

Catarina Rodrigues Gomes

Relatório de Estágio em Análises Clínicas

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

Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Porto

Orientadores:

Doutora Otilia Figueiras

Professora Doutora Olga Cardoso

Setembro, 2015

Universidade de Coimbra

É com muito agrado que inicio este relatório agradecendo a todas as pessoas que acompanharam durante este estágio. Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Doutora. Otília Figueiras, minha orientadora externa, pelo acompanhamento, disponibilidade constante e apoio.

Não poderia deixar de agradecer:

À Professora Leonor Almeida, pela sua dedicação, simpatia e constante preocupação ao longo destes dois anos.

À Professora Doutora Olga Cardoso, minha orientadora interna, que foi crucial na finalização deste trabalho.

Um agradecimento muito especial á minha família, por todo o carinho, apoio e incentivo. Sem eles nada disto tinha sido possível.

À Biotuna pela amizade incondicional e por todos os momentos que me proporcionaram. Com vocês estou sempre em casa! Um agradecimento especial á Ruiva e á Ná, que tanto significam para mim.

Às amigas de sempre, Mané e Mimi, pela amizade que sempre demonstraram.

Ao Jojo, pela enorme paciência, apoio e incentivo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	iv
RESUMO	vii
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO.....	1
CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO	2
CRONTOLO DE QUALIDADE.....	2
ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS	3
1. MICROBIOLOGIA	3
2. QUÍMICA CLÍNICA.....	4
3. IMUNOLOGIA	4
3.1. SECTOR DA AUTOIMUNIDADE.....	5
3.1.1. Imunofluorescência Indireta	5
3.1.2. Imunoensaios Enzimáticos	12
3.1.2.1. ELISA	12
3.1.2.2. FEIA.....	14
3.1.2.3. Quimioluminiscência	15
3.1.2.4. Immunoblot.....	16
3.2 SECTOR DA IMUNOQUÍMICA.....	17
3.2.1. Imunodifusão radial	17
3.2.2. Nefelometria	19
3.2.3. Electroforese Capilar	23
3.2.4. Imunofixação por subtração	24
3.2.5. Electroimunofixação.....	25
Detecção de secreção de IgG intratecal	26
Pesquisa, doseamento e identificação de crioglobulinas.....	26
3.3. SECTOR DA IMUNIDADE CELULAR	27
3.3.1. Citometria de Fluxo	27
3.3.1.1. Imunofenotipagem	29
3.3.2. Estudo de Lavados Broncoalveolares.....	29
4. HEMATOLOGIA LABORATORIAL.....	31
4.1. HEMOGRAMA	31

4.1.1. ADVIA® 2120.....	31
4.2. TÉCNICAS MANUAIS DE HEMATOLOGIA	37
4.2.1. Esfregaços sanguíneos e coloração	37
4.2.1.1. Coloração de Leishman	38
4.2.2. Fórmula leucocitária	40
4.2.3. Contagens celulares na câmara de Neubauer modificada	41
4.2.4. Contagem manual de reticulócitos	42
4.3. MICROHEMATÓCRITO	42
4.4. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO.....	43
4.5. CITOQUÍMICA	44
4.5.1. Reação de Perls	44
4.5.2. Mieloperoxidasas	45
4.5.3. Esterases.....	45
4.6. ESTUDO DE PATOLOGIAS DO GLÓBULO RUBRO	47
4.6.1. Hemoglobinopatias e Talassemias	47
4.6.1.1. HPLC.....	48
4.6.1.2. Electroforese de Hemoglobinas.....	49
4.6.2. Teste de Solubilidade	50
4.6.3. Teste da Fragilidade Osmótica.....	51
4.6.4. Distúrbios enzimáticos.....	52
4.6.4.1. Determinação de Glicose-6-fosfato desidrogenase	52
4.6.4.2. Determinação de Piruvato Quinase	52
4.6.5. Doseamento da Protoporfirina Zinco	53
CONCLUSÕES	54
ANEXOS	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. – Padrões de fluorescência nuclear detetados em células HEp-2.	7
Figura 2. – Padrão citoplasmático mitocondrial detetado em células HEp-2.....	8
Figura 3. – Padrão de AMA em substrato triplo	9
Figura 4. – Padrões de AML em substrato triplo	9
Figura 5. – Padrão de LKM em substrato triplo.....	10
Figura 6. – Padrão de fluorescência característico de anticorpos APC detetados em estômago de rato.	10
Figura 7. – Padrão de fluorescência caraterístico dos autoanticorpos EMA em cortes de esófago de macaco.....	11
Figura 8. – Neutrófilos em etanol, permitindo distinguir dois padrões.....	12
Figura 9. – Imunofixação por subtração sérica de um paciente com gamapatia monoclonal IgG lambda.	24
Figura 10. – Técnica de esfregaço sanguíneo.....	37
Figura 11. – Mobilidades electroforéticas das hemoglobinas	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. – Sectores do serviço de Imunologia e respetivas metodologias.	5
Tabela II. – Padrões nucleares mais comuns, antigénios associados e respetiva correlação clínica.	7
Tabela III. – Deficiências dos componentes do complemento e manifestações clínicas associadas.	19
Tabela IV. – Parâmetros doseados e respetivos aparelhos	20
Tabela V. – Características dos citómetros de fluxo	28
Tabela VI. – Classificação morfológica das anemias.....	35
Tabela VII. – Alterações quantitativas dos leucócitos e causas associadas.	36
Tabela VIII. – Alterações nos eritrócitos.	38
Tabela IX. – Tipos celulares, solutos de diluição utilizados e respetivo modo de contagem em câmara de Neubauer modificada.	41
Tabela X. – Classificação de LMA segundo o sistema FAB.	47

ABREVIATURAS

ACP	Anticorpos Anti-Célula Parietal
AEQ	Avaliação Externa de Qualidade
AMA	Anticorpos Anti-Mitocôndria
AML	Anticorpos Anti-Músculo Liso
ANA	Anticorpos Anti-Nucleares
ANAE	α -Naftil Acetato Esterase
ANBE	α -Naftil Butirato Esterase
Anti-CCP	Anticorpos Anti-Citrulina
Anti-GBM	Anticorpos Anti-Membrana Basal Glomerular
Anti-LKM	Anticorpos Anti-Microsossomais Hepáticos e Renais
Anti-tTG	Anticorpos Anti-Transglutaminase tecidual
AR	Artrite Reumatoide
BASO	Basófilo
CD	Cluster of Differentiation
CQI	Controlo de Qualidade Interno
DAI	Doenças Autoimunes
DC	Doença Celíaca
dsDNA	Double-stranded DNA
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
EMA	Anticorpos Anti-Endomísio
ES	Esclerodermia
FEIA	Ensaio Fluoroimunoenzimático
G6PD	Glucose-6-Fosfato Desidrogenase
HbA	Hemoglobina A
HbA₂	Hemoglobina A ₂
HbC	Hemoglobina C
HbD	Hemoglobina D
HbF	Hemoglobina F
HbG	Hemoglobina G
HbF	Hemoglobina Fetal
HEp-2	Human Epitelial Cell Line: type 2

IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Hct	Hematócrito
HGM	Hemoglobina Globular Média
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
IFI	Imunofluorescência Indireta
LBA	Lavado Broncoalveolar
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LDH	Lactato Desidrogenase
LES	Lúpus Eritematoso Sistémico
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LUC	Large Unstained Cells
MCTD	Doença Mista do Tecido Conjuntivo
MGUS	Gamopatias Monoclonais de Significado Indeterminado
MPO	Anticorpos Anti-mieloperoxidase
PCR	Proteína C Reativa
PEROX	Peroxidase
PLT	Plaquetas
PK	Piruvato Quinase
PM	Poliomiosite
PR3	Anticorpo Anti-proteinase 3
RBC	Red Blood Cell
RDW	Red Cell Distribution Width
RET	Reticulócitos
RNP	Ribonucleoproteínas
Rpm	Rotações por minuto
SS	Síndrome de Sjögren
UK-NEQUAS	United Kingdom National External Quality Assessment Service
VGM	Volume Globular Médio
VS	Velocidade de Sedimentação

ZPP

Protoporfirina zinco

RESUMO

Este relatório tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular do último ano do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

O estágio incluiu a integração nos serviços de Hematologia Laboratorial, Imunologia, Química Clínica e Microbiologia do Centro Hospitalar do Porto, estando este relatório centrado nas áreas de Hematologia Laboratorial e Imunologia. É apresentada uma descrição detalhada destas duas valências, onde são referidos todos os parâmetros determinados e metodologias utilizadas, assim como a interpretação dos resultados laboratoriais e sua importância clínica.

ABSTRACT

This report aims to describe all the activities in which I was involved during the curricular internship of the last year of the Master degree in Clinical Analysis at Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

The internship included the integration in Laboratorial Hematology, Clinical Chemistry, Immunology and Microbiology sectors at Centro Hospitalar do Porto. This report is focused on Laboratorial Hematology and Immunology. It presents a more detailed description of these valences, where is refer all parameters assayed and their methods, as well as results evaluation and clinical importance.

INTRODUÇÃO

O presente relatório de estágio pretende descrever todas as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular, realizado no âmbito do curso de Mestrado em Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio foi realizado no Centro Hospitalar do Porto.

Este estágio teve uma duração de cinco meses, num total de 600 horas. O tempo foi repartido pelas valências de Microbiologia, Hematologia Laboratorial, Química Clínica e Imunologia, permanecendo um mês em cada serviço. Este relatório centra-se nas atividades desenvolvidas nos serviços de Hematologia Laboratorial e Imunologia.

Durante o estágio tive a oportunidade de manipular vários produtos biológicos, contactar com diversos equipamentos e metodologias e, em algumas áreas, proceder à sua interpretação e validação clínica.

Este estágio teve como objetivos gerais aplicar os conhecimentos adquiridos durante a formação curricular num contexto real de trabalho, bem como promover o desenvolvimento de competências pessoais e profissionais.

CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O Centro Hospitalar do Porto, que surgiu por fusão do Hospital Geral de Santo António, com o Hospital Central Especializado de Crianças Maria Pia e a Maternidade Júlio Dinis, constitui uma entidade de referência na prestação de cuidados de saúde diferenciados. O Departamento de Patologia Clínica integra um dos muitos serviços que esta unidade hospitalar tem ao dispor dos seus utentes, sendo coordenado pela Prof. Dra. Margarida Lima. Foi neste Departamento que foi desenvolvido o estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas.

O Departamento de Patologia Clínica engloba seis serviços distintos, cada um supervisionado por um responsável de laboratório, dos quais se incluem o serviço de Hematologia Laboratorial, Imunologia, Microbiologia e Química Clínica.

Nestes setores são executadas análises em amostras biológicas com o objetivo de se obterem informações para apoiar os processos de diagnóstico, prognóstico e monitorização clínica dos utentes. Qualquer um destes laboratórios funciona em espaços físicos independentes, providos de equipamentos modernos que lhes permitem responder de forma rápida e eficaz às solicitações do Hospital. Estes setores encontram-se, na sua maioria, automatizados e totalmente informatizados.

No âmbito da reestruturação do Departamento de Patologia Clínica, que teve por objetivo diminuir os custos globais ligados à gestão do serviço, otimizar recursos e ganhos de eficiência, foi desencadeado um processo com vista à criação de um Laboratório Centralizado (CoreLab). Deste modo, os serviços de Hematologia Laboratorial, Imunologia e Química Clínica, não incluem a fase pré-analítica.

CRONTOLO DE QUALIDADE

Controlo de Qualidade Interno

O Controlo de Qualidade Interno (CQI) consiste no conjunto de procedimentos adotados num laboratório, com vista a garantir a fiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Tem como objetivo a validação dos métodos analíticos e aplicação de medidas corretivas, caso seja necessário.

O controlo interno é efetuado diariamente, antes do processamento das amostras. As amostras fornecidas por laboratórios de referência referem normalmente três níveis distintos: um nível alto, um nível médio e um nível baixo, com os respetivos valores bem definidos. A avaliação dos resultados do CQI baseia-se nos valores das bulas dos controlos, e na interpretação de cartas de Levey-Jennings através da aplicação das regras de Westgard. Apenas são validados

os resultados que se encontram dentro do intervalo de confiança (± 3 desvios padrão). Sempre que no processo de verificação do controlo os resultados não obedecerem aos critérios de confiança, devem ser tomadas medidas corretivas adequadas para eliminar as causas do erro.

Avaliação Externa da Qualidade

A avaliação externa da qualidade (AEQ) é efetuada mediante a realização de ensaios inter-laboratoriais, permitindo a cada laboratório avaliar a exatidão dos seus resultados.

Os serviços de Hematologia Laboratorial, Química Clínica e Imunologia estão integrados em dois programas de controlo externo de qualidade, um nível nacional com o INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge) e um a nível internacional com o UK-NEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Service). Na Microbiologia é efetuado o controlo mensal de bacteriologia e parasitologia do UK-NEQAS, efetuando-se a identificação dos microrganismos, e o respetivo antibiograma.

ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS

1. MICROBIOLOGIA

No serviço de Microbiologia o estágio envolveu a realização de análises bacteriológicas, parasitológicas e micológicas de diversos produtos biológicos, nomeadamente: urinas, fezes, sangue total (hemocultura), líquido cefalorraquidiano (LCR), produtos do trato respiratório, líquidos orgânicos de cavidades serosas, exsudados genitais, oculares, do ouvido médio e amostras purulentas.

No estudo bacteriológico, as amostras recebidas são semeadas nos meios de cultura selecionados e são realizadas preparações de lâminas para exame direto e coloração de Gram para observação ao microscópio ótico. Esta observação permite uma pesquisa orientada das colónias nos meios de cultura. Quando é isolada uma colónia pura procede-se à identificação que é feita a partir dos aparelhos automáticos VITEK®2, VITEK®MS e MicroScan WalkAway para identificação de *Pseudomonas aeruginosa*. São também executadas provas de identificação manuais que permitem diferenciar géneros e espécies de bactérias. Depois de identificada a espécie é realizado o antibiograma no VITEK®2. De modo a confirmar determinadas resistências ou em situações em que a técnica automática não obtenha resultados, são realizados E-test e testes de difusão em disco.

O estudo parasitológico envolve essencialmente a preparação de lâminas de fezes concentradas pelo método e Ritchie simplificado para a pesquisa de ovos, quistos ou trofozoítos de parasitas.

No estudo micológico é realizado o isolamento e identificação de fungos usando o meio Sabouraud. Frequentemente, a pesquisa de fungos é feita recorrendo a kits comerciais, como o Kit de imunofluorescência para detecção de *Pneumocystis jirovecii* da BIORAD, que consiste na marcação dos quistos de *Pneumocystis jirovecii* com anticorpos que vão emitir fluorescência quando observados ao microscópio de fluorescência. Também é realizada a pesquisa de fungos capsulares, nomeadamente de *Cryptococcus neoformans*, recorrendo à técnica da tinta-da-china.

O serviço de Microbiologia inclui o sector da serologia.

2. QUÍMICA CLÍNICA

A Química Clínica é o serviço que apresenta maior fluxo de amostras diariamente. O laboratório é constituído por várias áreas funcionais, tendo cada uma delas encargos específicos. Estas áreas incluem: bioquímica geral, onde são realizadas as análises dos analitos comuns; análises na urina, LCR, líquidos de cavidades serosas, líquido seminal, líquido sinovial, fezes e cálculos urinários; endocrinologia, metabolismo e nutrição; monitorização de fármacos, farmacocinética e toxicologia clínica; marcadores tumorais; cromatografia e eletroforese e espectrofotometria de absorção atómica para determinação de oligoelementos.

3. IMUNOLOGIA

No serviço de Imunologia são desenvolvidas um conjunto de atividades específicas que permitem o diagnóstico e monitorização de patologias associadas ao sistema imunitário.

O laboratório de Imunologia está organizado em três sectores técnicos, de acordo com as metodologias utilizadas (Tabela I.) e a natureza dos parâmetros efetuados.

Tabela I. – Sectores do serviço de Imunologia e respetivas metodologias.

Sector	Metodologia
Autoimunidade	Imunofluorescência indireta ELISA FEIA Quimioluminiscência <i>Immunoblot</i>
Imunoquímica	Imunodifusão radial Nefelometria Eletroforese capilar Imunofixação/Imunosubtração
Imunidade Celular	Citometria de Fluxo

Nesta secção são referidas as análises efetuadas e a sua importância clínica, assim como o respetivo equipamento e métodos utilizados.

3.1. SECTOR DA AUTOIMUNIDADE

As doenças autoimunes representam um grupo de doenças clinicamente heterogéneas, que incluem patologias com atingimento limitado a um órgão ou tecido (doenças autoimunes específicas de um órgão), até formas multissistémicas (doenças autoimunes multissistémicas). Todas elas têm como fator comum uma base etiopatogénica determinada por respostas imunes contra antígenos próprios, apresentando lesões que podem aparecer em qualquer órgão. O diagnóstico e terapêutica requerem uma abordagem multidisciplinar. ⁽¹⁾

A identificação e quantificação de autoanticorpos é muito útil para o diagnóstico das doenças autoimunes, sendo efetuada neste sector pela técnica de imunofluorescência indireta e ensaios imunoenzimáticos.

