

Tânia Vanessa Valadão Meneses

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Frederico Monteiro Marques Valido e pela Professora Doutora Teresa do Carmo Pimenta Dinis Silva, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Imagem da capa: “CONSTRUÍNDO O PRESENTE ENTRE O PASSADO E O FUTURO” - Paineis de azulejos de Ferreira da Silva, exposto na entrada principal do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E.

Tânia Vanessa Valadão Meneses

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Frederico Monteiro Marques Valido e pela Professora Doutora Teresa do Carmo Pimenta Dinis Silva, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“Só tens de olhar para as tuas ‘missões’ individualmente
e há medida que fores evoluindo no teu trabalho,
vais melhorando as tuas capacidades e serás cada vez melhor!”

Anónimo

Agradecimentos

Agradeço ao Dr. Frederico Valido, diretor do Serviço de Patologia Clínica do IPO de Coimbra Francisco Gentil, pela sua disponibilidade e orientação demonstrada ao longo destes meses.

À Professora Doutora Leonor Almeida, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, pela confiança demonstrada na realização deste estágio.

À Professora Doutora Teresa Dinis por todo o apoio, ajuda, disponibilidade e colaboração na realização do relatório.

Ao Dr. Nuno Cunha, meu co-orientador, por toda a disponibilidade e conhecimento demonstrado ao longo deste estágio.

Ao meu colega, amigo e co-orientador Dr. Jorge Reis, por todos os conselhos e conhecimentos transmitidos. Agradeço toda a paciência, disponibilidade e ajuda.

Aos meus pais, irmã, namorado, família e amigos, que mesmo a um oceano de distância, estiveram sempre a meu lado nos momentos mais difíceis, nunca me deixando desistir do meu objetivo, dando força e motivação para continuar. Graças a eles, agora termino esta etapa.

Aos colaboradores do SPC do IPO de Coimbra, técnicos de diagnóstico e terapêutica, técnicos superiores de saúde e médicos, por todo o conhecimento transmitido ao longo destes meses, e pela oportunidade que me deram de realizar todas as tarefas que são possíveis num laboratório de Análises Clínicas, tal como se deste fizesse parte. Obrigada SPC!

Índice

Abreviaturas	XIII
Resumo	XVII
Abstract	XVII
1. Introdução	1
2. Caracterização do Laboratório	2
3. Setores de Imunologia e Hormonologia.....	4
3.1. Imunoensaios.....	4
Imunoensaios competitivos.....	4
Imunoensaio não competitivo (“Sandwich”).....	5
CLIA (Chemiluminescence Immunoassay)	6
ECLIA (Electrochemiluminescent Immuno Assay)	6
TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission)	6
EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique).....	6
FEIA (Fluorometric Enzyme Immunoassay).....	6
RIA (Radioimmunoassay) e IRMA (Immunoradiometric Assay).....	7
Nefelometria.....	7
3.2. Marcadores Tumorais.....	9
Antigénio Carcinoembrionário (CEA).....	11
Antigénio hidrocarbonado 19.9 (CA 19.9).....	12
Antigénio do carcinoma das células escamosas (SCC).....	12
Cyfra 21.1	13
Antigénio hidrocarbonado 125 (CA 125).....	13
Proteína 4 do Epidídimo humano (HE-4) e ROMA associado ao CA 125.....	13
α -Feto-proteína (AFP).....	14
Antigénio Específico da próstata Total e livre (PSA e fPSA).....	15
Enolase Neuro Específica (NSE)	16
Peptídeo libertador da progastina (ProGRP)	17
Antigénio hidrocarbonado 72.4 (CA 72.4).....	17
Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)	17
Cromogranina A e B (CgA e CgB).....	18
Proteínas S100.....	19
β -2-Microglobulina (BMG)	19
Calcitonina.....	19
Tiroglobulina (TG)	20

