1.86 [\text{Na}^+] \text{ mmol/L}) + (0.36 [\text{Azoto Ureico}] \text{ mmol/L}) + (0.056 [\text{Glucose}] \text{ mmol/L}) + 9$$

Um aumento da osmolalidade pode estar associado a desidratação, a uma quantidade anormal de um constituinte normalmente presente no soro ou à presença de um constituinte anormal. Uma diminuição da osmolalidade está frequentemente associada a hiponatremia (sódio plasmático diminuído), devido ao facto do sódio ser o principal responsável pela osmolalidade do plasma ^[16].

4.2.1.5. Cálcio

É o quinto elemento mais comum do corpo e o catião mais prevalente. O esqueleto contém cerca de 99% do cálcio do corpo, predominantemente como cristais de hidroxapatite. Este existe no plasma de 3 formas: livre, ligado a proteínas plasmáticas (como a albumina) e complexada com pequenos aniões. O cálcio livre é o que está biologicamente ativo, sendo a sua concentração altamente regulada por hormonas (como hormona paratiroideia (PTH)) e 1,25-dihidroxitamina D).

O cálcio intracelular apresenta um papel essencial na contração muscular, na secreção hormonal, no metabolismo do glicogénio e na divisão celular. O cálcio extracelular é necessário para a mineralização óssea e para a coagulação sanguínea.

O equilíbrio do cálcio plasmático é maioritariamente mantido em controlo pela absorção e libertação do cálcio presente nos ossos e pela absorção gastrointestinal, e menos significativamente a nível renal.

Hipoalbuminémia é a causa mais comum para a diminuição do cálcio, está associada a patologias que diminuem a concentração plasmática de albumina (doença hepática, síndrome nefrótica e malnutrição). Também ocorre na pancreatite aguda e na hipotensão. O aumento do cálcio plasmático resulta de um fluxo de cálcio para o fluído extracelular do esqueleto, intestino e rins superior ao seu efluxo. Pode ser causado por absorção intestinal aumentada, aumento da retenção renal, aumento da reabsorção do osso e hiperparatiroidismo primário.

Para a determinação do cálcio é usado o método arsenazo III, onde a ligação do cálcio ao corante, leva a uma alteração de cor, possível de ser medida espectrofotometricamente ^[20].

4.2.1.6. Magnésio

O Mg^{2+} é um catião bivalente muito abundante nas células vivas. Dentro das células a maioria do magnésio encontra-se ligado a proteínas e a moléculas carregadas negativamente, especialmente o ATP. O magnésio extracelular perfaz cerca de 1% do conteúdo total de magnésio. Este desempenha vários papéis essenciais, como estabilização de complexos macromoleculares, de membranas, de ácidos nucleicos e nucleótidos e atua como um co-fator numa grande variedade de reações enzimáticas. Mais ainda, desempenha um papel

importante na função fisiológica do cérebro, coração e músculos esquelético e apresenta propriedades anti-inflamatórias.

A deficiência de magnésio é maioritariamente devida a perdas a nível intestinal, pela diarreia. Também pode ocorrer devido a má absorção, vômitos e perdas renais. O aumento de magnésio pode resultar de um incremento da ingestão e devido á toma de antiácidos.

O doseamento do magnésio é feito através de formação de complexos corados entre o magnésio e o arsenazo, posteriormente medido espectrofotometricamente [20,21].

4.2.1.7. Fósforo

O fósforo é um componente fundamental dos organismos vivos. A maioria do fósforo nas células é orgânico e incorporado nos ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfoproteínas (como a ATP e AMP) e NADP. É importante na atividade de várias enzimas e tem uma função essencial para o metabolismo. A manutenção do equilíbrio do fósforo é mantida maioritariamente pela excreção renal.

Valores diminuídos de fósforo (hipofosfatemia) estão associados a perda gastrointestinal (vômitos, diarreia, antiácidos), a diminuição do limiar renal (hiperparatiroidismo), a diminuição da absorção, entre outras causas. Um aumento do fósforo pode estar associado a insuficiência renal (devido a uma diminuição da taxa de filtração glomerular) ou a um aumento do fósforo na dieta.

Para a determinação do fósforo o corante mais frequentemente utilizado é o verde malaquita, um corante básico. Da reação do fosfato com este corante resulta o composto fosfomolibdato, determinado por espectrometria [20].

4.2.2. Glicémia e Diagnóstico da Diabetes

4.2.2.1. Glicémia

A glicose é um açúcar simples com seis átomos de carbono que atua como principal fonte de energia de muitos tecidos e é um importante precursor de muitos constituintes. A concentração da glucose no sangue é normalmente regulada em limites reduzidos por hormonas, como a insulina e o glucagon. A diabetes *mellitus* é a complicação mais associada ao metabolismo da glicose [22].

O controlo dos níveis de glicémia é essencial na diabetes, pois o desenvolvimento e progressão de complicações macrovasculares e microvasculares estão associados a altos níveis de glicémia. Valores de glicémia em jejum superiores a 126mg/dl permitem o diagnóstico da diabetes *mellitus* [23].

A determinação da glicose baseia-se num ensaio enzimático que utiliza a hexoquinase e a glicose-6-fosfato desidrogenase, com formação de NADH, sendo este possível de ser medido espectrofotometricamente [22].

4.2.2.2. Hemoglobina Glicada

A hemoglobina glicada (HbA1c) resulta de uma modificação pós-tradução das moléculas de hemoglobina por glicação, uma reação não-enzimática da extremidade-N da cadeia beta de hemoglobina com um resíduo de glicose. Esta alteração química é irreversível logo que se forme a ligação cetoamina, que leva a um bloqueio dos centros de fixação do 2,3-difosfoglicerato à hemoglobina [24].

O nível de hemoglobina glicada no sangue depende do tempo de vida do eritrócito (média de 120 dias), da concentração de glicose no sangue e pode ser influenciada por hemoglobinopatias e por fatores étnicos.

A hemoglobina glicada é um parâmetro útil na monitorização a longo prazo de doentes diabéticos, por não sofrer alteração com variações episódicas dos níveis de glicose no sangue e ser proporcional aos níveis médios de glicose no sangue das últimas 4 semanas. HbA1c é determinada, por rotina, em todas as pessoas diagnosticadas com diabetes *mellitus*, para avaliar o grau de controlo glicémico. Mais ainda, é usada na prevenção de risco de desenvolver complicações crónicas relacionadas com a diabetes e complicações na gravidez e parto de mulheres com diabetes prévia à gravidez [25].

No laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra a determinação da hemoglobina glicada é realizada pelo aparelho ADAMS A1C – HA-8160, como referido anteriormente.

4.2.2.3. Teste de Tolerância à Glicose Oral (PTGO)

Este teste avalia a *clearance* de glicose da circulação após uma toma de glicose sob condições definidas e controladas. Esta prova consiste em determinar a glicémia em jejum e 2 horas após a ingestão de uma solução de 200mL com 75g de glicose.

A PTGO é mais sensível para o diagnóstico de diabetes e deve ser realizado quando a glicémia em jejum apresenta valores elevados mas não o suficiente para estabelecer um diagnóstico, nomeadamente para valores superiores a 110 mg/dl e inferiores a 126 mg/dl [23].

No caso de gravidez, para despiste da diabetes gestacional é feita uma PTGO com 75g de glicose, às 24 e 28 semanas, com colheita de sangue ao minuto 0, aos 60 minutos e aos 120 minutos.

4.2.2.4. Diagnóstico da Diabetes

O diagnóstico de diabetes é feito com base nos seguintes parâmetros e valores para plasma venoso na população em geral:

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

A determinação da HbA1c pode ser considerada para o diagnóstico da diabetes mas deverá privilegiar-se o valor tradicional da glicose em jejum ou os valores da PTGO [23].

