



Ana Maria Jorge Costa

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Estágio Curricular, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Algarve - Unidade de Portimão, sob orientação do Dr. Carlos Nascimento

Setembro , 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Maria Jorge Costa

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Estágio Curricular, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Algarve – Unidade de Portimão

Orientador:

Dr. Carlos Nascimento

Orientadora interna:

Prof^a Dr^a Leonor Martins de Almeida

Setembro, 2015

Universidade de Coimbra

É com muito apreço que partilho aqui os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para a realização deste relatório, especialmente ao meu orientador, Dr. Carlos Nascimento, por todo o apoio que me deu, pelos conhecimentos transmitidos e pela dedicação e amizade ao longo de todo o período de estágio. A toda a equipa do Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Algarve (CHA) – Unidade de Portimão, pela oportunidade de aprendizagem e formação oferecida, por todo o carinho com que me receberam, por toda a ajuda prestada e pela boa disposição constante, um muito obrigado. Quero agradecer também à Professora Doutora Leonor Almeida, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, pela sua preocupação e disponibilidade de modo a proporcionar-me o melhor estágio possível.

Índice

Abreviaturas	XI
Resumo.....	XIII
Abstract	XIII
1. Introdução	1
2. O Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Algarve (CHA) - Unidade de Portimão.....	1
2.1 Hematologia.....	2
2.2 Bioquímica e Imunologia	2
2.3 Microbiologia.....	2
3. O Controlo de Qualidade.....	3
3.1 A Fase Pré Analítica.....	3
3.2 A Fase Analítica	4
3.3 A Fase Pós Analítica.....	5
3.4 O Controlo de Qualidade Interno (CQI) e a Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)	5
4. Hematologia.....	6
4.1 Introdução	6
4.2 As Células Sanguíneas.....	7
. Os Eritrócitos	7
. Os Leucócitos.....	10
. As Plaquetas.....	11
4.3 O Hemograma.....	11
. Eritrograma.....	13
. Leucograma.....	15
. Plaquetograma	16
. Validação do Hemograma	16
. Esfregaço de Sangue Periférico	17
. O Hemograma no Diagnóstico de Anemias e Poliglobulias.....	18
4.4 Velocidade de Sedimentação Globular (VSG).....	20
4.5 O Estudo Laboratorial de Hemoglobinopatias e Talassemias	21
. Variantes de Hemoglobina e Hemoglobinopatias	21
. Talassemias.....	22
4.6 Hemostase – Estudo Laboratorial.....	23
. A Coagulação Sanguínea	23

. A Fibrinólise.....	24
. Testes Laboratoriais para Avaliação da Hemostase.....	25
5. Bioquímica.....	27
5.1 Metodologias Gerais e Instrumentação.....	27
5.2 Avaliação do Equilíbrio Hidro-electrolítico.....	28
. Ionograma.....	28
. Osmolalidade.....	30
5.3 Avaliação da Função Renal.....	30
. Concentração Sérica da Creatinina e Clearance da Creatinina.....	30
. Concentração Sérica de Ureia.....	31
. Concentração Sérica de Ácido Úrico.....	32
5.4 Avaliação da Função Hepática.....	32
. Bilirrubina Direta e Bilirrubina Total.....	33
. Aminotransferases.....	34
. Fosfatase Alcalina (ALP).....	34
. Gama-Glutamil Transferase (GTT).....	35
5.5 Avaliação de Alterações do Metabolismo dos Hidratos de Carbono ..	35
. Glicémia e Glicosúria.....	35
. Hemoglobina A1c.....	36
5.6 Avaliação de Alterações do Metabolismo do Ferro.....	36
. Ferro Sérico.....	37
. Transferrina.....	37
. Capacidade Total de Fixação do Ferro (TIBC).....	37
. Ferritina.....	38
5.7 Metabolismo Osseo e Mineral.....	38
. Cálcio.....	38
. Fosfato.....	39
. Magnésio.....	39
5.8 Avaliação da Função Muscular.....	40
. Creatina Quinase (CK).....	41
. Lactato Desidrogenase.....	41
. Troponina.....	42
5.9 Avaliação da Função Pancreática.....	42
. Amilase.....	42
5.10 Lípidos e Lipoproteínas no Diagnóstico Clínico.....	43
. Colesterol Total.....	44

. Colesterol LDL	44
. Colesterol HDL	45
. Triglicerídeos.....	45
5.11 Estudo das Proteínas Plasmáticas	46
. Proteínas Totais.....	46
. Proteína C Reactiva.....	47
. Imunoglobulinas.....	47
. Eletroforese de Proteínas.....	48
. Diagnóstico Laboratorial de Algumas Gamopatias Monoclonais	54
5.12 Análise Sumária da Urina.....	55
6. Conclusão	56
7. Referências Bibliográficas.....	58

Abreviaturas

ADP – Adenosina difosfato

ATP - Adenosina trifosfato

AEQ – Avaliação Externa da Qualidade

ALT – Alanina Aminotransferase/Alanina Transaminase

AST – Aspartato Aminotransferase/Aspartato Transaminase

ATP – Adenosina trifosfato

CHA – Centro Hospitalar do Algarve

CHGM – Concentração de Hemoglobina Globular Média

CID – Coagulação Intravascular Disseminada

CK – Creatina Cinase (*Creatine Kinase*)

CQI – Controlo de Qualidade Interno

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

EDTA – Ácido etilendiamino tetracético (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

EGTA – Ácido etilenoglicol tetracético (*Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*)

ESP – Eletroforese de Proteínas Plasmáticas

Fib – Fibrinogénio

HbA_{1c} – Hemoglobina glicada

Hb – Hemoglobina

HCT – Hematócrito

HDL – Lipoproteínas de alta densidade (*High Density Lipoproteins*)

HDSA – Sódio N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo)-3,5-dimetoxianilina

HGM – Hemoglobina Globular Média

HMWK – Cininogénio de alta massa molecular (*High Molecular Weight Kininogen*)

INR – Razão internacional normalizada (*International Normalized Ratio*)

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

ISI – Índice de Sensibilidade Internacional

LDH – Lactato Desidrogenase

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade (*Low Density Lipoproteins*)

NAD – Dinucleótido de nicotinamida e adenina (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*)

NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*)

NM-BAPTA – Ácido 5-nitro-5-metil- (1,2 – bis- (o-aminofenoxilo) etano – N,N,N',N' tetracético)

NRBC – Eritrócitos nucleados (*Nucleated Red Blood Cells*)

PCR – Proteína C-Reactiva

PCT – Plaquetócrito

PDW – Amplitude de distribuição de plaquetas (*Platelet Distribution Width*)

PLT – Plaquetas (*Platelets*)

TTPA – Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada

TP – Tempo de Protrombina (*Prothrombin Time*)

PTGO – Prova de Tolerância à Glucose Oral

RBC – Eritrócitos (*Red Blood Cells*)

RDW – Amplitude de distribuição de eritrócitos (*Red Cell Distribution Width*)

RET – Reticulócitos

RIQAS – *Randox Internacional Quality Assessment Scheme*

RNA – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

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

UIBC – Capacidade não saturada de ligação do ferro (*Unsaturated Iron Binding Capacity*)

VGM – Volume Globular Médio

VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade (*Very Low Density Lipoproteins*)

VPM – Volume Plaquetário Médio

VSG – Velocidade de Sedimentação Globular

WBC – Glóbulos brancos (*White Blood Cells*)

Resumo

Neste relatório são descritas as principais atividades realizadas durante o Estágio Curricular integrado no segundo ano do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Este estágio decorreu no **Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Algarve (CHA) – Unidade de Portimão**, sob orientação do Dr. Carlos Nascimento, tendo incluído os estágios nas quatro secções fundamentais: *Hematologia*, *Bioquímica*, *Imunologia* e *Microbiologia*. Teve início a 20 de Outubro de 2014 e terminou a 29 de Maio de 2015.

Em termos de organização, este relatório inclui uma breve caracterização do local de estágio, o Laboratório de Patologia Clínica do CHA – Unidade de Portimão e das suas secções de trabalho, seguindo-se uma descrição sucinta do controlo de qualidade aí implementado. As secções de *Hematologia* e de *Bioquímica* foram selecionadas para uma descrição mais pormenorizada das atividades desenvolvidas, englobando os ensaios realizados e as suas aplicações clínicas no contexto do diagnóstico laboratorial.

Abstract

This report will describe the activities performed during the curricular internship of the second year of the Master Degree in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra.

This internship took place in the **Laboratory of Clinical Pathology** of the *Centro Hospitalar do Algarve (CHA) – Unidade de Portimão*, under the supervision of Dr. Carlos Nascimento, and its program included the four main areas: Hematology, Biochemistry, Immunology and Microbiology. It started on October 20th, 2014 and ended on May 31st, 2015.

In terms of organization, this report includes a brief description of the Clinical Pathology Laboratory of the *CHA – Unidade de Portimão* and of its main sections, followed by a brief explanation of the Laboratory Quality Management System. Further, the sections of Hematology and of Biochemistry were selected for a more detailed description, highlighting the main parameters determined and the methodologies used and their clinical applications in a context of laboratory diagnosis.

I. Introdução

No último ano do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra é proposto aos alunos a realização de um estágio curricular, parte integrante do plano de estudos. O estágio teve como objetivos principais: i) promover a integração no meio profissional e o contacto com os outros profissionais de saúde; ii) aplicar os conhecimentos adquiridos no curso num contexto real de trabalho; iii) desenvolver a capacidade de trabalho em equipa e, igualmente, de trabalho autónomo; iv) adquirir a capacidade de organização e de execução das atividades diárias de um laboratório; e v) promover o contacto com os utentes, aplicando princípios éticos e deontológicos.

O estágio foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Algarve (CHA) - Unidade de Portimão, no período compreendido entre Outubro de 2014 e Maio de 2015, onde me foi permitido o maior envolvimento possível em todas as atividades desenvolvidas diariamente no laboratório. Assim, foi proposta a permanência de cerca de 5 semanas em cada secção do laboratório, de modo a possibilitar o acompanhamento de todo o percurso das diferentes amostras biológicas, desde a sua colheita, receção, processamento, validação biopatológica e entrega dos resultados ao clínico ou ao doente.

No âmbito da realização do relatório de estágio é proposto aos alunos a exploração, em mais detalhe, de duas áreas científicas onde trabalharam. Neste sentido, foram aprofundadas as secções de Hematologia e Bioquímica.

2. O Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Algarve (CHA) - Unidade de Portimão

O laboratório de Patologia Clínica do CHA - Unidade de Portimão recebe amostras colhidas na central de colheitas do próprio hospital e também das restantes unidades do Centro Hospitalar do Algarve: Unidades de Faro e de Lagos.

Em termos de organização, o laboratório engloba sete diferentes secções: i) Receção Administrativa; ii) Receção de Amostras/Triagem; iii) Hematologia; iv) Microbiologia; v) Bioquímica; vi) Imunologia e vii) Urgência. Com exceção das secções de Bioquímica e de Imunologia, que funcionam no mesmo espaço, todas as outras secções estão separadas fisicamente, possuindo em cada uma delas os equipamentos necessários à determinação dos respetivos parâmetros analíticos.

Em termos de recursos humanos, este laboratório inclui Médicos Patologistas, Técnicos Superiores de Saúde, Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica, Técnicos Administrativos e Auxiliares, distribuídos por todas as secções que, em conjunto, asseguram naquele hospital a manutenção de um serviço diário, não só de rotina (8h-16h) como de urgência (24h).

2.1 Hematologia

Na secção de Hematologia, encontram-se os equipamentos automáticos necessários à realização das principais atividades aí desenvolvidas, nomeadamente: hemogramas, determinação da velocidade de sedimentação globular, provas de coagulação, doseamento de variantes de hemoglobina, coloração e observação microscópica de esfregaços de sangue periférico, entre outras.

2.2 Bioquímica e Imunologia

As secções de Bioquímica e de Imunologia, como já referido anteriormente, ocupam uma mesma sala. O principal equipamento aí existente é o Cobas 6000, da Roche, constituído por dois módulos: o c501 e o e601, destinados à determinação de parâmetros bioquímicos e imunológicos, respetivamente. No primeiro, são realizadas determinações por espectrofotometria, turbidimetria ou potenciometria, enquanto no segundo módulo são analisados marcadores tumorais, marcadores hormonais, marcadores virais e marcadores metabólicos através de eletroquimioluminescência. Outros equipamentos que podem ser encontrados nesta secção são o URISYS 2400, da Roche, um sistema semiautomático de análise sumária de urina, o CHORUS, da DIESSE, onde são realizadas serologias e o HYDRASYS, da Sebia, utilizado para a eletroforese e imunofixação. O equipamento MEDICA Pro da Elga, é aqui utilizado no fornecimento da água utilizada nos aparelhos clínicos. Através da combinação de osmose reversa, radiação UV e ultrafiltração, este equipamento assegura a obtenção de água de nível I.

2.3 Microbiologia

Por fim, na secção de Microbiologia são recebidos produtos biológicos para exame bacteriológico, parasitológico ou micológico, conforme o pedido do clínico. Nesta secção, onde as atividades desenvolvidas são maioritariamente técnicas manuais, os equipamentos aí existentes são o Vitek.2® e o Vitek ATB Expression Bacteriology Analyzer, da BioMérieux utilizados para a identificação de microrganismos e estudo da sua suscetibilidade a

antimicrobianos. Para além destes, existem ainda estufas para a incubação de placas de microrganismos e o Bac/ALERT® 3D, da *BioMerieux*, um sistema automático de deteção rápida de microrganismos em amostras biológicas.

O laboratório inclui ainda uma série de outros espaços como a sala do serviço administrativo, a sala de esterilização e lavagem de material, o gabinete do Diretor Técnico e divisões para arrumação e armazenamento de material.

3. O Controlo de Qualidade

Hoje em dia, os dados produzidos nos laboratórios de análises clínicas têm uma grande influência na tomada de decisão dos médicos clínicos e no diagnóstico dos doentes, por isso, a principal preocupação de um laboratório deve estar relacionada com a qualidade dos resultados fornecidos.

A qualidade dos resultados de um laboratório é influenciada por todos os procedimentos realizados desde a colheita das amostras até à obtenção do resultado, ao longo de três fases: Pré Analítica, Analítica e Pós Analítica. ⁽¹⁾

Durante muito tempo, os laboratórios focaram-se no controlo dos erros da fase analítica, no entanto, devido à crescente automatização do laboratório, é reconhecido que a maioria dos erros laboratoriais que ocorre se deve, particularmente, a erros na fase pré-analítica associados, por exemplo, à colheita, à identificação, ao manuseamento e ao transporte da amostra. ⁽²⁾

3.1 A Fase Pré Analítica

A Fase Pré Analítica inicia-se com a solicitação das análises e termina no momento em que se inicia a análise laboratorial propriamente dita. Um erro nesta fase compromete decisivamente a fase analítica e, conseqüentemente, o resultado final que o laboratório dá ao clínico. Assim, um tratamento adequado da amostra pode evitar a repetição quer de exames laboratoriais, quer de colheitas e um diagnóstico incorreto que conduza a um tratamento inadequado. ⁽³⁾

Esta fase tem sido descrita como a etapa onde se verifica a maioria dos erros laboratoriais, sendo responsável por 48-68% do total de erros que ocorrem num laboratório clínico. ⁽¹⁾ Um preenchimento inadequado do pedido, uma inadequada preparação do doente, o uso excessivo do garrote, uma má identificação da amostra, o uso de um anticoagulante errado, o enchimento do tubo de colheita com volume de sangue inadequado, um tempo

prolongado do transporte, a conservação da amostra a temperaturas inadequadas ou uma centrifugação incorreta são alguns exemplos de erros que podem ser cometidos nesta fase.

Com vista a uma redução da ocorrência de erros, é fundamental cumprir os procedimentos de trabalho estabelecidos pelo serviço e formar continuamente todos os profissionais envolvidos nos processos de obtenção e manipulação de amostras biológicas.

Uma das principais etapas da fase pré analítica é a colheita de amostras, na medida em que afeta a qualidade e credibilidade dos resultados, constituindo também, na quase totalidade das vezes, o local de contacto privilegiado entre o doente e o laboratório. ⁽³⁾

No laboratório de Patologia Clínica do CHA-unidade de Portimão as amostras são provenientes da Central de Colheitas do próprio hospital, dos seus diversos serviços e ainda das outras unidades que constituem o Centro Hospitalar do Algarve. Após o registo no sistema informático OMEGA, todas as amostras são identificadas através de etiquetas de código de barras coladas nos tubos. O procedimento de colheita e a receção de amostras encontra-se documentado no Manual de Colheitas, no qual estão definidas as metodologias de colheita de todos os tipos de amostras analisadas no laboratório, assim como os seus critérios de rejeição. Após a colheita as amostras provenientes da Central de Colheitas e das outras unidades do CHA são transportadas para a Secção de Receção de amostras/Triagem por Assistentes Operacionais, enquanto as amostras colhidas nos serviços chegam diretamente a esta secção através de um sistema automatizado de vácuo. As amostras são rececionadas, conferidas com as respetivas requisições, registadas, identificadas e avaliadas segundo os critérios de rejeição. Posteriormente, são centrifugadas, quando aplicável, e distribuídas pelas respetivas secções do laboratório.

3.2 A Fase Analítica

A fase analítica corresponde ao período de realização da análise propriamente dita. Os erros nesta fase podem decorrer de falhas na manutenção dos equipamentos, na hidratação dos reagentes, controlos e calibradores bem como da existência de interferentes nas amostras. Com o aparecimento dos equipamentos automáticos, os erros da fase analítica têm vindo a diminuir de forma radical, correspondendo a 7-14% dos erros totais. O aumento da precisão e exatidão dos resultados, bem como a diminuição dos custos para as análises e seu tempo reduzido de processamento são as principais vantagens associadas à automatização dos laboratórios de análises clínicas. ⁽¹⁾

3.3 A Fase Pós Analítica

Esta fase consiste na avaliação final de todos os resultados, incluindo a validação biopatológica, emissão do boletim analítico e entrega do mesmo ao utente. Os principais erros que ocorrem na fase pós analítica devem-se principalmente a falhas na interface entre os equipamentos automáticos e o sistema geral informático ou ainda, no caso de amostras que são enviadas para laboratórios exteriores, uma má passagem informática dos resultados ou no arquivo dos processos.⁽¹⁾

3.4 O Controlo de Qualidade Interno (CQI) e a Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

O controlo de qualidade é um conjunto de procedimentos postos em prática no laboratório com vista a obter fiabilidade nos resultados das análises à medida que elas vão sendo executadas.