Ácido Vanilmandélico (VMA)	20
Metanefrina, Normetanefrina Plasmáticas e Metanefrinas Urinárias	21
3.3. Controlo de Qualidade	22
4. Setor de Hematologia.....	23
4.1. Hemograma.....	24
4.1.1. Leucócitos	25
Contagem leucocitária	25
4.1.2. Eritrócitos.....	27
Contagem eritrocitária.....	27
Concentração de Hemoglobina (HGB).....	31
Hematócrito (HTC).....	31
4.1.3. Plaquetas	32
Contagem plaquetar:	32
4.1.4. Reticulócitos	33
Contagem de Reticulócitos.....	33
4.2. Citologia.....	34
4.2.1. Esfregaço de Sangue Periférico.....	34
4.2.2. Medulograma	35
4.3. Velocidade de sedimentação (VS).....	35
4.4. Imunofenotipagem – Citometria de Fluxo.....	36
4.5. Estudos Moleculares	37
4.6. Hemóstase.....	38
4.6.1. Tempo de Protrombina (TP)	39
4.6.2. Tempo de Trombina (TT)	39
4.6.3. Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativado (TTPa)	40
4.6.4. Anticoagulante Lúpico (AL).....	40
4.6.5. Fibrinogénio.....	41
4.6.6. D-Dímeros (DD).....	41
4.7. Controlo de Qualidade	42
5. Setor de Química Clínica	43
5.1. Controlo de Qualidade	44
6. Setor de Microbiologia	45
6.1. Controlo de Qualidade	46
7. Casos clínicos.....	47
7.1. Caso clínico nº1	47
7.2. Caso clínico nº2	52
8. Conclusão	55

9. Bibliografia.....	57
Anexo I. Immunologia e Hormonologia.....	61
Anexo II. Hematologia	63

Abreviaturas

- AFP:** α -Fetoproteína
AL: Anticoagulante Lúpico
ATCC: *American Type Culture Collection*
ATG: Anticorpos anti-tiroglobulina
CA 15.3: Antígeno hidrocarbonado 15.3, do inglês *Carbohydrate Antigen 15.3*
CA 19.9: Antígeno hidrocarbonado 19.9, do inglês *Carbohydrate Antigen 19.9*
CA 72.4: Antígeno hidrocarbonado 72.4, do inglês *Carbohydrate Antigen 72.4*
CA 125: Antígeno hidrocarbonado 125, do inglês *Carbohydrate Antigen 125*
CAL: Calcitonina
CEA: Antígeno carcinoembrionário, do inglês *Carcinoembryonic Antigen*
CgA: Cromogranina A
CgB: Cromogranina B
CK-MB massa: Creatinacina-se- MB massa
CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CLIA: *Chemiluninescent Immunoassay*
CTD: *Connective Tissue Diseases*
DHEA: Dehidroepiandrosterona
DHEA-SO₄: Dehidroepiandrosterona Sulfato
dRVV: *dilute Russel's Viper Venom*
ECLIA: *Electrochemiluminescent Immune Assay*
EBV: *Epstein-Barr virus*
EDTA: Ácido etilendiamino tetra-acético, do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*
EMIT: *Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*
EPN: Eritropoetina
FEIA: *Fluorometric Enzyme Immunoassay*
fPSA: Antígeno específico da próstata livre, do inglês *free Prostate Specific Antigen*
FSH: Hormona folículo estimulante, do inglês *Follicle-Stimulating Hormone*
FT3: Tri-iodotironina 3 livre, do inglês *Free Thyroxine 3*
FT4: Tiroxina 4 livre, do inglês *Free Thyroxina 4*
GAS: Gastrina
GH: Hormona de crescimento, do inglês *Growth Hormone*
GRP: Peptídeo libertado de gastrina, do inglês *Gastrine Releasing Peptide*
HCG: Gonadotrofina coriônica humana, do inglês *Human Chorionic Gonadotropin*
HCM: Hemoglobina Corpuscular Média
HCT: Hematócrito
HE-4: Proteína 4 do epidídimo humano, do inglês *Human Epididymis Protein 4*
hsPCR: Proteína C reactiva de alta sensibilidade, do inglês *high-sensitivity C-Reactive Protein*
HVA: Ácido Homovanílico, do inglês *Homovanillic Acid*
IPO: Instituto Português de Oncologia
IPOCFG: Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil
IMAO: Inibidores da Monoamina Oxidase
INR: Razão Internacional Normalizada, do inglês *International Normalized Ratio*
INSA: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