3.1.1. Imunofluorescência Indireta

A imunofluorescência indireta (IFI) é uma técnica que permite a determinação semi-quantitativa de autoanticorpos, presentes no soro ou plasma do paciente. O procedimento consiste na deposição da amostra a estudar sobre um substrato adequado, corte de tecido ou células, e na pesquisa da fixação de anticorpos sobre as estruturas antigénicas correspondentes, por aplicação de uma anti-imunoglobulina humana conjugada com um

fluorocromo (Isotiocina de Fluoresceína – FITC). Esta técnica é executada automaticamente, recorrendo ao equipamento QUANTA-LYSER™ 160.

A fluorescência observada indica a presença de anticorpos, e os resultados são expressos em função do padrão e da intensidade de fluorescência. ⁽¹⁾ Estes podem ser qualitativos (positivo ou negativo) ou semi-quantitativos, sendo frequentemente expressos em título – maior diluição à qual a amostra biológica é positiva.

A fim de se evitar falsos resultados, para cada substrato utiliza-se um controlo positivo e um controlo negativo. Uma amostra é considerada positiva se o padrão de fluorescência observado for mais intenso que o controlo negativo.

A IFI é, geralmente, utilizada como técnica de rastreio inicial dos anticorpos anti-nucleares (ANA), devido ao seu baixo custo e elevada sensibilidade; permitindo a deteção de um grande número de autoanticorpos, desde que o substrato escolhido seja o mais adequado. No entanto apresenta algumas limitações de interpretação e exibe baixa especificidade. ⁽¹⁾

A escolha do substrato depende do tipo de anticorpo a pesquisar, da distribuição e da riqueza em antígenos correspondentes.

No sector da Autoimunidade os substratos utilizados são os seguintes:

Células HEp-2 – Pesquisa de anticorpos anti-nucleares (ANA) e anti-citoplasmáticos

Células epiteliais humanas obtidas a partir do carcinoma da laringe (*human epithelial cell line: type 2*). Estas células são utilizadas na pesquisa de autoanticorpos dirigidos contra constituintes nucleares e citoplasmáticos da célula. A sua utilização é vantajosa uma vez que são de origem humana, possuem um núcleo grande com vários nucléolos bem visíveis, e apresentam uma atividade mitótica elevada, o que permite a deteção de anticorpos dirigidos a antígenos que apenas são expressos durante o ciclo celular. ⁽¹⁾

Os ANA constituem um grupo diversificado de autoanticorpos que reagem com diversos componentes do núcleo como o dsDNA (*double-stranded DNA*), histonas, nucleossomas, antígenos nucleares extraíveis ENA – Sm, RNP (*ribonucleoprotein*), SSA/Ro, SSB/La, Jo-1 (*histidyl-tRNA synthetase*) e Scl70 (*scleroderma antigen – 70 kDa*), nucléolo, membrana nuclear e aparelho mitótico (centrómero, centríolo e fuso mitótico).

A identificação das especificidades dos ANA tem grande importância clínica em doenças sistémicas de base autoimune, tais como o Lúpus Eritematoso Sistémico (LES), Artrite Reumatóide (AR), Síndrome de Sjögren (SS), Polimiosite (PM), Dermatomiosite (DM), Esclerodermia (ES), Doença Mista do Tecido Conjuntivo (MCTD), entre outras. Deste modo, diferentes especificidades dos ANA contribuem para o diagnóstico, produzindo padrões de fluorescência semelhantes.

Na tabela seguinte, estão descritos os padrões de fluorescência de anticorpos anti-nucleares mais comuns.

Tabela II. – Padrões nucleares mais comuns, antígenos associados e respetiva correlação clínica. ⁽²⁾

Padrão Nuclear	Descrição	Antígenos nucleares associados	Correlação Clínica
Homogéneo	Fluorescência difusa e uniforme do núcleo em interfase, com ou sem visualização dos nucléolos. Células mitóticas positivas.	dsDNA ssDNA Histonas	LES, Lúpus induzido por fármacos, AR
Mosqueado	Fluorescência granular fina ou grosseira dos núcleos em interfase. Mitoses negativas ou positivas.	Sm RNP Scl-70 SS-A SS-B	LES, MCTD, SS, PM, ES
Nucleolar	Fluorescência dos nucléolos, por vezes associada com fluorescência homogénea do restante núcleo.	PmScl Scl-70	ES, Miosite
Centrómero	Grânulos bem individualizados, espalhados pelo núcleo em interfase e agrupados no material cromossómico condensado nas células em divisão.	Centrómero	ES, Cirrose Biliar Primária

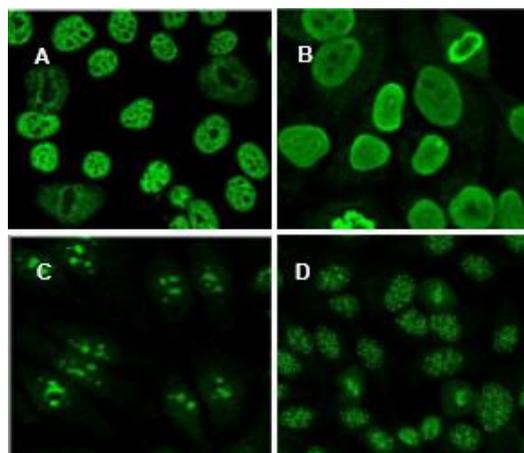


Figura 1. – Padrões de fluorescência nuclear detetados em células HEp-2: homogéneo (A), mosqueado (B), nuclear (C) e centrómero (D).

Adaptado de HEp-2 Image Library (University of Birmingham)

A elevada sensibilidade da técnica de IFI em substrato de células HEp-2, contrasta com a sua baixa especificidade: apenas alguns padrões são específicos de alguns antígenos e muitas especificidades diferentes dão origem a padrões semelhantes.

A visualização de autoanticorpos anti-citoplasmáticos também é possível neste tipo de substrato, nomeadamente de anticorpos anti-mitocôndria (AMA); caracterizam-se por uma fluorescência granular citoplasmática, que se estende ao longo do citoesqueleto (Figura 2.).

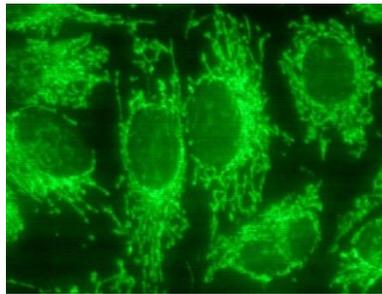


Figura 2. – Padrão citoplasmático mitocondrial detetado em células HEp-2.

Adaptado de HEp-2 Image Library (University of Birmingham)

Crithidia lucilae – pesquisa de anticorpos anti-dsDNA

Este substrato é utilizado na pesquisa de anticorpos anti-dsDNA. A *Crithidia lucilae* é um protozoário unicelular, flagelado, não patogénico para o Homem, que possui uma mitocôndria gigante – o cinetoplasto - que contém uma massa de dsDNA muito condensada. Esta massa parece ser livre de histonas ou de quaisquer outros antígenos nucleares ⁽²⁾; se o cinetoplasto apresentar fluorescência garante-se a presença deste autoanticorpo na amostra. Trata-se, portanto, de um ensaio altamente específico para a pesquisa de anti-dsDNA, embora pouco sensível.

Substrato triplo (rim, estômago e fígado de rato)

O substrato triplo é obtido a partir de cortes de três tecidos: rim, estômago e fígado de roedores. É utilizado na pesquisa de anticorpos anti-mitocôndria, anti-músculo liso, anti-microssomais hepáticos e renais e anti-célula parietal. Os diferentes anticorpos são identificados de acordo com aspeto e localização da fluorescência ao nível dos três tecidos.

i) Autoanticorpos anti-mitocôndria

Os anticorpos anti-mitocôndria (AMA) são marcadores específicos para o diagnóstico da cirrose biliar primária, presentes em cerca de 90% dos indivíduos afetados. Os AMA estão geralmente presentes em títulos elevados nesta patologia. ⁽⁴⁾

O padrão característico dos AMA no substrato triplo é revelada por uma fluorescência granular nas células parietais do estômago (A), no citoplasma dos hepatócitos (B) e nos túbulos distais e próximas do rim (C) (Figura 3.).

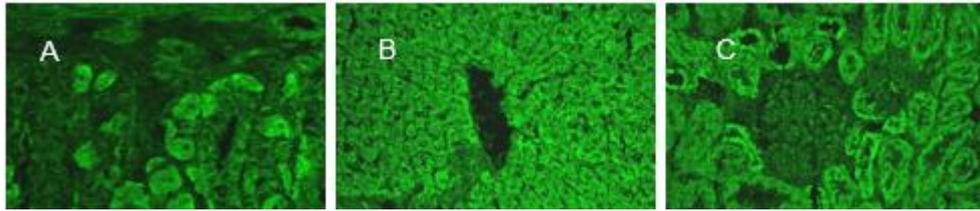


Figura 3. – Padrão de AMA em substrato triplo

Adaptado de Liver Antibodies (University of Birmingham)

ii) Autoanticorpos anti-músculo liso

Os anticorpos anti-músculo liso (AML) estão frequentemente presentes nas hepatites autoimunes e são dirigidos contra componentes do citoesqueleto, nomeadamente contra a actina. Os anticorpos AML são considerados marcadores da hepatite autoimune tipo I, apresentando geralmente títulos elevados nesta patologia. ⁽⁴⁾

No substrato triplo, ao nível do estômago observa-se uma fluorescência intensa da *muscularis mucosae* e das fibras da lâmina própria (A). Ao nível do rim observa-se uma marcação localizada no espaço peritubular (B) e os hepatócitos apresentam uma fluorescência membranar (C). Nos três tecidos é possível a visualização dos vasos (Figura 4.).

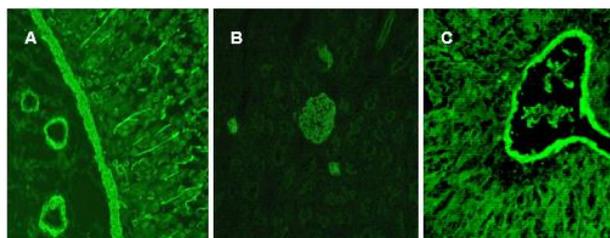


Figura 4. – Padrões de AML em substrato triplo

Adaptado de Liver Antibodies (University of Birmingham)

iii) Autoanticorpos anti-microsossomais do fígado e rim

Os anticorpos anti-microsossomais do fígado e rim (anti-LKM) constituem um grupo heterogéneo, podendo encontrar-se em vários tipos de hepatites. Os antígenos alvo

pertencem ao grupo do citocromo P450. Os anticorpos anti-LKM-1 são considerados marcadores de hepatite autoimune tipo II. ⁽⁵⁾

O padrão de anti-LKM é caracterizado por uma fluorescência homogênea do citoplasma dos hepatócitos (A) e alguma marcação no tecido renal, nomeadamente ao nível dos túbulos renais proximais (B). Os túbulos distais são habitualmente negativos ou fracamente positivos. As células parietais são negativas (C), como é visível na figura 5. Este aspeto é importante na distinção de anticorpos anti-LKM dos AMA, que marcam igualmente os túbulos proximais e distais.

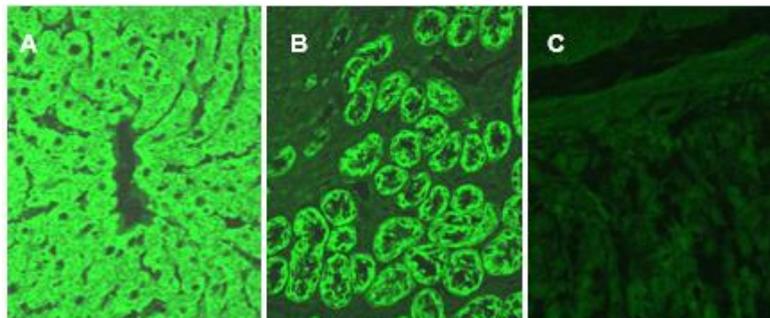


Figura 5. – Padrão de LKM em substrato triplo

Adaptado de Liver Antibodies (University of Birmingham)

iv) Autoanticorpos anti-célula parietal

A presença de anticorpos anti-célula parietal (APC) é revelada por uma fluorescência fina do citoplasma das células parietais do substrato (Figura 6.), na ausência de marcação nos cortes de rim e fígado. Estes anticorpos estão presentes em cerca de 90% dos doentes com anemia perniciosa, sendo úteis no diagnóstico desta patologia.

⁽⁵⁾

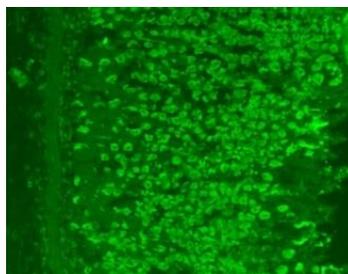


Figura 6. – Padrão de fluorescência característico de anticorpos APC detetados em estômago de rato.

Adaptado de Liver Antibodies (University of Birmingham)

Cortes de esôfago de macaco

Este substrato é obtido a partir de cortes de esôfago de macaco. É utilizado na pesquisa de anticorpos anti-endomísio.

O endomísio é uma estrutura de suporte, que rodeia as fibras de músculo estriado e liso de uma parte do esôfago. Os autoanticorpos dirigidos contra esta estrutura (EMA), geralmente da classe IgA, são altamente específicos e sensíveis para pacientes com Doença Celíaca (DC), uma vez que raramente são detetados em indivíduos saudáveis e em pacientes com outras enteropatias. Revelam-se, portanto, muitos úteis no diagnóstico desta patologia. ⁽⁵⁾

O padrão de fluorescência dos autoanticorpos EMA apresenta a forma característica, em favo de mel, à volta das fibras musculares da camada *muscularis mucosae*, como se pode observar na figura 7.

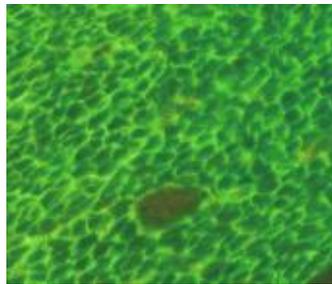


Figura 7. – Padrão de fluorescência caraterístico dos autoanticorpos EMA em cortes de esôfago de macaco.

Adaptado de Liver Antibodies (University of Birmingham)

Neutrófilos

As preparações de neutrófilos humanos, fixados em etanol, são utilizadas na pesquisa dos anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA), importantes marcadores de vasculites sistémicas. A fixação com etanol permite a distinção de dois padrões – c-ANCA (padrão citoplasmático), p-ANCA (padrão perinuclear). O padrão c-ANCA (A), geralmente associado a anticorpos dirigidos contra a proteinase 3 (PR3), apresenta marcação citoplasmática granular. O padrão p-ANCA (B), produzido por anticorpos que reagem contra a mieloperoxidase (MPO), apresenta uma marcação homogénea dos lóbulos nucleares, com frequente acentuação perinuclear (Figura 8.). ⁽⁵⁾

Muitos ANCA podem não ser dirigidos contra PR3 ou MPO, mas contra outras enzimas citoplasmáticas dos neutrófilos. Por este motivo, os padrões ANCA devem ser sempre confirmados com testes mais específicos para deteção de anti-PR3 e anti-MPO.

Alguns ANA podem também reagir com o núcleo dos neutrófilos humanos fixados com etanol, produzindo padrões semelhantes a p-ANCA. De modo a evitar falsos positivos, sempre que os neutrófilos apresentem fluorescência perinuclear, testa-se a mesma amostra

numa lâmina fixada em formol. Nestas preparações, a amostra com um padrão nuclear passa a um padrão citoplasmático.

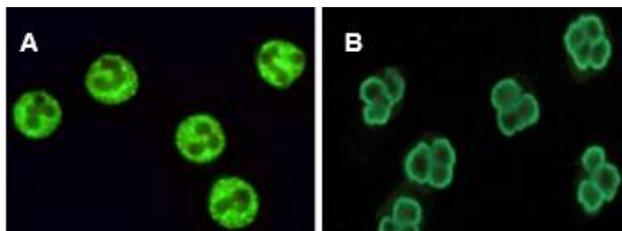


Figura 8. – Neutrófilos em etanol, permitindo distinguir dois padrões.

Adaptado de Liver Antibodies (University of Birmingham)

Resultados positivos obtidos por imunofluorescência indireta podem ser muito informativos. Contudo, os padrões são apenas orientativos, não permitindo uma identificação definitiva dos autoanticorpos. Deste modo, os resultados devem ser sempre confirmados por técnicas mais específicas como os imunoensaios enzimáticos. ⁽¹⁾

3.1.2. Imunoensaios Enzimáticos

3.1.2.1. ELISA - enzyme-linked immunoabsorbent assay

As técnicas de ELISA permitem a deteção e quantificação de autoanticorpos presentes no soro do paciente. Neste método, o suporte sólido é uma microplaca de poliestireno revestida por antígenos complementares aos anticorpos de interesse. Se os anticorpos estiverem presentes na amostra ocorre a formação de complexos antígeno-anticorpo. Estes complexos são detetados após adição de anti-imunoglobulina humana conjugada com uma enzima. A revelação da reação é conseguida através da adição do substrato, que ao reagir com o complexo produz cor azul que se altera para amarela, após adição de uma solução de paragem (ácido). Esta solução permite que a reação de conversão do substrato em produto pare simultaneamente em todas as amostras e as posteriores leituras espectrofotométricas possam ser uniformizadas. A absorvância, das amostras e controlos, é proporcional à concentração de anticorpos na amostra. ⁽¹⁾ Esta técnica está automatizada e é executada através do equipamento TRITURUS® e QUANTA LYSER™ 160.