O diagnóstico da diabetes gestacional faz-se com base nos seguintes valores para plasma venoso:

- Glicemia em jejum, a realizar na 1.^a consulta de gravidez ≥ 92 mg/dl e <126 mg/dl;
- Se a glicemia em jejum for inferior a 92 mg/dl, realiza-se a PTGO, como indicado anteriormente. É critério para o diagnóstico da diabetes gestacional, a confirmação de um ou mais valores:
 - às 0 horas, glicemia ≥ 92 mg/dl (ou $\geq 5,1$ mmol/l);
 - à 1 hora, glicemia ≥ 180 mg/dl (ou $\geq 10,0$ mmol/l);
 - às 2 horas, glicemia ≥ 153 mg/dl (ou $\geq 8,5$ mmol/l).

4.2.3. Avaliação do Metabolismo Lipídico

Os lípidos são moléculas lipossolúveis que são essenciais para a estrutura membranar e fornecedores de energia. Estes encontram-se associados a processos biológicos como sinalização e interações célula-célula. Os lípidos podem estar relacionados com doenças como a diabetes, obesidade, aterosclerose, Alzheimer, cancro e doenças infecciosas.

Deve ser determinado o perfil lipídico para avaliar o risco cardiovascular (CV) em doentes com doença cardiovascular aterosclerótica clinicamente evidente, com diabetes *mellitus*, história de dislipidemia familiar, doença inflamatória crónica (artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistémico, psoríase) e em caso de doença renal crónica.

O diagnóstico das dislipidémias realiza-se pela avaliação laboratorial, em jejum, do colesterol total, triglicéridos, colesterol das HDL e colesterol LDL [26].

4.2.3.1. Colesterol Total

O colesterol é um componente membranar muito importante em todas as células animais. A sua síntese realiza-se maioritariamente no fígado e intestino. Este pode esterificar formando ésteres de colesterol pela ação de enzimas, ser usado por células endócrinas para a formação de hormonas esteroides e pelo fígado para a formação de ácidos biliares.

O colesterol total no soro compreende todo o colesterol presente nas várias lipoproteínas. É o principal componente da LDL e um componente minoritário de VLDL.

Um aumento de colesterol no soro (hipercolesterolemia) pode estar associado a fatores ambientais como a alimentação (ingestão de alimentos ricos em colesterol e gorduras saturadas), e a fatores genéticos (como no caso da hipercolesterolemia familiar). A hipercolesterolemia pode também ser causada por hipotireoidismo, gravidez, síndrome de Cushing, agentes imunossupressores e terapêutica com corticosteroide.

A determinação do colesterol difere da maioria dos restantes testes no sentido em que não é utilizado para diagnosticar ou monitorizar uma doença mas sim para estimar o risco de desenvolver doença, nomeadamente, doença cardiovascular. Existe uma forte correlação entre níveis séricos de colesterol consideravelmente elevados e um aumento do risco de doenças cardiovasculares como a aterosclerose, enfarte agudo do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais.

O colesterol é determinado por métodos enzimáticos. Neste método são usadas a enzima colesterol esterase e colesterol oxidase, levando à formação de peróxido de

hidrogénio. O peróxido de hidrogénio sob a ação de uma peroxidase, leva à formação de um composto corado, seguidamente medido por espectrofotometria ^[27].

4.2.3.2. Colesterol HDL

As lipoproteínas de alta densidade ou HDL contêm cerca de 50% de proteína e 50% de lípidos. Esta é a lipoproteína mais pequena, com maior densidade. Quantitativamente a classe de lípidos maioritários nas HDL são os fosfolípidos, sendo a fosfatidilcolina o mais importante, perfazendo 70-80% dos fosfolípidos presentes.

O HDL é uma lipoproteína com propriedades anti-aterogénicas uma vez que promove o transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, pelo sistema de transporte de colesterol reverso. Em contraste com o colesterol LDL, um aumento do colesterol HDL tem mostrado um efeito protetor para doenças cardiovasculares.

A quantificação do colesterol HDL é realizada por métodos espectrofotométricos. O método de quantificação consiste numa reação de aceleração de colesterol oxidase usando um detergente acelerador seletivo ^[27].

4.2.3.3. Colesterol LDL

As lipoproteínas de baixa densidade ou LDL contêm aproximadamente 80% de lípidos e 20% de proteína. Cerca de 50% dos lípidos presentes na LDL são constituídos por colesterol. As LDL perfazem cerca de 40% a 50% das lipoproteínas presentes no plasma. Esta molécula é o maior transportador de colesterol e é considerada uma molécula facilitadora do desenvolvimento de aterosclerose, estando associada ao desenvolvimento de doenças coronárias.

A determinação do LDL pode ser feita por métodos indiretos. Estes métodos partem do princípio que o colesterol total é composto principalmente por colesterol nas VLDL, LDL e HDL. Este é calculado pela equação de Friedwald. Neste método o colesterol total, os triglicéridos e o colesterol HDL são medidos e o colesterol LDL é calculado a partir destes parâmetros, pela equação:

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

A fração [Triglicerídeos] /5 corresponde a uma estimativa do colesterol VLDL. Esta equação não deve ser usada para amostras que apresentem concentrações de triglicerídeos acima de 400 mg/dl, que possuam quantidades significativas de quilomicrons ou em doentes com disbetalipoproteinémias, pois nestes casos esta fração não dá uma estimativa correta sobre o colesterol VLDL. No laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra quando as concentrações de triglicerídeos apresentavam valores superiores a 400 mg/dl, o colesterol LDL era quantificado por uma técnica específica de doseamento ^[27].

4.2.3.4. Triglicerídeos

Os triglicerídeos (TG) são constituídos por três ácidos gordos esterificados ligados a um glicerol. Estas moléculas são transportadas no plasma em lipoproteínas e armazenados no tecido adiposo.

Um aumento de triglicéridos está associado a consumo de álcool, dieta rica em hidratos de carbono simples, obesidade, diabetes tipo 2, hipotireoidismo, gravidez (as concentrações de triglicéridos duplicam fisiologicamente durante o terceiro trimestre), doenças auto-imunes, a fármacos e a hipertrigliceridémia familiar.

Os triglicerídeos são determinados por reação colorimétrica direta. Estes são hidrolisados pela lipase, e o glicerol libertado sofre a ação do glicerol-fosfato-oxidase, produzindo peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio formado, sob a ação de uma peroxidase, forma um composto corado, que seguidamente é medido por espectrofotometria ^[27].

4.2.4. Avaliação da Função Renal

Os rins desempenham um papel muito importante na regulação do equilíbrio hidro-eletrolítico e ácido-base, bem como na neutralização e eliminação de compostos tóxicos para o organismo. O rim é responsável pela formação de urina, pela regulação da sua densidade e concentração, e também é o local de síntese de várias hormonas (como a eritropoietina e o calcitriol).

A doença renal é um das principais consequências de doenças comuns, como a diabetes e hipertensão. O doseamento da ureia e creatinina séricas é um método fiável para a identificar lesões glomerulares e/ou tubulares. A proteinúria e a albumina de baixa concentração são outros parâmetros que permitem detetar lesões glomerulares graves ^[28].

4.2.4.1. Creatinina

A creatinina é um produto endógeno resultante da quebra da creatina-fosfato durante o metabolismo muscular, sendo normalmente filtrada livremente nos rins, embora uma pequena quantidade seja excretada ativamente pelo túbulo renal. Esta proteína é influenciada pela idade, sexo, exercício, algumas drogas, massa muscular, estado nutricional e pela ingestão de carne.

A determinação deste parâmetro é útil no diagnóstico e monitorização de distúrbios renais crônicos e agudos, apesar de apresentar uma sensibilidade baixa em estados iniciais de dano renal, pois quando o seu aumento é detetado no soro, já ocorreu um declínio significativo da taxa de filtração glomerular.

Uma concentração de creatinina plasmática elevada é sugestiva de dano renal, mas uma concentração de creatinina normal não sugere necessariamente uma boa função renal.

A creatinina no soro ou na urina é determinada pela reação de Jaffe. Nesta reação a creatinina com o ácido pícrico, em meio alcalino, produz um composto corado possível de ser medido espectrofotometricamente ^[29,30].