IRMA: *Immunoradiometric Assay*
ISI: Índice de Sensibilidade Internacional, do inglês *International Sensitivity Index*
LCR: Líquido Cefalorraquídeo
LH: Hormona Luteinizante, do inglês *Luteinizing Hormone*
LLC: Leucemia Linfocítica Crónica
LMC: Leucemia Mieloide Crónica
LMMC: Leucemia Mielomonocítica Crónica
MPO: Mieloperoxidase
MTP: Metanefrinas plasmáticas
NMP: Normetanefrinas plasmáticas
NSCLC: *Non-Small Cell Lung Carcinoma*
NSE: Enolase neuro específica, do inglês *Neuron-Specific Enolase*
NT-Pro-BNP: N-terminal da pro-hormona do péptido natriurético cerebral, do inglês *N-terminal Prohormone of Brain Natriuretic Peptide*
OMS: Organização Mundial de Saúde
PBS: Tampão fosfato-salino, do inglês *Phosphate Buffered Saline*
PE: Poliestireno
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
PCT: Procalcitonina
PLT: Plaquetas
ProGRP: Peptídeo libertador da progastina, do inglês *Pro-Gastrin-Releasing Peptide*
PRL: Prolactina
PSA: Antígeno específico da próstata, do inglês *Prostate-Specific Antigen*
RBC: *Red Blood Cells*
RDW: *Red cell Distribution Width*
RIA: Rádio Imunoensaio, do inglês *Radioimmunoassay*
RIQAS: *Randox International Quality Assessment Scheme*
RNA: Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*
rpm: rotações por minuto
ROMA: *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*
SCC: Antígeno do carcinoma de células escamosas, do inglês *Squamous Cell Carcinomas*
SCLC: *Small Cell Lung Carcinoma*
sHBG: Globulina transportadora de hormonas sexuais, do inglês *Sex Hormone-Binding Globulin*
SPC: Serviço de Patologia Clínica
TG: Tiroglobulina
TEL: Testosterona livre
TP: Tempo de Protrombina
TPA: Antígeno polipeptídico tecidual, do inglês *Tissue Polypeptide Antigen*
TPO: Peroxidase da tiróide, do inglês *Thyroid Peroxidase*
TRACE: *Time Resolved Amplified Cryptate Emission*
TSA: Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
TSH: Hormona Estimuladora da Tiróide, do inglês *Thyroid Stimulating Hormone*
TT: Tempo de Trombina
TTPa: Tempo de Tromboplastina Parcial ativada

T3: Triiodotironina

T4: Tiroxina

UK-NEQAS: *United Kingdom - National External Quality Assessment Service*

VCS: Volume, condutividade e dispersão, do inglês *Volume, Conductivity and light Scatter*

VCM: Volume Corpuscular Médio

VMA: Ácido Vanilmandélico, do inglês *Vanillylmandelic Acid*

VS: Velocidade de Sedimentação

5-HIAA: Ácido 5-hidroxiindolacético, do inglês *5-Hydroxyindoleacetic*

Resumo

Neste relatório descrevo as atividades realizadas durante o estágio curricular no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E., no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Inicialmente apresento uma descrição geral do Serviço de Patologia Clínica, no que concerne aos diversos Setores, tecnologia disponível e organização interna. Os Setores de Imunologia, Hormonologia e Hematologia, são descritos com maior detalhe, dando relevância aos parâmetros analíticos, métodos e seu fundamento. Os Setores de Química Clínica e Microbiologia são apresentados resumidamente, com relevância para as diferentes metodologias de análise. São também referidos os procedimentos de controlo de qualidade interno e externo em que o Serviço de Patologia Clínica se encontra inscrito.

Durante este período, experienciei o quotidiano de um Laboratório de Análises Clínicas, que considero ter sido um complemento fundamental aos conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo do mestrado. Esta experiência revelou-se um desafio que permitiu desenvolver competências para a resolução de possíveis problemas que podem surgir na rotina de trabalho.

Abstract

In this report I describe the activities carried out during the internship in the Clinical Pathology Service of Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E., under the Master in Clinical Analysis of Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Initially I present an overview of the Clinical Pathology Service, regarding the various sectors, available technology and internal organization. The Immunology, Hormonology and Hematology sectors are described in more detail, giving relevance to the analytical parameters, methods and its fundament. The Clinical Chemistry and Microbiology Sectors are summarized, highlighting the different methods of analysis. The procedures for internal and external quality control, in which the Clinical Pathology Service is registered, are also mentioned.

During the internship period I had the opportunity to experience the daily life of a Clinical Laboratory, which I consider to have been a key complement to the theoretical and practical knowledge acquired during the Masters. This experience proved to be a challenge that allowed me to develop problem solving skills that can arise in the work routine.