Neste laboratório são realizados procedimentos de controlo da qualidade para monitorizar a validação dos ensaios. Os dados resultantes destes procedimentos são registados de maneira que possam ser detetadas tendências. Em todas as secções são realizados não só o controlo de qualidade interno (CQI) como a avaliação externa da qualidade (AEQ).

O CQI permite avaliar a precisão, é realizado diariamente ou quando se justifica, em todos os equipamentos utilizando 2 ou 3 níveis de controlo diferentes (controlo normal, patológico nível 1 e patológico nível 2). Os materiais de controlo utilizados são o mais similar possível às amostras dos utentes, e são processados em simultâneo com as amostras, assegurando a qualidade dos resultados obtidos. A avaliação dos resultados do CQI tem por base a utilização de gráficos de Levey-Jennings, através da aplicação das regras de Westgard.⁽⁴⁾ Esta avaliação tem por objetivo a validação dos métodos analíticos e a aplicação de medidas corretivas, caso seja necessário. A calibração das técnicas é efectuada sempre que os valores dos controlos se encontram fora dos limites estabelecidos, ou quando os reagentes são mudados e provêm de um lote diferente ou de acordo com os critérios do fornecedor.

Na avaliação externa da qualidade (AEQ), o laboratório analisa amostras com valores desconhecidos provenientes de uma entidade externa acreditada, no caso específico deste laboratório, do *Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS)* e do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Os resultados obtidos são enviados de volta para as entidades externas, onde são avaliados e devolvidos ao laboratório. Estes programas

de avaliação externa da qualidade permitem ao laboratório avaliar a sua capacidade de obter um resultado exato e comparar os seus resultados com outros laboratórios equipados com os mesmos equipamentos e reagentes, avaliando assim a exatidão dos procedimentos.

4. Hematologia

4.1 Introdução

Na secção de Hematologia são realizados vários procedimentos de rotina com vista ao estudo dos elementos do sangue periférico e dos seus precursores, nomeadamente: hemograma, observação do esfregaço de sangue periférico, velocidade de sedimentação globular, estudo de variantes de hemoglobina e provas de coagulação.

O sangue é constituído por dois componentes: uma matriz líquida designada plasma e os elementos figurados. Estes constituem cerca de 45% do volume total de sangue, enquanto o plasma corresponde a 55%, que num adulto médio, é cerca de 4 a 5 L no sexo feminino e 5 a 6 L no sexo masculino. Dos elementos figurados fazem parte os eritrócitos, leucócitos e plaquetas, enquanto o plasma é constituído essencialmente por água (cerca de 91%), nutrientes, proteínas, iões, produtos do catabolismo e gases. ⁽⁵⁾

A **hematopoiese** é o processo de produção e maturação das células sanguíneas que ocorre na medula óssea. Todas as células sanguíneas derivam de uma mesma célula, a célula estaminal pluripotente ou *stem cell*, que é provida de capacidade de proliferação, replicação e diferenciação. Sob a influência de substâncias mediadoras tais como interleucinas e fatores de crescimento, a célula estaminal pluripotente diferencia-se em duas células filhas, uma célula pluripotente mielóide e uma célula pluripotente linfóide, que irão originar as diferentes linhagens celulares. A célula pluripotente mielóide origina granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, eritrócitos e plaquetas, enquanto a célula pluripotente linfóide origina linfócitos B e T. Ao longo do processo de maturação das células sanguíneas são observadas alterações morfológicas como a perda de basofilia do citoplasma, redução do tamanho da célula e condensação da cromatina. ⁽⁶⁾

Na figura I, está representado um esquema descritivo da hematopoiese.

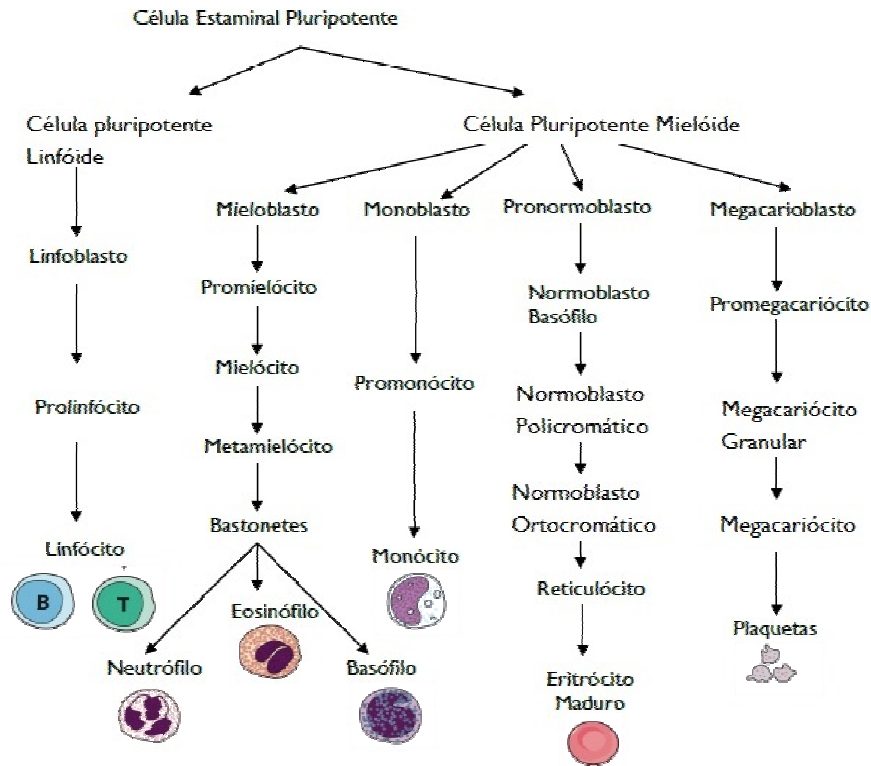


Figura 1- Esquema descritivo da Hematopoiese.

4.2 As Células Sanguíneas

. Os Eritrócitos

Os eritrócitos são o elemento celular mais abundante do sangue, possuem a forma de disco bicôncavo com cerca de 7,5 µm de diâmetro cuja principal função é a oxigenação dos tecidos. O principal componente do eritrócito é a hemoglobina, que ocupa um terço do volume total da célula e é responsável pela sua cor vermelha.

O processo de maturação dos eritrócitos é denominado Eritropoiese e tem início na diferenciação da célula pluripotente mielóide em pronormoblasto, que por sua vez sofre várias diferenciações (pronormoblasto - normoblasto basófilo – normoblasto policromático – normoblasto ortocromático) até ser formado o eritrócito policromático ou reticulócito que é lançado na corrente sanguínea, onde completa a sua maturação em 1 dia, passando a designar-se eritrócito maduro. O processo de maturação é acompanhado pelo aumento progressivo da acidofilia celular, perda do núcleo por extrusão e degeneração de quase todos os organelos celulares. A Eritropoiese é estimulada pela Eritropoietina, uma hormona produzida pelos rins em resposta a uma diminuição de oxigênio no sangue, levando ao

aumento de proeritroblastos formados e a uma diminuição do tempo de maturação dos eritrócitos.^{(5) (6)}

Diversas situações patológicas interferem com a eritropoiese, levando a variações na forma, conteúdo em hemoglobina e tamanho dos eritrócitos. Abaixo são descritas as alterações morfológicas que observei com maior frequência no exame microscópico do esfregaço do sangue periférico, ao longo da minha permanência na secção de Hematologia.

Variações de Forma Detetadas

A presença elevada de formas anormais dos eritrócitos designa-se poiquilocitose e as alterações morfológicas que podem ser encontradas designam-se:

- i) *Esferócitos* - eritrócitos que apresentam forma esférica, coloração intensa sem a característica palidez central e de tamanho aparentemente menor devido a diminuição do seu diâmetro. A sua existência está associada a esferocitose hereditária, patologia resultante de alterações genéticas nas proteínas de membrana dos eritrócitos.
- ii) *Eliptócitos* - eritrócitos em forma de charuto ou em forma ovalada, designados ovalócitos. A sua presença em grande escala está associada a anomalias hereditárias resultantes de alterações nas proteínas membranares dos eritrócitos, são vistos em pouca percentagem em anemias microcíticas, megaloblásticas e síndromes mieloproliferativas.
- iii) *Dacriócitos* - eritrócitos em forma de gota ou lágrima (*tear drop cells*), são observados em grande número em casos de mielofibrose, em anemias e esplenomegalia.
- iv) *Equinócitos* - eritrócitos que apresentam projeções espiculadas mais ou menos acentuadas, em resposta a difusão de substâncias alcalinas do vidro.
- v) *Células em alvo ou "target cells"* – eritrócitos que apresentam área corada adicional no centro da área descorada, adquirindo o eritrócito o aspeto de alvo. Esta forma é característica de anemias.
- vi) *Drepanócitos* ou células falciformes - eritrócitos em forma de foice ou meia-lua, devido a presença de HbS, associados a anemia falciforme ou drepanocitose.
- vii) *Estomatócitos* - eritrócitos que apresentam uma área central descorada, em forma de boca, que atravessa a célula de um lado ao outro, em forma de taça. Esta forma é característica de estomatocitose hereditária, alcoolismo e hepatopatias.

viii) *Formação de Rouleaux* - os eritrócitos aderem parcialmente uns aos outros com aspecto de “rolos” ou “pilhas de moedas espalhadas”. Esta alteração morfológica sugere uma concentração aumentada de proteínas plasmáticas em casos de inflamação ou de imunoglobulinas anormais, associadas a Mieloma Múltiplo ou Macroglobulinemia de Waldenström.

Podem, ainda, ser observados eritrócitos fragmentados, em resultado de trauma e agressão, que podem estar associados a anemias hemolíticas, hemólise intravascular ou a uma má técnica de execução do esfregaço de sangue periférico. ⁽⁷⁾

Alteração de tamanho

Um aumento na variabilidade do tamanho dos eritrócitos designa-se anisocitose. Assim, podem ser encontrados eritrócitos de menor tamanho, designados micróцитos, associados a anemias por deficiência de ferro e por outro lado, eritrócitos de tamanho superior ao normal, denominados macróцитos, que podem ser encontrados em anemias megaloblásticas, ou fisiologicamente em grávidas e recém-nascidos. ⁽⁷⁾

Alteração no conteúdo de Hemoglobina

O conteúdo de hemoglobina existente no interior dos eritrócitos pode variar em consequência de alterações na síntese de hemoglobina, originando uma variabilidade na coloração da população eritrocitária, designada anisocromia. Deste modo, os eritrócitos podem ser classificados de hipocrómicos (menor quantidade de Hb), normocrómicos (quantidade normal de Hb) ou hiperocrómicos (níveis elevados de Hb). Os eritrócitos hipocrómicos apresentam diminuição da coloração, com aumento da palidez central e estão normalmente associados a microcitose. ⁽⁷⁾

Outras particularidades dos eritrócitos relevantes ao diagnóstico de algumas patologias são, por exemplo, a observação de pontilhado basófilo. Este fenómeno deve-se à coloração que precipita os ribossomas ricos em RNA, não existindo “*in vivo*”. A sua presença é característica dos micróцитos em β -Talassemias minor, o que permite diferenciar esta patologia da anemia ferropénica e de situações de intoxicações por chumbo. Pode ainda ser observado um dimorfismo na população eritrocitária, ou seja, a presença de duas populações distintas de eritrócitos, uma microcítica hipocrómica e outra normocrómica, quer normocítica quer macrocítica, observado normalmente em consequência de transfusões. ⁽⁷⁾

. Os Leucócitos

Os leucócitos ou glóbulos brancos são os elementos celulares responsáveis pela defesa do organismo contra microorganismos estranhos. A leucopoiese tem a duração de 8 a 10 dias, durante os quais a célula pluripotente mielóide origina granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) e agranulócitos (monócitos).^{(5) (8)} Segue-se uma breve descrição dos diferentes tipos de leucócitos:

Neutrófilos

Os neutrófilos ou polimorfonucleares possuem um núcleo denso com 2 a 5 lóbulos e diâmetro entre 10 a 12 μm . O seu citoplasma é pálido e de contorno irregular, contendo muitos grânulos azurofílicos. Este granulócito é o leucócito que se encontra em maior quantidade no sangue periférico, com uma sobrevivência de 6-10 h, migrando depois para os tecidos onde a sua principal função é a fagocitose durante o processo de inflamação. Os neutrófilos segregam lisosimas, importantes na destruição de bactérias.^{(5) (8)}

Eosinófilos

Os eosinófilos possuem 11 a 14 μm de diâmetro e são caracterizados pelos seus grânulos citoplasmáticos de cor vermelho-alaranjada e um núcleo geralmente bilobado. São pouco frequentes na circulação, de onde migram para os tecidos para atuar em reações inflamatórias e alérgicas. Os eosinófilos libertam mediadores químicos que reduzem a inflamação e participam na defesa do organismo contra parasitas, situações em que se encontram elevados no sangue periférico.^{(5) (8)}

Basófilos

Os basófilos possuem tamanho semelhante aos neutrófilos e raramente são encontrados no sangue periférico em comparação com os outros demais leucócitos. São caracterizados pelos numerosos grânulos citoplasmáticos de coloração escura, que encobrem o núcleo dificultando a sua visualização e que contêm histamina (pro-inflamatória) e heparina (anticoagulante). Quando os basófilos migram para os tecidos passam a designar-se mastócitos, têm recetores para a imunoglobulina E, estando envolvidos nas reações de hipersensibilidade associadas a libertação de histamina.^{(5) (8)}

Monócitos

Os monócitos são os maiores leucócitos encontrados no sangue periférico, com 12 a 20 µm de diâmetro. O seu núcleo é grande e central, de forma oval ou dentada, e o citoplasma abundante é azulado, sendo possível observar a presença de vacúolos. Ao contrário dos granulócitos, o monócito circula temporariamente no sangue periférico, de onde migra para os tecidos e permanece sob a forma de macrófago, um fagócito com um papel fundamental na resposta imunitária do organismo. ^{(5) (8)}

Linfócitos

Os linfócitos são células do sistema imunológico que vão auxiliar os fagócitos na defesa do organismo. Morfologicamente, são células mononucleares, com um núcleo regular e um citoplasma sem grânulos específicos, contrariamente aos granulócitos. Os linfócitos têm origem na diferenciação da célula pluripotente linfóide. Na linfopoiese intervêm os órgãos linfóides primários (medula óssea e timo) e os órgãos linfóides secundários (baço e gânglios linfáticos). Existem dois tipos de linfócitos maioritários: os linfócitos B e os linfócitos T. Os linfócitos T completam a sua maturação no timo, onde adquirem a capacidade de reconhecer os diferentes antigénios e controlar a produção de anticorpos. Ao reconhecer um antigénio, os linfócitos T estimulam os linfócitos B a produzir anticorpos específicos para aquele antigénio. ⁽⁵⁾

. As Plaquetas

As plaquetas ou trombócitos são o elemento mais pequeno que circula no sangue, cuja função é a formação do trombo plaquetário na resposta hemostática a lesões vasculares. As plaquetas são produzidas na medula óssea pela fragmentação do citoplasma dos megacariócitos. A sua produção é regulada pela trombopoietina, produzida nos rins e no fígado que, através do seu recetor de superfície c-MPL aumenta o número e velocidade de maturação dos megacariócitos. Após a libertação no sangue periférico, as plaquetas apresentam uma vida média de 7 a 10 dias. ^{(5) (8)}

4.3 O Hemograma

O hemograma é uma das análises de rotina mais completas e requisitadas pelos clínicos, e consiste na avaliação quantitativa e qualitativa dos elementos celulares do sangue. Inclui o Eritrograma, o Leucograma e o Plaquetograma. O hemograma tem um papel

fundamental como auxiliar no diagnóstico e monitorização de diferentes patologias devidas a alterações nos eritrócitos, nos leucócitos ou nas plaquetas.⁽⁷⁾

As amostras de sangue total para a análise hematológica são colhidas em tubos com o anticoagulante K₃EDTA (sal de potássio do ácido etilendiaminotetracético), que possui uma atividade quelante dos íons cálcio evitando a sua disponibilidade para o processo de coagulação sanguínea.

Neste laboratório, o hemograma é executado pelo autoanalisador LH750, da Beckman Coulter. Este equipamento realiza a contagem e identificação das três séries celulares tendo como base o Princípio de Coulter, baseado no método da impedância e da tecnologia VSC (do inglês *Voltage Source Converter*), permitindo a separação das células de acordo com o seu volume, condutividade e dispersão. Esta tecnologia oferece grande sensibilidade, especificidade e eficiência.

O método da impedância foi descrito originalmente por Wallace Coulter em 1956, e baseia-se na deteção e medição de alterações na condutividade elétrica, que surgem quando uma partícula (ou célula) num líquido condutor passa através de uma pequena fenda situada entre dois eléctrodos existente na célula de contagem, originando um impulso eléctrico.⁽¹⁴⁾ Dado que as células não são condutoras de corrente eléctrica, a passagem de cada célula através da abertura causa uma diferença de potencial entre os dois eléctrodos, gerando-se um pulso eléctrico proporcional ao volume da célula que lhe deu origem e o número de impulsos gerados está relacionado com o número de células. Esta metodologia é utilizada para contagem de eritrócitos e plaquetas com prévia lise de leucócitos. As plaquetas e os eritrócitos são distinguidos com base no seu volume celular, uma vez que as plaquetas têm menor volume e, como tal, originam um pulso eléctrico de menor amplitude. A soma dos impulsos de todas as células num volume específico é avaliada com recurso a um histograma.