Neste sector, procede-se à quantificação de diversos autoanticorpos, entre eles: fator reumatoide, anticorpos anti-citrulina (anti-CCP), anticorpos anti-LKM-1, anticorpos anti-M2, anticorpos anti-actina e anticorpos anti-fator intrínseco.

Fator reumatóide e anticorpos anti-CCP

Vários autoanticorpos estão associados à AR, servindo como marcadores de diagnóstico e prognóstico. Estes incluem o fator reumatoide e anticorpos anti-CCP. Os fatores reumatoides (isótipos IgA, IgM e IgG) são autoanticorpos, geralmente do tipo IgM, dirigidos contra o fragmento Fc das imunoglobulinas. Este anticorpo apresenta baixa especificidade e sensibilidade, uma vez que pode estar presente em outras patologias autoimunes, casos de infecções crónicas e em pessoas saudáveis. ⁽⁴⁾

Os anticorpos anti-CCP constituem um marcador precoce e específico da AR. Estes anticorpos podem ser detetados anos antes do aparecimento de sintomas clínicos associados a AR, pelo que a sua utilidade diagnóstica e prognóstica é de elevada importância.

Comparativamente ao fator reumatoide, o anti-CCP é muito mais sensível e específico. ⁽⁵⁾

Anticorpos anti-M2

Os anticorpos anti-M2 têm maior significado clínico, podendo aparecer associados a situações de hepatite crónica ativa, colestase e diversas doenças autoimunes, mas a títulos altos correlacionam-se frequentemente com situações de cirrose biliar primária. Estes anticorpos estão presentes em cerca de 95% dos pacientes com esta patologia. ⁽⁵⁾

Anticorpos anti-actina

Os anticorpos anti-actina apresentam grande especificidade para a hepatite autoimune tipo I. Deste modo, sempre que um resultado seja positivo para AML por IFI, procede-se à pesquisa e quantificação de anticorpos anti-actina. ⁽⁴⁾

Anticorpos anti-LKM-1

Os anticorpos anti-LKM-1, como referido, são os marcadores da hepatite autoimune tipo II, pelo que a sua determinação e quantificação tem interesse clínico.

Anticorpos anti-fator intrínseco

A anemia perniciosa está associada à presença de anticorpos ACP e anticorpos anti-fator intrínseco. Embora os anticorpos ACP sejam específicos desta doença, podem estar frequentemente associados a outras patologias, pelo que o diagnóstico da anemia perniciosa deve sempre incluir também a pesquisa de autoanticorpos anti-fator intrínseco. ⁽⁵⁾

3.1.2.2. FEIA – ensaio fluoroenzimático

A técnica FEIA utiliza produtos fluorescentes para a determinação quantitativa de anticorpos (IgG, IgA e IgM) específicos de antígeno, recorrendo ao ImmunoCap 250. Este equipamento totalmente automatizado utiliza como fase sólida poços de poliestireno fechado numa cápsula que liga covalentemente os antígenos, permitindo uma ligação estável. Os anticorpos presentes na amostra vão reagir com os antígenos ligados. Os anticorpos anti-imunoglobulina humana marcados enzimaticamente (β -galactosidase) adicionados, ligam-se ao complexo anteriormente formado. A reação é revelada pela adição do substrato não fluorescente (4-metilumbeliferil- β -D-galactosideo), que vai ser convertido pela enzima num produto altamente fluorescente. A leitura da fluorescência é feita por um fluorímetro e a fluorescência emitida é diretamente proporcional à concentração de anticorpos na amostra. ⁽⁶⁾

Neste sector é utilizada a técnica FEIA na quantificação dos seguintes anticorpos: anti-dsDNA, anti-centrómero, anti-Scl70, anti-SSA/Ro e anti-SSB/La, anti-membrana basal glomerular, anti-gliadina deaminada e anti-transglutaminase (anti-tTG).

Anticorpos anti-dsDNA

Os anticorpos anti-dsDNA são marcadores específicos para LES, sendo observados em 75-90% dos pacientes com doença ativa. Deste modo a sua quantificação é importante para o diagnóstico e monitorização de pacientes com LES. O seu título está diretamente relacionado com a atividade da doença. ⁽⁴⁾

Anticorpos anti-centrómero e anti-Scl70

Pacientes com ES possuem autoanticorpos dirigidos contra antígenos nucleares. Alguns destes anticorpos estão mais relacionados com formas localizadas desta patologia, como é o caso do autoanticorpo anti-centrómero, estando presente em 20-40% dos pacientes. Os autoanticorpos anti-Scl70 ocorrem em 9-20% dos pacientes com ES difusa, uma forma mais severa desta patologia. ⁽⁴⁾

Anticorpos anti-SSA/Ro e anti-SSB/La

Os anticorpos mais característicos do SS são aqueles que se dirigem diretamente contra antígenos associados ao RNA, de localização citoplasmática ou nuclear, os anti-SS-A e anti-SS-B, contra as partículas ribonuceoproteicas Ro/SSA e La/SSB. Os anti-SSA são encontrados em 60% dos pacientes, e não são considerados totalmente específicos da doença, uma vez que também são identificados em pacientes com LES. Os anticorpos anti-SSB

também são característicos de SS e são detetados em 40% dos pacientes e co-existem com anti-SSA, em muitos dos casos. A sua co-existência é muito sugestiva de SS. ⁽⁵⁾

Anticorpos anti-membrana basal glomerular

Os autoanticorpos anti-membrana basal glomerular são dirigidos contra o colagénio tipo IV da membrana basal glomerular renal. Estão associadas à Síndrome de Goodpasture. ⁽⁵⁾

Anticorpos anti-transglutaminase tecidual e anti-gliadina deaminada

Os anticorpos produzidos na DC incluem anticorpos contra o endomísio, mais especificamente contra a enzima transglutaminase tecidual (anti-tTG), e contra a gliadina deaminada. Os anticorpos anti-tTG da classe IgA são altamente específicos e sensíveis, sendo muito úteis no diagnóstico desta patologia. Cerca de 2 a 3% dos pacientes com DC possuem deficiência seletiva de IgA, pelo que nesses casos procede-se à pesquisa de anticorpos anti-tTG da classe IgG.

Os anticorpos anti-gliadina deaminada apresentam menos especificidade que os anti-tTG. Contudo, são úteis no diagnóstico desta patologia em idades pediátricas, uma vez que crianças com menos de dois anos frequentemente não apresentam autoanticorpos anti-tTG e EMA. ⁽⁴⁾ No sector faz-se a determinação de anti-tTG e anti-gliadina deaminada em primeiro e, só em caso positivo, o resultado é confirmado procedendo-se à determinação de EMA por IFI.

3.1.2.3. Quimioluminiscência

A quimioluminiscência corresponde à emissão de luz quando um eletrão passa de um nível energético superior, ou do estado excitado, para um nível inferior. A excitação é causada por uma reação química que envolve a oxidação de um composto orgânico por um agente oxidante. O BIO-FLASH® é um equipamento automático, multiparamétrico destinado à determinação de autoanticorpos com recurso à técnica de quimioluminiscência. Os ensaios utilizam um derivado do isoluminol como marcador e micropartículas paramagnéticas como fase sólida.

O imunoensaio de micropartículas por quimioluminiscência ocorre em dois passos. No primeiro, a amostra e as micropartículas paramagnéticas, revestidas com o antigénio complementar ao anticorpo de interesse, são combinadas e incubadas. O anticorpo, presente na amostra, liga-se ao antigénio. No segundo passo, anticorpos anti-imunoglobulina humana marcadas com um derivado do isoluminol são adicionados, e ligam-se ao complexo anteriormente formado. As soluções ativadora e pré-ativadora (H₂O₂) são então adicionadas à mistura. A reação quimioluminiscente é medida em unidades de luz relativas, em que existe

uma relação direta entre a concentração do anticorpo presente na amostra e a luz detetada no sistema ótico do equipamento. ⁽⁷⁾

No sector utiliza-se a técnica de quimioluminiscência na determinação dos anticorpos anti-PR3, anti-MPO e anti-U1-RNP.

Anticorpos anti-PR3 e anti-MPO

Os anticorpos anti-PR3, geralmente associados ao padrão c-ANCA, são marcadores da Granulomatose de Wegener. Títulos elevados deste anticorpo correlacionam-se com a atividade da doença, pelo que a sua quantificação é útil na monitorização da patologia. ^(4,5)

Os anticorpos anti-MPO, associado ao padrão p-ANCA, manifestam-se em algumas vasculites como a Poliangite Microscópica e Síndrome Churg-Strauss, pelo que a sua determinação é clinicamente relevante. ⁽⁴⁾

Anticorpos anti-U1-RNP

Pacientes com DMTC possuem títulos elevados de anticorpos dirigidos contra ribonucleoproteínas, especialmente contra a pequena ribonucleoproteína nuclear U (U1-RNP). ⁽⁴⁾ Deste modo, anticorpos anti-U1-RNP são bastante úteis para o diagnóstico desta patologia

3.1.2.4. Immunoblot

A técnica *immunoblot* permite a identificação qualitativa de anticorpos. Neste ensaio, antigénios extraídos de culturas celulares são separados por electroforese em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes. Os antigénios são posteriormente transferidos para uma membrana de nitrocelulose, que corresponde à fase sólida da reação. A membrana é cortada em tiras de modo a que cada tira seja composta por um conjunto de antigénios individualizados e um controlo interno. ⁽¹⁾ Deste modo, um único teste permite a identificação de vários antigénios.

A tira é incubada com a amostra do doente e na eventual presença de anticorpos, estes ligam-se aos antigénios. Esta ligação é revelada após incubação com anti-imunoglobulina humana conjugada com uma enzima, seguida de uma nova incubação com um substrato cromogénico, com a formação de cor nos locais de imobilização dos antigénios. O resultado final é dado como positivo ou negativo, e só serão válidos se para cada tira a zona do controlo interno apresentar coloração negra. ⁽¹⁾ É uma técnica automatizada, executada no equipamento EUROBlotMaster.

No sector são utilizados kits, que contêm várias tiras, que permitem a identificação qualitativa dos autoanticorpos presentes na amostra de um paciente. Cada tipo/perfil de tira contém um determinado conjunto de antígenos.

Perfil Esclerose Sistémica

Este perfil permite a determinação de autoanticorpos dirigidos contra antígenos associados à esclerose múltipla: autoanticorpos da classe IgG dirigidos contra doze antígenos diferentes: Scl-70, CENP A, CENP B, RP11, RP155, Fibrilarina, NOR-90, Th/To, PM-Scl100, PM-Scl175, Ku, PDGFR.

Perfil Hepático

Este perfil permite a determinação de nove autoanticorpos diferentes relevantes no diagnóstico da cirrose biliar primária e da hepatite autoimune. Para além disso, este teste assegura o diagnóstico de síndromes de sobreposição caracterizadas pela presença simultânea de autoanticorpos específicos da cirrose biliar primária e da hepatite autoimune. As tiras são compostas por antígenos nucleares, mitocondriais e citoplasmáticos, tais como: AMA-M2, M2-3E, Sp100, PML, gp210, LKM-1, LC-1, SLP/LP e RO-52.

3.2 SECTOR DA IMUNOQUÍMICA

A imunquímica engloba um conjunto de metodologias que permitem explorar as reações específicas que ocorrem entre antígenos e anticorpos.

Este sector dedica-se ao diagnóstico e monitorização de gamopatias monoclonais através das técnicas de electroforese e imunofixação/imunosubtração e ao doseamento de proteínas individuais, nomeadamente quando são detetadas alterações nos padrões electroforéticos. São também efetuados estudos de patologias inflamatórias neuroimunes e o doseamento e caracterização de crioglobulinas.

3.2.1. Imunodifusão radial

A imunodifusão radial é uma técnica quantitativa utilizada para medir a concentração de antígenos solúveis. O método envolve uma placa de agarose homogeneamente revestida com um gel que contém anticorpo apropriado. A amostra de antígeno é colocada nos poços da placa e a interação antígeno-anticorpo é manifestada pelo aparecimento de um halo de precipitação. O tamanho deste halo aumentará até se alcançar o equilíbrio entre a formação e

o esgotamento destes complexos. Em condições de equilíbrio, a concentração do antigénio é proporcional ao quadrado do diâmetro (d^2) do halo de precipitação. ⁽⁸⁾

A partir da medição do diâmetro dos halos de três calibradores com concentrações conhecidas, poderá construir-se uma curva de calibração. A concentração do antigénio numa amostra pode então ser determinada pelo valor da medição do diâmetro do halo produzido por esta amostra, numa curva de calibração.

Neste sector, a técnica de imunodifusão radial é realizada para doseamento de fatores do sistema do complemento.

Proteínas do sistema do complemento

O sistema do complemento tem um papel importante na resposta imunitária. Este é constituído por pelo menos trinta proteínas diferentes, sintetizadas sobretudo no fígado, que circulam no plasma na sua forma inativa. Sob influência de diversos fatores, produzem vários complexos que desempenham um papel importante na defesa imune inata e adaptativa. A ativação do complemento permite a destruição de antigénios particulares, quer por ligação ao imunocomplexo, quer através da estimulação da fagocitose. ⁽⁹⁾

Existem três vias de ativação do complemento: a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas. A via clássica é importante na defesa imune antigénio-específica, pois é ativada por complexos antigénio-anticorpo e vai funcionar como um mecanismo efetor da imunidade humoral. A via alternativa não depende da reação antigénio-anticorpo, sendo ativada por estruturas de microrganismos. A via das lectinas também é ativada na ausência de anticorpos, por ligação de polissacarídeos microbianos a lectinas presentes na circulação. Esta via permite a ativação da via clássica do sistema do complemento na ausência de anticorpos. As três vias desencadeiam a clivagem do componente C3 e conseqüente formação do complexo de ataque à membrana (MAC), responsável pela lise e morte celular.

A via alternativa e a via das lectinas são componentes do sistema imunológico inato, constituindo a primeira linha de defesa contra organismos invasores. A via clássica faz ponte entre o sistema imunológico inato e o sistema imunológico adquirido.

Deficiências primárias do complemento são raras, com prevalência de 0.03%. Estas para além de aumentarem a suscetibilidade a infeções recorrentes, também estão associadas a doenças autoimunes. ⁽⁹⁾

Tabela III. – Deficiências dos componentes do complemento e manifestações clínicas associadas. ⁽⁹⁾

Componente	Manifestação clínica
C1q	LES
C2	Infeções recorrentes; vasculite; LES
C3	Infeções recorrentes e severas, frequentemente por bactérias piogénicas, capsuladas
C4	LES; nefropatias; angiodema hereditário
C5-C9	Infeções recorrentes e severas por espécies <i>Neisseria</i>
Factor H	Infeções bacterianas recorrentes; síndrome hemolítica-urémica
Factor B	Infeções piogénicas

Assim, a deficiência primária de fatores do complemento predispõe os indivíduos a infeções bacterianas e doenças autoimunes. Doentes com alguma deficiência específica do complemento tornam-se suscetíveis a infeções pulmonares, bacteriemias e/ou meningites, sendo os microrganismos mais frequentemente implicados bactérias capsuladas. ⁽⁹⁾

3.2.2. Nefelometria

A nefelometria baseia-se na capacidade dos complexos antigénio-anticorpo, em solução, formarem agregados capazes de dispersar a luz incidente. Na determinação nefelométrica, a amostra diluída (soro, urina ou LCR) é combinada com uma diluição otimizada de anti-soro específico. Assim, o material suspenso é quantificado a partir da luz dispersa medida por um detetor, normalmente num ângulo de 90°. ⁽⁸⁾ A intensidade da luz dispersa é diretamente proporcional à quantidade de antigénio presente na amostra, desde que se processe na zona de excesso de anticorpo do reagente, e que é determinada por comparação com uma série de padrões ou calibradores.

No sector da imunoquímica, o doseamento de proteínas por nefelometria é realizado por intermédio de dois equipamentos distintos: BNTM II e Image® 800.

Tabela IV. – Parâmetros doseados e respetivos aparelhos

Autoanalisador	Parâmetros
BNT TM II	Proteína C reativa; amiloide sérico A; cadeias leves κ e λ (urina); IgA (baixa concentração); subclasses IgG e IgA
Image [®] 800	IgA, IgG, IgM; C3, C4; α 1-antitripsina; α 1-glicoproteína ácida; α 2-macroglobulina; IgA e IgG (urina); IgG (LCR)

Proteínas doseadas

Albumina

A albumina é a proteína mais abundante no plasma, sintetizada exclusivamente no fígado. Tem como principal função o transporte e ligação ao cálcio, ácidos gordos, bilirrubina, hormonas, entre outros. Contribui para a pressão oncótica.

A hipoalbuminémia ocorre em casos graves de insuficiência hepática, bem como em situações de perda acentuada de proteínas, devido a perdas renais, gastroenteropatias ou queimaduras graves.

O doseamento de albumina na urina permite avaliar defeitos na barreira de filtração glomerular. Normalmente, a membrana basal do glomérulo não permite a passagem de albumina, pelo que a albuminúria é um marcador de lesão glomerular. ⁽⁸⁾

Proteína C reativa

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína não glicolisada sintetizada no fígado, que é libertada para a circulação algumas horas após o início da reação inflamatória.

Uma das ações da PCR presentes no soro é estimular a fagocitose de bactérias por leucócitos polimorfonucleares, sendo que em caso de deficiência há maior predisposição para infeções bacterianas.