I. Introdução

O aumento do número de novos casos anuais, tem tido um impacto significativo na epidemiologia oncológica. As modificações no estilo de vida, para além de influenciarem as variações de incidência, contribuem para mudanças relativas entre as diversas neoplasias. O cancro não é só uma doença do presente, mas também do futuro!⁽¹⁾ Numa doença tão marcante, é fundamental investir no estudo de novas formas de prevenção, diagnóstico e tratamento.

O Instituto Português de Oncologia tem como objetivo principal a prestação de cuidados de saúde em oncologia, desde o rastreio, diagnóstico e tratamento. Não esquecendo a área dos cuidados paliativos, tão intimamente ligada a este tipo de patologia.

No âmbito do estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas, tive oportunidade de integrar o Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (SPC do IPOCFG), onde colaborei nos diversos Setores do Serviço: Imunologia, Hormonologia, Hematologia, Química Clínica e Microbiologia. Este estágio, com duração de seis meses, teve início em dezembro de 2015 e revestiu-se de elevada importância na minha formação académica, pois constituiu a minha primeira experiência com a realidade de um laboratório, nomeadamente com a organização interna, sistemas de garantia de qualidade, segurança laboratorial e com as análises clínicas nas diversas fases (pré-analítica, analítica e pós-analítica), onde tive oportunidade de aplicar os conhecimentos já adquiridos ao longo do mestrado e aprofundar os mesmos.

Neste relatório abordo as áreas que mais me cativaram, Imunologia e Hormonologia e Hematologia. Nos Setores de Imunologia e Hormonologia são efetuadas as determinações de marcadores tumorais, de extrema relevância num hospital oncológico, pois contribuem para o diagnóstico, prognóstico e monitorização do doente, onde a monitorização é o principal interesse dos mesmos. A Hematologia laboratorial representa uma área essencial na avaliação do doente oncológico, tanto na patologia hematológica como nas restantes áreas oncológicas, constituindo uma ferramenta com interesse no diagnóstico, prognóstico e *follow up* do doente.

Para os restantes Setores – Química Clínica e Microbiologia – é efetuada uma breve descrição da sua organização e metodologias utilizadas.

Apresento, no âmbito do estágio, dois casos clínicos que se enquadram nas atividades laboratoriais mais representativas do presente relatório.

2. Caracterização do Laboratório

O Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E., é uma unidade hospitalar que integra a rede de prestação de cuidados de saúde do Serviço Nacional de Saúde e de referência hospitalar de oncologia, conferindo-lhe responsabilidades de topo no diagnóstico e tratamento da doença oncológica em toda a Região Centro do país.

O estágio decorreu no Serviço de Patologia Clínica (SPC) desta instituição, o qual é dirigido pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido, médico especialista em patologia clínica. Este serviço é formado por uma equipa de trinta elementos, médicos, técnicos superiores de saúde, técnicos de diagnóstico e terapêutica, administrativos e auxiliares.

O Serviço tem um fluxo diário médio de 300 utentes, incluindo internamento e ambulatório. Na área administrativa, é efetuado o registo em suporte informático de todas as requisições que chegam ao Serviço de Patologia Clínica, utilizando o número de processo único do utente. A cada registo irá corresponder uma identificação alfanumérica com código de barras, associada a todas as amostras do utente em questão.

As colheitas de produtos biológicos no SPC, são na sua maioria, da responsabilidade dos técnicos de diagnóstico e terapêutica, o que permite um acompanhamento integral de todo o processo analítico.

Apesar da amostra mais processada na maioria dos Setores ser o sangue, é vasta a diversidade de produtos que são analisados no SPC e como tal, cada tipo de análise requer material apropriado para as diferentes colheitas. Na tabela I, estão apresentados os sistemas de colheita utilizados no SPC do IPOCFG.

Tabela I: Sistema de colheitas utilizado no SPC do IPOCFG.