A tecnologia VSC permite diferenciar linfócitos, monócitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos e reticulócitos com base no volume da célula, na sua condutividade e dispersão. Para a execução do Hemograma o equipamento utiliza reagentes como o *Erythrolyse*[™] e o *Stabilise*[™] que são misturados com a amostra de sangue numa câmara de mistura orbital para remover os eritrócitos, enquanto os leucócitos permanecem inalterados. O primeiro é utilizado para lisar os eritrócitos e o segundo é posteriormente adicionado para parar a reação lítica, deixando os leucócitos prontos para a análise. Este equipamento possui um citómetro de fluxo modificado com cristais de quartzo que permite que os leucócitos passem um de cada vez no sistema de deteção usando focagem hidrodinâmica.⁽⁷⁾

. Eritrograma

O estudo dos parâmetros eritrocitários permite a avaliação de patologias associadas a alterações dos eritrócitos, desde anemias (diminuição da concentração de Hb) a poliglobulias (aumento do número de eritrócitos). Os parâmetros avaliados no Eritrograma são descritos seguidamente:

Contagem do número total de Eritrócitos (RBC)

Corresponde ao número de eritrócitos circulantes, presentes num dado volume de sangue, é determinado directamente pelo equipamento sendo expresso em $n10^6/\mu\text{L}$.

Hematócrito (HCT)

O hematócrito (HCT) é definido como o volume relativo ocupado pelos eritrócitos no volume de sangue total, sendo expresso em L/L (U.I) ou em percentagem. Para um mesmo número de eritrócitos podem corresponder valores de HCT diferentes. No caso de desidratação, a diminuição do volume plasmático gera valores mais elevados deste parâmetro, enquanto em caso de hipervolemia os valores são menores.⁽⁷⁾

Hemoglobina (Hb)

O doseamento da hemoglobina (Hb) é determinado por um método espectrofotométrico, em que após a lise dos eritrócitos a hemoglobina é oxidada com formação de um complexo estável corado, cianometohemoglobina, cuja absorvância é lida no comprimento de onda de 525 nm. O valor de absorvância é proporcional à concentração de hemoglobina na amostra, expressa em g/dL. Este método é influenciado pela turvação da amostra, que pode estar relacionada com o grau de lipémia ou de leucocitose. Os valores de referência para a hemoglobina variam com o sexo e idade, sendo mais elevados no sexo masculino.⁽⁷⁾

Volume Globular Médio (VGM)

O VGM indica o volume médio de um eritrócito, expresso em fentolitros (fL). O volume globular médio é calculado directamente a partir do histograma dos eritrócitos, sendo utilizado geralmente na classificação de anemias, por estar associado a alterações no tamanho dos eritrócitos.

A anemia é classificada como normocítica, quando os valores de VGM estão dentro dos valores de referência (80-100 fl), macrocítica, quando o valor de VGM é superior a 100 fL (macrocitose) e microcítica, quando o seu valor é inferior a 80 fL. Este parâmetro é determinado pelo equipamento automático mas pode também ser calculado através da divisão do hematócrito pelo número total de eritrócitos. ⁽⁷⁾

Hemoglobina Globular Média (HGM)

Este parâmetro indica o peso médio da hemoglobina contida num eritrócito médio, expresso em picogramas (pg). Os valores de referência para a hemoglobina globular média são de 27 a 32 pg podendo ser calculado a partir da fórmula: $(Hb/RBC) \times 10$. ⁽⁷⁾

Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM)

A concentração de hemoglobina globular média (CHGM) indica a concentração média de hemoglobina em cada eritrócito, expressa em g/dL. É usado para classificar morfologicamente as anemias, como normocrômicas se os valores de CHGM estão dentro dos valores de referência (31-35g/dL) ou hipocrômicas, para valores inferiores a 28g/dL. O seu valor pode também ser obtido pela divisão da hemoglobina pelo hematócrito.

Os parâmetros HGM e CHGM estão ambos relacionados com o conteúdo de hemoglobina nos eritrócitos, pelo que valores diminuídos ocorrem em situações de hipocromia. O valor de HGM está aumentado geralmente em situações de macrocitose enquanto a CHGM aumentada (raro) está associada a situações de esferocitose ou ainda em casos de erro técnico, se superior a 36 g/dL. ⁽⁷⁾

Coefficiente de Dispersão Eritrocitária (RDW)

O coeficiente de dispersão eritrocitária (RDW, do inglês *Red Cell Distribution Width*) corresponde ao coeficiente de variação na distribuição do volume eritrocitário. O cálculo é executado pelo equipamento automático a partir do histograma de distribuição do volume dos eritrócitos, sendo expresso em percentagem. Valores elevados de RDW são indicativos de anisocitose. ⁽⁷⁾

Contagem de Reticulócitos (RET)

Os reticulócitos são eritrócitos jovens, recentemente libertados da medula óssea e que ainda contêm restos de RNA ribossômico no seu citoplasma. O RNA precipita em

presença de certos corantes, como o azul brilhante de cresil ou o azul novo de metileno, originando filamentos que são visíveis ao microscópio ótico.

A contagem de reticulócitos no sangue periférico reflete a atividade eritropoiética da medula óssea. Quando a eritropoiese é estimulada, o número de reticulócitos no sangue periférico aumenta em resultado de uma maior libertação destes pela medula óssea. A contagem de reticulócitos é utilizada como técnica complementar no estudo das anemias, avaliando assim resposta medular perante a patologia. Quando a anemia é acompanhada por um número elevado de reticulócitos é designada como anemia regenerativa, enquanto que se a anemia for acompanhada por um número normal ou diminuído dessas células diz-se arregenerativa. Em condições normais, os reticulócitos permanecem na medula durante 2 a 3 dias e terminam a sua maturação já no sangue periférico em aproximadamente 24 h.⁽⁷⁾

A contagem de reticulócitos é também efectuada no equipamento Coulter LH750, no seu modo especial RETICS. O equipamento fornece a percentagem de reticulócitos (RET% - número de reticulócitos/100 eritrócitos) e o número de reticulócitos (RET#), ou seja, número absoluto de reticulócitos, calculado a partir de RET% e do nº de eritrócitos, sendo o valor expresso em 10^9 cel/L.

Eritroblastos

Os eritroblastos correspondem a formas imaturas da série eritróide ainda nucleadas. Em condições normais, estas células estão presentes na medula óssea, mas a sua presença no sangue periférico pode ocorrer fisiologicamente em crianças (bebés imaturos) ou patologicamente na hiper-regeneração eritroblástica devido a anemia hemolítica ou esplenectomia. No equipamento, os eritroblastos podem ser contados como leucócitos, originando falsas leucocitoses e é emitido um alerta de NRBC (*Nucleated Red Blood Cells*). Se a presença de eritroblastos for superior a 10% deve ser feita uma correção da fórmula leucocitária no valor total de leucócitos, através do cálculo: $WBC \times 100 / 100 + n^\circ$ eritroblastos (contados no microscópio, por 100 leucócitos).⁽⁷⁾

. Leucograma

O estudo dos leucócitos inclui a contagem total de Leucócitos (WBC, do inglês *White Blood Cells*) e a contagem diferencial dos vários tipos de células: Neutrófilos (NO), Eosinófilos (EO), Basófilos (BA), Linfócitos (LY) e Monócitos (MO).

O número total normal de leucócitos varia entre 3,6 e 11,0 × 10⁹/L. Deste valor, 40 a 70% são neutrófilos, 20 a 50% linfócitos, 2 a 10% monócitos, 1 a 7% eosinófilos e 0 a 3% basófilos.

Em alguns estados patológicos pode ocorrer o aumento do número de leucócitos (leucocitose) resultante, na maioria dos casos, do aumento do número de neutrófilos (neutrofilia) devido a infecção, inflamação, traumatismo ou situações de leucemia/linfoma.

A diminuição do número de leucócitos designa-se por leucopénia e resulta, geralmente, de uma diminuição do número de neutrófilos (neutropénia). As principais causas associadas são o uso de fármacos que afetam a produção de leucócitos, terapêuticas imunossupressoras e síndromes de imunodeficiência. Sobretudo em situações de neoplasias, para além da contagem dos leucócitos, é fundamental o estudo morfológico e imunológico destas células.

Pode ser observado ainda o aumento de uma classe específica de leucócitos, como por exemplo, dos neutrófilos em casos de infeções bacterianas, dos linfócitos em infeções virais, de eosinófilos em infeções parasitárias ou doenças alérgicas e basofilia associada a síndromes mieloproliferativas, geralmente Leucemia Mielóide Crónica.⁽⁷⁾

. Plaquetograma

O estudo das plaquetas inclui para além do número total de plaquetas (PLT), a determinação do Plaquetócrito (PCT) e dois índices plaquetários: o Volume Plaquetário Médio (VPM) e o Coeficiente de Dispersão Plaquetária (PDW). O aumento do número de plaquetas (trombocitose) está associado geralmente a processos inflamatórios e doenças mieloproliferativas, enquanto a sua diminuição (trombocitopénia) está associada a distúrbios autoimunes, nomeadamente trombocitopenia imunológica adquirida e Púrpura trombocitopénia idiopática/imunológica. As trombocitopénias devem ser sempre confirmadas com a observação de esfregaço de sangue periférico para excluir falsas reduções provocadas pela existência de coágulos, de agregação plaquetária ou satelismo plaquetário, ou ainda presença de elevado número de eritrócitos microcíticos que podem ser contados como plaquetas.⁽⁷⁾

. Validação do Hemograma

A validação biopatológica dos resultados do hemograma tem em conta a idade, o sexo, o contexto clínico e historial do utente e os eventuais sinais de alarme emitidos pelo equipamento automático. Também devem ser tidas em consideração outras indicações

relevantes, nomeadamente, a informação obtida no ato da colheita e os resultados de outros parâmetros laboratoriais, tais como ferro, ferritina, transferrina, velocidade de sedimentação, entre outros. No decorrer da validação, são selecionadas as amostras que requerem repetição e/ou execução do esfregaço sanguíneo para observação ao microscópio, através dos critérios de lâmina, nomeadamente: casos de inversão de fórmula leucocitária (% leucócitos > % neutrófilos), monocitose (>14%), eosinofilia (>17%), basofilia (>2%), trombocitopenia (<1x10⁵ n/uL), trombocitose (> 7x 10⁵ n/uL).

. Esfregaço de Sangue Periférico

O esfregaço de sangue periférico consiste na preparação de uma fina camada de células sobre uma lâmina de vidro, para posterior exame microscópico. A observação do esfregaço de sangue periférico (ESP) é efetuada sempre que um dos critérios de lâmina é preenchido e inclui a observação da morfologia dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas bem como o estabelecimento da fórmula leucocitária. O procedimento de execução do esfregaço é descrito, esquematicamente, abaixo (Figura 2):

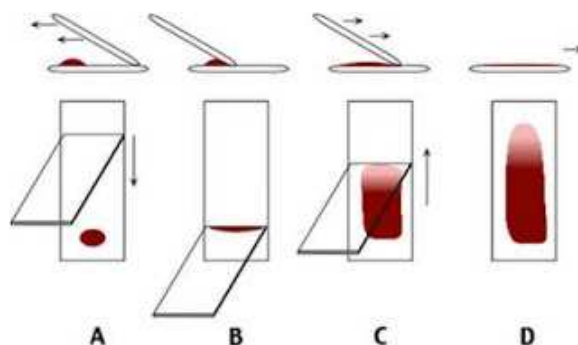


Figura 2- Modo correto de efetuar um esfregaço do sangue periférico.

1. Identificar a lâmina da amostra na cabeça do esfregaço com lápis de carvão.
2. Depositar uma gota de sangue perto da extremidade da lâmina (A);
3. Segurar a lâmina com uma mão, de forma que a gota fique mais próxima do dedo indicador;
4. Com a outra mão, segurar uma lamela que se apoia na lâmina à esquerda da gota, de forma que ambas façam um ângulo de 30° a 45° e deslocar a lamela (sempre apoiada na lâmina) até encontrar a gota, deixando que esta se difunda ao longo da mesma (B);
5. Com um movimento uniforme, deslizar a lamela no sentido da extremidade livre até que o sangue se esgote (C e D);
6. Deixar secar e, posteriormente, seguir com a coloração do esfregaço.

No laboratório, a coloração do esfregaço de sangue periférico é realizada automaticamente, pelo equipamento AEROSPRAY® HEMATOLOGY PRO, que utiliza a coloração Wright-Giemsa, baseada no método da coloração de Romanowsky. Trata-se de uma coloração panótica que combina as vantagens de vários corantes, corando elementos acidófilos, granulações neutrófilas e granulações azurófilas.

O estudo da morfologia do sangue periférico faz-se com base na observação microscópica do esfregaço das três linhagens de células, a eritrocitária (distribuição, maturação, tamanho, cor, forma e inclusões), a leucocitária (alterações morfológicas e numéricas, maturação) e a plaquetária (alterações morfológicas, do número e agregação).⁽⁷⁾

. O Hemograma no Diagnóstico de Anemias e Poliglobulias

Anemias

A anemia define-se como a diminuição da concentração de hemoglobina no sangue, por vezes acompanhada pela diminuição do número de eritrócitos e do hematócrito. Os valores de referência para a hemoglobina dependem da idade, sexo e etnia. Segundo a Direção Regional da Saúde, existe anemia na mulher quando os valores de Hb são inferiores a 11,5 g/dl, no homem quando os valores de Hb são inferiores 13,6 g/dl. Em crianças com idade até 6 meses o limite inferior é 14 g/dl e dos 6 meses aos 11 anos é 11 g/dl.⁽⁹⁾

Entre as principais causas de anemia figuram: hemorragias, produção diminuída de eritrócitos por deficiência de fatores (ferro, vitamina B12 ou ácido fólico), redução do tempo de vida dos eritrócitos (hemólise), existência de variantes de hemoglobina (anemia falciforme), distribuição anormal de eritrócitos na vasculatura (hiperesplenismo) e deficiência de eritropoietina.⁽⁷⁾ Assim, vários tipos são considerados:

Anemia Ferropénica

A anemia ferropénica é considerada o tipo de anemia mais frequente na população. Nesta patologia, a diminuição da hemoglobina está relacionada com a diminuição de ferro no organismo. Entre as causas mais comuns de deficiência de ferro encontram-se a ingestão insuficiente, distúrbios na sua absorção ou ainda hemorragias. Quando as reservas de ferro são insuficientes para assegurar uma eritropoiese eficaz, há uma reduzida síntese do heme, e consequentemente, de Hb e de eritrócitos. No esfregaço de sangue periférico é observada a presença de eritrócitos microcíticos e hipocrómicos. Para o estabelecimento do diagnóstico é importante, para além do hemograma, a análise de alguns parâmetros bioquímicos que

avaliam o metabolismo do ferro: o doseamento do ferro, da ferritina, da transferrina e da capacidade total de ligação ao ferro (TIBC).⁽⁷⁾

Anemia Megaloblástica

A deficiência de alguns fatores, como Vitamina B12 ou ácido fólico, vão interferir na síntese de DNA o que origina uma eritropoiese ineficaz, com eritrócitos de tamanho superior ao normal (macroscíticos). A anemia perniciososa é decorrente da carência de vitamina B12, sendo esta deficiência causada frequentemente pela atrofia da mucosa gástrica o que leva à diminuição ou ausência do fator intrínseco, essencial à absorção desta vitamina.

De igual modo, a deficiência de ácido fólico pode ser devida quer a uma defeituosa absorção, em consequência, por exemplo, da doença de Crohn, da ingestão de certos medicamentos e do alcoolismo, quer ao aumento da sua necessidade, tal como acontece na gravidez. O doseamento de ácido fólico e da vitamina B12 são essenciais para a avaliação desta classe de anemias, bem como a observação do esfregaço de sangue periférico onde são observados eritrócitos macroscíticos, neutropenia e a presença de neutrófilos hipersegmentados.⁽⁷⁾

Anemia Hemolítica

Designa-se por anemia hemolítica a diminuição de hemoglobina decorrente da diminuição da sobrevivência dos eritrócitos, em virtude do aumento da sua destruição. Normalmente, um eritrócito tem uma sobrevivência de cerca de 120 dias, sendo que quando esse tempo fica aquém dos 15 dias, a capacidade de resposta medular eritropoiética é ultrapassada surgindo a anemia de origem hemolítica. Além dos sinais e dos sintomas gerais das anemias, nestes casos há icterícia e esplenomegália.

As anemias hemolíticas podem ter origem hereditária ou adquirida. Entre as causas hereditárias incluem-se anomalias na síntese e na estrutura da hemoglobina, defeitos enzimáticos nos eritrócitos (deficiência de glicose-6-P-desidrogenase) ou ainda anomalias da membrana eritrocitária (esferocitose, hemoglobinúria paroxística noturna). Por outro lado, causas adquiridas como agentes infecciosos, parasitas, reações de auto-imunidade ou alguns fármacos podem também levar a uma hemólise exagerada e consequente anemia.⁽⁷⁾

Poliglobulias

As poliglobulias ou eritrocitoses correspondem a uma proliferação exagerada da população eritróide, geralmente associada ao aumento da concentração de hemoglobina e do hematócrito. Estas patologias podem surgir com um aumento real da massa total dos eritrócitos, designadas Poliglobulias verdadeiras, ou Pseudopoliglobulias, quando o aumento do número de eritrócitos é devido a uma diminuição do volume plasmático (hemoconcentração). Situações de hipóxia, presença de variantes de hemoglobina, aumento de eritropoietina, desidratação ou Policitemia Vera estão associadas a hiperprodução eritrocitária.⁽¹¹⁾ Na tabela I encontram-se indicadas as alterações que podem ser encontradas no Eritrograma, associadas às principais patologias responsáveis.

Tabela I - Alterações dos índices eritrocíticos e respetivas patologias associadas.