Níveis aumentados de PCR observam-se especialmente após infarto agudo do miocárdio, em situações de trauma, infeção pneumocócica, cirurgia e em neoplasias. Trata-se de um parâmetro muito sensível, no entanto é útil apenas como indicador de um processo de fase aguda. ⁽⁸⁾

α 1-antitripsina

A α 1-antitripsina é uma glicoproteína sintetizada no fígado e representa uma das proteínas plasmáticas mais abundantes. É uma proteína de fase aguda com atividade anti-proteásica. Tem como principal função a inibição de elastases libertadas pelos neutrófilos.

Tanto a deficiência hereditária de $\alpha 1$ -antitripsina, como valores séricos elevados durante uma reação de fase aguda, estão associados a síndromes específicas. Os estados de deficiência de $\alpha 1$ -antitripsina têm frequentemente uma causa genética. A sua deficiência está associada a doença pulmonar (enfisema) e hepática (cirrose). Valores elevados de $\alpha 1$ -antitripsina devem-se, na maioria dos casos, a situações inflamatórias. ⁽⁸⁾

Amilóide sérico A

O Amiloide sérico A é uma proteína da família das apolipoproteínas, que é produzida predominantemente no fígado em resposta a citocinas. Tem como função o transporte de colesterol, proveniente do fígado, para a bÍlis e o recrutamento de células imunitárias aos locais de inflamação.

O Amiloide sérico A é uma proteína de fase aguda com sensibilidade comparável à da PCR, sendo libertada horas após o início da reação inflamatória. Esta proteína está também associada a processos inflamatórios crónicos, apresentando valores séricos permanentemente aumentados, embora inferiores aos encontrados durante a fase aguda. ⁽⁸⁾

$\alpha 2$ -Macroglobulina

A $\alpha 2$ -macroglobulina é uma glicoproteína inibidora de proteases, embora de forma menos específica do que a $\alpha 1$ -antitripsina. Tem como função o transporte de hormonas e enzimas e a inibição de fatores do complemento e da hemostase.

Nos estados hiperfibrinolíticos, após cirurgia, na septicemia e na insuficiência hepática grave, os valores de $\alpha 2$ -macroglobulina séricos, são frequentemente baixos. Os doentes com pancreatite aguda apresentam concentrações séricas baixas, que se correlacionam com a gravidade da doença. ⁽⁸⁾

$\alpha 1$ -Glicoproteína ácida

A $\alpha 1$ -glicoproteína ácida, também conhecida como orosomucóide, é uma mucoproteína sintetizada no fígado, podendo ser também produzida por leucócitos e células tumorais. É o componente mais importante da fração seromucóide do plasma, que consiste num grupo de proteínas assim caracterizadas devido ao seu elevado teor em hidratos de carbono. A sua função fisiológica ainda não é bem conhecida.

A $\alpha 1$ -glicoproteína ácida é uma proteína de fase aguda. Deste modo, aumento sérico pode ser observado em casos infecciosos e de necrose tecidular. Valores diminuídos devem-se, na maioria dos casos, a situações de insuficiência hepática, má-nutrição e gastroenteropatias com perda de proteínas. ⁽⁸⁾

Complemento C3 e C4

O sistema do complemento corresponde a um conjunto de proteínas séricas que se encontram em circulação, na forma inativa. O componente C3 é o mais abundante e representa uma proteína-chave de ambas as vias, enquanto a C4 é uma proteína exclusiva da via clássica. A ativação anómala do complemento é acompanhada por um consumo excessivo das proteínas C3 e C4, de modo que a diminuição das suas concentrações séricas permite um diagnóstico de patologias associadas às proteínas C3 e C4 do complemento.

Concentrações séricas diminuídas de C3 e C4 observam-se sobretudo no LES, em infeções bacterianas e em formas de glomerulonefrite. Uma diminuição isolada da C4 pode manifestar-se no angiodema hereditário. Estes dois fatores do complemento reagem como proteínas de fase aguda, podendo apresentar concentrações aumentadas nos processos inflamatórios. ⁽⁸⁾

Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são proteínas produzidas pelos plasmócitos (linfócitos B diferenciados) após estimulação antigénica. Estes funcionam como anticorpos pois reconhecem os determinantes antigénico que estimulam a sua produção. Cada imunoglobulina é constituída por duas cadeias leves idênticas, κ ou λ , e duas cadeias pesadas idêntica. Estas cadeias polipeptídicas estão unidas entre si por interações não covalentes, estabilizadas por pontes dissulfureto. As cadeias pesadas definem cada uma das cinco classes de imunoglobulinas: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. A classe IgG tem quatro subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A classe IgA tem duas subclasses: IgA1 e IgA2.

Tanto as cadeias leves como as cadeias pesadas possuem duas regiões funcionais, a região variável (V) responsável pelo reconhecimento e ligação ao antigénio, e a região constante (C) com funções efetoras, que é responsável pela interação com outros componentes do sistema imunitário. ^(5,8)

O aumento das imunoglobulinas no soro pode ocorrer de forma policlonal ou de forma monoclonal. Na forma policlonal, há produção heterogénea de anticorpos em resposta a quadros clínicos infecciosos e inflamatórios crónicos, a doenças hepáticas e autoimunes. Na forma monoclonal, os anticorpos são produzidos por uma única linhagem de plasmócitos, resultando na produção de uma única classe de imunoglobulinas, como acontece no mieloma múltiplo, na macroglobulinémia de Waldenström, e em doenças hepáticas crónicas (hepatite crónica e cirrose).

A diminuição das imunoglobulinas, hipogamaglobulinémia, pode ocorrer em consequência de defeitos genéticos (imunodeficiências congénitas) ou adquiridas, como infeções e alguns tumores malignos. ^(5,8)

Cadeias leves das imunoglobulinas

As imunoglobulinas são constituídas por duas cadeias leves, κ ou λ . Nos indivíduos saudáveis, as cadeias leves são produzidas em excesso, de modo que uma pequena concentração, que representa apenas 0,1% das imunoglobulinas totais, pode ser encontrada no plasma. As baixas concentrações são mantidas devido à clearance renal. No entanto, em algumas patologias monoclonais, a síntese destas cadeias pode exceder grandemente a produção de cadeias pesadas, o que resulta na libertação de quantidades variáveis de cadeias leves.

As imunoglobulinas policlonais apresentam os dois tipos de cadeias leves, κ e λ , numa relação constante de 2:1, as imunoglobulinas monoclonais possuem cadeias leves de um só tipo, κ ou λ . O aumento da produção de imunoglobulinas completas ou de cadeias leves livres altera a relação das cadeias leves κ/λ . Assim, um quociente κ/λ alterado está geralmente associado à presença de uma gamapatia monoclonal. ⁽⁵⁾

3.2.3. Electroforese Capilar

A separação electroforética das proteínas séricas é uma técnica determinante na deteção das gamopatias monoclonais e complemento no diagnóstico de estados patológicos associados com variações na quantidade de proteínas.

Na electroforese capilar a separação das proteínas é efetuada em meio líquido através de um capilar de sílica fundida, e tem como base os princípios fundamentais da separação das proteínas. Quando se aplica uma alta voltagem dentro do capilar é criado um fluxo electrosmótico, que promove o movimento das moléculas desde o ânodo até ao cátodo. Um detector ultravioleta, junto ao cátodo, controla a absorvância das proteínas, permitindo a sua identificação e quantificação. ⁽¹⁰⁾

A electroforese capilar permite separar as proteínas séricas totais em 6 frações distintas:

- Albumina
- Fração $\alpha 1$ – $\alpha 1$ -antitripsina, $\alpha 1$ -glicoproteína ácida, $\alpha 1$ -fetoproteína
- Fração $\alpha 2$ – $\alpha 2$ -macroglobulina, haptoglobulina e ceruloplasmina
- Fração $\beta 1$ – transferrina, ferritina
- Fração $\beta 2$ – proteínas C3 e C4
- Fração γ – imunoglobulinas e proteína C reativa

Esta técnica é executada em amostras de soro ou urina, recorrendo ao equipamento automático CAPILLARYS™ II.

3.2.4. Imunofixação por subtração

A técnica de imunofixação por subtração permite a identificação e caracterização das imunoglobulinas monoclonais, detetadas na electroforese de proteínas séricas. Nesta técnica faz-se reagir a amostra de soro com anticorpos específicos antes de efetuar a electroforese capilar.

O perfil proteico de referência (ELP) é obtido por injeção das amostras pré-diluídas no capilar, obtendo-se o perfil electroforético completo das proteínas das amostras. Os perfis anti-soro são obtidos por injeção, em cinco capilares diferentes, das amostras previamente diluídas e misturadas com anti-soros específicos contra as cadeias pesadas γ (IgG), α (IgA) e μ (IgM), e cadeias leves (livres e ligadas) κ e λ .

As imunoglobulinas específicas são identificadas no analisador automático pela ausência e/ou diminuição do respetivo pico relativamente ao perfil proteico de referência, permitindo assim a caracterização do componente monoclonal suspeito (Fig. 9).⁽¹¹⁾

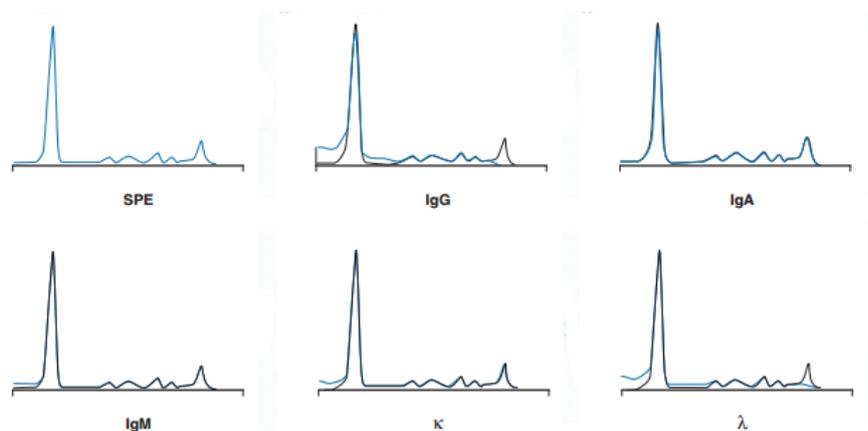


Figura 9. – Imunofixação por subtração sérica de um paciente com gamapatia monoclonal IgG lambda.⁽¹¹⁾

Imunoglobulinas Monoclonais

As imunoglobulinas monoclonais, também designadas de paraproteínas ou proteínas M, derivam de uma única linhagem de células plasmáticas que podem produzir altas concentrações de uma única classe de anticorpo. As imunoglobulinas monoclonais podem ser polímeros, monómeros ou fragmentos, usualmente cadeias pesadas ou leves.⁽⁸⁾

A confirmação da presença de uma paraproteína é essencial para distinguir as gamopatias monoclonais das gamopatias policlonais. Esta distinção é importante, uma vez que as gamopatias monoclonais constituem patologias neoplásicas ou potencialmente neoplásicas enquanto as policlonais são consequência de processos inflamatórios e/ou infecciosos.

Uma parte significativa das gamopatias monoclonais identificadas na electroforese sérica são gamopatias benignas, designadas *gamopatias monoclonais de significado indeterminado* (MGUS). O risco de transformação maligna (mieloma múltiplo) em indivíduos com MGUS é de 20% em 10 anos, de modo é recomendável a estes utentes a monitorização anual da evolução da doença. ⁽⁵⁾

3.2.5. Electroimunofixação

A componente monoclonal pode ser também detetada através de técnicas de electroimunofixação. Esta técnica consiste na separação de proteínas por electroforese e posterior fixação com antisoro monoespecífico anti-cadeias pesadas γ (IgG), α (IgA) e μ (IgM), e anti-cadeias leves (livres e ligadas) κ e λ . Assim, numa primeira fase, as proteínas são separadas em meio alcalino (pH=9.2), em gel de agarose e, posteriormente, são fixadas e imunoprecipitadas. Os complexos antígeno-anticorpo resultantes são retidos na matriz do gel e corados com violeta ácido. ⁽⁸⁾ De modo a identificar de forma precisa a natureza das bandas monoclonais, as amostras são testadas simultaneamente em seis pistas. A primeira pista serve como referência (ELP), usando-se antisoro poliespecífico de forma a produzir o perfil electroforético das proteínas, enquanto as restantes cinco pistas permitem a caracterização das bandas monoclonais devido aos anti-soros específicos.

O Hydrasys® é um sistema analítico semiautomático, multiparamétrico, que se destina à realização das técnicas de electrofores e imunofixação, em gel de agarose. No sector da Imunoquímica a técnica de electroimunofixação é realizada em amostras de urina para a pesquisa de proteína de Bence Jones.

Proteína de Bence Jones

A proteína Bence Jones é formada por cadeias leves (κ ou λ) livres de imunoglobulinas monoclonais encontradas na urina ou no soro. A presença ou ausência desta proteína na urina depende da quantidade de síntese de cadeias leves e do estado renal do doente. É geralmente encontrada em doentes com mieloma múltiplo, mas também pode ocorrer em doentes com macroglobulinemia de Waldenström, em doenças mieloproliferativas e em gamopatias monoclonais benignas.

Esta proteína de baixo peso molecular é rapidamente filtrada pelo glomérulo renal e posteriormente é reabsorvida pelos túbulos proximais dos nefrónios, pelo que só aparece na urina quando é filtrada em níveis que ultrapassam a capacidade de reabsorção tubular. A proteinúria de Bence Jones tem um efeito nefrotóxico.

A monitorização da proteína de Bence Jones é útil na avaliação de recidivas da doença, na transição para uma forma mais agressiva e na resposta a terapia. A presença e a quantidade de proteína de Bence Jones influencia no prognóstico. ^(12,13)

A pesquisa de proteína de Bence Jones no soro ou urina é realizada por electroimunofixação semelhante à descrita anteriormente, no entanto os anti-soros aplicados são diferentes. Neste caso, é utilizado um anti-soro trivalente – anti-cadeias pesdas γ (IgG), α (IgA) e μ (IgM); anti-cadeias leves livres κ e λ (livres e ligadas) e anti-cadeias leves livres κ e λ .

Deteção de secreção de IgG intratecal

A maioria das proteínas do LCR (80%) provêm do plasma por ultrafiltração e as restantes são sintetizadas de novo pelas células dos plexos coróides. A composição do LCR é controlada pela barreira hematoencefálica, pelo que uma elevação do teor proteico do LCR, apesar de ser um parâmetro inespecífico, pode indicar alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica ou na síntese intratecal de imunoglobulinas, ou em ambas.

A deteção da síntese intratecal de imunoglobulinas é muito importante no diagnóstico de doenças desmielinizantes do sistema nervoso central, nomeadamente da esclerose múltipla. ⁽⁷⁾

A imunofixação do LCR é utilizada para confirmar a existência de síntese intratecal de imunoglobulinas e tem como objetivo a pesquisa de bandas oligoclonais, definidas por duas ou mais bandas discretas na região gama.

A deteção de bandas oligoclonais consiste numa electroforese por focagem isoelectrica, em gel de agarose, seguida de imunofixação das proteínas com um anti-soro anti-IgG, pois na maioria dos casos as imunoglobulinas provenientes da síntese intratecal pertencem à classe IgG. Amostras de LCR e de soro colhidas na mesma altura são analisadas em paralelo de forma a comparar o perfil das imunoglobinas. A observação de um perfil diferente de imunoglobulinas entre o soro e o LCR do mesmo paciente ou a presença de bandas suplementares monoclonais ou oligoclonais no LCR permite concluir que houve síntese intratecal de imunoglobulinas. ⁽⁵⁾

Pesquisa, doseamento e identificação de crioglobulinas

As crioglobulinas são imunoglobulinas presentes no soro que se caracterizam por precipitarem a temperaturas inferiores à temperatura corporal. A crioglobulinemia provoca vasculites, uma doença que afeta os vasos sanguíneos devido à deposição de imunocomplexos, que estimula a ativação do sistema complemento, ou por bloqueio dos próprios vasos.

As crioglobulinas podem ser classificadas em três tipos, consoante a composição em imunoglobulinas. As crioglobulinas do tipo I consistem numa imunoglobulina monoclonal, normalmente IgM. Estas estão geralmente associadas a doenças linfoproliferativas. As do tipo II possuem uma componente monoclonal, geralmente IgM, e uma componente IgG policlonal, que estão geralmente associadas a doenças linfoproliferativas, doenças autoimunes, mieloma múltiplo e doenças crónicas infecciosas, nomeadamente hepatite C. Por último, as crioglobulinas do tipo III são compostas por uma ou mais classes de imunoglobulinas policlonais, associadas a doenças autoimunes e doenças crónicas infecciosas. ⁽¹⁴⁾

A pesquisa de crioglobulinas consiste na colheita de sangue para um tubo seco, previamente aquecido a 37°C, que é mantido a esta temperatura até à retração do coágulo. Após centrifugação, o soro é separado em dois tubos. O tubo-teste é colocado a 4°C e outro tubo, que serve como tubo controlo negativo, é colocado na estufa a 37°C. A presença de crioglobulinas manifesta-se pela presença de um precipitado esbranquiçado ao fim de sete dias. No entanto deve proceder-se a uma observação diária do tubo.

Após centrifugação, as crioglobulinas sedimentadas são redissolvidas em solução salina a 37°C para se proceder ao doseamento, por método nefelométrico, e à caracterização dos componentes monoclonais, através da técnica de electroimunofixação.