Taxa de filtração glomerular

A taxa de filtração glomerular (GFR) é o melhor marcador para avaliar a função de excreção renal. Esta pode ser baseada na *clearance* plasmática de um marcador. Este marcador tem de apresentar características específicas, como uma concentração plasmática estável, ser fisiologicamente inerte, ser filtrada livremente pelo glomérulo e não ser excretada, reabsorvida, sintetizada ou metabolizada pelo rim, permitindo que a quantidade de substância filtrada pelo glomérulo seja igual á quantidade excretada pela urina. O marcador endógeno mais usado para avaliar a taxa de filtração glomerular é a creatinina.

A *clearance* de creatinina pode ser dada pela fórmula simplificada:

$$\text{Clearance de creatinina (mL/min)} = \frac{[\text{Creatinina Urinária}] \times \text{Volume de Urina}}{[\text{Creatinina Plasmática}]}$$

Com creatinina urinária e plasmática em mg/dl e o volume dado em mL/min ^[28].

Taxa de Filtração Glomerular Estimada

A relação matemática entre a creatinina plasmática e a taxa de filtração glomerular é melhorada pela correção das variáveis que fazem desta relação não linear. Esta fórmula corrige a concentração plasmática de creatinina com a idade, sexo, tamanho corporal, raça e idade [31].

A taxa de filtração glomerular estimada pode ser dada pela fórmula abreviada:

$$\text{GFR (mL/min/1.73 m}^2\text{)} = 186 \times [\text{creatinina plasmática (mg/dl)}]^{-1.154} \times [\text{idade}]^{-0.203} \times (1.210 \text{ se negro}) \times (0.742 \text{ se mulher})$$

4.2.4.2. Ureia

A ureia é o produto final azotado do catabolismo das proteínas, sendo produzida no fígado a partir de vários aminoácidos. Mais de 90% da ureia é eliminada pelos rins podendo haver algumas perdas mínimas a nível gastrointestinal e pela pele.

Os níveis séricos da ureia podem apresentar variações durante o dia e de acordo com a dieta.

Uma função renal debilitada pode levar a um aumento da ureia no soro, e portanto a avaliação da ureia pode fornecer uma boa estimativa da função renal. A medição da ureia plasmática foi usada durante muitos anos como um indicador de doença renal, contudo atualmente determinou-se que a creatinina permite obter melhor informação a respeito da função renal.

Vários fatores extra renais podem levar a um aumento da concentração de ureia no plasma, como dieta rica em proteína, aumento do catabolismo de proteínas, tratamento com cortisol ou análogos, desidratação e diminuição da perfusão renal. Nestas condições pré-renais a creatinina usualmente encontrar-se normal. Em condições de obstrução pós-renal, ocorre um aumento simultâneo da ureia e da creatinina. A ureia pode também encontrar-se aumentada devido a causas renais como na nefrite crónica, necrose tubular ou na glomerulonefrite. Níveis diminuídos podem estar associados a doença hepática grave e baixa ingestão de proteínas.

A determinação da ureia é realizada por reações enzimáticas, usando a urease. Neste método a ureia sofre hidrólise (pela urease) e oxidação (pela glutamato desidrogenase), com formação de NAD^+ , possível de ser quantificada espectrofotometricamente [28].

4.2.4.3. Ácido Úrico

O ácido úrico é o principal produto do catabolismo de purinas. As purinas são metabolizadas inicialmente a hipoxantina e xantina pela via enzimática xantina oxidase até chegar a ácido úrico, sendo este o produto final. A maior parte da formação do ácido úrico ocorre no fígado e é eliminado através dos rins.

O aumento da concentração de ácido úrico no plasma pode estar associado a um aumento da sua formação ou devido a uma eliminação deficiente. Está relacionado com doenças do metabolismo, com excesso de consumo de purinas, aumento do turnover de ácidos nucleicos, álcool, doença renal aguda ou crónica, devido a aumento da reabsorção renal ou a redução da excreção renal de ácido úrico. A diminuição de ácido úrico no plasma é menos comum, pode estar relacionada com doença hepática severa com redução da síntese de purinas e defeito na reabsorção tubular do ácido úrico.

A determinação do ácido úrico no soro baseia-se em métodos enzimáticos com o uso da enzima uricase, responsável pela conversão do ácido úrico a alantoína e peróxido de hidrogénio. Este na presença de uma peroxidase, forma um composto corado possível de ser detetado espectrofotometricamente ^[28].

4.2.4.4. Albumina de Baixa Concentração

A albumina de baixa concentração é geralmente definida como uma taxa de excreção de albumina entre 30 a 300 mg na urina de 24h. Esta associada a danos glomerulares que se manifestam por um aumento da excreção de albumina, em quantidades muito pequenas para ser detetável pelos procedimentos habituais de deteção de proteinúria do laboratório.

Este parâmetro é usado como marcador de doença renal inicial. É também usada por clínicos como despiste e diagnóstico de nefropatia diabética e como fator de previsão de desenvolvimento de hipertensão.

A albumina de baixa concentração é determinada por imunoturbidimetria. Neste ensaio, a albumina é detetada usando um anticorpo para a albumina humana que leva à sua imunoprecipitação, com posterior deteção da turvação da amostra por difusão da luz ^[32].

4.2.5. Avaliação da Função Hepática

Testes da função e integridade do fígado são úteis para o diagnóstico, monitorização da terapêutica e avaliação da gravidade e prognóstico da doença hepática. São marcadores de agressão aos hepatócitos e permitem classificar os principais tipos de doença hepática. Os resultados dos testes de avaliação da função hepática estão alterados no caso de doenças severas como: hepatite viral, hepatite auto-imune, hemocromatose e doença do fígado alcoólico [33].

4.2.5.1. Bilirrubina Total e Direta

A bilirrubina é um pigmento da bÍlis e um metabolito produto do metabolismo do grupo heme. Este metabolito é biotransformado no fígado e excretado na bÍlis e na urina. A bilirrubina é transportada até ao fígado pela albumina, na sua forma não-conjugada. No fígado, a esta é transportada para o interior do hepatócito onde é conjugada para produzir a bilirrubina diglicuronídeo (bilirrubina conjugada), que pode depois ser eliminada pela bÍlis para o intestino.

No intestino a bilirrubina sofre a ação de bactérias dando origem aos compostos incolores designados urobilinogénios, que podem ser reabsorvidos pelo intestino. A maioria dos urobilinogénios absorvidos são novamente excretados pelo fígado para o intestino, e uma pequena fração pode ser excretada na urina. Posteriormente no intestino, o urobilinogénio é convertido nos pigmentos responsáveis pela coloração das fezes, as estercobilinas. A ausência de formação de estercobilinas leva a formação fezes incolores, um sinal precoce de metabolismo alterado da bilirrubina.

Alterações no metabolismo podem levar a icterícia. Elevações da bilirrubina (hiperbilirrubinémia) podem ser devidas a causas pré-hepáticas, hepática ou pós-hepática. No caso de causa pré-hepática, ocorre uma produção aumentada de bilirrubina, que se traduz num aumento mais significativo da bilirrubina não-conjugada (como ocorre na anemia hemolítica). Se a causa for hepática pode estar associada a um *uptake* de bilirrubina anormal (como no Síndrome de Gilbert e na hepatite), por uma conjugação da bilirrubina ineficiente (como nos recém-nascidos prematuros) ou por uma secreção anormal da bilirrubina na bÍlis (como na lesão hepatocelular generalizada), nestes casos, ocorre um aumento tanto da forma conjugada como da forma não-conjugada da bilirrubina. Finalmente, pode ser pós-

hepática, estando associada a uma obstrução do fluxo biliar, levando a um aumento mais significativo da forma conjugada da bilirrubina (como em situação de colestase).

Geralmente, quando ocorre um aumento de bilirrubina conjugada no soro, este reflete-se na urina, devido a apresentar-se na forma solúvel. O mesmo não ocorre no caso da bilirrubina não-conjugada.

O método de determinação da bilirrubina baseia-se na reação diazo. Esta consiste na reação entre a bilirrubina e um reagente diazo, resultando na formação de azo-pigmentos, que são possíveis de ser medidos espectrofotometricamente ^[33].