Tipo de análise	Amostra	Contentor para colheita
Hemocitometria, estudo morfológico e velocidade de sedimentação	Sangue total	Tubo com EDTA tripotássico
Hemóstase	Plasma	Tubo com citrato trissódico na proporção 9 volumes de sangue para 1 de anticoagulante
Provas Bioquímicas	Soro	Tubo com esferas de poliestireno
	Urina pontual Líquidos biológicos	Contentor esterilizado de 100 mL
	Sangue total	Tubo com EDTA tripotássico
Gasometria	Sangue total	Seringa com heparina de lítio
Cálcio ionizado	Sangue total	Seringa com heparina de lítio
Provas de Imunologia e Hormonologia	Soro	Tubo com esferas de poliestireno e com gel de separação
	Sangue total	Tubo com EDTA tripotássico
Ácido Vanilmandélico, Proteína de Bence Jones, Ácido 5-Hidroxiindolacético e Metanefrinas urinárias	Urina de 24h	Frasco esterilizado de 2000mL
Análises Microbiológicas	Urina pontual Expetoração Líquidos biológicos	Contentor esterilizado de 100 mL
	Fezes	Contentor esterilizado de 100 mL com espátula
	Sangue total	Frascos de hemocultura
	Exsudato	Seringa esterilizada ou zaragatoa de algodão

Após o registo e colheita das amostras, estas são encaminhadas para os respetivos Setores: Imunologia e Hormonologia, Hematologia, Química Clínica e Microbiologia.

Todo o trabalho realizado no laboratório é precedido pela execução diária e rigorosa do controlo de qualidade interno que inclui todos os equipamentos automáticos e algumas técnicas manuais. É ainda de referir que o SPC se encontra associado a diversos programas de controlo de qualidade externo nacionais e internacionais, descritos mais detalhadamente no capítulo referente a cada Setor.

Todos os procedimentos executados no laboratório são regidos por métodos e orientações vigentes, estando descritos no Manual de Boas Práticas Laboratoriais (última atualização 1/03/2016).

3. Setores de Imunologia e Hormonologia

Os Setores de Imunologia e Hormonologia têm como responsável o Dr. Nuno Cunha e os recursos humanos a ele afetos compreendem três técnicos superiores de saúde e dois técnicos de diagnóstico e terapêutica.

Estes Setores encontram-se reunidos no mesmo espaço físico, partilhando equipamentos e metodologias. Nestes, efetua-se a determinação de marcadores tumorais, hormonas, proteínas de fase aguda, fármacos e marcadores da função cardíaca por técnicas de imunquímica. São também realizados estudos de autoimunidade e o estudo de proteínas específicas, isoenzimas e hemoglobina por técnicas eletroforéticas. Estas técnicas eletroforéticas englobam os proteinogramas (eletroforeses de proteínas séricas em gel de agarose, úteis no despiste e acompanhamento de doenças linfoproliferativas), imunofixações (no diagnóstico diferencial de mieloma múltiplo e de gamopatias monoclonais de significado indeterminado) e pesquisa da proteína da Bence Jones.

A maioria das determinações são efetuadas no soro, obtido por centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos do sangue total previamente retraído em tubos com gel e esferas de poliestireno. Também se efetuam determinações em plasma, sangue total (colhido para tubo com EDTA tripotássico) e urina.

Devido à natureza proteica dos analitos em estudo, a sua determinação quantitativa é efetuada por imunoensaios que utilizam anticorpos específicos.⁽²⁾

3.1. Imunoensaios

Os imunoensaios são, por definição, ensaios baseados na reação de um antígeno com um anticorpo específico. A elevada especificidade e afinidade dos anticorpos para antígenos específicos, em conjunto com a sua capacidade para estabelecer ligações cruzadas com os antígenos, permitem a identificação e quantificação de moléculas específicas por vários métodos.⁽³⁾ Os imunoensaios mais utilizados nestes Setores são:

- **Imunoensaios competitivos:**

Neste ensaio, o antígeno livre (em estudo), é incubado na presença de antígenos marcados com um radioisótopo, fluorocromo ou outro agente de deteção, análogos aos antígenos que se pretendem determinar na amostra do paciente, numa matriz com anticorpos específicos. Ambos os antígenos competem pela ligação ao anticorpo da fase sólida⁽⁴⁾ (Figura 1). Após incubação realiza-se uma lavagem final por forma a remover tudo o

que não se ligou. Logo, quanto maior o sinal emitido, menor a concentração do marcador em estudo.