Índices eritrocitários	Alteração eritrócito	Patologias associadas	
RBC/Hb/HCT	Diminuído	Anemia	Eritropoiese ineficaz (RET baixos), hemorragias/hemólise (RET altos);
	Elevados	Eritrocitose	EPO aumentada (poliglobulia 2ª) EPO diminuída ou normal (Policitemia vera)
VGM	Diminuído	Microcitose	Anemia ferropénica (RET baixo), Talassemia (RET Normal) Anemia sideroblástica
	Normal	Normocitose	Anemia da doença crónica (RET baixo ou normal); Anemia hemolítica (RET alto)
	Elevado	Macrocitose	Hepatopatias, alcoolismo, deficiência ácido fólico, anemia perniciosa
HGM/CHGM	Diminuído	Hipocromia	Secundária a um défice de ferro; Talassemia (RET baixo), Hemoglobinopatias
	Normal	Normocromia	Anemia da doença crónicas (RET baixo ou normal) Anemia hemolítica (RET alto)
	Elevado	Hipercromia	Esferocitose Hereditária

4.4 A Velocidade de Sedimentação Globular (VSG)

A velocidade de sedimentação é definida como a velocidade de queda espontânea dos eritrócitos em suspensão no plasma, expresso em mm/h. Geralmente a velocidade de sedimentação está aumentada em estados de inflamação e infeção, sendo nesse sentido o principal papel da sua avaliação no laboratório. Contudo, é considerado um teste pouco

específico e pouco sensível, em virtude de não indicar a gravidade do estado de inflamação/infeção.

No laboratório, a determinação da VSG é efetuada num equipamento automático, ALIFAX TEST I BCL com obtenção de resultados equivalentes ao método de Westergreen, o método de referência. Este equipamento determina a velocidade de sedimentação globular dos eritrócitos, em amostras colhidas em tubo com K₃-EDTA através de fotometria cinética capilar.

A velocidade de sedimentação é influenciada por diversos factores, quer globulares, quer plasmáticos ou mecânicos, nomeadamente: número, forma e tamanho dos eritrócitos, formação de *rouleaux*, viscosidade do sangue, aumento do fibrinogénio plasmático, presença de imunoglobulinas, proporção entre sangue e anticoagulante ou ainda o tempo de espera até que seja processada a amostra, levando neste caso, à alteração da forma dos eritrócitos, tornando-os esféricos.

O aumento da velocidade de sedimentação pode estar associado a variações fisiológicas como a idade avançada, período menstrual e a gravidez, no entanto algumas patologias podem também levar a um aumento ou diminuição da velocidade de sedimentação, como resumido na Tabela 2. ⁽¹¹⁾

Tabela 2 - Patologias associadas a alterações na VSG.

VSG	Elevada	Infeções agudas e crónicas; processos inflamatórios agudos; doenças reumáticas; necrose tecidular; leucemias, mieloma múltiplo, neoplasias em geral; anemias;
	Diminuída	Poliglobulias; patologias associadas a alterações de forma dos eritrócitos;

4.5 O Estudo Laboratorial de Hemoglobinopatias e Talassemias

A hemoglobina (Hb) é uma metaloproteína composta por quatro cadeias polipeptídicas e por quatro grupos heme. Cada cadeia polipeptídica, chamada globina, está ligada a um grupo heme, que contém um átomo de ferro. Devido a variações nas cadeias globínicas, distinguem-se vários tipos de hemoglobina, dos quais três são considerados normais, HbA ($\alpha_2\beta_2$, a mais abundante representando 96% da Hb total), HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$, cerca de 2,5%) e HbF ($\alpha_2\gamma_2$, cerca de 1%). No recém-nascido, existe cerca de 80% de HbF que será substituída por HbA, seis meses após o nascimento. ⁽⁸⁾

As Hemoglobinopatias, patologias que envolvem anomalias das hemoglobinas podem ser de dois tipos, qualitativo ou quantitativo. As Hemoglobinopatias de origem qualitativa

resultam da alteração da estrutura de uma cadeia globínica, α - ou β -globina, originando variantes de hemoglobina. As Hemoglobinopatias do tipo quantitativo, são denominadas Talassemias, e devem-se à ausência ou diminuição da síntese de uma cadeia globínica. ⁽⁷⁾

. Variantes de Hemoglobina e Hemoglobinopatias

As variantes de hemoglobina resultam, na maioria dos casos, de mutações pontuais nas sequências de aminoácidos que codificam as cadeias de globina. A variante mais frequente é a HbS, tem origem na substituição de um ácido glutâmico por uma valina. Esta mutação leva à diminuição da solubilidade da molécula de hemoglobina e à deformação dos eritrócitos devido a polimerização. No esfregaço de sangue periférico são observadas células falciformes, associadas à anemia falciforme ou drepanocitose. ⁽⁷⁾

A HbC é a segunda variante mais frequente e resulta da substituição de um ácido glutâmico por uma lisina. Esta alteração confere à hemoglobina uma elevada carga positiva, diminuindo a sua solubilidade. Neste caso, os eritrócitos sofrem alterações morfológicas, sendo observadas células em alvo ou “target cells” no esfregaço de sangue periférico. ⁽⁷⁾

. Talassemias

As síndromes talassémicas têm origem em alterações quantitativas caracterizadas pela diminuição ou ausência da síntese de uma das cadeias de globina. Para compensar este défice, geralmente há um aumento da síntese de outras cadeias para se formar o tetrâmero. Nas β -talassemias há uma redução de síntese das cadeias β , sendo substituídas pelas cadeias δ que formam a HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), levando assim a um aumento da HbA₂. Nas α -talassemias há uma diminuição da síntese das cadeias α , que afeta todas as frações da hemoglobina (A, A₂ e F). ⁽⁷⁾

Entre os tipos de Hb referidos, o doseamento de HbA₂ é o mais pedido no laboratório, essencial ao diagnóstico definitivo de β -talassemia ou à sua exclusão.

No laboratório, o doseamento de alguns tipos de hemoglobina (HbA, HbA₂, HbF, HbS/C) é realizado no equipamento ADAMS AIC HA-8180, através de Cromatografia Líquida de Alta Precisão (HPLC). O equipamento fornece um cromatograma onde podemos analisar as várias frações de hemoglobina existentes nas amostras.

Nos casos de deteção das variantes HbS/C, são necessários estudos mais específicos para a sua distinção que não são realizados neste laboratório, sendo necessário enviar as amostras para outros laboratórios. Esta técnica é também utilizada para o doseamento da

hemoglobina glicada A_{1c} (HbA_{1c}), referida mais à frente na secção da Bioquímica (Avaliação das Alterações no Metabolismo dos Hidratos de Carbono).

4.6 Hemostase – Estudo Laboratorial

A hemostase diz respeito ao conjunto de mecanismos biológicos que permitem a manutenção da fluidez do sangue no sistema vascular, assegurando a prevenção e reparação de hemorragias resultantes de lesões nos vasos. O processo de hemostase engloba 4 acontecimentos principais que ocorrem continuamente no tempo: resposta vascular, formação de um trombo plaquetário, formação do coágulo de fibrina e fibrinólise.

Qualquer lesão vascular causa uma contração reflexa do vaso afetado, o que leva a uma diminuição do fluxo sanguíneo. Seguidamente, as plaquetas circulantes aderem ao colagénio exposto através do fator von Willebrand (FvW), libertado pelas células endoteliais, ativando-as. Em consequência desta ativação as plaquetas libertam substâncias químicas, tais como adenosina difosfato (ADP) e tromboxano A₂, este último, um potente vasoconstritor e agente agregante, que estimulam a ativação de mais plaquetas. Para além destas substâncias, também são libertados recetores que se ligam ao fibrinogénio circulante, mediando a agregação plaquetária e a formação do trombo plaquetário. Posteriormente, entram em ação os fatores de coagulação que promovem a formação da rede de fibrina pelo processo de coagulação.⁽⁸⁾

. A Coagulação Sanguínea

O processo de coagulação culmina na conversão de protrombina em trombina, desencadeando a formação de fibrina a partir do fibrinogénio. Classicamente são descritas duas vias de ativação da trombina: a via extrínseca e a via intrínseca. Estas duas vias diferem apenas nos mecanismos pelos quais são ativadas. O processo de coagulação encontra-se esquematizado na figura 3.

No caso da via extrínseca, esta é desencadeada pela libertação do fator tecidual ou tromboplastina pelo endotélio vascular que, na presença de iões cálcio, forma um complexo com o fator VII plasmático, resultando na ativação do factor X. Por outro lado, a via intrínseca é desencadeada pela ativação de substâncias intrínsecas do sangue. Devido à lesão vascular, o fator XII liga-se ao colagénio exposto, estimulando a ativação dos fatores XI e IX. O fator IX ativado liga-se ao fator VII, aos fosfolípidos das plaquetas e aos iões cálcio para ativar o fator X. A partir da ativação do fator X ambas as vias convergem numa via comum: o fator X juntamente com o fator V, fosfolípidos plaquetários e iões cálcio, medeiam a

formação de trombina e a conversão de fibrinogénio em fibrina, formando o coágulo. Para assegurar que o efeito da trombina seja limitado ao local da lesão do vaso sanguíneo existem inibidores circulantes que regulam o processo de coagulação, nomeadamente, a antitrombina, a proteína C e proteína S. Poucos dias após formação do coágulo, ocorre a remoção deste trombo pelo processo de fibrinólise e a normal circulação sanguínea é restabelecida. ⁽⁸⁾

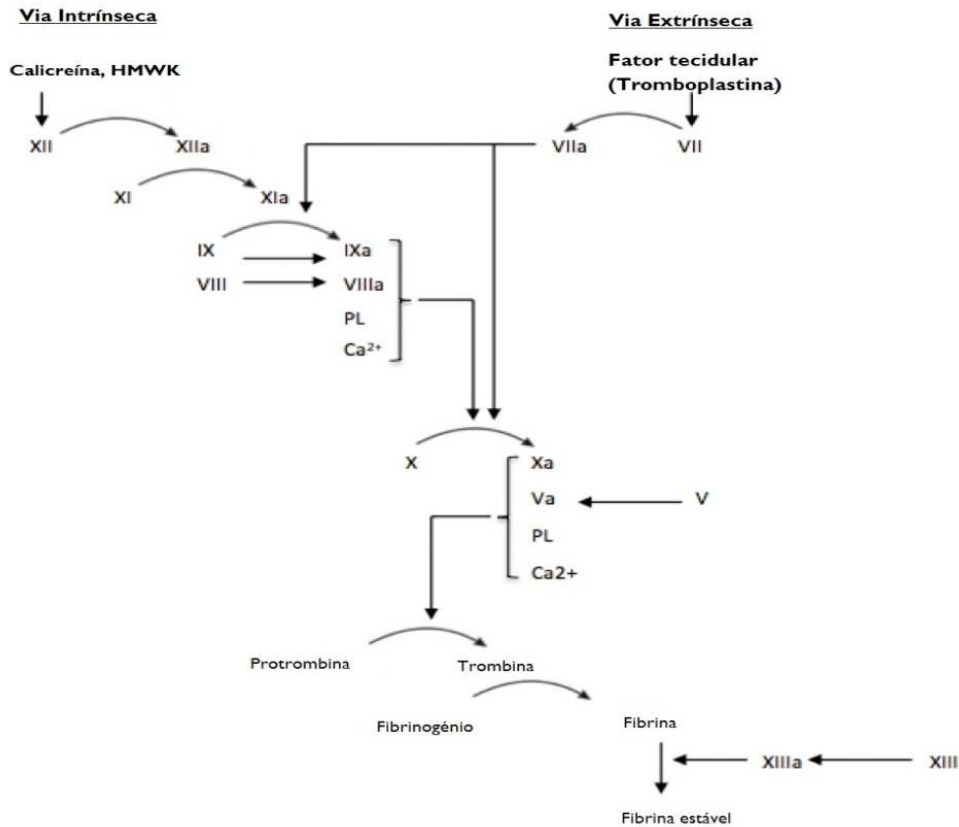


Figura 3 - Esquema representativo do processo clássico de coagulação sanguínea, incluindo as vias intrínseca e extrínseca.

. A Fibrinólise

A principal reação da fibrinólise é a conversão de plasminogénio em plasmina, enzima que hidrolisa a fibrina. Fatores como a trombina, fator XII, ativador do plasminogénio tecidual (t-PA) e a uroquinase são ativadores do processo de fibrinólise, promovendo a dissolução do coágulo e a restauração do fluxo sanguíneo. Por outro lado, este processo é regulado pelo inibidor do ativador do plasminogénio (PAI), α_2 - antiplasmina e α_2 - microglobulina, dois inibidores da plasmina.

Num indivíduo saudável, o mecanismo fisiológico da hemostase mantém-se num equilíbrio dinâmico pelo controlo permanente dos mecanismos ativadores e inibidores da coagulação. No entanto, quando esse equilíbrio é alterado por variação qualitativa ou quantitativa dos componentes acima referidos, há risco de desenvolvimento de doença hemorrágica ou trombótica.⁽⁸⁾

. Testes Laboratoriais para Avaliação da Hemostase

Para uma correta avaliação da hemostase deve ser realizada não só a contagem de plaquetas, como também o estudo do processo de coagulação sanguínea, nomeadamente, a via extrínseca, a via intrínseca e a conversão do fibrinogénio em fibrina.

Contagem de plaquetas

É efetuada no equipamento automático durante a realização do hemograma, como referido anteriormente, e é realizada em diversas situações, tais como estados pré-operatórios, indivíduos com problemas hemorrágicos e doentes sujeitos a tratamento com citostáticos e/ou radioterapia. Paralelamente, é importante a observação do esfregaço sanguíneo para avaliar a morfologia plaquetar.

Avaliação Global da Coagulação

No laboratório, a avaliação da coagulação sanguínea baseia-se na realização de duas provas: i) *determinação do tempo de protrombina (TP)* e ii) *determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)*, complementadas pelo iii) *doseamento do Fibrinogénio (Fib)*. Estas determinações são efetuadas no equipamento automático através de técnicas coagulométricas (turbidimetria). Para as provas de coagulação, a amostra de sangue total é colhida em tubo com o anticoagulante citrato de sódio (3,8%), numa proporção de 1/9 com o sangue. Este anticoagulante forma complexos insolúveis com os iões cálcio e protege alguns pro-coagulantes (protrombina e fator VIII).

Tempo de Protrombina (TP)

O tempo de protrombina (TP) corresponde ao tempo de coagulação de um plasma citratado e pobre em plaquetas, na presença de excesso de tromboplastina e cálcio. Os resultados são expressos em segundos, sendo o valor de referência entre 12-16s. Este parâmetro avalia a via extrínseca bem como a subsequente via comum. Neste sentido, reflete alterações em três dos fatores dependentes da vitamina K (II, VII e X), do fibrinogénio e do factor V.

O TP é utilizado no diagnóstico de deficiências congénitas e adquiridas de fatores de coagulação, no controlo da atividade de síntese hepática e na monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais, nomeadamente, a varfarina. Este parâmetro está aumentado em doenças hepáticas, deficiência de vitamina K e na coagulação intravascular disseminada. ⁽⁸⁾

No sentido de uniformizar os resultados dos diferentes testes que avaliam o tempo de protrombina, eliminando os fatores de variação relacionados com os reagentes e as técnicas usadas, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs que a tromboplastina fosse padronizada através do Índice de Sensibilidade Internacional (ISI), que é fornecido pelo fabricante de tromboplastina. Após a determinação do ISI da tromboplastina, os resultados podem ser referidos como *International Normalized Ratio* (INR). O tempo de protrombina é convertido em INR pela seguinte fórmula:

$$INR = (TP_{Amostra} / TP_{Controlo})^{ISI}$$

Os valores de referência para o INR são de 0,9 a 1,2. Na monitorização da terapêutica anticoagulante, este valor deve variar entre 2 e 3, sendo sempre estabelecido pelo médico. Valores de INR elevados estão associados a maior risco de hemorragia, enquanto valores de INR abaixo do estabelecido pode aumentar o risco de AVC. ⁽⁸⁾

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa)

O tempo de tromboplastina parcial ativada avalia a via intrínseca (fatores XII, XI, IX e VIII), a via comum (fatores X, V) e o fibrinogénio. Ao plasma citratado e pobre em plaquetas são adicionados fosfolípidos pró-coagulantes, um ativador por contacto e cálcio. O tempo de coagulação do plasma corresponde ao TTPa, expresso em segundos, e os valores de referência encontram-se entre 30-40s. Este parâmetro é muito utilizado na monitorização terapêutica com heparina.

No laboratório, quando são verificados aumentos no TP ou no TTPa sem históricos anteriores do doente, recorre-se ao teste de mistura para verificar se há uma deficiência de fatores. Este teste consiste na adição de um plasma com valores de TP e TTPa normais, numa proporção 50:50, ao plasma do doente. Se, após a adição, o TP for corrigido, verifica-se deficiência em fatores. Se não for observada correção ou se esta for incompleta, suspeita-se da presença de um inibidor da coagulação (antitrombina, proteína C, proteína S). ⁽⁸⁾

Doseamento do Fibrinogénio

O doseamento do fibrinogénio é feito no sistema ACL TOP 500, através de uma derivação do cálculo do TP, em que o tempo de coagulação da amostra é inversamente proporcional ao nível de fibrinogénio.

Este doseamento é efetuado pela avaliação da taxa de aumento da turbidez obtida durante a determinação do TP da amostra, que é diretamente proporcional à concentração de fibrinogénio no plasma. Sempre que os valores se encontram fora do intervalo de referência, as amostras são automaticamente processadas com recurso ao método de referência - método de Clauss. Neste método, o plasma é levado a coagular com a adição de um excesso de trombina, sendo o tempo de coagulação inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio plasmático. O tempo de coagulação obtido é comparado posteriormente com o de uma preparação de fibrinogénio padrão.