4.2.5.2. Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é uma glicoproteína membranar, responsável pela hidrólise de uma grande variedade de substratos naturais e sintéticos. ALP é encontrada em vários tecidos, com concentrações mais elevadas no fígado, no epitélio dos ductos biliares, no osso, na mucosa intestinal e placenta. O fígado e os ossos são os dois tecidos mais comumente responsáveis pela elevação da ALP. Esta enzima é composta por várias isoenzimas, associadas a diferentes tecidos e apresenta uma meia-vida de 1-10 dias. A ALP é um indicador global excelente da formação óssea.

Os níveis séricos de ALP são usualmente utilizados na prática clínica como um marcador de doença hepática ou do osso, encontrando-se aumentados no caso de obstrução do trato biliar, tumor metastizado do fígado e em condições mais raras no caso de cirrose biliar primária. O grau de elevação da ALP reflete a gravidade da obstrução e da quantidade de tecido biliar envolvido.

Esta enzima encontra-se mais aumentada em crianças do que em adultos, devido ao crescimento ósseo ativo.

Para a determinação da fosfatase alcalina é usado o substrato p-nitrofenil fosfato. Este é um composto incolor, que após sofrer hidrólise forma um composto corado (p-nitrofenil), possível de ser medido espectrofotometricamente ^[33,34].

4.2.5.3. Alanina Aminotransferase

A alanina aminotransferase (ALT) catalisa a transferência de um grupo amina para a conversão de aminoácidos para os correspondentes α -cetoácidos. Também catalisa a reação reversa. Esta proteína apresenta uma meia-vida de aproximadamente 47 dias.

Esta enzima está presente no citoplasma e nas mitocôndrias dos hepatócitos, mas nas mitocôndrias a sua concentração é muito baixa. Encontra-se também presente noutros tecidos como no músculo, tecido adiposo, intestino, cólon, próstata e no cérebro, no entanto, a concentração de ALT nestes órgãos é muito mais baixa do que no fígado.

A ALT é libertada durante lesões celulares do hepatócito, surgindo relativamente rápido no plasma. A atividade da ALT nas células hepáticas é de aproximadamente 3000 vezes mais elevada do que a atividade ALT no soro. Quando ocorre uma lesão hepática, a ALT é libertada dos hepatócitos levando uma elevação significativa da atividade da enzima no soro.

A determinação desta enzima é amplamente usada para detetar a incidência, desenvolvimento e prognóstico de doença hepática com sintomas clínicos evidentes.

Presença de miosite severa (inflamação muscular) ou rabdomiólise (lise do músculo esquelético) pode aumentar ALT para níveis normalmente associados à hepatite viral aguda. O aumento pode estar associado a hepatite, cirrose, icterícia obstrutiva, carcinoma hepático e no abuso crónico de álcool. Níveis de ALT elevados semelhantes aos níveis de aspartato aminotransferase (AST) estão presentes na hepatite causada por vírus e na lesão celular hepática aguda induzida por drogas.

A determinação da ALT é realizada por métodos enzimáticos. Esta enzima vai ser responsável pela formação de piruvato, que posteriormente sob a ação do lactato desidrogenase, forma L-lactato e NAD^+ , medido seguidamente por métodos espectrofotométricos [34,35].

4.2.5.4. Aspartato Aminotransferase

A aspartato-aminotransferase (AST) pertence ao grupo das transaminases que catalisam a conversão dos aminoácidos para os correspondentes α -cetoácidos por transferência de grupos amina, também catalisa a ação reversa. Apresenta uma meia-vida de 17 horas.

A AST está presente no citoplasma e nas mitocôndrias dos hepatócitos. Ao contrário da ALT apresenta uma concentração mitocondrial mais significativa. O aumento desta enzima está associado a doenças hepatocelulares, apresentando um aumento mais significativo do que a ALT em casos de cirrose, na doença alcoólica e no tumor metastático para o fígado.

A determinação da AST é realizada por métodos enzimáticos. Esta enzima vai ser responsável pela formação de oxaloacetato, que posteriormente sob a ação da enzima malato desidrogenase, forma L-malato e NAD^+ , medido seguidamente por métodos espectrofotométricos ^[34].

4.2.5.5. Gamaglutamiltransferase

A Gamaglutamiltransferase (Gama GT) está envolvida no transporte transmembranar de aminoácidos, no metabolismo dos leucotrienos e do glutatião. Catalisa a transferência de uma porção da gama-glutamil da GSH ou GSH conjugada para aceitadores como aminoácidos, peptídeos e moléculas com características semelhantes.

A Gama GT é uma enzima normalmente presente no soro e na superfície de vários tipos celulares, apresentando-se na membrana dos canalículos biliares, sendo por isso um bom indicador de doenças do fígado e do trato biliar. Esta enzima está também presente em vários tecidos como baço, pâncreas e canais biliares, mas principalmente no fígado. Recentemente tem sido demonstrada a sua importância no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e os níveis séricos de Gama GT têm sido demonstrados bons indicadores de diabetes, hipertensão, síndrome metabólico e de doença arterial coronária.

Esta enzima é particularmente sensível aos efeitos do etanol, e pode estar elevada mesmo quando os outros indicadores se encontram normais. A Gama GT apresenta uma meia-vida de 7 a 10 dias na circulação, aumentando no caso de dano no fígado associado ao álcool para 28 dias.

Os níveis séricos de Gama GT podem ser afetados pela massa corporal, hipertensão, diabetes, hiperuricemia, fatores genéticos, ingestão de alimentos, gravidez, fármacos e tabaco.

A determinação da Gama GT deve ser realizada como marcador isolado na avaliação e monitorização do abuso de ingestão alcoólica, na deteção e monitorização de lesão hepática desencadeada por fármacos hepatotóxicos e para o diagnóstico diferencial entre

origem hepática ou extra-hepática, quando o valor da fosfatase alcalina se encontra elevado e o diagnóstico não é óbvio.

O método para determinação de GGT usa o composto L-gamma-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide como substrato, com formação de um composto corado possível de ser medido espectrofotometricamente ^[34,36].

4.2.5.6. Lactato Desidrogenase

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima de transferência de hidrogénio que catalisa a oxidação do lactato a piruvato com a intervenção do NAD⁺ como aceitador de hidrogénio.

A LDH é um tetrâmero composto por dois tipos de subunidades H (coração) ou M (músculo). A combinação destas subunidades forma as cinco isoenzimas do lactato desidrogenase encontradas nos tecidos. Diferentes tecidos apresentam diferentes composições de isoenzimas, as proporções relativas das isoenzimas individuais encontradas no soro estão relacionadas com a gravidade da lesão no órgão ou tecido em que as isoenzimas estão presentes. As isoenzimas LDH-1 e LDH-2 estão maioritariamente presente no músculo cardíaco, eritrócitos e rins. No caso das LDH-4 e LDH-5 estão predominante no fígado e músculo-esquelético, enquanto a LDH-3 é predominante no pulmão.

Devido á sua grande distribuição por todos os tecidos, a lactato desidrogenase encontra-se elevada em várias situações clínicas como: enfarte do miocárdio, hemólise e disfunções do rim, fígado, pulmão e músculo. O aumento da atividade da LDH em doença hepática é menor ao aumento sofrido pelas aminotransferases.

A determinação do LDH tem por base a reação reversível do lactato a piruvato pela LDH, a pH 9. O NADH formado pela reação pode ser medido diretamente por espectrofotometria ^[34].

4.2.5.7. Albumina

A albumina é uma proteína carregada negativamente, relativamente pequena, sintetizada pelas células do fígado na forma de preproalbumina. É a proteína mais abundante do fluido extracelular, constitui aproximadamente 50% do conteúdo total de proteína e contribui com cerca de 70% para a pressão oncótica do plasma. Como tal tem um papel

crucial na regulação da distribuição do fluido corporal. Mais ainda, a albumina possui domínios funcionais com propriedades antioxidantes, de ligação a metais altamente reativos e a um grande número de substâncias endógenas e exógenas. Esta proteína liga e transporta em meio aquoso diversos compostos como a bilirrubina, cálcio e ácidos gordos de cadeia longa e é um marcador de fase aguda negativo, podendo a quantidade de albumina diminuir durante a inflamação.