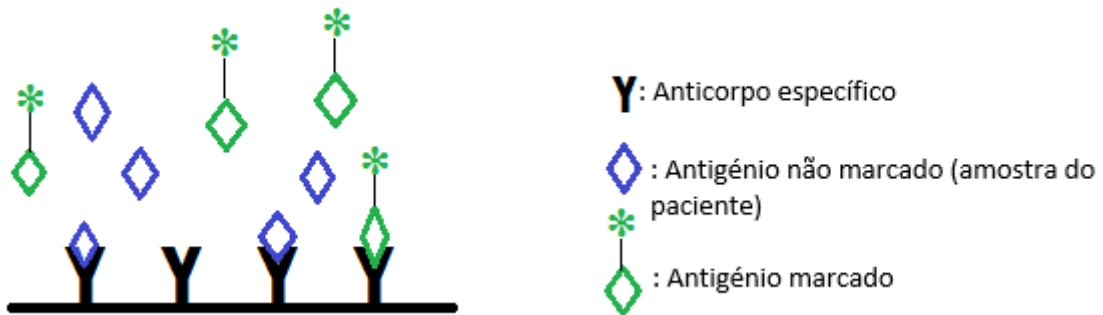


Figura 1: Esquema ilustrativo do imunoensaio competitivo.

- **Imunoensaios não competitivos (*Sandwich*):**

No imunoensaio não competitivo, o antígeno (em estudo) é incubado com um anticorpo específico (primário), que se encontra ligado a uma matriz sólida. Após a remoção do antígeno livre não ligado ao anticorpo, é adicionado um anticorpo marcado (secundário) que se liga a um epítipo diferente do local de ligação do anticorpo primário, formando um imunocomplexo com o antígeno e o anticorpo da fase sólida⁽⁴⁾ (Figura 2). Após incubação procede-se a uma lavagem final para remoção de tudo o que não se encontra ligado. Assim, a quantidade de antígeno presente na amostra do paciente é diretamente proporcional ao sinal obtido.

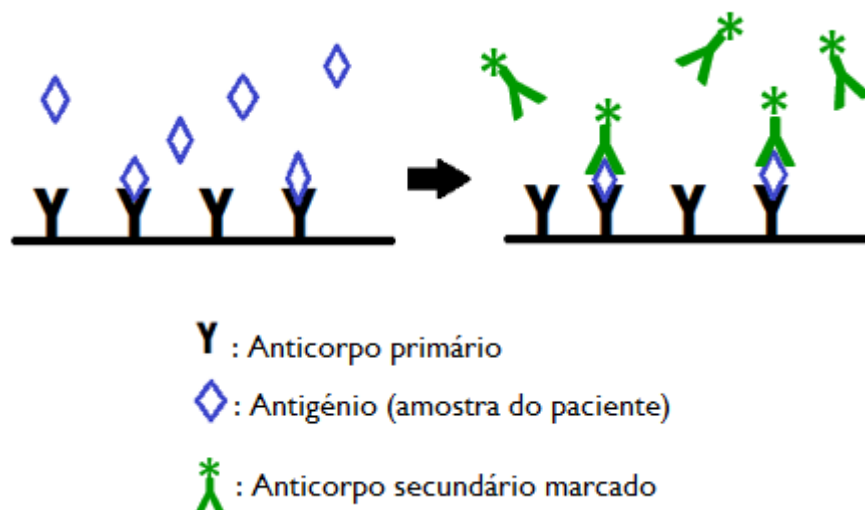


Figura 2: Esquema ilustrativo do imunoensaio não competitivo (*sandwich*).

Os métodos de detecção dos imunocomplexos antígeno-anticorpo utilizados nas determinações analíticas realizadas nestes Setores são:

- **CLIA (Chemiluminescence Immunoassay):**

Este ensaio tem como base os imunoenaios competitivo ou não competitivo. Os imunocomplexos formados são conjugados com uma enzima que reage com um substrato luminogénico produzindo luz. A luz emitida é amplificada por um fotomultiplicador e quantificada por um luminómetro.⁽⁵⁾

- **ECLIA (Electrochemiluminescent Immuno Assay):**

À semelhança do CLIA, este ensaio também pode ser competitivo ou não competitivo. A diferença relativamente à técnica CLIA, é que neste método a reação de quimiluminescência é estimulada por uma corrente elétrica, levando a que ocorram reações de oxidação-redução, que resultam, então, na produção de luz.⁽⁶⁾