3.3. SECTOR DA IMUNIDADE CELULAR

A citometria de fluxo é um método rápido e objetivo que permite avaliar simultaneamente vários parâmetros celulares. Nesse sentido, no sector da Imunidade Celular, realizam-se estudos das alterações quantitativas ou funcionais das células do sistema imune passíveis de analisar por citometria de fluxo, que permitem, de modo rápido e recorrendo a pequenos volumes de amostra, diagnosticar ou caracterizar uma imunodeficiência primária ou secundária.

3.3.1. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é um método analítico que permite a determinação rápida de certas características físicas e químicas de células ou partículas em suspensão.

Neste método, as células em suspensão são aspiradas e forçadas a passar numa câmara especial (*Flow Cell*) que faz com que estas fiquem envolvidas e centralizadas num fluxo contínuo de líquido (*Sheath fluid*). Através da focagem hidrodinâmica, são forçadas a mover-se em fluxo laminar, o que mantém as células alinhadas de modo a que estas passem, uma a uma, em frente ao feixe luminoso.

Um ou mais raios laser incidem sobre as células levando à dispersão da luz e emissão de fluorescência por excitação dos fluorocromos. As dimensões das células são determinadas por um detetor que regista a luz que passa através das células linearmente, segundo um ângulo de 0° em relação ao feixe de luz incidente, e que corresponde ao parâmetro Forward Scatter (FS) ou dispersão frontal. A complexidade da célula é determinada por um detetor colocado num ângulo de 90° em relação ao feixe de luz incidente e corresponde ao Side Scatter (SS) ou dispersão lateral da luz. As duas informações em simultâneo permitem distinguir vários tipos de células numa amostra heterogénea.

A medição da fluorescência emitida a diferentes comprimentos de onda, selecionados com recurso a diferentes filtros, fornece informação quantitativa e qualitativa acerca dos fluorocromos ligados tanto à superfície das células (recetores celulares) como ao seu interior (moléculas intracelulares, como DNA e citocinas).

Os sinais luminosos transformam-se em impulsos elétricos que são amplificados e convertidos em sinais digitais pelo computador, onde é armazenada toda a informação.

É possível a utilização simultânea de diferentes anticorpos marcados com fluorocromos que emitem luz de comprimentos de onda diferentes. Cada um desses comprimentos de onda será registado por um detetor diferente. Deste modo, quando uma célula passa em frente do laser, os fluorocromos ligados aos anticorpos na sua superfície emitem luz, que é registada pelos detetores. Conjugando vários fluorocromos é possível obter-se informações acerca de múltiplas propriedades celulares numa só análise.

A análise de células marcadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos diferentes é convertida em representações gráficas designadas histogramas. ^(15,16)

No sector da Imunidade Celular existem três citómetros de fluxo: Coulter® Epics XL-MCL™ Beckman Coulter Cytomics FC 500 e Navios Flow Cytometer, que se distinguem pelo número de lasers e cores fluorescentes que conseguem detetar.

Tabela V. – Características dos citómetros de fluxo

Citómetros de Fluxo/ Caraterísticas	Coulter® Epics XL-MCL™	Beckman Coulter Cytomics FC 500	Navios Flow Cytometer
Número de lasers	Um	Dois	Três
Cores	Quatro	Cinco	Dez

Aplicações

A citometria de fluxo pode ser aplicada numa grande variedade de estudos. Para a realização destes estudos são utilizadas, normalmente, amostras de sangue periférico total e lavados broncoalveolares. O EDTA é o anticoagulante de eleição.

Algumas das aplicações clínicas desta técnica, neste sector, são:

- ✓ Estudos funcionais das células fagocíticas: fagocitose de neutrófilos e monócitos, explosão oxidativa dos neutrófilos, avaliação de proteínas citosólicas essenciais ao processo da fagocitose;
- ✓ Estudos imunofenotípicos, para caracterização de subpopulações celulares através da expressão de antigénio citoplasmáticos e/ou de superfície.

3.3.1.1. Imunofenotipagem

A imunofenotipagem é uma técnica utilizada na identificação e distinção de tipos celulares. Para isso, são utilizados anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos para analisar qualitativa e quantitativamente antigénios expressos no citoplasma ou na superfície da membrana, designados por *cluster of differentiation* ou CD. Cada tipo de célula possui um padrão próprio de expressão destes antigénios, permitindo a identificação precisa da célula de interesse. Existem vários marcadores celulares podendo ou não ser específicos para uma determinada célula. ⁽¹⁵⁾

3.3.2. Estudo de Lavados Broncoalveolares

O lavado broncoalveolar (LBA) é uma técnica pouco invasiva de recolha de células, partículas inaladas, organismos infecciosos e componentes solúveis derivados do trato respiratório inferior e, em particular, dos espaços alveolares do pulmão, recorrendo à broncoscopia.

A análise do LBA permite identificar, caracterizar e quantificar células, organismos potencialmente infetantes, poeiras inaladas intra ou extracelulares e material particulado proveniente das células. Deste modo, constitui um importante auxílio para o diagnóstico de diversas doenças pulmonares intersticiais, tais como a sarcoidose, fibrose pulmonar idiopática e pneumonites. ⁽¹⁷⁾

O exame de rotina de LBA consiste no registo macroscópico, determinação do volume, contagem celular e diferencial de leucócitos e, se necessário, na determinação das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo.

Após colheita, a amostra é enviada a 4°C, em seringas de plástico graduadas, com rolha apropriada, de modo a evitar a contaminação microbiana e perda da viabilidade celular. Os exames de rotina devem ser executados 2 horas após a colheita, no entanto podem ser realizadas após 24 horas, se adicionado meio de transporte adequado e enviado à temperatura ambiente.

Antes do processamento da amostra é anotado o seu aspeto macroscópico. Em indivíduos saudáveis, apresenta um aspeto esbranquiçado e espumoso. Em pacientes fumadores, o líquido pode ter uma coloração acastanhada. A presença de sangue é devida à broncoscopia mas também pode aparecer em casos graves de hemorragia pulmonar. ⁽¹⁷⁾

O processamento da amostra é sempre realizada em Câmara de Fluxo Laminar. O conteúdo das seringas é misturado e o volume total é medido. Frequentemente, o LBA contem grandes quantidades de muco, pelo que deve ser passado através de uma gaze. Assim, a filtração na presença de fragmentos de material mucoide permite a diminuição do número total de células, eliminação de células do epitélio bronquial e de detritos celulares, o aumento do número de linfócitos e macrófagos, e diminuição do número de neutrófilos

Posteriormente procede-se à contagem celular total e à contagem diferencial. O número total de leucócitos é determinada pela contagem de células com diferenciação grosseira entre granulócitos, linfócitos e monócitos, na câmara de Neubauer. Deste modo, podemos saber a quantidade de células efetoras existentes nas estruturas alveolares.

Na contagem diferencial cada tipo celular é apresentado em percentagem do total de células recuperadas. Estes valores (granulócitos, linfócitos e macrófagos alveolares) determinam-se a partir da contagem mínima de 500 células ao microscópio ótico, após concentração de células por citocentrifugação, em campos aleatórios. As lâminas observadas são coradas com corante de Leishman. ⁽¹⁷⁾

Para além da contagem diferencial, a análise do citoesfregaço permite:

- Apreciação da morfologia celular:
 - Macrófagos/monócitos: inclusões de fumador, vacuolização (lipidiose), hemossiderina;
 - Linfócitos: variantes/atípicos, células linfoplasmocitárias, granações citoplasmáticas, blastos;
 - Neutrófilos: vacuolizações, bactérias;
- Observação de pneumócitos tipo II (aspecto ativo ou diplásico)
- Contagem do número de células do epitélio brônquico: se > 5% no total das células nucleares indica que a mostra não é representativa do interstício/alvéolo;

- Observação de células do epitélio pavimentoso bucal (contaminantes);
- Detecção de células neoplásicas não hematopoiéticas (metástases ou pulmonares);
- Detecção de microrganismos: *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus*, e outros fungos leveduriformes, *Aspergillus*, *Toxoplasma*;
- Detecção de células infetadas por CMV ou por outros vírus;
- Observação de material celular orgânico (proteínose alveolar) ou inorgânico (fibras de asbestos);
- Por vezes, pode fazer o diagnóstico.

Qualquer estudo de imunofenotipagem leucocitária é orientada pelo médico e depende da informação clínica fornecida, dos resultados da celularidade e tipo e proporção das células observadas em Câmara de Neubauer ou no citoesfregaço. ⁽¹⁷⁾

4. HEMATOLOGIA LABORATORIAL

O serviço de Hematologia Laboratorial é constituído por três áreas funcionais distintas: hematologia geral de rotina, que inclui a determinação de hemogramas, técnicas manuais e colorações; citomorfologia e estudo do glóbulo rubro para determinação das múltiplas patologias dos eritrócitos. Neste serviço as amostras recebidas são, na sua maioria, pediátricas.

Durante o estágio obtive formação em todos os equipamentos utilizados, e tive oportunidade de executar uma série de técnicas manuais. Nesta secção são referidas as análises efetuadas, a sua importância clínica, assim como o respetivo equipamento e métodos utilizados. Em anexo I apresentam-se os valores de referência dessas análises.

4.1. HEMOGRAMA

4.1.1. ADVIA® 2120

O hemograma compreende a quantificação dos elementos figurados do sangue (eritrócitos, leucócitos, plaquetas e ainda reticulócitos quando é requerido), bem como o doseamento de hemoglobina e determinação do hematócrito e dos índices eritrocitários. O hemograma é dos exames complementares de diagnóstico mais solicitados, sendo indispensável no diagnóstico e monitorização de diferentes patologias.

No serviço de Hematologia Laboratorial foi possível trabalhar com o equipamento automático ADVIA® 2120 na elaboração de hemogramas. Este autoanalisador processa amostras de

sangue venoso com EDTA, possibilitando a análise de uma amostra num curto espaço de tempo e a determinação de uma série de parâmetros (ANEXO II).

O princípio básico para a contagem celular neste equipamento é a citometria de fluxo. Neste processo, as células fluem individualmente ao longo de uma câmara de leitura sobre o qual incide perpendicularmente um feixe de luz branca ou um laser, avaliando-se a dispersão da luz produzida pelas células sanguíneas. Consoante o tipo de dispersão de luz, as células podem ser diferenciadas de acordo com o seu tamanho e forma. Diferentes detetores convertem a luz dispersa em impulsos elétricos, permitindo assim a obtenção de análises detalhadas em diagramas de dispersão ou histogramas.

No ADVIA[®] 2120 a amostra é recolhida para uma válvula de segmentação que divide a amostra em alíquotas para os diferentes tipos de teste. A amostra mistura-se com os reagentes em câmaras/canais de reação, onde ocorrem as diferentes reações citoquímicas. Quando as reações nas câmaras de reação ficam concluídas, as misturas de amostra e reagente são enviadas para análise nas células de fluxo, com exceção da câmara de reação da hemoglobina que serve de cuvette ótica. ⁽¹⁸⁾

i) Canal RBC/PLT

Os eritrócitos e as plaquetas são isovolumetricamente esferificadas e fixadas. Ao tornar todas as células todas esféricas, a forma deixa de ser uma variável a ter em conta e apenas é importante a medição do volume para distinguir as duas populações celulares.

A medição da luz dispersa fornece uma correspondência com o volume dos eritrócitos, com a concentração de hemoglobina. São fornecidos histogramas da distribuição por volume e por concentração hemoglobínica, além de um gráfico no qual o volume aparece nas ordenadas e a concentração nas abcissas. ^(17,18)

ii) Canal HGB

A determinação de hemoglobina é efetuada por um método colorimétrico e as reações que ocorrem neste canal são livres de cianeto. Os eritrócitos são lisados para libertar a hemoglobina, sendo o átomo de ferro presente no grupo heme oxidado do estado ferroso (Fe^{2+}) para o estado férrico (Fe^{3+}) formando metahemoglobina.

Posteriormente, um ião hidróxido e uma molécula de água ligam-se à metahemoglobina, formando um complexo que é medido espectrofotometricamente a 546 nm. ⁽¹⁹⁾

Índices Eritrocitários

VGM – Volume Globular Médio

O volume corpuscular médio, expresso em fentolitros, é medido diretamente pelo autoanalisador. É o parâmetro que corresponde ao tamanho médio dos eritrócitos, sendo muito usado na classificação de anemias, por estar associado a alterações no tamanho dos eritrócitos. Valores baixos de VGM indicam microcitose e valores elevados indicam macrocitose. ⁽²⁰⁾ Pode ser obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{VGM (fL)} = \frac{\text{Htc (\%)}}{\text{RBC (x } 10^6/\mu\text{L)}} \times 10$$

HGM – Hemoglobina Globular Média

A hemoglobina globular média avalia a quantidade de hemoglobina média presente nos eritrócitos. Um valor baixo de HGM indica hipocromia e está normalmente associado a microcitose; um valor elevado está associado a macrocitose. ⁽²⁰⁾ É expresso em picogramas e obtêm-se pela seguinte fórmula:

$$\text{HGM (pg)} = \frac{\text{Hb (g/dL)}}{\text{RBC (x } 10^6/\mu\text{L)}} \times 10$$

CHGM – Concentração de Hemoglobina Globular Média

A concentração de hemoglobina média estima a concentração média de hemoglobina presente nos eritrócitos. ⁽²⁰⁾ É expressa em g/dL e é calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{CHCM (g/dL)} = \frac{\text{Hb (g/dL)}}{\text{Htc (\%)}} \times 100$$

RDW – Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos

O RDW é definido como o coeficiente de variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos, indicando o grau de anisocitose dos eritrócitos. Obtém-se a partir do histograma. Em condições normais, a maioria dos eritrócitos tem aproximadamente o mesmo tamanho, produzindo apenas um pico no histograma; a presença de patologias pode modificar o tamanho de alguns eritrócitos, que se traduz na produção de mais um pico ou no alargamento do pico normal no histograma. ⁽²⁰⁾

iii) Canal RET

A diferenciação dos reticulócitos é conseguida através da utilização de um reagente que provoca a esferificação isovolumétrica dos eritrócitos e a coloração das células de acordo com o seu conteúdo em RNA. A dispersão da luz é proporcional ao tamanho da células e à concentração de hemoglobina, e a absorção de luz é proporcional ao conteúdo de RNA. ⁽¹⁹⁾

iv) Canal PEROX

Neste canal é utilizado um surfactante que, em combinação com “stress” térmico, provoca a lise dos eritrócitos e a fixação dos leucócitos. O ambiente hipertónico provoca o encolhimento e crenação ligeira dos leucócitos, o que aumenta o índice de refração das células e a sua deteção. Os leucócitos com atividade peroxidase são corados com um reagente que serve de substrato ao peróxido de hidrogénio, formando um precipitado negro, nas granulações dos neutrófilos, eosinófilos e monócitos. A absorção da luz é proporcional à intensidade da reação da peroxidase, e a quantidade de luz dispersa, é proporcional ao tamanho das células.

Uma vez que os linfócitos, basófilos e as LUC (*Large Unstained Cells*) não contêm peroxidase, permanecem não coradas. Em pessoas saudáveis, as LUC são principalmente linfócitos grandes, mas células anormais, como blastos e linfócitos atípicos, podem cair nesta categoria. ^(18,19)

v) Canal BASO

Numa primeira fase os eritrócitos e as plaquetas são lisados. De seguida todos os leucócitos são separados do seu citoplasma, exceto os basófilos que são resistentes ao surfactante. Os leucócitos separados podem ser classificados como células mononucleares ou polimorfonucleares consoante a forma e complexidade dos seus núcleos. Os basófilos intactos distinguem-se facilmente dos resíduos sem citoplasma das demais células. A dispersão frontal da luz é proporcional ao tamanho celular e a dispersão lateral corresponde a uma combinação da forma do núcleo com a densidade celular.

Este canal permite também detetar a presença de blastos. Estes são detetados como uma população com uma densidade nuclear anormalmente baixa. ⁽¹⁸⁾

Para além dos parâmetros analisados, este aparelho apresenta um sistema de alarmes (*flags*), que permitem alertar para resultados fora dos valores de referência ou de alterações nos

histogramas que evidenciam possíveis alterações morfológicas. Assim, sempre que a contagem automática forneça resultados ou indique alarmes que o justifiquem, deve ser realizada uma observação microscópica do esfregaço de sangue periférico e, se necessário, uma contagem manual das células.

Interpretação de hemogramas

Eritrograma

O distúrbio mais frequente e relevante desta série é a anemia. Esta é definida como redução da concentração de hemoglobina no sangue, abaixo dos valores de referência para idade e sexo. Uma baixa contagem de eritrócitos constitui um bom indicador de anemia. A contagem de reticulócitos e a morfologia dos eritrócitos também auxiliam no diagnóstico da anemia. A classificação da anemia é útil porque fornece uma referência conveniente para o diagnóstico diferencial. As anemias podem decorrer da diminuição da produção medular, do aumento da taxa de destruição dos eritrócitos ou por perdas sanguíneas, segundo a classificação fisiopatológica. Outra classificação das anemias baseia-se na morfologia dos eritrócitos. Deste modo, podem ser classificadas em microcíticas, normocíticas ou macrocíticas; e como hipocrómicas ou normocrómicas.^(18,21)

Na tabela seguinte encontra-se descrito o diagnóstico das anemias de acordo com a classificação morfológica.