A albumina funciona como um indicador de doença crónica e da gravidade na doença, apresentando-se diminuída no caso de hepatite crónica com insuficiência hepática. O mesmo pode ser observado no caso da hepatite aguda, na desnutrição, em distúrbios inflamatórios, na síndrome nefrótica, edema e perda gastrointestinal.

O método para a determinação da albumina é o verde de bromocresol. A albumina presente na amostra reage com o verde de bromocresol em meio ácido, formando um complexo corado que é detetado espectrofotometricamente ^[37,38].

4.2.5.8. Proteínas Totais

As proteínas são macromoléculas formadas por aminoácidos que fazem parte de todas as células, fluidos e órgãos. As proteínas apresentam várias funções biológicas, como função enzimática, hormonal, estrutural, proteção e defesa contra infeções, e de transporte de várias substâncias. Mais ainda as proteínas plasmáticas permitem manter a pressão osmótica.

Um aumento das proteínas totais está associado a desidratação grave e a doenças como o mieloma múltiplo. A diminuição das proteínas totais pode estar relacionada a hemorragias, queimaduras, glomerulonefrite, doença hepática, malnutrição, má absorção e síndrome nefrótica. Normalmente um valor baixo de proteínas totais significa que a concentração de albumina está baixa, devido à albumina ser a principal proteína plasmática.

O método de biureto é o método espectrofotométrico mais comum para quantificação de proteína total no soro. A reação biureto depende do número de ligações peptídicas presentes na amostra, permitindo determinar a concentração de proteína presente. Na reação, as proteínas formam complexos com o cobre em solução alcalina formando um produto corado possível de ser medido por espectrofotometria ^[38].

4.2.6. Marcadores de Lise Muscular

4.2.6.1. Creatina Cinase

A creatina cinase (CK) é uma enzima dimérica que catalisa a fosforilação reversível da creatina a adenosina trifosfato (ATP). A CK é encontrada no músculo cardíaco, no músculo-esquelético e cérebro.

A CK total pode ser separada em três frações principais (isoenzimas):

- CK - BB encontra-se predominantemente no cérebro;
- CK - MM encontrada no músculo-esquelético;
- CK - MB encontra-se predominantemente no músculo cardíaco.

Apresenta-se elevada num número considerável de condições de lesão muscular aguda ou esforço físico aumentado, estando por isso geralmente aumentada em caso de trauma muscular, miosite, distrofia muscular, pós-cirurgias, pós-parto, convulsões e no enfarte do miocárdio.

Estudos demonstram que apenas o músculo-esquelético e o músculo cardíaco contêm grandes quantidades de CK, assim, aumentos consideráveis na atividade desta enzima no soro reflete quase exclusivamente doenças e lesões do músculo-esquelético ou cardíaco.

A determinação da creatina cinase é composta por duas reações acopladas. Na primeira reação ocorre a formação da creatina e ATP pela fosfocreatina, e na segunda a fosforilação da glucose pela hexoquinase A glucose-6-fosfato formada nas reações anteriores, na presença de uma desidrogenase origina NADH, que pode ser medido espectrofotometricamente ^[34].

A LDH apresentada anteriormente pode ser determinada também como um marcador de lise celular.

4.2.7. Marcadores de Lesão Cardíaca

As doenças cardiovasculares continuam a ser, em Portugal, a principal causa de morte, sendo responsável por 32% do total dos óbitos, apesar dos avanços alcançados a nível de diagnóstico e da terapêutica.

As doenças cardiovasculares têm uma natureza multifatorial, como resultado da multiplicidade de fatores intervenientes (genéticos, ambientais, dietéticos, metabólicos, hemodinâmicos e inflamatórios) ^[39,40].

4.2.7.1. CK-MB

A creatinina cinase isoenzima MB (CK-MB) é uma proteína similar á troponina e é libertada para a circulação devido á necrose dos cardiomiócitos, estando relacionada com a extensão do enfarte e inversamente relacionada com a esperança de vida. A principal desvantagem deste marcador é o tempo de resposta comparando com a troponina, pois começa a aumentar 4 a 6 horas após a lesão cardíaca, atingindo o pico às 24h, enquanto a troponina atinge o pico às 18h. Os valores regressam ao normal após 48 a 72 horas.

Valores aumentados de CK-MB podem também estar associados a distrofia muscular ou devido a exercício extremo. O aumento de CK-MB no caso de exercício extremo pode estar relacionado com uma adaptação do músculo-esquelético durante o treino, resultando num aumento de CK-MB, que se reflete no soro. Nestas patologias a troponina encontra-se habitualmente dentro da normalidade, quando não há dano do tecido cardíaco.

A determinação da CK-MB é realizada por métodos imunoquímicos, na qual a atividade da CK derivada de músculo (CK-MM) e metade da atividade da CK-MB (inibe a subunidade M mas não a B), é inativada com anti-CK-MM. Para este método considera-se a ausência da isoenzima CK-BB ^[39,41].

4.2.7.2. Troponina

Três subunidades de troponina formam um complexo que regula a interação da actina e miosina e conseqüentemente, regula a contração cardíaca. As 3 troponinas são a C, I e T. A troponina está localizada principalmente nas miofibrilhas com uma pequena fração no citoplasma.

A troponina I e T apresentam especificidade cardíaca devido à codificação por genes diferentes daqueles presentes no músculo-esquelético. No caso da troponina C esta não apresenta especificidade para o músculo cardíaco.

O aumento da troponina é o marcador mais eficaz e sensível na deteção do enfarte de miocárdio. A concentração de troponina no soro é muito baixa ou indetetável em

indivíduos sem doença cardíaca. Como tal, é possível detetar a presença de lesões cardíacas pela libertação de pequenas quantidades de troponina.

Esta proteína apresenta um aumento 4-6 horas após lesão cardíaca, e um pico às 18 horas. A troponina apresenta uma maior sensibilidade clínica, pois após o enfarte agudo do miocárdio permanecendo elevada de 4 a 14 dias, mantendo-se por isso, durante mais tempo do que a CK-MB (mantêm-se durante 4 a 7 dias).

A determinação da troponina é realizada através de imunoensaio, com utilização de anticorpos monoclonais para a medição da troponina presente no soro [39].

4.2.8. Avaliação do Metabolismo do Ferro

A maioria do ferro está complexado pela hemoglobina, produzida na medula óssea, por uma via que termina com a incorporação do ferro na protoporfirina IX pela ferroquelatase.

A quebra do grupo heme leva á libertação de ferro, que é reutilizado para formar novamente o grupo heme. A transferrina é a proteína responsável pelo transporte extracelular do ferro, na forma férrica (Fe^{3+}). A absorção do ferro vai depender da quantidade de ferro na dieta, da sua biodisponibilidade e da necessidade do organismo.

A transferrina liga com grande afinidade ao recetor TfR1, presente na superfície da membrana celular. Há a formação de um complexo, que é posteriormente endocitado, formando um endossoma. O pH acidificado dos endossomas leva a uma alteração da conformação da transferrina e posterior libertação do ferro. O ferro é depois reduzido pela ferriredutase, formando o Fe^{2+} que é transportado para o citoplasma pelo Transportador de Metal Divalente I (DMTI). O ferro pode depois sofrer dois destinos, ou é armazenado ou é usado pela célula. No caso de ser armazenado vai incorporar a ferritina, uma proteína armazenadora de ferro [42].

4.2.8.1. Ferro

A medição de ferro sérico reflete principalmente o ferro ligado a proteínas séricas. Em condições normais, a maioria encontra-se ligado à transferrina.

O ferro apresenta várias funções como co-fator essencial de enzimas e componente dos citocromos. O seu doseamento pode variar de forma significativa ao longo do dia.

A homeostasia do ferro é regulada por um complexo sistema para controlar a distribuição e consumo do ferro. Alterações do seu metabolismo levam a um excesso de acumulação de ferro em células e tecidos ou a uma depleção das reservas de ferro o que consequentemente pode levar a patologias.

O ferro sérico pode encontrar-se diminuído a anemia associada a deficiência de ferro, como consequência de uma dieta pobre em ferro, devido a absorção inadequada, cirrose ou por perda crónica resultado de hemorragia.