Os valores de referência para este parâmetro são 150 a 350 mg/dl. Concentrações elevadas de fibrinogénio estão associados a um aumento do risco trombótico, enquanto teores baixos podem ocorrer em hepatopatias ou coagulação Intravascular disseminada (CID). Como o fibrinogénio é uma proteína de fase aguda, está frequentemente elevado durante os processos inflamatórios. ⁽⁸⁾

D-Dímeros

Os D-dímeros são produtos de degradação específicos do coágulo de fibrina estabilizado. São criados pela ação do fator XIII sobre a fibrina na presença de cálcio. Os D-dímeros não estão presentes na estrutura original do fibrinogénio nem nos seus produtos de degradação, o que os torna um bom indicador do risco de trombose e monitorização de terapêutica trombolítica. Níveis elevados deste parâmetro constituem um indicador direto da atividade fibrinolítica e indireto da formação de um coágulo, sendo particularmente importante para excluir o diagnóstico de trombose venosa profunda e embolia pulmonar. ⁽¹¹⁾

5. Bioquímica

5.1 Metodologias Gerais e Instrumentação

No Laboratório de Patologia Clínica do CHA-Unidade de Portimão as análises bioquímicas são realizadas no equipamento automático Cobas 6000, da Roche. Este equipamento é constituído por dois módulos, o *c501*, responsável pela determinação dos parâmetros bioquímicos e o *e601*, onde são doseados parâmetros imunológicos. No módulo

c501 são realizadas diversas metodologias que incluem reações colorimétricas, enzimáticas, de oxidação-redução, cujos princípios gerais de leitura englobam, essencialmente:

- i) **Espectrofotometria** - é definida como uma medida da intensidade da luz a um determinado comprimento de onda e baseia-se na capacidade de absorção da radiação. Nos métodos espectrofotométricos, a amostra contendo o analito em estudo é misturada com um reagente líquido, cuja reação resulta na formação de um complexo corado que medeia a alteração na absorvância, detetada por um fotodetector. A absorvância detetada é proporcional à concentração do analito presente na amostra em estudo. Normalmente, uma amostra mais concentrada produz um complexo de cor mais intensa, fazendo com que a quantidade de luz que atravessa o fotodetector seja menor. ⁽¹²⁾
- ii) **Turbidimetria** - consiste numa medida da diminuição da intensidade da luz incidente causada pela dispersão, reflexão e absorção de um feixe luminoso com uma determinada intensidade. O detetador está alinhado com o feixe de luz incidente e a quantidade de luz detetada diminui à medida que a turbidez do meio aumenta. O aumento da turbidez está relacionado com o aumento do número de partículas em suspensão. Assim, a concentração do analito presente na amostra em estudo é tanto maior quanto menor for a quantidade de luz medida. A turbidimetria pode ser utilizada no doseamento de proteínas específicas através de uma reação de imunoprecipitação (imunoturbidimetria), medindo a quantidade de luz que consegue atravessar a amostra, na presença de imunocomplexos. ⁽¹²⁾
- iii) **Potenciometria** - baseia-se na medição do potencial de um eléctrodo indicador em relação a um eléctrodo de referência. Este potencial depende das actividades das espécies iónicas que entram nas reações redox (de oxidação-redução) correspondentes e é expresso através da equação de Nernst. No âmbito das análises clínicas, o eléctrodo indicador utilizado é o eléctrodo seletivo de iões (ISE, do inglês, *ion-selective membrane electrode*), constituído por uma membrana com permeabilidade seletiva para os aniões ou catiões a analisar. ⁽¹³⁾

5.2 Avaliação do Equilíbrio Hidro-eletrolítico

. Ionograma

O ionograma consiste na determinação do Na^+ , K^+ e Cl^- , através de potenciometria indireta e permite uma avaliação parcial do equilíbrio eletrolítico do organismo. Estes iões

são essenciais para o equilíbrio hidro-eletrolítico extracelular e manutenção do potencial elétrico das membranas celulares, crucial para a fisiologia e actividade celular.

Sódio

O Na^+ é o catião extracelular mais abundante no organismo humano, tem um papel essencial na distribuição hídrica normal e na manutenção da pressão osmótica nos fluidos extracelulares. Os seus teores séricos são regulados pela reabsorção e excreção renal. O Na^+ é filtrado no glomérulo e 70-80% é reabsorvido nos túbulos proximais e ansa de Henle (20-25%), juntamente com o Cl^- e H_2O . Já no túbulo distal, a intervenção da aldosterona determina a reabsorção do restante Na^+ filtrado, de acordo com a necessidade do organismo, por troca com o K^+ , definindo a quantidade de Na^+ em termos finais, a ser excretado na urina.

O aumento de Na^+ designa-se hipernatrémia e pode estar associado a diversas patologias tais como, Síndrome de Cushing, desidratação grave ou diabetes insípida. Por outro lado, uma situação de hiponatrémia pode desencadear-se devido, por exemplo, ao uso excessivo de diuréticos, a perdas gastrointestinais, à acidose metabólica, doença de Addison ou patologia renal.⁽¹⁴⁾

Potássio

O K^+ é o principal catião intracelular, responsável pela contração muscular e manutenção do batimento cardíaco normal. A principal fonte de potássio é a dieta, pelo que diariamente são absorvidos no trato gastrointestinal 50-150 mmols deste ião, sendo o seu excesso excretado a nível renal. No rim, o K^+ filtrado é reabsorvido quase na sua totalidade nos túbulos proximais e é secretado nos túbulos distais por troca com o Na^+ , sob ação da aldosterona, que comanda o ajuste final da concentração extracelular de Na^+ .

Situações de hipercalemiemia (aumento da concentração sérica de potássio) levam a confusão mental, debilidade generalizada, diminuição da frequência cardíaca e eventual paragem, enquanto que a diminuição da concentração deste catião (hipocaliémia) causa debilidade muscular, irritabilidade e aceleração do batimento cardíaco. A hipocaliémia está associada, principalmente, a défice na dieta, à redistribuição do K^+ extracelular e ao aumento da perda de fluidos orgânicos ricos em potássio.⁽¹⁴⁾

Cloreto

O Cl^- é o principal anião extracelular, estando envolvido, juntamente com o Na^+ na manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico do espaço extracelular. A maioria do cloreto ingerido é absorvida no trato gastrointestinal, filtrado no glomérulo e posteriormente reabsorvido no túbulo proximal renal. Apenas o excesso é excretado na urina.

O aumento da concentração sérica de cloreto (hiperclorémia) ocorre em acidoses metabólicas associadas a diarreia prolongada e a perda de bicarbonato (HCO_3^-) ou ainda doença renal onde ocorre decréscimo de reabsorção de HCO_3^- . A diminuição da concentração sérica deste anião (hipoclorémia) está associada a situações de vômito prolongado com perda de HCl e acidose metabólica com hiato aniônico elevado. ⁽¹⁴⁾

. Osmolalidade

O cálculo da osmolalidade determina a concentração de solutos que contribuem para a pressão osmótica de uma solução. Deste modo, a osmolalidade no plasma é, geralmente determinada por cálculo, recorrendo à seguinte fórmula:

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

onde o fator 9 adicionado representa a contribuição de outras substâncias osmoticamente ativas no plasma, tais como o potássio, o cálcio, e as proteínas. A constante 1,86 reflete a contribuição do Cl^- associado ao Na^+ . ⁽¹⁴⁾ No laboratório, o cálculo da osmolalidade é realizado automaticamente, através do sistema informático.

5.3 Avaliação da Função Renal

Os rins desempenham um papel fundamental na regulação hidro-eletrólítica do organismo. A determinação de alguns parâmetros bioquímicos, nomeadamente, concentração sérica de creatinina, clearance da creatinina, concentração sérica de ureia e concentração sérica de ácido úrico, constituem uma ferramenta útil na avaliação e diagnóstico de alterações da função renal. Estes parâmetros são doseados através de métodos espectralométricos.

. Concentração Sérica da Creatinina e Clearance da Creatinina

A creatinina é o produto final do metabolismo da creatina, resultante do metabolismo muscular, sendo eliminada no sangue por filtração glomerular. A produção de creatinina é proporcional à massa muscular de um indivíduo, e a sua produção diária é relativamente

constante, exceto em casos de danos muscular extensos. Assim, uma redução da função renal, refletida no decréscimo da filtração glomerular pode levar ao aumento significativo dos teores de creatinina sérica. No entanto, trata-se de um parâmetro bioquímico pouco sensível, já que a concentração sérica da creatinina só aumenta quando a taxa de filtração glomerular diminui significativamente. A sua quantificação é utilizada, em particular, no diagnóstico e monitorização de doença renal aguda ou crónica e para o cálculo da clearance da creatinina, parâmetro bioquímico que é uma medida da Taxa de Filtração Glomerular (TFG).

A determinação da concentração sérica de creatinina é realizada através de um ensaio colorimétrico baseado no método Jaffé. Numa solução alcalina, a creatinina reage com picrato, formando um complexo amarelo-avermelhado, cuja taxa de formação, medida espectrofotometricamente, é proporcional à concentração de creatinina na amostra.

Através do doseamento de creatinina na urina de 24 h e no soro, é calculado o valor da clearance da creatinina, pela seguinte fórmula, onde Cr é a concentração de creatinina e Vol é o volume de urina de 24 h: ⁽¹¹⁾⁽¹⁵⁾

$$\text{Clearance da Creatinina (ml/min)} = (\text{Cr Urina/Cr Soro}) \times (\text{Vol (ml)/1440 min})$$

Este parâmetro, muito sensível da função glomerular, é influenciado pela massa muscular e, por isso, esta fórmula geralmente é corrigida com um fator relacionado com a área corporal.

De referir, ainda, que em substituição desta determinação experimental, na prática clínica são utilizadas, frequentemente, fórmulas de cálculo da TFG, como a de Cockcroft-Gault, com base na determinação sérica da creatinina e entrando em conta com o peso, a idade e o sexo do doente.

. Concentração Sérica de Ureia

A ureia é um metabolito resultante da degradação das proteínas e cerca de 90% deste metabolito é excretado do organismo a nível renal. Os homens apresentam valores de ureia mais elevados que as mulheres.

Em situações que levem a uma diminuição da TFG, a concentração sérica da ureia aumenta, sendo por esta razão utilizada como parâmetro de avaliação da função renal, juntamente com a determinação da creatinina, e por outro lado, no diagnóstico de doenças metabólicas do ciclo da ureia. As causas de hiperurémia podem ter diversas origens: i) pré-renal, como por exemplo, devido ao aumento do catabolismo proteico, estados de

desidratação; ii) renal, devido a glomerulonefrites ou necrose tubular; iii) pós-renal, devido a uma obstrução do trato urinário. ⁽¹¹⁾ No entanto, é de referir a falta de sensibilidade da concentração sérica de ureia, sendo de maior utilidade no diagnóstico e monitorização da doença renal aguda ou crónica, em conjunto com a creatinina.

O doseamento da ureia envolve a ação da urease e glutamato desidrogenase (GLDH). A ureia é hidrolisada pela urease, dando origem à amónia e ao carbonato. Numa segunda reação, o 2-cetoglutarato reage com a amónia na presença de GLDH e NADH, dando origem a L-glutamato. Nesta reação, 2 moles de NADH são oxidadas a NAD^+ por cada mole de ureia hidrolisada. A taxa de diminuição da concentração de NADH é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra, e é medida por absorção a 340 nm.

. Concentração Sérica de Ácido Úrico

O ácido úrico é um metabolito resultante do catabolismo das purinas, constituintes dos ácidos nucleicos. O ácido úrico é produzido no fígado, transportado para os rins onde é parcialmente reabsorvido e excretado na urina. Em situações de disfunção renal este metabolito pode acumular-se no sangue, e levar à formação de depósitos de cristais de urato nas articulações, gerando uma inflamação designada Gota, ou nos rins culminando na formação de cálculos renais.

O doseamento do ácido úrico é utilizado essencialmente no diagnóstico da gota, situação em que os teores séricos podem atingir valores bastante elevados. No entanto, estes teores estão também elevados sempre que aumenta o catabolismo das nucleoproteínas, como na leucemia e nos doentes sujeitos a quimioterapia ou radioterapia, ou se há uma diminuição da sua eliminação, sendo por esse motivo também de utilidade na avaliação da função renal.

A sua determinação baseia-se na reação da decomposição do ácido úrico pela uricase, donde resulta a formação de alantoína e peróxido de hidrogénio que, numa segunda reação, é quantificado pela reação com fenol e 4-aminofenazona, catalisada pela peroxidase, com formação de um composto corado, uma quinoneimina. A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de ácido úrico na amostra, sendo determinada espectrofotometricamente. ⁽¹⁵⁾

5.4 Avaliação da Função Hepática

O fígado está envolvido em varias funções essenciais, desde síntese de proteínas plasmáticas, factores de coagulação, produção e armazenamento de aminoácidos, hidratos de

carbono, lípidos, vitaminas e minerais. É também o principal local de desintoxicação de componentes exógenos, tais como fármacos e toxinas, e do catabolismo de várias hormonas, ajudando a regular os níveis hormonais plasmáticos.

Outras funções importantes do fígado são a conjugação da bilirrubina com o ácido glicurónico e a síntese de ácidos biliares, os quais regulam o metabolismo do colesterol e facilitam a absorção das gorduras provenientes da dieta. Qualquer lesão hepática que cause alteração da permeabilidade e necrose dos hepatócitos, causa libertação de várias enzimas, cuja medição no soro permite avaliar a extensão do dano hepático e diferenciar a sua origem, entre patologia hepatocelular e obstrutiva.

. Bilirrubina Direta e Bilirrubina Total

Após o seu ciclo de vida média, os eritrócitos são degradados no sistema reticuloendotelial, principalmente no baço. O grupo heme resultante, assim que o ferro é removido, é convertido em bilirrubina. Deste processo resulta aproximadamente 80% da bilirrubina produzida diariamente no organismo. As outras fontes de bilirrubina incluem a decomposição de mioglobina e citocromos e o catabolismo de eritrócitos imaturos na medula óssea.

Uma vez produzida, a bilirrubina é transportada para o fígado, ligada à albumina, e esta fracção é denominada bilirrubina indireta ou não-conjugada. Nos hepatócitos, a bilirrubina é conjugada com o ácido glicurónico, formando a bilirrubina conjugada ou bilirrubina direta, que é excretada através do sistema biliar para o intestino, onde é metabolizada pelas bactérias a vários compostos coletivamente conhecidos como urobilinogénio. A sua eliminação é quase completa e os níveis séricos são geralmente insignificantes. A bilirrubina direta é a soma das fracções conjugadas, enquanto a bilirrubina total é a soma das fracções não-conjugadas e conjugadas. O doseamento das concentrações séricas das duas fracções ajuda no diagnóstico diferencial da icterícia. A icterícia pode resultar de hiperbilirrubinémia não conjugada ou conjugada. Entre as causas de hiperbilirrubinémia não-conjugada estão a hemólise excessiva e a deficiência na conjugação hepática com ácido glicurónico. A hiperbilirrubinémia conjugada, pode ter origem hepática ou pós-hepática, sendo que nestas situações há, normalmente, obstrução do sistema biliar, quer intra, quer extra-hepático, originando icterícia obstrutiva.

A determinação da bilirrubina é baseada na reacção com um sal de diazónio, o ácido sulfanílico diazotado, que leva à formação de azobilirrubina, um composto corado, cuja absorvância é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina na amostra. A fracção

conjugada reage diretamente (bilirrubina direta), mas a fração não conjugada (bilirrubina indireta) requer um adjuvante. Assim, na presença deste determina-se a bilirrubina total, sendo a bilirrubina indireta calculada pela diferença entre a bilirrubina total e a direta.^{(11) (17)}

. Aminotransferases

As aminotransferases são enzimas que catalisam a transferência do grupo amina de um aminoácido para um ácido α -cetônico. As duas enzimas determinadas mais frequentemente são a Alanina Aminotransferase (ALT) e a Aspartato Aminotransferase (AST). Ambas são enzimas intracelulares e o seu aumento no soro resulta da sua libertação para a corrente sanguínea em consequência de necrose celular.

A AST está presente em vários tecidos, como o coração, fígado, músculo esquelético, rim e células hematopoiéticas, enquanto a ALT se encontra especialmente no fígado, pelo que é considerada um indicador mais específico do que a AST para doenças hepáticas. Concentrações séricas elevadas destas enzimas refletem situações de lesão hepatocelular, nomeadamente, em casos de hepatite ou cirrose hepática. A determinação individual das atividades enzimáticas da ALT e da AST é baseada em reações catalisadas pelas mesmas, onde NADH é oxidado formando-se NAD^+ . A reacção é monitorizada medindo o decréscimo da absorvância a 340 nm, devido à oxidação do NADH.⁽¹¹⁾

. Fosfatase Alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima que catalisa a hidrólise de monoésteres de fosfato, em pH alcalino. Está presente na maioria dos tecidos, em maior quantidade no osso, fígado, intestino e rins, especialmente nas membranas celulares, o que sugere a sua intervenção no transporte de metabolitos através das membranas. Uma variedade de processos patológicos pode resultar na libertação de quantidades elevadas de ALP no sangue como, por exemplo, a obstrução do trato biliar, crescimento ósseo, doença de Paget e Mieloma Múltiplo.

A atividade enzimática da fosfatase alcalina é determinada através de uma reacção de hidrólise de *p*-nitrofenil fosfato, um composto descorado que, pela ação dessa enzima, liberta o fosfato inorgânico e o *p*-nitrofenol, que sofre um rearranjo a pH alcalino formando a respetiva forma quinónica, corada. A absorvância do composto corado é diretamente proporcional a atividade da fosfatase alcalina presente na amostra.⁽¹¹⁾

. Gama-Glutamil Transferase (GTT)

A γ -glutamil transferase (GGT) é uma enzima que catalisa a transferência de grupos glutamil entre aminoácidos. Encontra-se sobretudo no rim, mas também no pâncreas, fígado, baço e intestino delgado. Embora o rim apresente o nível mais elevado de GGT, a enzima presente no soro parece ter origem, sobretudo no sistema hepatobiliar, apresentando-se elevada em muitas formas de doença hepática.