Tabela VI. – Classificação morfológica das anemias.⁽²¹⁾

Classificação	Patologias associadas
Anemia Microcítica (VGM < 80fL) Hipocrómica (HGM < 27pg)	Anemia por deficiência de ferro; talassemias; anemia da doença crónica; anemia sideroblástica congénita; intoxicação por Chumbo
Anemia Normocítica (VGM 80-95 fL) Normocrómica (HGM ≥ 27 pg)	Anemias hemolíticas; anemia pós-hemorrágica aguda; nefropatias; falência medular
Anemia Macroscítica (VGM > 95 fL)	Anemia megaloblástica (défice de folato/vitamina B ₁₂); anemia não-megaloblástica (álcool, hepatopatias, mielodisplasias)

Leucograma

Os leucócitos são geralmente classificados em dois grupos: os polimorfonucleares ou granulócitos que englobam os neutrófilos, eosinófilos e basófilos e os mononucleares ou

agranulócitos que incluem os monócitos e os linfócitos. Apesar de todos os leucócitos agirem na defesa do organismo, as suas funções diferem.

A quantificação dos leucócitos é utilizada para identificar situações de infeção e para seguir o progresso de certas patologias e terapias. As anomalias nas contagens dos leucócitos podem estar associadas a diversas patologias. ⁽²¹⁾

Na tabela seguinte encontram-se descritas as alterações mais frequentes, e algumas das possíveis causas.

Tabela VII. – Alterações quantitativas dos leucócitos e causas associadas. ^(18,21)

Leucócitos		Possíveis causas
Neutrófilos	Neutrofilia	Infeções bacterianas; inflamação e necrose tecidual; administração de determinados fármacos; tabagismo
	Neutropenia	Medicamentosa; insuficiência da medula óssea; esplenomegalia; radiação
Eosinófilos	Eosinofilia	Doença alérgica; parasitoses; hipersensibilidade medicamentosa
Basófilos	Basofilia	Leucemia mieloide crónica; policitemia vera; mixedema; colite ulcerativa
Monócitos	Monocitose	Infeções bacterianas crónicas: tuberculose; malária; infeções por protozoários
Linfócitos	Linfocitose	Infeções virais e bacterianas; leucemia linfocítica crónica
	Linfopenia	Infeções; imunodeficiência congénita: síndrome da imunodeficiência adquirida

Trombocitograma

As plaquetas são células que derivam dos megacariócitos da medula óssea. Estas desempenham um importante papel no processo hemostático, participando no processo de coagulação e mantendo a integridade dos capilares.

A análise das plaquetas permite identificar situações de trombocitose, caracterizada por um aumento do número de plaquetas, ou de trombocitopenia, definida por um número reduzido de plaquetas. A trombocitopenia constitui a anormalidade plaquetária mais comum, e pode

resultar de uma diminuição da produção de plaquetas por trombopoiese ineficaz; do aumento da sequestração esplênica ou da destruição aumentada. A trombocitose pode ser de origem primária ou secundária. A trombocitose primária pode ocorrer em casos de síndromes mieloproliferativas, principalmente na trombocitemia essencial. A trombocitose secundária pode ser devida a doenças inflamatórias e infecciosas, e após hemorragias. ⁽¹⁸⁾

4.2. TÉCNICAS MANUAIS DE HEMATOLOGIA

4.2.1. Esfregaços sanguíneos e coloração – estudo morfológico do sangue periférico

O esfregaço sanguíneo consiste na preparação de uma fina camada de células sanguíneas sobre uma lâmina de vidro, que tem como objetivo avaliar a morfologia das células sanguíneas assim como a caracterização qualitativa e quantitativa das mesmas. Permite ainda determinar a fórmula leucocitária, pesquisa de parasitas e de agregados plaquetários. É realizado um esfregaço sempre que seja solicitado pelo clínico, por suspeita patológica ou monitorização terapêutica, e sempre que seja necessário confirmar e/ou complementar qualquer resultado obtido pelos métodos automáticos.

Uma gota de sangue é colocada na extremidade da lâmina e com outra lâmina faz-se a extensão da gota com um movimento firme e uniforme (Figura 10.). A velocidade do movimento deve ser ajustada consoante o tipo de amostra. ⁽²²⁾

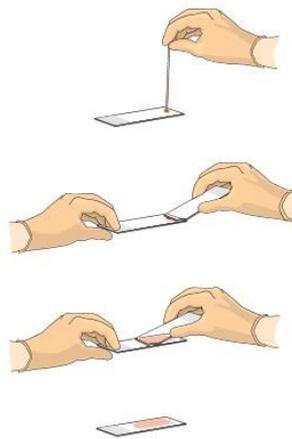


Figura 10. – Técnica de esfregaço sanguíneo.

Um bom esfregaço sanguíneo deve ser fino, regular e homogêneo, apresentar bordos bem definidos e franja, e deve diminuir a espessura da cabeça para a cauda. A análise microscópica

deve ser realizada a partir do corpo em direção à cauda, para evitar locais de sobreposição celular.

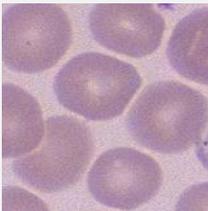
4.2.1.1. Coloração de Leishman

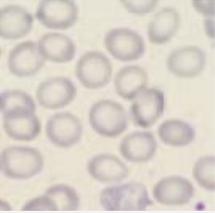
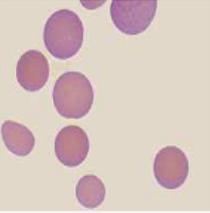
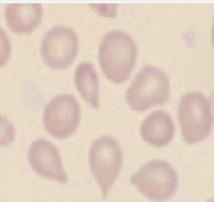
Após execução do esfregaço, e para que este seja visualizado ao microscópio ótico, as lâminas são coradas usando a coloração de Leishman. Esta coloração é do tipo *Romanowsky*, sendo constituída por dois componentes essenciais: o azul B e eosina. Tanto o azul B como a eosina são muito sensíveis às variações de pH das diferentes estruturas celulares. Assim, estruturas que têm características básicas fixam preferencialmente a eosina (corante ácido), enquanto as que possuem propriedades ácidas fixam preferencialmente o azul B (corante básico). Deste modo, componentes celulares acídicos, como as nucleoproteínas, ácidos nucleicos e certas proteínas do citoplasma, coram de azul e os componentes básicos, como a hemoglobina, adquirem uma cor rosada. A diferente afinidade das estruturas celulares para cada um dos componentes do corante permite distinguir os múltiplos aspetos morfológicos do sangue.⁽¹⁸⁾ A observação do esfregaço sanguíneo de boa qualidade e corretamente corado é uma parte importante e complementar da avaliação hematológica. Embora o diagnóstico possa ser sugerido com base em resultados obtidos por métodos automáticos, muitas patologias têm contagem celular normal mas apresentam morfologia celular anormal.

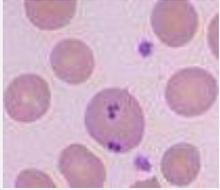
Alterações qualitativas da série eritrocitária

Os eritrócitos podem apresentar alterações no tamanho, forma, estrutura e coloração, ou apresentar inclusões eritrocitárias. Pode ainda ser observada a formação de *rouleaux* (Tabela VIII.).

Tabela VIII. – Alterações nos eritrócitos.⁽¹⁸⁾

Alteração	Característica	Patologias
<i>Tamanho</i>		
<p><u>Macrócitos</u></p> 	Aumento do tamanho	Anemia megaloblástica

<p><u>Micrócitos</u></p> 	<p>Diminuição de tamanho.</p>	<p>Anemias associadas a deficiência de ferro; talassemias.</p>
<p>Forma</p>		
<p><u>Esferócitos</u></p> 	<p>Forma praticamente esférica, não apresentam palidez central. Em alguns casos de deficiências enzimáticas hereditárias podem apresentar.</p>	<p>Esferocitose hereditária e anemias hemolíticas autoimunes.</p>
<p><u>Drepanócitos</u></p> 	<p>Apresentam forma em foice, com extremos pontiagudos, devido à polimerização da hemoglobina S no interior da célula.</p>	<p>Anemia falciforme.</p>
<p><u>Em alvo</u></p> 	<p>Apresentam uma área central corada, um anel sem cor e a zona terminal novamente corada.</p>	<p>Icterícia obstrutiva; talassemias, doença hepática e hemoglobinopatias como anemia falciforme.</p>
<p><u>Dacriócitos</u></p> 	<p>Apresentam forma de gota/lágrima.</p>	<p>Anemia megaloblástica; talassémia; mielofibrose.</p>
<p>Inclusões eritrocitárias</p>		
<p><u>Pontuado basófilo</u></p> 	<p>Agregados de RNA sob a forma de grânulos distribuídos pelo eritrócito.</p>	<p>Anemias megaloblásticas; β-talassemia menor; hemoglobinas instáveis; anemia hemolítica.</p>

<u>Corpos de Howell-Jolly</u>	 <p>Fragmentos nucleares redondos resultantes de DNA condensado.</p>	<p>Anemias hemolíticas severas e após esplenectomia.</p>
Rouleaux	 <p>Eritrócitos que aderem uns aos outros, dando aspeto de pilhas de moedas espalhadas.</p>	<p>Gravidez; condições inflamatórias; mieloma múltiplo ou macroglobulinemia.</p>

Alterações qualitativas da série leucocitária

Alterações qualitativas ao nível dos leucócitos podem ser detetadas pela presença de alterações morfológicas, produção aumentada de tipos de leucócitos menos comuns, ou pela presença de células imaturas. Consoante a situação observada, diversas patologias podem estar associadas, nomeadamente distúrbios benignos de leucócitos, leucemias e síndromes mielodisplásicas. ⁽¹⁸⁾

Alterações qualitativas da série trombocítica

As plaquetas podem apresentar alterações de tamanho: plaquetas grandes são designadas macrotrombócitos, e plaquetas muito grandes são chamadas de plaquetas gigantes. Quando a renovação plaquetária está aumentada as plaquetas são normalmente grandes.

A agregação plaquetária pode ocorrer devido à agregação das plaquetas na presença de anticoagulantes, sendo o mais comum o EDTA. O satelitismo plaquetário é outro fenómeno induzido por um fator plasmático, usualmente IgG ou IgM, que provoca a adesão das plaquetas à superfície dos neutrófilos. A falha no reconhecimento destas alterações, que levam a contagens falsamente diminuídas, pode resultar em diagnósticos erróneos e tratamento inapropriado. ⁽¹⁸⁾

4.2.2. Fórmula leucocitária

A fórmula leucocitária, também designada como contagem diferencial, permite apresentar a relação percentual de cada tipo de leucócito presente na amostra. A sua determinação é extremamente útil na deteção do tipo ou tipos de leucócitos que se encontram em número alterado. ⁽²²⁾

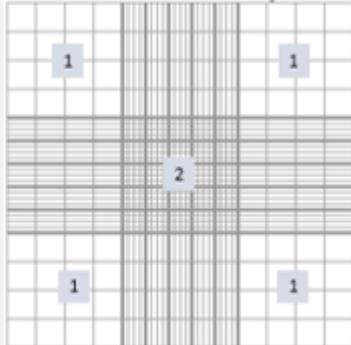
A contagem diferencial é realizada por observação do esfregaço corado, de preferência em campos onde não ocorra sobreposição celular, mas sim uma camada fina de células. Como os diferentes tipos de leucócitos não se distribuem uniformemente sobre a lâmina, no laboratório de Hematologia Laboratorial são identificados e contabilizados 200 leucócitos com vista a minorar os erros. É utilizado um contador manual que emite um sinal sonoro quando atinge as 100 células registadas, e que fornece uma leitura fácil do resultado da contagem em termos percentuais.

4.2.3. Contagens celulares na câmara de Neubauer modificada

A contagem manual de células em câmara de Neubauer modificada é importante quando o método automático não consegue fornecer com confiança valores de contagens celulares anormais, que podem surgir em determinadas condições hematológicas.

Neste método prepara-se a câmara de Neubauer modificada fixando a lamela sobre a zona central e adiciona-se 10 μ L de amostra diluída. A contagem celular é realizada nos 4 quadrantes dos cantos, no caso dos leucócitos e das plaquetas, e no quadrante central, no caso dos eritrócitos (Tabela IX.).

Tabela IX. – Tipos celulares, solutos de diluição utilizados e respetivo modo de contagem em câmara de Neubauer modificada. ⁽²²⁾

	Soluto de diluição	Contagem
Eritrócitos	Soluto de <u>Dacie</u> 1:200	 <p>1 Leucócitos e Plaquetas 2 Eritrócitos</p>
Leucócitos	Acido Acético 1:20	
Plaquetas	Oxalato de Amónia 1:20	

O resultado do procedimento deve ser dado em função da contagem efetuada, do número de quadrículas contadas, do seu volume e em função da diluição inicial. ⁽²²⁾

Hoje em dia, este método já está ultrapassado, no entanto é realizado no laboratório de Hematologia Laboratorial sempre que seja necessária a confirmação do valor de plaquetas obtido pelo método automático.

4.2.4. Contagem manual de reticulócitos

Os reticulócitos são os precursores dos eritrócitos maduros. São eritrócitos jovens, anucleados, que contêm no seu interior ácido ribonucleico remanescente. A utilização de corantes vitais, tal como o novo azul-de-metileno, permite evidenciar os reticulócitos presentes no sangue periférico. Este corante vai neutralizar e precipitar o RNA residual sob a forma de retículo ou grânulos azuis-escuros permitindo assim, a identificação e quantificação ao microscópio ótico. ⁽²²⁾

No laboratório de Hematologia Laboratorial são preparados dois esfregaços de modo a garantir uma boa observação. São contabilizadas 500 células da linhagem eritrocitária, em cada um dos esfregaços, com o auxílio de um contador manual. O resultado é expresso em percentagem em relação ao número total de eritrócitos.

Interpretação clínica

A contagem de reticulócitos é importante para avaliar a capacidade de resposta medular. Um aumento do número de reticulócitos após situações como quimioterapia ou transplante de medula óssea indica uma boa capacidade de resposta medular.

Esta contagem permite também classificar as anemias em regenerativas, em que há estimulação da medula e há uma resposta medular com aumento do número de reticulócitos, e consequente aumento da produção de eritrócitos; ou hiporegenerativas, caracterizadas por valores reduzidos de reticulócitos e defeitos na produção de eritrócitos. Uma anemia regenerativa tem como principais causas hemorragias e anemias hemolíticas. Por outro lado, situações como anemia por défice de ferro, folato ou vitamina B₁₂, anemias de doença crónica e quimioterapia conduzem a uma diminuição do número de reticulócitos – anemia hiporegenerativa. ⁽¹⁸⁾

4.3. MICROHEMATÓCRITO

Volume globular, ou hematócrito, corresponde ao volume ocupado pelos eritrócitos em relação ao volume total de sangue, expresso em percentagem.

O microhematócrito é uma técnica manual utilizada quando não é possível determinar automaticamente o valor do hematócrito em amostras com pouco volume de sangue. Nesta

metodologia utiliza-se um tubo capilar específico, preenchido por atração capilar, e uma centrífuga especial – Biofuge® haemo. Após cinco minutos de centrifugação a 15.000 rpm, faz-se a leitura com uma régua própria, enquanto os tubos permanecem em posição horizontal. ^(18,22)

Interpretação clínica

Um hematócrito baixo pode significar a presença de anemia, hemorragia, destruição de eritrócitos ou deficiência nutricional em ferro, folato e vitamina B₁₂. Um valor alto pode dever-se a eritrocitose (policitemia vera), desidratação, hipoxia ou doença cardíaca. ⁽²⁰⁾

4.4. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

A velocidade de sedimentação (VS) consiste na velocidade de queda espontânea dos eritrócitos, em suspensão no plasma. A determinação da VS constitui um teste hematológico que, apesar de não ser específico, é utilizado para detetar processos inflamatórios, neoplásicos e infecciosos.

A sedimentação dos eritrócitos é composta por três etapas: a primeira corresponde à agregação ou formação de *rouleaux*; a segunda corresponde à queda dos *rouleaux* a velocidade constante e, por fim, na terceira etapa dá-se a sedimentação final, que corresponde ao empilhamento dos eritrócitos no fundo do tubo. ⁽²²⁾

A velocidade de sedimentação pode ser determinada manualmente através do método de Westergreen modificado, em situações onde o volume de sangue colhido é muito pequeno. Esta técnica consiste em diluir a amostra numa solução de cloreto de sódio a 0.9% e colocar numa pipeta graduada. A pipeta é preenchida até à marca zero e deixada a sedimentar, em posição vertical, durante uma hora. A VS, expressa em mm/h, será a distância do sedimento até ao topo da coluna inicial de eritrócitos.

Interpretação clínica

O valor da VS é influenciada por vários fatores, tais como, a composição em proteínas plasmáticas (fibrinogénio e globulina) que interferem na carga negativa dos eritrócitos, pela concentração e morfologia dos eritrócitos, e por fatores mecânicos, relacionados com a execução da técnica.

Um dos fatores mais importantes é o tamanho ou massa dos eritrócitos, uma vez que a taxa de sedimentação é diretamente proporcional ao peso do agregado celular e inversamente proporcional à área de superfície. Assim, eritrócitos micrócitos têm a tendência para sedimentar mais lentamente que os macrócitos, pois têm relação área/volume menor.

Eritrócitos com morfologia anormal ou irregular, como as células falciformes ou esferócitos, dificultam a formação de *rouleaux* e diminuem a VS.

Em indivíduos saudáveis, os eritrócitos mantêm-se afastados devido à sua carga negativa. Em certas patologias ocorrem alterações da concentração de algumas proteínas, nomeadamente do fibrinogénio e de certas globulinas, que favorecem a diminuição da força de repulsão entre os eritrócitos. Esta diminuição promove a agregação e formação de *roulaeaux* e, conseqüente aumento da VS.