Perante suspeita de deficiência de ferro esta deve ser confirmada laboratorialmente com hemograma, reticulócitos e parâmetros do metabolismo do ferro (TIBC, ferritina e observação de esfregaços da medula óssea) na ausência de doença crónica ou hemoglobinopatia. Devem ser também avaliados os hábitos alimentares, a história familiar de má absorção, causas que levem a perdas sanguíneas, doenças de coagulação e talassemias.

Níveis de ferro aumentados estão associados a condições de sobrecarga de ferro, a terapia de estrogénio (devido a um aumento da transferrina), a terapia com ferro parentérico, hemossiderose, hemocromatose e envenenamento por ferro.

A determinação do ferro é realizada em dois passos, inicialmente o ferro é libertado da transferrina, a pH ácido, e seguidamente ocorre uma redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} , que depois complexa com um cromogénio, como o FERENE. O complexo formado apresenta uma elevada absorvância possível de ser determinada espectrofotometricamente ^[42,43].

4.2.8.2. Capacidade Total de Fixação do Ferro

No plasma o ferro encontra-se ligado á transferrina. O TIBC corresponde ao doseamento do ferro ligado á transferrina sérica e não entra em conta com o ferro ligado á hemoglobina livre.

O TIBC é determinado pela concentração de ferro no plasma mais a capacidade de ligação de ferro insaturado (UIBC) ^[44]:

$$\text{TIBC} = [\text{Ferro}]_{\text{plasma}} + \text{UIBC}$$

TIBC apresenta-se aumentado na deficiência crónica de ferro simples e em condições que podem levar a um aumento da transferrina e consequentemente do TIBC como a gravidez, a terapia com estrogénio, alcoolismo e hepatite aguda. A diminuição do TIBC está

associada a hipoproteinémia, sobrecarga de ferro, doenças inflamatórias crônicas ou malignidades ^[42].

4.2.8.3. Ferritina

A ferritina é uma proteína de armazenamento de ferro intracelular. É caracterizada por uma capsula esférica com uma cavidade que pode acomodar até 4500 átomos de ferro. A sua função primária é sequestrar o ferro livre dos vários compartimentos subcelulares, prevenindo reações com o oxigênio e consequentemente a formação de espécies reativas de oxigênio. Por esta razão, a ferritina está amplamente distribuída pelos diferentes tecidos e compartimentos subcelulares. A ferritina citoplasmática é a mais comum mas também já foi caracterizada uma forma mitocondrial.

A determinação da ferritina tem sido amplamente usada para detetar aumentos da incorporação de ferro ou deficiências de ferro. A ferritina sérica é uma proteína de fase aguda apresentando-se aumentada no caso de infecção e inflamação, mas em condições normais reflete o conteúdo de ferro presente. No caso de inflamação o aumento começa entre 24-48 horas após a inflamação, apresentando-se aumentada durante semanas.

Em situações de deficiência de ferro, a concentração da ferritina plasmática diminui antes de se observarem alterações na concentração de hemoglobina, do tamanho dos eritrócitos e na concentração plasmática do ferro.

A ferritina é determinada por imunoturbidimetria. Neste ensaio, a ferritina é detetada usando um anticorpo específico para a ferritina que leva à sua imunoprecipitação, com posterior detecção da turvação da amostra por difusão da luz ^[42,45].

4.2.8.4. Transferrina

A transferrina é a principal proteína plasmática de transporte de ferro, sendo produzida no fígado. A transferrina tem a capacidade de ligar dois átomos de ferro e o complexo formado permite o transporte do ferro para as células. Praticamente todos os tipos celulares têm recetores para a transferrina. A sua concentração depende da disponibilidade de ferro, aumentando no caso de deficiência de ferro e diminuindo se o ferro estiver aumentado.

A determinação da transferrina é útil para o diagnóstico da anemia. Altas concentrações estão associadas à gravidez e durante a administração de estrogénios. Baixas

concentrações estão presentes em caso de inflamação, tumores malignos e síndrome nefrótica.

A transferrina é determinada por imunoturbidimetria. Neste ensaio, a transferrina é detetada usando um anticorpo específico que leva à sua imunoprecipitação, com posterior detecção da turvação da amostra por difusão da luz ^[42].

4.2.9. Marcadores de Inflamação

4.2.9.1. Proteína C Reactiva

A proteína C reativa (PCR) consiste em 5 subunidades polipeptídicas idênticas ligadas não covalentemente para formar um polímero em forma de disco. Esta proteína é produzida no fígado, com uma produção máxima às 24-38 h após o início do processo inflamatório.

PCR liga a bactérias Gam positivas e negativas. A principal função desta proteína é ligar estruturas exógenas e endógenas, de modo a estimular os mecanismos de defesa, ativar o sistema complemento, estimular a opsonização e a fagocitose. Normalmente apresenta uma baixa concentrações no plasma.

Aumento desta proteína está associado a trauma, enfarte do miocárdio e *stress*. A PCR encontra-se também elevada em certas doenças autoimunes, em algumas doenças oncológicas, com trauma significativo e após cirurgias. É uma das primeiras proteínas a aumentar em caso de doença inflamatória e também a que apresenta um aumento mais dramático de concentração.

Estudos demonstraram que um aumento de PCR no soro pode estar relacionado a um aumento do risco cardiovascular, que pode ser devido a processos inflamatórios decorrente do desenvolvimento e progressão desta patologia.

A PCR no soro é determinada por imunturbidimetria, usando partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti-PCR. O aparecimento de aglutinação é possível de ser detetado espectrofotometricamente ^[38,46].

4.2.10. Avaliação da Função Pancreática

4.2.10.1. Amilase

A amilase é uma enzima que pertence à classe das hidrólases que catalisa a hidrólise de ligações 1,4- α -glicosídeos em polissacarídeos. Apresenta duas isoenzimas diferentes: isoenzima pancreática e isoenzima salivar. Esta enzima apresenta uma semi-vida no plasma muito curta, de aproximadamente 1 a 2 horas. Mais de 90% da amilase sérica é produzida pelas glândulas salivares e no pâncreas, no entanto, existem outros órgãos onde esta pode ser produzida.

A atividade da amilase no plasma é baixa e constante e aumenta exponencialmente em caso de pancreatite aguda e em caso de inflamação da glândula salivar. A atividade da enzima no pâncreas é superior do que no plasma o que permite que esta seja usada como um marcador de dano pancreático.

Devido á amilase não ser específica para o pâncreas, vários estudos sugerem necessário um aumento de 3 a 5 vezes o valor de referência para se considerar o diagnóstico de pancreatite. A amilase aumenta no soro umas horas após o dano no pâncreas e permanece aumentada durante 5 a 7 dias após o dano. A magnitude da elevação da enzima plasmática não esta relacionada com a severidade da pancreatite, contudo, quanto maior o aumento, maior a probabilidade de ser uma pancreatite aguda. Doenças associadas ao trato biliar podem levar a um aumento da amilase, como resultado do envolvimento primário ou secundário do pâncreas.

Hiperamilasemia (aumento da amilase plasmática) pode ocorrer em situações de lesão da glândula salivar como infecções, cirurgias e tumores. Macroamilasemia pode estar também presente no soro e causar hiperamilasemia. Esta consiste na formação de complexos entre a amilase e IgG ou IgA, estas moléculas não são filtradas pelo glomérulo renal devido ao seu tamanho e como tal ficam retidas levando a um aumento da atividade da amilase. Não apresentam sintomas associados.

A determinação da amilase baseia-se na quebra do substrato 2-cloro-4- nitrofenil- α -D-maltotriose com a formação de 2-cloro-4-nitrofenol. A formação deste composto é possível ser detetado espectrofotometricamente ^[34,47].

4.2.10.2. Lípase

A lípase é uma pequena glicoproteína produzida no pâncreas, responsável pela hidrólise de triglicéridos a diglicerídeos, com formação de monoglicéridos e ácidos gordos. Esta enzima é filtrada pelo glomérulo, sendo totalmente reabsorvida pelo túbulo renal, e normalmente não é detetada na urina. A concentração de lípase no pâncreas é superior á presente noutros tecidos (mucosa gástrica e intestinal). A ausência desta proteína leva a mal absorção de lípidos e esteatorreia severa.