O aumento dos teores de GGT é identificado mais precocemente e é mais acentuado relativamente a outras enzimas hepáticas, em casos de obstrução hepatobiliar, e por este motivo a GGT é considerada um indicador sensível para estas doenças, juntamente com a ALP. O consumo de álcool também estimula a síntese de GGT e por isso o seu doseamento é útil para detetar casos de hepatopatia alcoólica.

A determinação da atividade desta enzima tem por base uma reação catalisada pela própria, na qual o grupo γ -glutamil é transferido do substrato γ -glutamil-3-carboxi-1,4-fenilenodiamina para o aceitador glicilglicina, originando o 3-carboxi-1,4-fenilenodiamina e o γ -glutamilglicina. Numa segunda reação, o hexacianoferrato de potássio oxida a 3-carboxi-1,4-fenilenodiamina a uma substância azul-esverdeada na presença de ácido N-metilantranílico, detetada espectralmente. ⁽¹¹⁾

5.5 Avaliação de Alterações do Metabolismo dos Hidratos de Carbono

. Glicémia e Glicosúria

A oxidação da glicose constitui a principal fonte de energia do organismo. A glicose proveniente da dieta é convertida em glicogénio, para armazenamento no fígado, ou em ácidos gordos, para armazenamento no tecido adiposo. A glicémia é controlada por várias hormonas, sendo as mais importantes de origem pancreática, nomeadamente: insulina, glucagon e somatostatina.

A glicose é doseada em amostras de soro ou urina através de espectralmetria pelo método enzimático de referência com hexoquinase. A hexoquinase catalisa a fosforilação da glicose a glucose-6-fosfato, mediada por ATP, que numa segunda reação, catalizada pela glucose-6-fosfato-desidrogenase e na presença de NADP, vai ser oxidado a gliconato-6-fosfato. Trata-se de uma metodologia específica da glicose, sendo a taxa de formação de NADPH durante a reação diretamente proporcional à sua concentração na amostra. ⁽¹⁶⁾

No laboratório, a determinação da glicémia em conjunto com a determinação da hemoglobina glicada (HbA_{1c}) é utilizada principalmente como auxiliar no diagnóstico e na monitorização do tratamento de diabetes. O diagnóstico da diabetes pode ser feito através

de duas provas: a glicémia em jejum e a prova de tolerância à glicose oral (PTGO). Esta prova consiste em analisar a glicémia em jejum e após a ingestão de uma solução de 200 mL com 75g de glicose.

Para além da diabetes, outras causas estão associadas ao aumento da glicémia, nomeadamente pancreatite, disfunção da tiróide, insuficiência renal e hepatopatias. A diminuição da glicémia, é observada com menor frequência e pode surgir em virtude de terapêuticas com dose excessiva de insulina, hepatopatias ou insuficiências endócrinas.

A determinação qualitativa ou semi-qualitativa da glicose na urina pode ser útil no despiste e na monitorização da diabetes mellitus e como auxiliar na avaliação da glicosúria, para detetar defeitos tubulares renais.⁽¹¹⁾

. Hemoglobina A_{1c}

A hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}, ou hemoglobina glicada) corresponde a uma molécula de hemoglobina ligada covalentemente a uma molécula de glicose. A hemoglobina é glicada espontaneamente na circulação, sendo formada em maior quantidade em situações de hiperglicémia. O doseamento da HbA_{1c} é utilizado no controlo a longo prazo da glicémia, permitindo uma visão retrospectiva dos níveis de glicémia nos 3 meses anteriores à análise, devido ao tempo de vida média dos eritrócitos. Neste laboratório, a HbA_{1c} é determinada na secção de Hematologia, em sangue total, no aparelho da *Arkray, Adams A1C – HA-8160*, já referido no capítulo de Hematologia, através de cromatografia líquida de alta precisão (HPLC).⁽¹¹⁾

5.6 Avaliação de Alterações do Metabolismo do Ferro

O ferro é um elemento essencial à maioria das células do organismo, participando como cofator no transporte de oxigénio, síntese de DNA e metabolismo energético.

A maior parte do ferro provém da dieta, sendo consumido no estado férrico (Fe³⁺) e convertido na forma ferrosa (Fe²⁺), após a ingestão. A absorção do ferro ocorre sobretudo no duodeno e no jejuno superior, sendo esta a principal forma de regulação da homeostasia deste ião, dado que o organismo não possui mecanismos eficazes para excretar este metal. O ferro é absorvido na forma de ferro ferroso (Fe²⁺), circula no sangue ligado à transferrina na forma férrica (Fe³⁺) sendo transportado até à medula óssea, onde os precursores eritróides incorporam o ferro necessário para a síntese de hemoglobina, sendo o restante armazenado sob a forma de ferritina e de hemossiderina nas células do sistema reticuloendotelial do fígado, baço e medula óssea. A avaliação do metabolismo do ferro é

utilizada principalmente como auxiliar no diagnóstico diferencial de anemias, alterações no metabolismo do ferro e na monitorização da terapêutica com ferro e inclui, geralmente, as determinações a seguir indicadas.⁽¹⁷⁾

. Ferro Sérico

O doseamento do Ferro é realizado através de um ensaio colorimétrico baseado no método FerroZine sem desproteinização. Neste método, o ferro é libertado da transferrina em condições ácidas. O ascorbato reduz os iões Fe^{3+} libertados a iões Fe^{2+} que, posteriormente, reagem com FerroZine, um conhecido ligando deste catião, formando um complexo corado. A intensidade da cor é determinada espectrofotometricamente e é diretamente proporcional à concentração de ferro na amostra.⁽¹¹⁾

. Transferrina

Em condições normais, apenas 30% da transferrina plasmática está ligada ao ferro, mas em situações patológicas, a capacidade de ligação pode ser ultrapassada e o ferro pode aparecer no plasma na sua forma livre, tornando-se tóxico para os tecidos.

O doseamento da transferrina é realizado através de um ensaio imunoturbidimétrico, onde a transferrina forma um precipitado com um anticorpo específico, que é determinado turbidimetricamente. Outro parâmetro que pode ser calculado é a percentagem de saturação da transferrina, ou seja, a quantidade de ferro que se encontra ligado à transferrina, através da fórmula abaixo indicada, onde TIBC é a capacidade total de fixação do ferro, a seguir referida:⁽¹¹⁾

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

. Capacidade Total de Fixação do Ferro (TIBC)

A Capacidade Total de Fixação de Ferro (TIBC – *Total Iron Binding Capacity*) avalia a capacidade de ligação ao ferro pela transferrina. Para a determinação do TIBC, é adicionado à amostra ferro em excesso (Fe^{3+}), de modo a saturar todos os locais de ligação da transferrina, sendo o ferro livre removido previamente. Deste modo, a capacidade de total de ligação da transferrina ao ferro é avaliada pela quantidade de ferro total ligado. Os valores de TIBC tendem a diminuir com o aumento da idade, doenças crónicas e desnutrição, enquanto que em casos de deficiência de ferro, nomeadamente, na anemia ferropénica e na gravidez os valores de TIBC são caracteristicamente elevados.

A diferença entre o valor de TIBC e a quantidade de ferro existente no soro (sideremia) permite obter o valor da capacidade latente de fixação de ferro (UIBC – *Unsaturated Iron Binding Capacity*). ⁽¹¹⁾⁽¹⁷⁾

. Ferritina

O doseamento da Ferritina é utilizado como indicador das reservas de ferro, uma vez que a sua concentração sérica está em equilíbrio com o ferro depositado nos tecidos. A ferritina é doseada através de um ensaio imunoturbidimétrico no qual a ferritina é aglutinada por partículas de látex revestidas com anticorpos anti-ferritina. O precipitado resultante é determinado turbidimetricamente. ⁽¹¹⁾

Na tabela seguinte encontram-se as principais patologias associadas a alterações séricas de ferro, transferrina e ferritina.

Tabela 3 - Patologias associadas a alterações no metabolismo do ferro.

Parâmetro	Patologias Associadas	
Ferro	Aumento	Hemocromatose; hepatopatias; terapêuticas com ferro
	Diminuição	Deficiência de ferro devido a má absorção gastrointestinal; dieta pobre; hemorragias.
Transferrina	Aumento	Deficiência de ferro
	Diminuição	Patologia hepática crônica; síndrome nefrótico; excesso de ferro devido a transfusões múltiplas ou Hemocromatose.
Ferritina	Aumento	Anemia hemolítica, Hemocromatose
	Diminuição	Deficiência de ferro, anemia ferropénica.

5.7 Metabolismo Ósseo e Mineral

. Cálcio

A homeostase do cálcio (Ca^{2+}) é um dos mecanismos mais controlados do organismo. Este ião tem um papel crucial no processo de sinalização intracelular, na membrana plasmática das células e no controlo da função de proteínas extracelulares, nomeadamente no processo de coagulação. O cálcio extracelular está intimamente relacionado com o fósforo e, em menor extensão, com o magnésio.

A maior parte do cálcio existente no organismo (cerca de 99%) encontra-se no osso e o restante na circulação sanguínea, essencialmente sob duas formas: na forma livre ou ligado a proteínas, principalmente à albumina. Este íão é responsável pela redução da excitabilidade neuromuscular, ativação do processo de coagulação sanguínea e de algumas enzimas que participam na formação óssea. A concentração de cálcio sérico (calcémia) é regulada pela ação da paratormona (PTH), da vitamina D e da calcitonina.

Um desequilíbrio de qualquer um destes reguladores conduz a alterações dos teores de cálcio, levando ao aumento da sua concentração sérica (hipercalcémia) ou, por outro lado, a uma diminuição (hipocalcémia).

Este parâmetro é determinado através da reação dos íões de cálcio com 5-nitro-5'-metil-BAPTA (NM-BAPTA) em condições alcalinas, formando um complexo. Este complexo reage numa segunda etapa com EDTA, levando a uma alteração da absorvância que é diretamente proporcional à concentração de cálcio, medida espectrofotometricamente. ⁽¹⁸⁾

. Fosfato

Cerca de 80 a 85 % do fósforo do organismo está presente na matriz óssea, sob a forma de hidroxiapatite, enquanto o restante encontra-se sob a forma de fosfato inorgânico e ésteres de fosfato, envolvidos no metabolismo intermédio dos hidratos de carbono, e na constituição estrutural de fosfolípidos, ácidos nucleicos e ATP.

O cálcio e o fosfato séricos apresentam, geralmente, uma relação de reciprocidade, sendo que quando os teores de cálcio diminuem, os de fosfato aumentam e vice-versa. Este mecanismo é influenciado por interações entre a PTH e a vitamina D.

O doseamento do fosfato baseia-se na clássica reação da formação de um complexo entre o fosfato inorgânico e o molibdato de amónio, na presença de ácido sulfúrico, de onde resulta a formação de fosfomolibdato de amónio $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$. A concentração de fosfomolibdato formado é diretamente proporcional à concentração de fosfato inorgânico e é medida espectrofotometricamente. ⁽¹⁸⁾

. Magnésio

O magnésio é o quarto catião mais abundante do organismo, tem funções essenciais a diversos processos bioquímicos, nomeadamente um papel estrutural nos ácidos nucleicos e ribossomas, é cofator de várias enzimas, sobretudo as que convertem energia para a função muscular, e participa na fosforilação oxidativa para a produção de energia.

Este íão é importante na estrutura óssea, onde mais de 50% do magnésio do organismo está complexado com o cálcio e o fosfato e o restante nos tecidos moles. Apenas cerca de 1% do magnésio total se encontra na circulação, principalmente ligado à albumina. O teor sérico de Mg^{2+} é mantido constante dentro de limites muito estreitos e a sua regulação tem lugar principalmente por via renal, especialmente através da ansa ascendente de Henle.

Este parâmetro é determinado através da reação do magnésio com o azul de xilidilo, um sal diazónio, numa solução alcalina contendo EGTA, para mascarar o cálcio na amostra. O íão magnésio forma um complexo púrpura com o azul de xilidilo, e a sua concentração é medida espectrofotometricamente, através da diminuição da absorção do azul de xilidilo. ⁽¹⁸⁾

Na tabela 4, encontram-se as patologias associadas a aumentos ou diminuições séricas dos valores de cálcio, fósforo e magnésio.

Tabela 4 - Alterações séricas de cálcio, fosfato e magnésio e as principais patologias associadas.

Parâmetro	Alteração Sérica	Patologias Associadas
Cálcio	Aumentado	Hiperparatiroidismo; aumento Vit. D; Mieloma Múltiplo e outras neoplasias;
	Diminuído	Hipoparatiroidismo; deficiência de Vit. D; hipoalbuminémia; síndrome nefrótico;
Fósforo	Aumentado	Doença renal crónica ou aguda; hipoparatiroidismo; hemólise intravascular; acromegália;
	Diminuído	Raquitismo (deficiência de Vit.D); hiperparatiroidismo;
Magnésio	Aumentado	Insuficiência renal glomerular; rabdomiólise; terapêuticas com magnésio;
	Diminuído	Perturbação da função neuromuscular; diarreia prolongada; síndromes de má absorção; perda renal; terapêutica diurética;

5.8 Avaliação da Função Muscular

No laboratório de análises clínicas a função muscular é avaliada através do doseamento de várias enzimas que se encontram normalmente no interior das células. Deste modo, a presença de quantidades elevadas de determinadas enzimas no soro ou plasma são clinicamente informativas de lesões tecidulares. O doseamento destes marcadores é efetuado em amostras de soro através de espectrofotometria.

. Creatina Cinase (CK)

A creatina cinase (CK) ou creatina Fosfocinase (CPK) catalisa a transferência, reversível, de um grupo fosfato da creatina-fosfato para a adenosina difosfato (ADP). Desta forma, há formação de creatina e adenosina trifosfato (ATP), utilizada no metabolismo energético das células. Esta enzima está presente em elevada quantidade no músculo-esquelético, no miocárdio e no cérebro. A CK é uma molécula dimérica constituída pelas subunidades, M e B, que estão na origem de três isoenzimas, presentes em diferentes proporções em diferentes tecidos: CK-MM (maioritariamente no músculo esquelético), a CK-BB (cérebro) e CK-MB (essencialmente no miocárdio). Em consequência de isquemia, lesão ou inflamação muscular, a CK é libertada na circulação em grandes quantidades o que torna esta enzima um bom indicador de lesões musculares ou cardíacas. O aparecimento de CK-MB no soro sugere a sua libertação do miocárdio, e a sua determinação em conjunto com a da troponina T e, eventualmente, da mioglobina é utilizada para o diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio.

Outras situações em que se verifica o aumento dos valores séricos de CK são as distrofias musculares, tais como a distrofia de Duchenne, a miosite, a polimiosite ou ainda em indivíduos saudáveis em consequência da prática de exercício físico intenso. Por outro lado, níveis séricos baixos estão associados a indivíduos com baixos índices de massa muscular.

Na determinação da atividade enzimática da CK sérica, recorre-se à reação catalizada por esta, em que um grupo fosfato da creatina fosfato é transferido para o ADP. O ATP produzido é usado para fosforilar a glucose, numa segunda reação catalisada pela hexocinase, formando glicose-6-fosfato, que, por sua vez, é oxidada pela glicose-6-fosfato desidrogenase com a consequente redução de NADP^+ a NADPH. O aumento da formação de NADPH é medido espectrofotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade de CK na amostra.

A determinação da atividade enzimática da isoenzima CK-MB baseia-se numa reação semelhante, com a adição de uma mistura de anticorpos monoclonais que inibem a atividade da CK-MM e metade da atividade da CK-MB, uma vez que inibe a subunidade M mas não a B. A atividade da CK-MB é obtida multiplicando a atividade da CKB por dois. ⁽¹¹⁾

. Lactato Desidrogenase

A lactato desidrogenase (LD ou LDH) é uma enzima presente na maioria dos tecidos, como o coração, pulmão, fígado, rim e músculo esquelético. Catalisa a conversão reversível

do lactato em piruvato, utilizando NAD^+ como cofator. A LDH é uma molécula tetramérica, constituída por 4 subunidades de duas formas possíveis (H e M), formando 5 isoenzimas designadas de LD1 (H4) a LD5 (M4), específicas de determinados tecidos: as LD1 e LD2 encontram-se, essencialmente, no músculo cardíaco e eritrócitos, enquanto a LD5 se encontra elevada no músculo esquelético e no fígado.

No laboratório, faz-se a determinação da atividade total da LDH no soro. O aumento do seu valor sérico surge em consequência de qualquer estado patológico em que ocorra destruição celular, como enfarte do miocárdio, hemólise (anemia hemolítica), hepatopatias, lesões musculares, sendo por isso considerada uma determinação pouco específica.

A atividade da LDH é determinada através da reação que catalisa entre o piruvato e o NADH com formação de L-lactato e NAD^+ . A velocidade inicial de oxidação do NADH é diretamente proporcional à atividade catalítica da LDH, determinada espectrofotometricamente pelo decréscimo da absorvância a 340 nm. ⁽¹¹⁾

. Troponina

A Troponina é constituída por um complexo de três proteínas, a troponina C, a troponina T e a troponina I, envolvidas no processo de contração do músculo esquelético e cardíaco.

Nas células do miocárdio estão presentes isoformas específicas de troponina I (cTnI) e T (cTnT), que são libertadas na circulação sanguínea em consequência de lesões dos cardiomiócitos e, por este motivo, as suas concentrações séricas são utilizadas como marcadores no diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio, juntamente com a determinação de outros parâmetros bioquímicos, como a da CK-MB. Neste laboratório, é realizado o doseamento da isoforma troponina T (cTnT), em amostras de soro, através de um imunoensaio de eletroquimioluminescência, no módulo e601, do Cobas 6000. ⁽¹¹⁾

5.9 Avaliação da Função Pancreática

. Amilase

A amilase é uma enzima digestiva produzida nas glândulas salivares e no pâncreas. No soro, ambas as formas de amilase estão presentes, a pancreática e a salivar, sendo predominante a amilase salivar nos indivíduos saudáveis.