As variações patológicas dos valores normais podem levar a um aumento ou a uma diminuição da VS. Esta encontra-se aumentada em infeções agudas e crónicas (tuberculose, sífilis), em processos inflamatórios, artrite reumatóide, neoplasias em geral e anemias.

Valores diminuídos podem ser encontrados em policitemias, hipofibrinogénemia, hipogamaglobulinémias e em situações associadas a alterações da forma dos eritrócitos. ⁽²²⁾

4.5. CITOQUÍMICA

As colorações citoquímicas são utilizadas na investigação de diversas patologias, sendo particularmente úteis no diagnóstico diferencial de doenças hematopoiéticas. Para além disso, constituem uma valiosa ferramenta para o diagnóstico e classificação de leucemias.

As colorações citoquímicas podem ser realizadas em esfregaços de sangue periférico ou em esfregaços de aspirado medular. Em muitos dos casos, são executados estudos em esfregaços de sangue periférico devido à impossibilidade de obter aspirados de medula óssea. ⁽¹⁸⁾

4.5.1. Reação de Perls

A reação de Perls, também denominada por reação do Azul da Prússia, baseia-se na reação química entre o ferrocianato de potássio e o ferro iónico (Fe^{3+}) da hemossiderina, em solução ácida. Há formação de um precipitado de cor azul intenso, designado Azul da Prússia, em forma de grânulos. A safranina é utilizada como corante de contraste. ⁽¹⁸⁾

Interpretação clínica

A reação de Perls tem como fim a avaliação das reservas de ferro nos eritroblastos, de modo que é muito útil no diagnóstico diferencial de várias patologias dos eritrócitos. A anemia sideroblástica é definida pela presença de sideroblastos patológicos, sideroblastos em anel, na medula óssea. Alterações na síntese do grupo heme levam à acumulação de ferro nas mitocôndrias, no interior dos eritroblastos. A coloração de Perls é responsável pela deteção

destes depósitos de ferro nos eritoblastos presentes na medula e quando circulam no sangue periférico.

A anemia sideroblástica é diagnosticada quando 15% ou mais dos eritoblastos da medula possuem pelo menos cinco grânulos dispostos à volta do núcleo. ^(18, 21)

4.5.2. Mieloperoxidasas

As peroxidases são enzimas que catalisam a oxidação de substratos específicos na presença de peróxidos de hidrogénio. Nesta coloração, utilizam-se corantes como substrato que, ao serem oxidados, originam um derivado colorido no local da atividade enzimática. Como indicador da atividade desta enzima é utilizada benzidina ou um dos seus derivados.

Uma reação positiva para mieloperoxidase é indicada pela presença de grânulos que variam de castanho-esverdeado a preto. ⁽²²⁾

Interpretação clínica

A mieloperoxidase é uma enzima que existe nos granulócitos e monócitos e seus percursores, sendo, por isso, específica da linhagem mieloide. Os granulócitos expressam positividade crescente conforme a maturação, sendo possível, em muitos casos, observar bastonetes de Aeur. Nos monócitos a reação é menos intensa, apresentando grânulos finos, dispersos por toda a célula. Os linfócitos não apresentam qualquer marcação. Deste modo, esta coloração permite a diferenciação de leucemias mieloblásticas e monocíticas (mieloperoxidase positivas) das leucemias linfoblásticas (mieloperoxidasas negativas). ⁽¹⁸⁾

4.5.3. Esterases

As esterases são um grupo de enzimas que hidrolisam ligações éster. Para análise destas enzimas, os esfregaços de sangue periférico ou de aspirados de medula óssea são incubados com naftol AS-D cloroacetato, α -naftil acetato ou α -naftil butirato na presença de um sal de diazónico. A hidrólise enzimática de ligações éster liberta compostos de naftol livres. Estes compostos acoplam-se ao sal de diazónico, formando depósitos fortemente coloridos nos locais de atividade enzimática. ⁽²²⁾

- Naftol AS-D cloroacetato esterase

Esta enzima é normalmente considerada específica dos neutrófilos e seus percursores. Os locais de atividade enzimática apresentam uma granulação vermelha viva. Positividade nos

mieloblastos é rara, mas os promielócitos e mielócitos coram fortemente. A atividade é fraca ou ausente nos monócitos. ⁽¹⁸⁾

- Esterase não específicas

As estereases não específicas, α -naftil acetato esterase (ANAE) e α -naftil butirato esterase (ANBE), são usadas para identificar células da linhagem monocítica.

A ANAE é detetada principalmente nos monócitos e seus precursores, não apresentando atividade nos granulócitos. Uma reação positiva é indicada pela presença de uma granulação negra.

A ANBE apresenta também atividade nos monócitos e seus precursores, e os locais de atividade apresentam grânulos de cor castanha-escura. A ANBE é mais específica na identificação da componente monocítica em LMA do que ANAE. ^(18,22)

- Dupla coloração das esterases

Nesta coloração é utilizada uma esterase específica (Naftol AS-D cloroacetato esterase) e uma esterase não específica (α -naftil acetato esterase). Deste modo, a dupla coloração permite, no mesmo esfregaço, avaliar a atividade de dois tipos de esterases.

Interpretação clínica

A leucemia mieloide aguda é um grupo heterogéneo de doenças clonais do tecido hematopoiético, que se caracteriza pela proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mieloide. De acordo com o sistema de classificação French-American-British (FAB), as LMA são subclassificadas em oito tipos. Esta classificação é baseada em critérios morfológicos e citoquímicos. ⁽²³⁾

Tabela X. – Classificação de LMA segundo o sistema FAB. ⁽²³⁾

LMA
M0 – LMA sem diferenciação morfológica
M1 – LMA com mínima diferenciação morfológica
M2 – LMA com diferenciação (componente monocítico < 20%)
M3 – LMA promielocítica hipogranular
M4 – LMA mielomonocítica (células monocíticas ≥ 20%)
M5 – LMA monocítica (com células monocíticas ≥ 20% das células leucémicas)
M5a – LMA monoblástica (sem diferenciação, blastos ≥ 80%)
M5b – LMA monocítica (com diferenciação, blastos < 80%)
M6 – Eritroleucemia
M7 – LMA megacarioblástica

As esterases constituem uma referência conveniente para o diagnóstico diferencial de LMA, uma vez que permitem distinguir células da linhagem granulocítica da linhagem monocítica. Por sua vez, a dupla coloração apresenta grande utilidade na identificação de leucemias com componente mielomonocítico (LMA-M4).

4.6. ESTUDO DE PATOLOGIAS DO GLÓBULO RUBRO

4.6.1. Hemoglobinopatias e Talassemias

A hemoglobina humana é formada por quatro subunidades de cadeias peptídicas idênticas duas a duas, designadas por globinas. Cada uma das subunidades está ligada ao grupo heme ao qual se liga o oxigénio.

O tipo de hemoglobina é determinado pela sua composição em cadeias globínicas. A HbA tem duas cadeias α combinadas com duas β ($\alpha_2\beta_2$), a HbA₂ tem duas cadeias α e duas δ ($\alpha_2\delta_2$), e a Hb fetal (HbF) tem duas cadeias α combinadas com duas γ ($\alpha_2\gamma_2$). Nos adultos normais, a HbA é o tipo de hemoglobina mais abundante representado 97-98% da hemoglobina total; HbA₂ conta com aproximadamente 2,5% e HbF com cerca de 1%. No recém-nascido, existe cerca de 60-85% de HbF que será substituído por HbA, aproximadamente 1 ano após o nascimento.

Existem dois grupos de distúrbios genéticos da hemoglobina: hemoglobinopatias e talassemias. As hemoglobinopatias resultam de mutações pontuais nas cadeias globínicas α e β , levando à substituição de um aminoácido por outro. As talassemias resultam de um desequilíbrio das cadeias globínicas devido à síntese reduzida ou ausência de cadeias normais. (24)

A quantificação das frações normais da Hb (A, A₂, F) e a deteção de variantes de hemoglobinas (S, C, E e D) permitem a identificação destas patologias.

4.6.1.1. HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão

O Variant II é um equipamento automático destinado à separação das diferentes frações de hemoglobina através da sua separação por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iónica.

A HPLC de troca iónica baseia-se na separação dos componentes de uma mistura, devido à diferente afinidade desses componentes na presença de duas fases: a fase estacionária (coluna de resina de troca iónica) e a fase móvel. Quando o hemolisado, contendo uma mistura de hemoglobinas é adsorvido sobre a resina, o tempo de retenção da diferente mistura é determinado pelo pH e afinidade do tampão de eluição aplicado sobre a coluna. O tempo de retenção de hemoglobinas normais ou de variantes presentes é comparado com uma hemoglobina conhecida (HbA₂), permitindo assim a quantificação de hemoglobinas normais (A, A₂ e F) e determinação presuntiva de variantes de hemoglobina. (22)

Interpretação clínica

Para cada amostra analisada é obtido um cromatograma com a identificação de 3 picos (HbF, HbA e HbA₂) e a indicação da respetiva percentagem. Caso haja uma hemoglobina variante aparece um pico com a observação S/C Window.

Valores alterados de HbA, HbA₂ ou HbF permitem identificar talassemias. Estas patologias são caracterizadas pela diminuição da síntese das cadeias α ou β globínicas. Para compensar este défice há um aumento da síntese de outras cadeias. Nas α -talassemias há uma diminuição da síntese das cadeias α e, como tal, ocorre uma diminuição da HbA ($\alpha_2\beta_2$), da HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) e da HbF ($\alpha_2\gamma_2$). Nas β -talassemias há uma redução na síntese de cadeias β , sendo substituídas pelas cadeias δ e γ que formam a HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) e a HbF ($\alpha_2\gamma_2$) respetivamente, levando assim ao seu aumento. Um nível aumentado de HbA₂ é considerada o aspeto diagnóstico mais característico do traço β -talassémico e a sua quantificação é utilizada para o diagnosticar ou excluir. (22,23)

No laboratório de Hematologia Laboratorial, a identificação presuntiva de variantes de hemoglobina por este método é utilizado como teste screening. Deste modo, se HPLC não detetar nenhuma variante, nenhum outro teste é requerido. Por outro lado, se uma variante for detetada o resultado deve ser confirmado por técnicas mais específicas como a electroforese em meio básico.

4.6.1.2. Electroforese de Hemoglobinas

A eletroforese de hemoglobinas consiste na separação, em meio alcalino (pH 8,5), das hemoglobinas normais (A e A₂) permitindo a deteção das principais variantes da hemoglobina (HbS, HbD, HbC, HbE). A eletroforese é executada a partir do hemolisado de eritrócitos. A pH alcalino as hemoglobinas apresentam carga negativa e migram em direção ao ânodo. Após coloração com negro de amido, as frações de hemoglobina podem ser analisadas visualmente por comparação com um padrão de referência contendo HbA, HbF, HbS e HbC (Figura 11.). No laboratório de Hematologia Laboratorial, a electroforese de hemoglobinas é realizada recorrendo ao equipamento semi-automático HYDRASYS.

A análise de variantes da hemoglobina é utilizada como auxiliar de diagnóstico da talassemia, particularmente em doentes com história familiar e na avaliação da anemia hemolítica de etiologia desconhecida. ⁽²²⁾

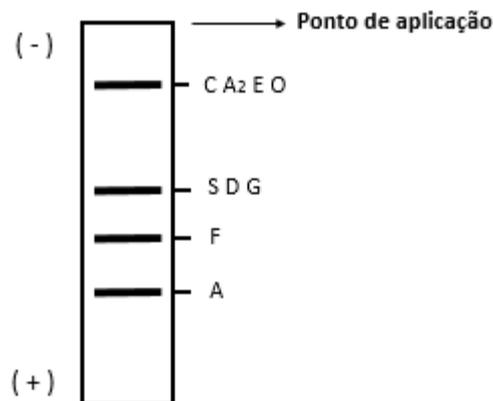


Figura 11. – Mobilidades electroforéticas das hemoglobinas

Interpretação clínica

A estrutura da hemoglobina, assim como as suas propriedades moleculares, dependem da natureza e sequência de aminoácidos que formam as cadeias. A substituição de aminoácidos, por mutação, é responsável pela formação de variantes de hemoglobina, que têm diferentes cargas superficiais e conseqüentemente diferentes mobilidades eletroforéticas. ⁽²²⁾

Variantes da hemoglobina

HbS – É a variante de hemoglobina mais comum, determinada por uma mutação pontual na cadeia β da globina, que resulta na substituição do ácido glutâmico pela valina. Esta modificação favorece a polimerização da forma desoxigenada da hemoglobina que deforma os eritrócitos, tornando-os em forma de foice, fragilizando-os e tornando-os rígidos, o que pode provocar anemia hemolítica e acidentes vaso-oclusivos. ⁽²²⁾

HbC – É a segunda variante mais comum; resulta de uma mutação pontual na cadeia β da globina, na qual há substituição do ácido glutâmico pela lisina. A carga positiva, resultante desta substituição, confere uma mobilidade electroforética reduzida à HbC e a sua migração sobrepõe-se à da HbA₂. Os níveis elevados de HbA₂ são incompatíveis com a vida, pelo que este aumento pode dever-se na realidade à presença de HbC. ⁽²²⁾

HbE – Resulta de uma mutação por substituição do ácido glutâmico pela lisina da cadeia β -globina. Apresenta uma mobilidade electroforética semelhante à HbC, sendo possível a sua distinção por electroforese em meio ácido. ⁽²²⁾

HbD – Resulta de uma mutação por substituição do ácido glutâmico pela glicina da cadeia β -globina. Apresenta uma mobilidade semelhante à da HbS, mas ao contrário desta, não se distingue das hemoglobinas A e A₂ por eletroforese em meio ácido. Deste modo, é necessário recorrer à prova de solubilidade permitindo assim distinguir as variantes S e D da hemoglobina. ⁽²¹⁾

4.6.2. Teste de Solubilidade

O teste de solubilidade é um teste manual qualitativo baseado na relativa insubilidade da HbS quando combinada com um tampão fosfato. Neste teste, o hemolisado é colocado em contacto com agente redutor, que provoca a desoxigenação da HbS. Esta, quando desoxigenada, é insolúvel em tampões fosfato, pelo que precipita tornando a solução turva. Este teste é útil na confirmação da presença de HbS. ⁽²²⁾

Para controlo da reacção é utilizada uma amostra de sangue normal do mesmo dia (controlo negativo) e, se possível, uma amostra com HbS (controlo positivo).

Interpretação clínica

A reacção é observada macroscopicamente pela visualização, através do tubo, das linhas que se encontram no suporte. Um teste positivo é indicado pela turvação da suspensão, que

impossibilita a visualização das linhas do suporte. Um teste negativo é indicado pela transparência da solução. Falsos positivos podem ocorrer na presença de hemoglobinas instáveis e em situações de hiperproteinémia.

Este teste é recomendado em crianças com idades superiores a 6 meses, visto que com idades inferiores observam-se baixos níveis de HbS, podendo ocorrer falsos negativos. ⁽²²⁾

4.6.3. Teste da Fragilidade Osmótica

A fragilidade osmótica corresponde à capacidade ou flexibilidade de uma membrana celular de suportar pressão. O teste da fragilidade osmótica avalia o comportamento dos eritrócitos em diferentes soluções hipotónicas de cloreto de sódio. Quando se colocam eritrócitos numa solução hipotónica de cloreto de sódio, a diferença de osmolaridade entre o interior dos eritrócitos e o exterior, leva a que a água circundante entre para o interior dos eritrócitos. Os eritrócitos vão aumentar de volume, podendo chegar à ruptura – hemólise. A percentagem de células hemolisadas é calculada pela quantidade de hemoglobina libertada no sobrenadante. Este teste é importante na avaliação de anemias hemolíticas hereditárias, particularmente quando há suspeita de esferocitose hereditária. ⁽²⁵⁾

Para controlo deste teste utiliza-se uma amostra de um dador saudável, que é determinado em simultâneo com amostra em estudo.

Interpretação clínica

Neste procedimento, o fator principal é a morfologia do eritrócito, que é dependente do volume, área superficial e do estado funcional da membrana do eritrócito. Devido à menor relação superfície/volume, os esferócitos conseguem absorver menos água que os eritrócitos normais, deste modo hemolisam em soluções menos hipotónicas. Apresentam, assim, fragilidade osmótica aumentada, que pode ser observada na esferocitose hereditária e na esferocitose associada a anemias hemolíticas auto-imunes.

Eritrócitos com relação superfície/volume aumentado (células em alvo) são mais resistentes que os eritrócitos normais, pelo que hemolisam em soluções mais hipotónicas. Apresentam, assim, fragilidade osmótica diminuída, observada na anemia por deficiência de ferro e talassemias. ^(22,25)

Para cada amostra é obtido um gráfico, que contem as curvas-controlo pré-definidas. Em pacientes normais, a curva deverá apresentar-se entre as curvas-controlo. O desvio da curva para a direita, para além do limite de controlo, representa fragilidade osmótica aumentada; o desvio da curva para a esquerda representa uma menor fragilidade osmótica (ANEXO III).