Esta enzima constitui um parâmetro importante no diagnóstico diferencial das doenças pancreáticas. Após uma pancreatite aguda, a atividade da lípase aumenta no espaço de 4-8 horas, atingindo um pico às 24 horas, e diminuindo entre 8 a 14 dias. A elevação dos níveis séricos da lípase nem sempre coincidem com o aumento da amilase pancreática, como tal, é recomendado que os níveis séricos de ambas sejam determinados no diagnóstico de distúrbios pancreáticos. Para o diagnóstico da pancreatite aguda, uma elevação da lípase 5 vezes superior ao normal permite um diagnóstico mais específico do que o aumento da amilase pancreática no soro.

O aumento da lípase também se encontra associado a colecistite aguda, a obstrução do ducto biliar por cálculos ou no carcinoma do pâncreas. Igualmente, encontra-se aumentada em doentes com taxa de filtração glomerular reduzida, como tal, tem de ser interpretado com cuidado a presença de elevação da lípase em doentes com insuficiência renal ^[34].

A lípase não é um parâmetro determinado no laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra, sendo a sua determinação realizada por um laboratório externo.

5. Conclusão

A realização deste estágio foi essencial para a minha formação, não só a nível profissional mas também a nível pessoal, pois permitiu reconhecer que as análises clínicas são uma ferramenta indispensável para uma boa prestação de cuidados de saúde, tornando-se muitas vezes fundamental no diagnóstico.

A concretização deste estágio permitiu aplicar as bases teóricas adquiridas durante o Mestrado de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra e correlacionar esses conhecimentos entre si, ajudando-me ainda na interpretação dos resultados laboratoriais.

O laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra mostrou ser um excelente laboratório de formação, não só pela qualidade dos colaboradores, como pela sua estrutura, permitindo contactar com uma considerável diversidade de metodologias.

Neste estágio foi ainda possível a integração total na rotina dos setores, principalmente nas áreas mais aprofundadas, o que permitiu vivenciar uma experiência muito próxima do que será efetivamente trabalhar num laboratório de análises clínicas.

Considero ter atingido os objetivos propostos, uma vez que desenvolvi as minhas competências profissionais, quer em termos de conhecimentos teóricos adquiridos quer em termos do trabalho prático de laboratório desenvolvido.

6. Referências Bibliográficas

- [1] BHAT, V. [et al.] - Analysis of laboratory sample rejections in the pre-analytical stage at an oncology center. *Clinica Chimica Acta* 413 (2012) 1203 – 1206.
- [2] MILLER, W. Greg. - *Quality Control*. In MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 22th Ed. (2011), pp 119-134.
- [3] GREEN, R.; WACHSMANN-HOGIU, S. - Development, History, and Future of Automated Cell Counters. *Clin Lab Med* (2014) 0272-2712.
- [4] BRIGGS, Carol; BAIN, Barbara J. - *Basic haematological techniques*. In BAIN Barbara J.; BATES, Imelda; LAFFAN, Michael A.; LEWIS S. Mitchell. *Dacie and Lewis Practical Haematology*, Elsevier Limited, Churchill Livingstone, 11th Ed. (2011), pp 23-56.
- [5] VAJPAYEE N., Graham S. S., Bem S., *Basic examination of blood and bone marrow*. In MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 22th Ed. (2011), pp 510-535.
- [6] Norma da Direção-Geral de Saúde, Prescrição e determinação do hemograma, N° 063/2011.
- [7] STOLLA, M. [et al.] - Platelet transfusion – the new immunology of an old therapy. *Frontiers in immunology* (2015), 10.3389.
- [8] BAIN, Barbara J. - *Blood Cell morphology in health and disease*. In BAIN Barbara J.; BATES Imelda; LAFFAN Michael A.; LEWIS S. Mitchell. *Dacie and Lewis Practical Haematology*, Elsevier Limited, Churchill Livingstone, 11th Ed. (2011), pp 70-100.
- [9] ELGHETANY, M. Tarek; BANKI Katalin - *Erythrocytic disorders*. In MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 22th Ed. (2011), pp 557-600.
- [10] REGAN, Fiona - *Blood Cell antigens and antibodies: erythrocytes, platelets and granulocytes*. In BAIN Barbara J.; BATES Imelda; LAFFAN Michael A.; LEWIS S. Mitchell. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Elsevier Limited, Churchill Livingstone, 11th Ed. (2011), pp 483-513.
- [11] SIEMONS, L. [et al.] - How age and sex affects the erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in early rheumatoid arthritis. *Siemons et al. BMC Musculoskeletal Disorders* (2014) 15:368.
- [12] OURY, C. [et al.] - Purinergic control of inflammation and thrombosis: Role of P2X1 receptors. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 13 (2015) 106–110.

- [13] *Blood Coagulation*. In RAVEL, Richard. *Clinical Laboratory Medicine: Clinical Applications of Laboratory Data 6th* (1995) pp 54-69.
- [14] LAFFAN, Mike; MANNING, Richard - *Investigation of haemostasis*. In BAIN Barbara J.; BATES Imelda; LAFFAN Michael A.; LEWIS S. Mitchell. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Elsevier Limited, Churchill Livingstone, 11th Ed. (2011), pp 394-445.
- [15] BAIN, Barbara J.; LEWIS, S. Mitchell - *Preparation and staining methods for blood and bone marrow films*. In BAIN Barbara J.; BATES Imelda; LAFFAN Michael A.; LEWIS S. Mitchell. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Elsevier Limited, Churchill Livingstone, 11th Ed. (2011), pp 57-68.
- [16] SCOOT, Mitchell G.; LEGRYS, Vicky A.; KLUTTS, J. Stacey - *Electrolytes and Blood Gases*. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G.. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 431-449.
- [17] Norma da Direção-Geral de Saúde, Indicações para prescrição do ionograma, N° 070/2011.
- [18] KLUTTS, J. Stacey; SCOTT, Mitchell G. - *Physiology and disorders of water, electrolyte, and acid-base metabolism*. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G.. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 655-674.
- [19] TIETZ, NW, (1995) - *General Clinical Test*. In: Tietz NW (ed). *Clinical Guide to Laboratory Tests*, WB Saunders Company, Philadelphia, pp 456.
- [20] ENDRES, David B.; RUDE, Robert K. - *Disorders of bone*. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G.. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 711-734.
- [21] BAAI, J.H.F. [et al.] - Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol Rev* (2015) 95:1–46.
- [22] SACKS, David B. - *Carbohydrates*. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G.. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 373-401.
- [23] Norma da Direção-Geral de Saúde, Diagnostico e classificação da diabetes mellitus, N°002/2011.
- [24] SILVA, M.E. - Glicosilação não-enzimática das proteínas. Implicações patogénicas e no controlo metabólico da diabetes mellitus. *Acta médica portuguesa* (1983) 4:421-430.

- [25] Norma da Direção-Geral de Saúde, Prescrição e determinação da hemoglobina glicada A1c, N°033/2011.
- [26] Norma da Direção-Geral de Saúde, Prescrição de exames laboratoriais para avaliação de dislipidemias no adulto, N° 066/2011.
- [27] RIFAI, Nader; WARNICK, G. Russell; REMALEY, Alan T. - *Lipids, lipoproteins, apolipoproteins and other cardiovascular risk factors*. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G.. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 402-430.
- [28] LAMB, Edmund J.; PRICE, Christopher P. - *Creatinine, Urea, and Uric Acid*. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G.. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 363-372.
- [29] ARGARWAL, B.; DEVENPORT, A. - Difficulties in diagnosing acute kidney injury post liver transplantation using serum creatinine based diagnostic criteria, *World j Hepatol* (2014) 696-703.
- [30] CURRIE, G. [et al.] - Biomarkers in diabetic nephropathy: present and future, *World J Diabetes* (2014) 763-776.
- [31] DELANEY, Michael P.; PRICE, Christopher P.; LAMB, Edmund J. - *Kidney function and disease*. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G.. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 631-654.
- [32] XIA, F. [et al.] - Impact of microalbuminuria on incident coronary heart disease, cardiovascular and all-cause mortality: a meta-analysis of prospective studies, *Int J Clin Exp Med* (2015) 8(1):19.
- [33] DUFOUR, Robert - *Liver disease*. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G.. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 675-695.
- [34] PANTEGHINI, Mauro; BAIS, Renze - *Enzymes*. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G.. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 317-336.
- [35] LIU, Z. [et al.] - Alanine Aminotransferase-Old Biomarker and a new concept: a review, *International Journal of Medical Sciences* (2014) 11(9): 925-935.