O doseamento sérico ou urinário desta enzima é realizado por uma reação espectrofotométrica e o seu valor é utilizado geralmente como auxiliar no diagnóstico e na monitorização terapêutica da pancreatite aguda. O aumento da sua concentração sérica

ocorre, essencialmente, na pancreatite aguda mas também pode ser observado em consequência de inflamação das glândulas salivares (parotidite) ou em casos de insuficiência renal, pelo que apesar de sensível, não é um parâmetro específico de doença pancreática. Para confirmar, em caso de dúvida, a origem pancreática da amilase é útil a determinação da lipase, uma vez que esta é libertada exclusivamente pelo pâncreas. A ocorrência de hipoamilasémia está relacionada com a insuficiência pancreática.

A determinação da atividade desta enzima baseia-se numa reação de hidrólise de oligossacáridos, como por exemplo, o 4,6-etilideno-(G7)p-nitrofenil-(G1)- α -D-maltoheptaósido (etilideno-G7PNP), catalizada pela mesma. Nesta reação, são formados fragmentos (G2PNP, G3PNP e G4PNP) que posteriormente são hidrolisados, numa segunda reação, em p-nitrofenol e glicose, pela α -glicosidase. A intensidade da cor do p-nitrofenol formado é diretamente proporcional à atividade da amilase, medida espectrofotometricamente.⁽¹¹⁾

5.10 Lípidos e Lipoproteínas no Diagnóstico Clínico

A determinação do perfil lipídico plasmático é um meio de avaliação do risco individual de doença cardiovascular. Os analitos que constituem o perfil lipídico são determinados no soro e incluem o colesterol total, o colesterol LDL, o colesterol HDL e os triglicerídeos. O estudo conjunto destes parâmetros permite a avaliação primária do risco cardiovascular e a tomada de medidas para alterar o estilo de vida com vista a prevenir ou reduzir o risco de enfarte agudo do miocárdio ou outras doenças ateroscleróticas.

Os lípidos circulantes estão organizados em lipoproteínas responsáveis pela sua solubilização e transporte no sangue. As lipoproteínas plasmáticas são classificadas em função da sua densidade, que é determinada pelas diferentes proporções de colesterol, triglicerídeos, fosfolípidos e proteínas (apoproteínas) existentes em cada classe. Os fosfolípidos, o colesterol livre e parte das proteínas fazem parte da monocamada lipídica à superfície das lipoproteínas, enquanto que o núcleo interior hidrofóbico contém, sobretudo, colesterol esterificado e triglicerídeos. As diferentes classes de lipoproteínas plasmáticas podem ser separadas por ultracentrifugação, de acordo com a sua densidade, em cinco frações principais: os quilomícrons, as lipoproteínas de mais baixa densidade, as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermédia (IDL), as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL).

No indivíduo em jejum, a maioria dos triglicerídeos estão incorporados nas VLDL, enquanto após uma refeição são encontrados principalmente nos quilomícrons. O colesterol

plasmático, maioritariamente esterificado, está contido quase na sua totalidade nas LDL e apenas 20% nas HDL. ⁽¹¹⁾

. Colesterol Total

O colesterol é um lípido esteróide proveniente essencialmente de duas fontes, a dieta e a síntese hepática. Este lípido é um importante constituinte das membranas celulares, participante na síntese de esteróides e de ácidos biliares. O aumento da colesterolémia é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular, e o seu doseamento é essencial ao diagnóstico e classificação de hiperlipoproteinémias.

O doseamento do colesterol total pode ainda ser utilizado como indicador da função hepática, da função biliar, da absorção intestinal e do funcionamento da tiróide. Os teores normais deste lípido são influenciados por fatores secundários, como o *stress*, a idade, o sexo, o equilíbrio hormonal e a gravidez.

O colesterol total é determinado por um método colorimétrico enzimático, no qual os ésteres de colesterol são inicialmente hidrolisados pela ação da enzima colesterol esterase, com libertação do colesterol livre e ácidos gordos. Seguidamente, numa segunda reação combinada, a colesterol-oxidase catalisa a oxidação do colesterol livre a colest-4-en-3-ona, com formação do H₂O₂. Numa terceira reação, na presença da peroxidase, o H₂O₂ formado reage com 2 componentes do reagente (fenol e 4-aminoantipirina), levando à oxidação do fenol e à sua interação com a 4-aminoantipirina, com a formação de um corante vermelho (quinoneimina). A intensidade da cor do corante formado é diretamente proporcional à concentração de colesterol, determinada espectralmente. ⁽¹¹⁾

. Colesterol LDL

As LDL têm como principal ação o transporte do colesterol plasmático para os tecidos periféricos, onde vai exercer as suas diversas funções biológicas, podendo ser armazenado no citosol numa certa concentração. O aumento sérico das LDL, junto de outros fatores, contribui para a acumulação de colesterol nos macrófagos na íntima da parede das grandes artérias, levando à formação de células esponjosas e estrias gordas, a lesão primária aterosclerótica. Assim a hipercolesterolemia-LDL é considerada um fator de risco da formação de placas ateroscleróticas, que estão na origem de doença cardíaca coronária e outras doenças vasculares.

As LDL são geralmente determinadas através da quantificação do seu colesterol, o chamado colesterol-LDL. Este parâmetro é determinado frequentemente por cálculo, com

base nos valores da colesterolémia total, da colesterolémia-HDL e da concentração sérica de triglicerídeos, previamente determinados, através da equação de Friedwald, onde $[Triglicerídeos/5]$ é uma estimativa da concentração do colesterol VLDL.

$$Colesterol-LDL = Colesterol Total - [Colesterol-HDL] - [Triglicerídeos/5]$$

Esta equação só pode ser aplicada para valores de triglicerídeos inferiores a 400 mg/dL uma vez que para valores superiores esta proporção deixa de ser válida.

O colesterol-LDL pode ser quantificado no autoanalisador Cobas 6000 através de um método chamado *directo*, já que apenas o colesterol das LDL é medido pelo método enzimático atrás referido, sendo as outras frações de lipoproteínas impedidas de reagir com os reagentes, devido à presença de iões magnésio, apesar de mantidas em solução homogénea. ⁽¹¹⁾

. **Colesterol HDL**

A principal função das HDL no metabolismo lipídico reside no transporte reverso do colesterol, ou seja, no seu transporte dos tecidos periféricos, em particular dos macrófagos da parede das artérias, para o fígado podendo, assim, o excesso ser excretado na bília na forma de sais biliares e de colesterol livre. Este processo é um importante meio de eliminação do colesterol sendo que teores elevados de HDL, avaliados através do chamado colesterol-HDL têm sido associados a um menor risco de patologias cardiovasculares, enquanto teores baixos associados a teores elevados de colesterol-LDL e triglicerídeos séricos são considerados fatores de risco de doença cardiovascular.

O colesterol-HDL é determinado pelo método enzimático atrás referido na fração de LDL, após o bloqueio das outras frações de lipoproteínas por sulfato de dextrano, na presença de iões magnésio, que ficam impedidas de reagir com os reagentes, embora sejam mantidas em solução homogénea, o que permite que esta determinação (método direto) seja feita no autoanalisador Cobas 6000. ⁽¹¹⁾

. **Triglicerídeos**

Os triglicerídeos podem ser absorvidos a partir da dieta (via exógena) e transportados para o plasma nos quilomícron, ou produzidos no fígado por via endógena, a partir de ácidos gordos e de glicerol-3-fosfato. Muitos dos ácidos gordos existentes no organismo fazem parte dos triglicerídeos, a maior parte dos quais são armazenados no tecido adiposo.

A quantificação dos triglicerídeos plasmáticos é importante no diagnóstico e tratamento das hiperlipidémias. Estas doenças podem ser devidas a alterações genéticas no metabolismo dos lípidos ou secundárias a outras patologias, incluindo nefrose, diabetes *mellitus* e endocrinopatias. Teores elevados de triglicerídeos estão associados a um maior risco de desenvolvimento da aterosclerose e a sua determinação é utilizada na avaliação do risco de doenças cardiovasculares.

A determinação dos triglicerídeos baseia-se na sua hidrólise em glicerol e ácidos gordos, mediada pela ação da lipase, seguida da quantificação do glicerol. Nesta reação, o glicerol é fosforilado a glicerol-3-fosfato pela glicerol cinase, na presença de ATP, seguindo-se a sua oxidação pela ação da glicerol fosfato oxidase, com formação de fosfato de di-hidroxiacetona e peróxido de hidrogénio. Posteriormente, é quantificado através da sua reação com a 4-aminofenazona e o 4-clorofenol, catalizada pela peroxidase, com formação de um composto de cor vermelha (quinoneimina). A intensidade cromática do corante vermelho formado é determinada espectrofotometricamente e é diretamente proporcional à concentração de triglicerídeos na amostra. ⁽¹¹⁾

5.11 Estudo das Proteínas Plasmáticas

As proteínas são macromoléculas constituídas essencialmente por aminoácidos ligados covalentemente entre si, podendo ser polares ou apolares, de acordo com o pH, em função da distribuição elétrica resultante das ligações covalentes ou iónicas dos seus grupos estruturais.

As proteínas existentes no soro diferem entre si estruturalmente e participam em vários processos fisiológicos como anticorpos, transportadores de moléculas e iões, enzimas, inibidores enzimáticos e fatores da coagulação. ⁽¹⁹⁾

. Proteínas Totais

As proteínas plasmáticas são sintetizadas principalmente a nível hepático e a sua concentração sérica pode sofrer variações devido a alteração de uma ou mais proteínas específicas ou por alterações do volume de água no plasma.

As alterações nos teores de proteínas totais apresentam uma correlação clínica variada e o interesse da sua determinação é, essencialmente, como auxiliar no diagnóstico de hepatopatias e patologias renais. Uma diminuição da concentração sérica das proteínas totais (hipoproteinémia) ocorre em situações de síndrome nefrótica, hemorragia generalizada, má

absorção das proteínas, queimaduras graves, enquanto uma hiperproteinémia é observada em consequência de casos graves de desidratação ou Mieloma Múltiplo.

As proteínas totais são quantificadas em amostras de soro, através de um ensaio colorimétrico clássico (reação do biureto). Em solução alcalina, o cobre divalente reage com as ligações peptídicas formando um complexo de coloração púrpura. A intensidade cromática é diretamente proporcional à concentração de proteínas, determinada espectrofotometricamente.⁽¹¹⁾

. Proteína C Reactiva

A proteína C reactiva (PCR) é a proteína de fase aguda mais precoce, cuja concentração aumenta devido a processos inflamatórios, sobretudo na resposta a infeção pneumocócica (bacteriana), doença histolítica e a uma variedade de outros estados patológicos. A PCR é utilizada como marcador, ou indicador genérico, de infeção e de inflamação, além de servir para monitorizar a resposta à terapêutica farmacológica ou a cirurgia. Trata-se de um parâmetro muito sensível, no entanto é pouco específico. A sua determinação é realizada no soro através de uma reação imunoturbidimétrica.⁽¹¹⁾

. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são proteínas essenciais na defesa do organismo contra substâncias estranhas. São produzidas pelos plasmócitos após estimulação antigénica, funcionando como anticorpos, pois reconhecem os determinantes antigénicos que suscitam a sua produção.

No laboratório, os doseamentos das imunoglobulinas pertencentes às classes IgA, IgG e IgM, em amostras de soro, são efetuados por métodos imunoturbidimétricos. Na tabela 5 encontra-se uma breve descrição da função, bem como as diferentes aplicações clínicas das três classes de imunoglobulinas referidas.⁽⁸⁾

Tabela 5 - Principais funções e aplicações clínicas das classes de imunoglobulinas IgA, IgG e IgM.

Classe de Imunoglobulinas	Função	Aplicação Clínica
IgA	Essencial na protecção das mucosas	Episódios recorrentes de infecção, sobretudo do trato respiratório inferior
IgG	Resposta imunitária secundária	Avaliação da imunidade humoral, monitorização terapêutica do Mieloma Múltiplo
IgM	Resposta secundária primária	Diferenciação entre infeções agudas ou crónicas

. Eletroforese de Proteínas

A eletroforese de proteínas séricas (EPS) é considerado um teste bastante útil para detetar alterações proteicas e permite separar as proteínas presentes no plasma humano em diferentes frações, de acordo com a sua mobilidade num campo elétrico.

A análise das frações proteicas facilita o diagnóstico de algumas patologias e auxilia na identificação de padrões eletroforéticos patológicos típicos, sendo utilizada na avaliação de processos inflamatórios agudos ou crónicos, patologias hepáticas, deficiências de anticorpos, gamopatias monoclonais, policlonais e ainda na monitorização terapêutica de doentes.

A eletroforese consiste na migração de moléculas ionizadas, de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares em campo elétrico. Neste sentido, moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo (ânodo) enquanto moléculas com carga positiva migram para o pólo negativo (cátodo), a migração cessa no ponto isoelétrico. No laboratório, o equipamento HYDRASYS da Sebia, é utilizado para a realização da electroforese, em gel de agarose, de proteínas em amostras de soro, obtido após centrifugação do sangue total (colhido sem anticoagulante), durante 10 minutos a 3000 rpm. As bandas obtidas são quantificadas por um sistema de digitalização, através de densitometria, do qual resulta um gráfico que em situações normais é semelhante ao da figura 4. ⁽¹⁹⁾

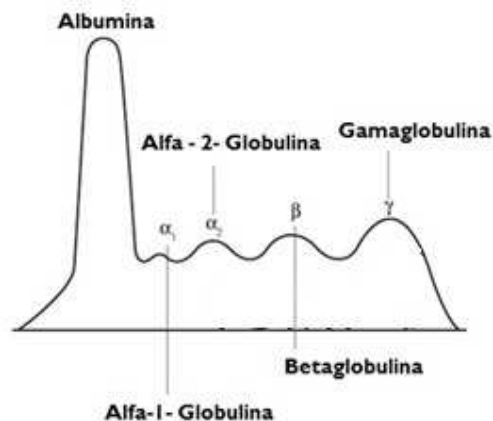


Figura 4 – Perfil eletroforético de proteínas séricas onde são observadas as cinco frações, de acordo com a sua mobilidade num campo elétrico, num meio a pH alcalino.

Interpretação do Proteinograma

A migração das proteínas, quando sujeitas a um campo elétrico, em meio de agarose e a pH alcalino, leva à formação de cinco frações, de acordo com a mobilidade elétrica: albumina, alfa-I-globulina, alfa-2-globulina, betaglobulina e gamaglobulina, como mostra a figura 4.

Albumina

A albumina é a proteína mais abundante no plasma e corresponde a cerca de 60% da concentração total de proteínas. É sintetizada exclusivamente no fígado e as suas principais funções incluem o transporte de diversas substâncias e manutenção da pressão oncótica. É uma proteína de baixo peso molecular e em caso de lesões nos glomérulos renais tende a perder-se na urina.

A diminuição sérica da albumina (hipoalbuminémia), reflete-se no proteinograma como um pico menor e é uma ocorrência inespecífica que acompanha inúmeras patologias associadas à diminuição da síntese proteica (cirrose hepática e hepatite viral), ao aumento do catabolismo proteico (infecção bacteriana grave, neoplasias malignas, insuficiência cardíaca congestiva, doenças inflamatórias e infecciosas crônicas), à ingestão proteica inadequada ou ainda a perdas renais ou intestinais.

A diminuição extrema dos teores de albumina sérica é observada na síndrome nefrótica. O seu aumento no plasma (hiperalbuminémia) verifica-se em casos de desidratação devido, por exemplo, a sudorese excessiva, diarreia ou vômitos.

Muito raramente, pode ser detetada no proteinograma do soro, uma banda adicional com mobilidade superior à de albumina, designada pré-albumina, sem gerar quaisquer manifestações clínicas associadas. Nestes casos pode ser observado um simples aumento na largura da banda da albumina ou a formação de dois picos distintos. Esta banda diz respeito à presença da transtirretina, a proteína que transporta as hormonas da tiróide e proteína que liga o retinol.⁽¹¹⁾⁽¹⁹⁾

Alfa-I-Globulinas

Esta banda proteica é constituída por um conjunto de várias proteínas, entre as quais a alfa-I-antitripsina, correspondente a 90% do pico normal da alfa-I-globulinas. Um aumento das alfa-I-globulinas é observado geralmente em processos inflamatórios, infecciosos e imunes, devido ao aumento de proteínas de fase aguda que engloba.

A alfa-1-antitripsina é codificada por dois alelos denominados M e Z e a homozigotia do alelo Z resulta na produção diminuída desta proteína, alteração congénita associada ao desenvolvimento de enfisema pulmonar bem como a uma forma, rapidamente progressiva, de cirrose. Nestes casos o proteinograma pode ser um método, útil de triagem perante a suspeita desta deficiência, sendo necessário completar o diagnóstico com testes mais específicos. ^{(11) (19)}

Alfa-2-Globulinas

A banda alfa-2 é constituída por um grupo variado de proteínas, incluindo a haptoglobina, alfa-2-macroglobulina, ceruloplasmina, eritropoetina e colinesterase. Estas proteínas também apresentam um comportamento de proteínas de fase aguda, aumentando a sua concentração na presença de infeção, processos inflamatórios e respostas imunes. A haptoglobina e a alfa-2-macroglobulina são os constituintes maioritários desta banda.

A haptoglobina migra mais lentamente, em comparação com a alfa-2-macroglobulina e tem como função a ligação à hemoglobina libertada pelos eritrócitos durante o processo de hemólise. Deste modo, é possível a eliminação do complexo haptoglobina-hemoglobina pelas células do sistema retículoendotelial, conservando o ferro. Na hemólise intravascular, os níveis séricos de haptoglobina estão diminuídos, originando uma banda alfa-2-macroglobulina mais clara no perfil eletroforético.