4.6.4. Distúrbios enzimáticos

4.6.4.1. Determinação de Glicose-6-fosfato desidrogenase

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) desempenha um papel de importância fundamental no metabolismo eritrocitário, nomeadamente na proteção contra agentes oxidantes. Uma deficiência nesta enzima, seja por produção insuficiente ou por produção de enzima não funcional, torna o eritrócito suscetível ao stresse oxidativo, que pode levar a uma anemia hemolítica devido à acumulação de peróxidos tóxicos. A maioria das pessoas com esta deficiência não apresenta sintomas, enquanto outras só desenvolvem sintomas de anemia na presença de um agente oxidante, os quais desaparecem quando a causa é removida. Os agentes oxidantes envolvidos no aparecimento da anemia hemolítica podem ser medicamentos (antimaláricos, analgésicos, antibacterianos), infeções ou ingestão de favas (favismo).⁽²⁶⁾

O método de deteção da atividade G6PD utilizado no laboratório de Hematologia Laboratorial tem por base uma reação catalisada pela mesma, na qual a glucose-6-fosfato e o NADP^+ são convertidos em 6-fosfogluconato e NADPH. Ao contrário do NADP^+ , o NADPH absorve luz fortemente. Deste modo, o aumento da absorvância a 340 nm é diretamente proporcional à atividade de G6PD na amostra.

4.6.4.2. Determinação de Piruvato Quinase

O piruvato quinase (PK) é uma enzima da via Embden-Meyerhorf, essencial na produção da ATP. As moléculas de ATP fornecem energia necessária para a manutenção do volume do eritrócito e da sua forma discoide. Uma deficiência na PK provoca, deste modo, a redução da síntese de ATP, tornando os eritrócitos mais rígidos e, conseqüentemente, mais suscetíveis à hemólise. A deficiência desta enzima é a causa comum de anemia hemolítica crónica não esferocítica.^(27,28)

A determinação da atividade desta enzima baseia-se numa reação catalisada pela mesma, na qual o fosfoenol piruvato (PEP) e o ADP são convertidos em piruvato e ATP. O piruvato na presença de NADH e lactato desidrogenase (LDH) é reduzido a L-lactato. Nesta reação o NADH é oxidado formando-se NAD^+ . A taxa de oxidação de NADH é limitada pela atividade de PK, uma vez que a LDH está presente em excesso. A reação é monitorizada medindo o decréscimo da absorvância a 340 nm devido à oxidação do NADH.

4.6.5. Doseamento da Protoporfirina Zinco

A protoporfirina IX é o precursor do grupo heme, essencial à sua síntese. A enzima ferroquelatase catalisa a incorporação do ferro na protoporfirina, levando à síntese de heme. Posteriormente, o grupo heme combina-se com a globina formando, deste modo, a hemoglobina. Em casos de redução da disponibilidade de ferro, a protoporfirina livre acumula-se no eritrócito, e o zinco é incorporado na protoporfirina no lugar do ferro, formando protoporfirina zinco (ZPP).

No laboratório, o doseamento de ZPP é realizado por intermédio do equipamento automático AVIV ZPP Hematofluorometer. Este equipamento permite uma simples e rápida determinação de ZPP, através da medição da fluorescência emitida por ZPP. Além do ZPP também é determinada a hemoglobina presente na amostra. O resultado é expresso pela razão ZPP:hemoglobina (ZPP μ mol/mol de heme).

O doseamento de ZPP é utilizado como ferramenta de auxílio no diagnóstico de anemias por deficiência de ferro. Este teste apresenta boa sensibilidade, contudo a sua especificidade é limitada uma vez que níveis aumentados de ZPP são também observados em contexto de inflamações, intoxicações por chumbo e anemias hemolíticas. ⁽²⁹⁾

O doseamento de ZPP como indicador de deficiência de ferro trás vantagens particularmente na hematologia pediátrica devido ao pequeno volume de amostra necessário para a sua execução.

CONCLUSÕES

O estágio que realizei nos diversos serviços do Departamento de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Porto constituiu, para mim, um desafio e uma experiência muito enriquecedora tanto a nível profissional como pessoal. Com este estágio foi possível aplicar e consolidar todos os conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado em Análises Clínicas.

Estando ciente que não me possibilitaram uma participação tão ativa na execução de algumas tarefas considero que a realização deste estágio permitiu uma formação complementar e atualizada das várias áreas analíticas descritas no presente relatório, só possível obter em contexto real de trabalho. Deste modo, é importante salientar a importância que este estágio teve como primeiro contato com o mercado de trabalho, permitindo compreender rotinas laboratoriais, para além de possibilitar o desenvolvimento de competências e conhecimentos. Apesar de ao longo do estágio me ter confrontado com alguns momentos difíceis de gerir, considero que os objetivos propostos foram atingidos.

ANEXOS

ANEXO I – Valores de referência das análises hematológicas efetuadas.

HEMOGRAMA

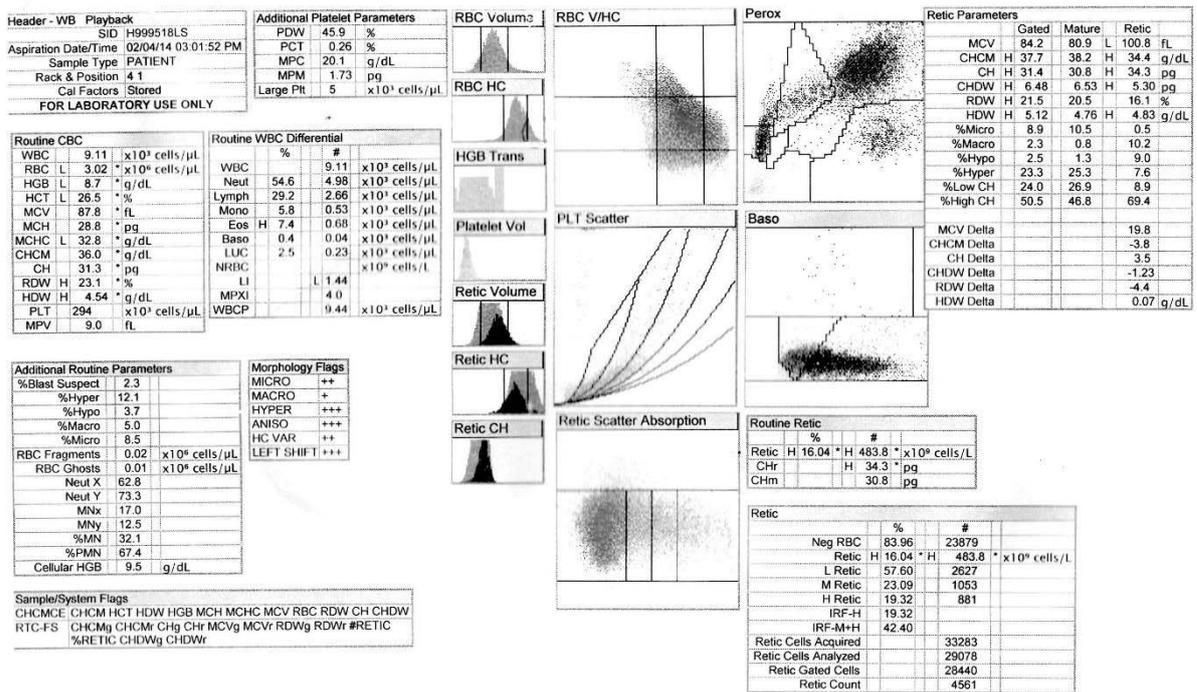
Parâmetro	Intervalo	Sexo	Valores de referência
Eritrócitos (milhão/mm ³)	Até 3 anos	Todos	3,6 – 5,2
	3 a 5 anos	Todos	3,7 – 5,7
	5 a 10 anos	Todos	3,9 – 4,5
	> 10 anos	Feminino	3,8 – 4,8
	> 10 anos	Masculino	4,5 – 5,5
Hemoglobina (g/dL)	Até 3 anos	Todos	10,8 – 12,8
	3 a 5 anos	Todos	10,7 – 14,7
	5 a 10 anos	Todos	11,0 – 15,0
	> 10 anos	Feminino	12,0 – 15,0
	> 10 anos	Masculino	17,0 – 17,0
Hematócrito (%)	Todos	Feminino	36,0 – 46,0
	Todos	Masculino	40,0 – 50,0
VGM (fL)	Até 12 anos	Todos	77,0 – 91,0
	> 12 anos	Todos	80,0 – 99
HGM (pg)	Até 12 anos	Todos	24,0 – 30,0
	> 12 anos	Todos	27,0 – 31,0
CHGM (g/dL)	Até 12 anos	Todos	330 – 380
	> 12 anos	Todos	320 – 360
RDW (%)	Todos	Todos	11 – 17
Leucócitos (milhar/mm ³)	Até 2 anos	Todos	6,0 – 17,0
	2 a 4 anos	Todos	5,5 – 15,5
	2 a 6 anos	Todos	5,0 – 14,5
	6 a 12 anos	Todos	4,5 – 13,5
	12 a 16 anos	Todos	4,5 – 13,0
	16 a 18 anos	Todos	4,5 – 12,5
	> 18 anos	Todos	4,8 – 10,8
Neutrófilos (%)	Até 1 ano	Todos	17,0 – 60,0
	> 1 ano	Todos	40,0 – 80,0

Eosinófilos (%)	Até 1 ano	Todos	1,0 – 5,0
	> 1 ano	Todos	1,0 – 6,0
Basófilos (%)	Todos	Todos	1,0 – 2,0
Monócitos (%)	Até 1 ano	Todos	1,0 – 11,0
	Até 12 anos	Todos	1,0 – 6,0
	> 12 anos	Todos	2,0 – 10,0
Linfócitos (%)	Até 1 ano	Todos	20,0 – 70,0
	Até 12 anos	Todos	25,0 – 50,0
	> 12 anos	Todos	20 – 40,0
Reticulócitos (%)	Todos	Todos	0,5 – 2,5
Plaquetas (milhar/mm ³)	Todos	Todos	150,0 – 400,0

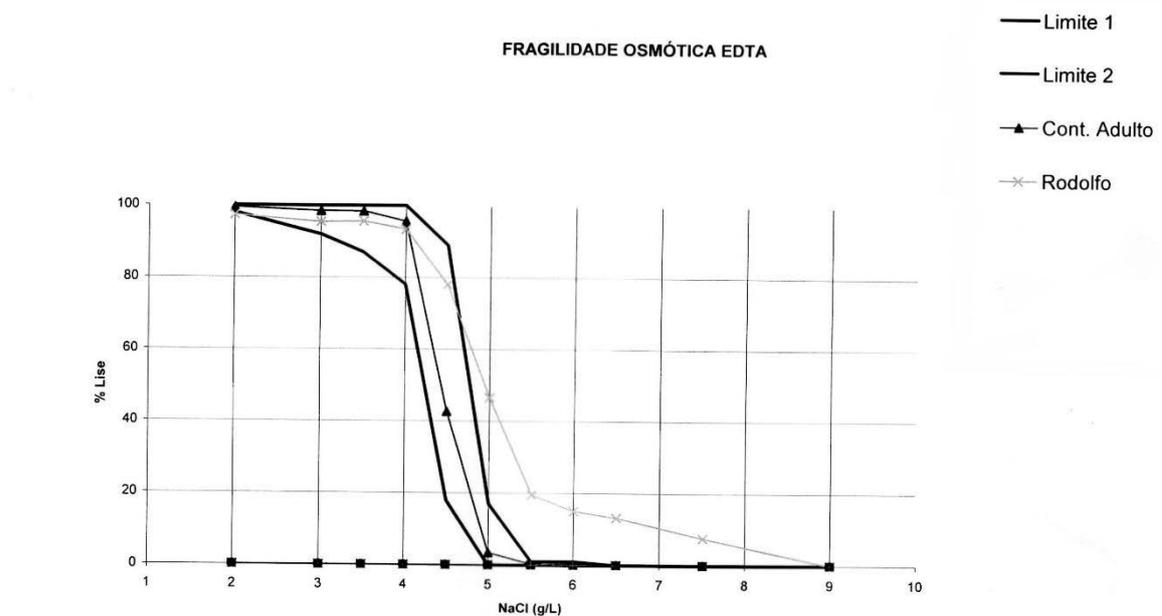
VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

Intervalo	Sexo	Valores de referência
0 – 60 anos		≥ 19
61 – 70 anos	Feminino	≥ 20
> 71 anos		≥ 35
0 – 50 anos		≥ 11
51 – 60 anos	Masculino	≥ 12
61 – 70 anos		≥ 14
> 71 anos		≥ 30

Anexo II – Folha de resultados de um hemograma efetuado no ADVIA® 2120.



ANEXO III – Gráfico de uma amostra patológica, obtido após execução do teste de fragilidade osmótica.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (¹) CERVERA, Ricard; PLAZA, Aresio – *Guías de Práctica Clínica y de Laboratorio: Autoanticuerpos y Enfermedades Autoinmunes*. Sweden Diagnostics, Sant Cugat del Vallés, 2006
- (²) BRADWELL, A.; HUGHES, R. – *Atlas of HEp-2 patterns: & laboratory techniques*. 3rd ed.: The Binding Site Group Ltd, 2007. ISBN 0704425955
- (³) Clinical Immunology Service – Autoimmunity. University of Birmingham. 2015. [Acedido a 4 de Maio de 2015]. Disponível na Internet:<http://www.birmingham.ac.uk/facilities/clinical-immunology-services/autoimmunity/index.aspx>
- (⁴) SCHOENFELD, Yehuda; CERVERA, Ricard; Gershwin, Eric – *Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases*. Humana Press, 2008. ISBN: 978-1-60327-427-2
- (⁵) McPHERSON, Richard; PINCUS, Matthew – *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22nd ed.: Elsevier, 2011. ISBN 978-1-4377-0974-2
- (⁶) Pharmacia Diagnostics ImmunoCAP 250 Laboratory Procedure Manual. Environmental Health, 2006
- (⁷) BIO-FLASH[®] Operator's Manual. Biokit S.A., 2012
- (⁸) BURTIS, Carl; ASHWOOD, Edward; BRUNS, David – *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 5th ed.: Elsevier, 2012. ISBN 978-1-4160-6164-9
- (⁹) PRADA, Daniela; HENRIQUES, Pedro; SILVA, Rita – Deficiências do complemento. *Saúde Infantil*. 2011. Dez; 33(3):137-143
- (¹⁰) SPUDEIT, Daniel Afonso; DOLZAN, Maressa Danielli; MICKE, Gustavo Amadeu – Conceitos básicos em eletroforese capilar. *Scientia Chromatographica*. 2012. 4(4):287-297
- (¹¹) YANG, Zhaohai et al. – Performance of the Sebia Capillarys 2 for detection and immunotyping of serum monoclonal paraproteins. *American Journal of Clinical Pathology*. 2007. 128:239-299
- (¹²) CHAUVEAU, D.; CHOUKROUN, G. – Bence Jones proteinuria and myeloma kidney. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1996. 11:413-415
- (¹³) NOWROUSIAN, Mohammad et al. – Serum free light chain analysis and urine immunofixation electrophoresis in patients with multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*. 2005. 11(24):8706-8714
- (¹⁴) CHAN, Angel; LAU, June; CHAN, CH.; SHEK, CC. – Cryoglobulinaemia: clinical and laboratory perspectives. *Hong Kong Medical Journal*. 2008. 14:55-9

- (15) RAMÍREZ, Lourdes María et al. – Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 2004. 17(1):42-55
- (16) NAKAGE, Ana Paula et al. – Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. *Ciência Rural*. 2005. 35(4):23-38
- (17) SILVEIRA, Pedro; PALMARES, Maria do Carmo; DELGADO, Luís – Lavagem broncoalveolar: metodologia e aplicação. *Resista Portuguesa de Pneumologia*. 1997. III(2): 155-178
- (18) BAIN, Barbara – *Blood Cells: A Practical Guide*. 4th ed.: Blackwell, 2006. ISBN-13: 978-1-4051-4265-6
- (19) ADVIA[®] 2120/2120i Hematology Systems Operator's Guide. Siemens. Rev. C, 2010
- (20) FAILACE, Renato et al. – *Hemograma: manual de interpretação*. 5^a ed.: Artmed, 2009. ISBN: 8536319194
- (21) HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. – *Fundamentos em Hematologia*. 6^a ed.: Artmed, 2013. ISBN 9781405198905
- (22) BAIN, Barbara; BATES, Imelda; LAFFAN, Mike; LEWIS, S. – *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2011. ISBN 13: 9780702034084
- (23) SILVA, Grazielle; PILGER, Diogo; CASTRO, SimonE; WAGNER, Sandrine – Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2006. 77-78
- (24) KHOSA, Shafi Mohammad et al. – Comparative analysis of cellulose acetate hemoglobin electrophoresis and high performance liquid chromatography for quantitative determination of hemoglobin A₂. *Blood Research*. 2015. 50:46-50
- (25) DONATO, Hugo et al. – Esferocitosis Hereditaria. Revisión. Parte I. Historia, demografía, etiopatogenia y diagnóstico. *Archivos Argentinos de Pediatría*. 2015. 113(1):69-80
- (26) MAURÍCIO, Rômulo Filgueira et al. – Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase: dados de prevalência em pacientes atendidos no Hospital Universitário Onofre Lopes, Natal – *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2006. 38(1):57-59
- (27) ZANELLA, Alberto; BIANCHI, Paola; FERMO, Elisa – Pyruvato kinase deficiency. *Haematologica*. 2007. 92:721-723
- (28) Leal, Daniel Pacheco – *Bioquímica Médica*. LIMUSA, 2004. ISBN 968-18-6468-9
- (29) YU, Kyeong Hee- Effectiveness of zinc protoporphyrin/heme ratio for screening iron deficiency in preschool-aged children. *Nutrition Research Practice*. Feb. 2011. 5(1):40-45