- [36] KUNUTSOR, S. [et al.] - Gamma glutamyltransferase, alanine aminotransferase and risk of cancer: systematic review and meta-analysis, *International Journal of Cancer* (2015) 136, 1162–1170.
- [37] BERNARDI, M. [et al.] - Role of Human Albumin in the management of complications of liver cirrhosis, *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* (2014) 302–311.
- [38] JHONSON, A. Myron - *Amino Acids and Proteins*. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G.. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 286-316.
- [39] APPLE, Fred S.; JAFFE, Allan S. - *Cardiovascular disease*. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G.. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 614-630.
- [40] Norma da Direção-Geral de Saúde, Hipertensão Arterial: definição e classificação, N° 020/2011.
- [41] ROGNONI, A. [et al.] - Novel biomarkers in the diagnosis of acute coronary syndromes: the role of circulating miRNAs, *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 12(9), (2014) 1119–1124.
- [42] HIGGINS, Trefor; BEUTLER, Ernest; DOUMAS, Basil T. - *Hemoglobin, iron, and bilirubin*. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G.. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 509-527.
- [43] LEGENDRE, C.; GARCION, E. - Iron metabolism: a double-edged sword in the resistance of glioblastoma to therapies, *Trends in Endocrinology and Metabolism* (2015) 1–10.
- [44] GAMBINO, R. [et al.] - The relation between chemically measured total iron-binding capacity concentrations and immunologically measured transferrin concentrations in human serum, *Clinical Chemistry* (1997) 43:12.
- [45] LEVI, S.; ROVIDA, E. - Neuroferritinopathy: from ferritin structure modification to pathogenic mechanism, *Neurobiol. Dis.* (2015).
- [46] COFFI, M. [et al.] - Laboratory markers in ulcerative colitis: current insights and future advances, *World J Gastrointest Pathophysiol* (2015) 13-22.
- [47] OUDART, J. [et al.] - Augmentation de l'amylasémie après chirurgie cardiaque: quelle signification?, *Ann Biol Clin* (2011) 223-7.

Anexos

Anexo I- Valores de referência dos parâmetros analisados no setor de Hematologia.

Parâmetro	Valores de referência
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{l}$)	4,0-5,5
Hemoglobina (g/dl)	Mulheres: 12-16 Homens: 13-18
Hematócrito (%)	Mulheres: 35-47 Homens: 40-54
Volume globular médio (fl)	85-95
Hemoglobina globular média (pg)	27-32
Concentração de hemoglobina globular média (g/dl)	32-36
Glóbulos brancos ($10^3/\mu\text{l}$)	4,0-11
Neutrófilos (%)	45-70
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{l}$)	2,5-7,5
Linfócitos (%)	20-40
Linfócitos ($10^3/\mu\text{l}$)	1,5-3,5
Monócitos (%)	3-10
Monócitos ($10^3/\mu\text{l}$)	0,2-0,8
Eosinófilos (%)	1-5
Eosinófilos ($10^3/\mu\text{l}$)	0,04-0,4
Basófilos (%)	0-2
Basófilos ($10^3/\mu\text{l}$)	0,01-0,1
Plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$)	150-450
Reticulócitos (%)	0.5-2.5

Anexo II - Parâmetros analisados no setor de bioquímica, a metodologia de detecção e fundamento da técnica.

Parâmetro	Metodologia de detecção	Fundamento da Técnica
Ácido Úrico	Espectrofotometria	Uricase
Albumina	Espectrofotometria	Verde de Bromocresol
Albumina de baixa concentração	Imunoturbidimetria	Medição da turvação provocada por imunocomplexos insolúveis
Amilase	Espectrofotometria	2-cloro-4- nitrofenil- α -D- maltotriose
Alanina Aminotransferase	Espectrofotometria	NADH
Aspartato Aminotransferase	Espectrofotometria	NADH
Bilirrubina Total e Direta	Espectrofotometria	Reagente Diazo
Cálcio	Espectrofotometria	Complexo Arsenazo III
Cloreto	Potenciometria	Eletródio Seletivo de Iões
Colesterol Total	Espectrofotometria	CHOD-PAP Enzimático
Colesterol HDL	Espectrofotometria	Detergente Acelerador Seletivo
Creatinina	Espectrofotometria	Jaffe mod/ Picrato
Creatina Cinase	Espectrofotometria	NADH
Creatina Cinase MB	Espectrofotometria	Imuno-inibição
Ferritina	Imunoturbidimetria	Medição da turvação provocada por imunocomplexos insolúveis
Ferro	Espectrofotometria	FERENE
Fosfatase Alcalina	Espectrofotometria	p -nitrofenil fosfato

Fósforo	Espectrofotometria	Fosfomolibdato
Gama GT	Espectrofotometria	L-gamma-glutamyl-3-Carboxy-4-Nitroanilide
Glicose	Espectrofotometria	Hexoquinase
Lactato Desidrogenase	Espectrofotometria	Lactato a piruvato
Magnésio	Espectrofotometria	Enzimático
Proteína C Reativa	Imunoturbidimetria	Medição da turvação provocada por imunocomplexos insolúveis
Proteínas Totais	Espectrofotometria	Método do Biureto
Potássio	Potenciometria	Elétrodo Seletivo de Iões
Sódio	Potenciometria	Elétrodo Seletivo de Iões
Transferrina	Imunoturbidimetria	Medição da turvação provocada por imunocomplexos insolúveis
Triglicerídeos	Espectrofotometria	Glicerol fosfatase oxidase
Troponina	Imunoturbidimetria	Medição da turvação provocada por imunocomplexos insolúveis
UIBC	Espectrofotometria	FERENE
Ureia	Espectrofotometria	Urease

Anexo III - Valores de referência dos parâmetros analisados no setor de Bioquímica.

Parâmetro	Valor de Referência
Ácido Úrico	3.5 – 7.2 mg/dl
Albumina	3.5-5.0 g/dl
Albumina de baixa concentração	<30 mg/24h
Amilase	25-125 U/L 1-17 U/h
Alanina Aminotransferase	<55 U/L
Aspartato Aminotransferase	5-34 U/L
Bilirrubina Direta	<0.5 mg/dl
Bilirrubina Total	0,2-1.2 mg/dl
Cálcio	2.10-2.55 mmol/L
Cloreto	96-110 mmol/L
Colesterol Total	<200 mg/dl
Colesterol HDL	>40 mg/dl
Colesterol LDL	<100 mg/dl
Creatinina	Homens: 0.7-1.3 mg/dl Mulheres: 0.6-1.1 mg/dl
Creatina Cinase	Homens: 30-200 U/L Mulheres: 29-168 U/L
Creatina Cinase MB	<25U/L
Ferritina	Homens: 20-270 ng/ml

	Mulheres: 5-200 ng/ml
Ferro	Homens: 31-144 µg/dl Mulheres: 25-156 µg/dl
Fosfatase Alcalina	40-150 U/L
Fósforo	2.5-5 mg/100 ml
Gama GT	Homens: 12-64 U/l Mulheres: 9-36 U/l
Glicose	<99 mg/dl
Lactato Desidrogenase	125- 243 U/L
Magnésio	1.6-2.6 mg/dl
Osmolalidade	275-300 mOsm/kg
Proteína C Reativa	<0.5 mg/dl
Proteínas Totais	6.4-8.3 g/dl
Potássio	3.5-5.0 mmol/L
Sódio	135-145 mmol/L
TIBC	250-450 µg/dL
Transferrina	175-370 mg/dl
Triglicerídeos	<150 mg/dl
Troponina	<30 µg/L
UIBC	Homens: 69-240 µg/dl Mulheres: 70-310 µg/dl
Ureia	9.0-20 mg/dl