A alfa-2-macroglobulina é uma das maiores proteínas globulínicas presentes no plasma, o que permite a sua retenção no plasma mesmo em casos de proteinúria profunda. Em situações graves, nomeadamente, na síndrome nefrótica, pode ser observado um aumento relativo de 10 vezes ou mais, da sua concentração sérica, em resultado da perda urinária de outras proteínas de peso molecular mais baixo, sendo por vezes observada uma concentração sérica igual ou mesmo maior que a da albumina. ⁽¹⁹⁾

A ceruloplasmina é a proteína responsável pelo transporte do cobre no plasma. Na doença de Wilson, uma perturbação hereditária do metabolismo do cobre, os teores séricos de ceruloplasmina encontram-se acentuadamente diminuídos. Teores baixos de ceruloplasmina ocorrem também em doentes com insuficiência hepática e na síndrome de perda de proteínas. ⁽¹¹⁾

Beta-globulinas

A banda das beta-globulinas é constituída, essencialmente, pela beta-lipoproteína, transferrina e o componente C3 do complemento. A transferrina, proteína responsável pelo transporte do ferro no plasma, tem a maior mobilidade desta banda e encontra-se

aumentada na anemia ferropénica, originando neste caso um pequeno pico no proteinograma. O C3 é o componente com menor mobilidade e o seu decréscimo está associado às doenças glomerulares ou a patologias que desencadeiam a ativação do sistema do complemento, nomeadamente o lúpus eritematoso sistémico. O aumento desta fração é observado em patologias com teores de colesterol sérico elevado, como icterícia obstrutiva, hipotiroidismo ou alguns casos de *diabetes mellitus*, enquanto que a sua diminuição é rara. ⁽¹¹⁾

Fibrinogénio

O fibrinogénio é o único fator de coagulação presente no plasma em quantidades suficientes para ser detetado na eletroforese de proteínas séricas. Durante o processo de coagulação todo o fibrinogénio existente no plasma é convertido em fibrina, o que leva à sua ausência do soro. Contudo, em casos de coagulação incompleta da amostra, como acontece em doentes sujeitos a terapêutica com anticoagulantes (heparina), pode permanecer uma quantidade razoável de fibrinogénio no soro, detetável no proteinograma. O fibrinogénio apresenta-se como uma banda entre as betaglobulinas e as gamaglobulinas, levando por vezes à suspeita, erradamente, de picos monoclonais. ⁽¹¹⁾

Gama-Globulinas

A banda eletroforética das gama-globulinas corresponde às imunoglobulinas (Igs), ou seja, aos anticorpos produzidos pelos plasmócitos em resposta a estimulação antigénica ou devido à expansão clonal maligna destas células. As Igs são classificadas em cinco classes, sendo que todas são formadas por duas cadeias pesadas (G, A, M, D e E) e duas cadeias leves (kappa ou lambda).

As imunoglobulinas apresentam diferentes concentrações no plasma, encontrando-se por ordem decrescente a IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Apenas a IgG apresenta uma migração que acompanha toda a banda das gama globulinas e refletindo esta banda o seu comportamento. A IgA encontra-se na área de junção com a banda das beta-globulinas enquanto a IgM, por sua vez, migra na região localizada entre IgA e IgG e é detetada apenas no caso de infeções agudas. ⁽¹¹⁾

A aplicação clínica mais significativa da eletroforese de proteínas séricas está relacionada com a identificação e diferenciação de picos monoclonais e policlonais de imunoglobulinas, sendo um auxiliar no diagnóstico das Gamopatias policlonais e monoclonais. ⁽¹⁹⁾

A hipogamoglobulinémia consiste na redução da concentração das gamaglobulinas, geralmente observada em consequência da destruição do tecido linfóide, congénita ou

secundária a terapêuticas, ou ainda associada à variante de cadeia leve do Mieloma Múltiplo.⁽⁷⁾

As gamopatias policlonais representam uma resposta imunológica simultânea de diversos clones plasmocitários a um determinado estímulo antigênico, seja este inflamatório, imune ou infeccioso, tais como tuberculose, sífilis, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, entre outros. Este perfil eletroforético característico aparece como um aumento difuso da banda das gamaglobulinas, representado pela presença de uma curva de base larga, evidenciando a produção aumentada de todas as classes de imunoglobulinas.⁽¹⁹⁾

As gamopatias monoclonais são caracterizadas pelo aumento homogêneo e fusiforme da banda das gamaglobulinas, o que representa a produção, por um único clone plasmocitário, de um tipo específico de imunoglobulina que apresenta a mesma mobilidade eletroforética. Desde modo, observa-se uma curva de base estreita conhecida como pico monoclonal. A proteína monoclonal (proteína M) geralmente apresenta-se como um pico na fração das gama-globulinas, porém, este pode estar presente algumas vezes na fração beta-globulinas, quando a imunoglobulina envolvida é a IgA. A existência de picos monoclonais é característica das patologias pertencentes ao grupo das gamopatias monoclonais, nomeadamente o Mieloma Múltiplo, Macroglobulinemia de Waldenstrom, e Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI).⁽¹⁹⁾

Quando são observados picos monoclonais na eletroforese das proteínas séricas, é essencial identificar a origem da imunoglobulina monoclonal, com recurso à imunofixação, para identificar as classes de cadeias pesadas e leves.

Caracterização das Imunoglobulinas por Imunofixação

Após a deteção de um pico ou banda monoclonal numa eletroforese de proteínas, como evidenciado na figura 5, deverá ser realizada uma imunofixação para confirmar a presença de proteína M e identificar o tipo de cadeias presentes, como mostra a figura 6. A imunofixação combina as técnicas de eletroforese e imunoprecipitação e é efetuada no aparelho semi-automático de eletroforese, Hydrasis da Sebia, em amostras de soro ou urina (pesquisa de proteína de Bence-Jones). Neste processo, as proteínas são separadas por eletroforese em meio alcalino (pH 9,1) e posteriormente imunoprecipitadas com anti-soros específicos para os diferentes componentes das imunoglobulinas: anti-cadeias pesadas gama (IgG), alfa (Ig A) e mu (Ig M), e anti-cadeias leves kappa e lambda (livres e ligadas). Após a imunofixação, as proteínas imunoprecipitadas são coradas diretamente no próprio equipamento.

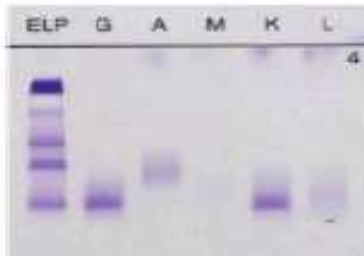


Figura 6- O resultado da imunofixação revelou a presença de uma banda monoclonal com origem IgG kappa.

. Diagnóstico Laboratorial de Algumas Gamopatias Monoclonais

Mieloma Múltiplo

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma neoplasia disseminada na medula óssea caracterizada pela proliferação desregulada e clonal de plasmócitos, os quais produzem e secretam uma imunoglobulina monoclonal, designada proteína M, que está presente no soro e/ou urina. O diagnóstico laboratorial do MM baseia-se na presença de proteína M no soro e/ou na urina, juntamente com o aumento de plasmócitos na medula óssea (Figura 7), danos tecidulares ou em órgãos, bem como em alterações de outros parâmetros bioquímicos, do hemograma e VSG.

Esta patologia é mais frequente após os 40 anos, com um pico na 7ª década de vida, e é geralmente precedida pela Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI), onde é encontrada uma imunoglobulina monoclonal no soro com uma concentração inferior a 3 g/ dL, com ausência de lesões ósseas, de anemia, de hipercalcemia e insuficiência renal, características do MM. ⁽⁶⁾

O hemograma associado ao Mieloma Múltiplo é caracterizado pela presença de uma leve anemia normocítica ou macrocítica, sem sinais de regeneração (reticulócitos normais ou diminuídos), enquanto o leucograma e o plaquetograma estão geralmente normais, embora possam apresentar, por vezes, neutropenia e trombocitopenia. No esfregaço de sangue periférico é observada uma agregação excessiva dos eritrócitos, com a formação de *rouleaux* característicos (Figura 8) e aumento da VSG. ⁽⁷⁾

Na eletroforese de proteínas séricas é observada a existência de um pico monoclonal na região das gamaglobulinas, e a natureza da imunoglobulina é identificada através de imunofixação. No MM, a proteína M é mais frequentemente do tipo IgG (60%), em segundo lugar do tipo IgA (20%) e, mais raramente, é devido a cadeias leves kappa ou lambda. Neste último caso, os plasmócitos secretam apenas cadeias leves, e devido ao seu baixo peso molecular estas são excretadas na urina em grande quantidade, situação denominada proteinúria de Bence-Jones, o que leva à ausência de pico monoclonal na eletroforese do

soro. Nestes casos, a pesquisa da proteína de Bence-Jones, através de imunofixação, é um dado muito relevante. De facto, numa pequena percentagem de mielomas não são detetadas imunoglobulinas monoclonais e esta ausência retarda o diagnóstico e piora o prognóstico dos doentes.

O diagnóstico de MM é confirmado pelo exame microscópico de uma amostra de medula óssea, onde é observada plasmocitose, com a presença de células binucleadas (Figura 7). Esta proliferação dos plasmócitos na medula causa osteólise, hipercalcémia e o aumento de β 2-microglobulina, sendo este último parâmetro utilizado como auxiliar na monitorização terapêutica dos doentes. ⁽⁸⁾

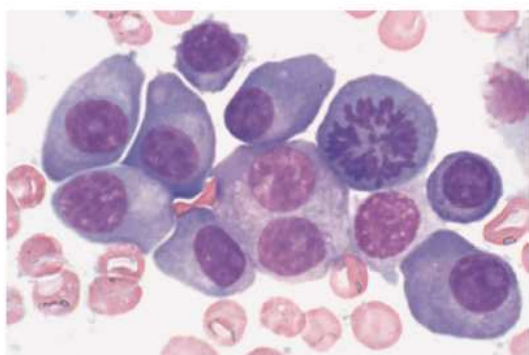


Figura 7- Plasmocitose na medula óssea com presença de células binucleadas em caso de Mieloma Múltiplo.

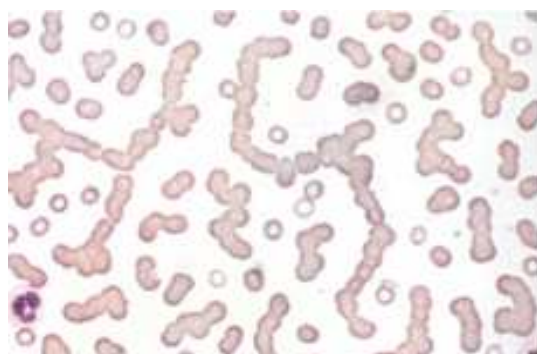


Figura 8- Esfregaço de sangue periférico onde é observada a presença de eritrócitos em *rouleaux*, característico do Mieloma Múltiplo.

Macroglobulinémia de Waldenström

A Macroglobulinémia de Waldenström é caracterizada por uma neoplasia de plasmatócitos proteína M é do tipo IgM. Esta patologia é muito mais rara que o Mieloma Múltiplo e é predominante no sexo masculino. O seu diagnóstico laboratorial deriva principalmente: i) da presença de eritrócitos em *rouleaux* no esfregaço de sangue periférico; ii) da identificação de um pico monoclonal na região das gama-globulinas na eletroforese de proteínas séricas e iii) da identificação da IgM na imunofixação. ⁽⁷⁾

5.12 Análise Sumária da Urina

A análise de urina consiste no exame físico-químico da urina e no exame microscópico do sedimento urinário. É dos exames de triagem mais pedidos em laboratório e fornece uma ampla variedade de informações clínicas úteis, no que respeita a patologias renais e do trato

urinário. A amostra utilizada é a primeira urina da manhã, não centrifugada, e a análise deve ser efetuada dentro de 2h após a colheita.

No laboratório, a análise físico-química de urina é efetuada no equipamento automático Urisys 2400 da Roche, que é um analisador automático de tiras-reagente que faz a leitura da intensidade de cor por refletofotometria. Permite a determinação automática qualitativa ou semi-quantitativa, de diversos parâmetros analíticos, nomeadamente, pH, nitritos, proteínas, glicose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e eritrócitos, assim como a densidade, a cor e o aspeto da urina. Por vezes, o volume de amostra é insuficiente (ex. amostra pediátrica) e a análise automática de urina não é possível, sendo efetuada por técnica manual, na qual a tira de teste é mergulhada na amostra e a leitura é feita por comparação visual das cores obtidas com uma tabela de referência.

A existência de parâmetros positivos na análise semi-quantitativa na tira reagente ou a solicitação do médico constituem os critérios para a execução do exame microscópico do sedimento urinário.

O exame microscópico do sedimento inclui a observação e identificação de elementos figurados presentes na amostra de urina, nomeadamente leucócitos, eritrócitos, cilindros, células epiteliais, bactérias, leveduras, parasitas e cristais. Para este exame, a amostra de urina, após ter sido analisada no sistema automático, é centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante é decantado e procede-se à ressuspensão do sedimento em aproximadamente 1 mL da própria urina. Uma gota do sedimento obtido é colocada numa lâmina limpa, sobrepõe-se uma lamela e o sedimento é observado ao microscópio óptico.

6. Conclusão

A elaboração deste relatório culmina com a chegada ao fim de mais uma etapa da minha vida académica e o início de uma carreira profissional. O Mestrado em Análises Clínicas, e principalmente o estágio curricular no Laboratório de Análises Clínicas do Centro Hospitalar do Algarve-Unidade de Portimão, constituiu a experiência mais enriquecedora que poderia ter, tanto a nível pessoal como profissional, pois possibilitou a consolidação dos conhecimentos teóricos adquiridos ao longo de todo o mestrado e permitiu a aquisição de conhecimentos práticos imprescindíveis ao começo de uma carreira profissional como Técnica Superior de Análises Clínicas.

A minha presença diária e o contato direto com um serviço hospitalar deste nível foi uma mais-valia pois permitiu-me ter a noção de todo o trabalho diário de um laboratório de patologia clínica, sempre com o objetivo do fornecimento de resultados de qualidade e da

sua importância como auxiliar para o diagnóstico e monitorização terapêutica dos doentes, sensibilizando-me para as condicionantes a que um serviço destes está sujeito, principalmente a nível económico.

Posso afirmar, com toda a convicção, que este estágio superou as minhas expectativas iniciais e que a equipa de profissionais com quem tive a oportunidade de trabalhar me transmitiu os alicerces necessários para o início de uma nova etapa como Técnica Superior de Análises Clínicas.

7. Referências Bibliográficas

1. Hammerling, J. A., *A Review of Medical Errors in Laboratory Diagnostics and Where We Are Today*. Lab. Med. (2012), 43(2): 41-44.
2. Goswami, B., Singh, B. Chawla, and Mallika, V., *Evaluation of errors in a clinical laboratory: a one-year experience*. Clin. Chem. Lab. Med. (2010), 48(1): 63-66.
3. Ashakiran, S., Sumati, M. and Murthy, N., *A study of pre-analytical variables in clinical biochemistry laboratory*. Clin. Biochem. (2011), 44(10-11): 944-945.
4. Westgard, J. O., Barry, P. L. and Hunt, M. R., *A multi-rule shewhart chart for quality control in clinical chemistry*. Clin. Chem. (1981), 27:493-501.
5. Seeley, R., Stephens, T. and Tate, P., *Anatomia & Fisiologia*, 6ª Edição (2007). Lusociência - Edições Técnicas e Científicas Lda.
6. Carr, J. H. and Rodak, B. F., *Clinical Hematology Atlas*, 3ª Edition (2009). Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 30-31.
7. Failace, R., *Hemograma - Manual de Interpretação*, 5ª Edição (2009). Artmed, Porto Alegre.
8. Hoffbrand, A.V. and Moss, P.A.H., *Fundamentos em Hematologia*. 6ª Ed. (2013). Artmed, Porto Alegre.
9. Norma da Direção-Geral da Saúde, *Prescrição e Determinação do Hemograma*, Nº 063/2011, 12/09/2013.
10. Bacall, N. S., *Automated hematology analyzer and the importance of validation of new equipment in the clinical laboratory*. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. (2009), 31(4): 218-220.
11. Sacher, R. A. and McPherson, R. A., *Widmann-Interpretação Clínica dos Exames Laboratoriais*, 11ª Edição (2002). Manole, São Paulo.
12. Kricka, L. J., Park, J. Y., *Optical Techniques*. In Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Burtis, C. A. and Bruns, D. E. (Editors), 6th Edition (2008). Saunders Elsevier, St.Louis, Missouri, pp. 64-83.
13. D'Orazio, P. and Meyerhoff, M. E., *Electrochemistry and Chemical Sensors*. In Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Burtis, C. A. and Bruns, D. E. (Editors), 6th Edition (2008). Saunders Elsevier, St.Louis, Missouri, pp. 85-90.
14. Schindles, E. I., Scott, M. G., *Physiology and disorders of water, eletrolyte and acid-base metabolism*. In Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Burtis, C. A. and Bruns, D. E. (Editors), 7th Edition (2015). Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 680-699.
15. Lamb E., Price C., *Creatinine, Urea, and Uric Acid*. In Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Burtis, C. A., Ashwood, E. R. and Bruns, D. E. (Editors), 6th Edition (2008). Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, pp 363-372.
16. Sacks D., *Carbohydrates*. In Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Burtis, C. A., Ashwood, E. R. and Bruns, D. E. (Editors), 6th Edition (2008). Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 373-401.

17. Higgins T., Beutler E., Doumas B., *Hemoglobin, Iron, Bilirubin In* Burtis, C. A., and Bruns, D.E. (Eds). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Saunders Elsevier, St.Louis, Missouri, 6th Ed. (2008) pp. 509-516.
18. Risteli, J., Winter, W.E., Klerrekoper, M., Risteli, L., *Disorders of Bone and Mineral Metabolism. In* Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Burtis, C. A. and Bruns (Editors), 7th Edition (2015). Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 741-768.
19. Silva, R. O., Lopes, A. and Faria, R., *Seric Proteins Electrophoresis: Clinical Interpretation and Correlation*. Revista Médica de Minas Gerais, (2008),18(2): 116-122.