- **TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission):**

Ensaio que se baseia na transferência de energia que ocorre entre dois fluorocromos, um dador (não emissor) e um aceitador (emissor). O imunocomplexo formado com o antígeno que se pretende pesquisar, promove a aproximação do fluorocromo dador ao aceitador, resultando na excitação deste último e à emissão de sinal de fluorescência. A intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à concentração do antígeno presente na amostra.^(7,8)

- **EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique):**

Este método é utilizado na monitorização de fármacos. Baseia-se num ensaio imunoenzimático homogéneo competitivo, no qual o analito a pesquisar, compete com um fármaco análogo marcado enzimaticamente, pela ligação ao mesmo anticorpo. A enzima conjugada com o análogo ao ligar-se ao anticorpo fica inativa, impedindo-a de converter o substrato. Desta forma a velocidade de formação do produto é determinada fotometricamente e comparada com a velocidade obtida com diferentes concentrações conhecidas do mesmo fármaco, obtendo-se assim a concentração do fármaco existente na amostra.⁽⁹⁾

- **FEIA (Fluorometric Enzyme Immunoassay):**

É uma técnica imunoenzimática heterogénea não competitiva, em que o anticorpo secundário utilizado é marcado com uma enzima. Esta enzima hidrolisa o substrato

adicionado transformando-o num produto fluorescente. A intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de analito presente na amostra.⁽¹⁰⁾

- **RIA (Radioimmunoassay) e IRMA (Immunoradiometric Assay):**

Ensaio que utiliza radioisótopos (sendo o mais comum o ¹²⁵I) como marcadores. A técnica de RIA baseia-se no imunoensaio competitivo, que utiliza um antígeno análogo marcado e a técnica de IRMA tem por princípio o imunoensaio não competitivo, que utiliza um anticorpo secundário conjugado. A leitura da radiação emitida, após lavagem, é feita num contador de radiação gamma, onde, a par da determinação, é sempre realizada uma curva de calibração com concentrações conhecidas do analito em estudo.

Estes são os métodos utilizados nas técnicas manuais, pelo que requerem cuidados e atenção devido aos riscos inerentes à radiação e volatilidade do iodo.⁽¹¹⁾

- **Nefelometria:**

É a técnica analítica que mede a dispersão da luz que ocorre quando a energia radiante atravessa uma solução e colide com uma partícula (neste caso um imunocomplexo), resultando no espalhamento da luz em todas as direções. A intensidade da luz dispersa é medida com um detetor em ângulo com o feixe de luz incidente.⁽¹²⁾

Os equipamentos que executam as diferentes determinações nestes Setores são apresentados na tabela II:

Tabela II: Equipamentos e princípios utilizados nos Setores de Imunologia e Hormonologia do SPC.

Equipamento	Técnica	Analitos
Immulite 2000[®]Xpi da Siemens[™]	Imunoensaios de Quimioluminescência (CLIA)	CEA, AFP, β ₂ -Microglobulina, HCG, TPSA, fPSA, TSH, ATG, Anticorpos anti-TPO, TG, CAL, PRL, ACTH, IGF1, GH, Δ4-Androstenediona, EPN, GAS e sHBG.
Advia Centaur Xp[®] da Siemens[™]	Imunoensaios de Quimioluminescência (CLIA)	DHEA-SO ₄ , Estradiol, FSH, Ferritina, iPTH, LH, Progesterona, 25-OH-DT e IgE total.
Liaison[®] da DiaSorin[™]	Imunoensaios de Quimioluminescência (CLIA)	TPA, SI00, CK-MB massa, Mioglobina, Troponina I, Renina, BAP. Anticorpos: anti-EBV, anti-Rubeóla e anti-Toxoplasma gondii (IgG e IgM).
Kryptor[®] Brahms[™]	Imunoensaio de fluorescência por 'Time- Resolved Amplified Cryptate Emission' (TRACE)	CA 15.3, CgA, NSE, PCT, Prolactina (monomérica) e SCC.

Tabela II: Equipamentos e princípios utilizados nos Setores de Imunologia e Hormonologia do SPC.
(Continuação)

VIVA-E® da Siemens™	Imunoensaio por 'Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique' (EMIT)	Ácido Valpróico, Carbamazepina, Digoxina, Fenobarbital, Fenitoína, Vancomicina e Metotrexato.
Cobas e601 Analyzer® da Roche Diagnostics™	Imunoensaios de Electroquimioluminescência (ECLIA)	CA 125, CA 19.9, CA 72.4, Cryfra 21.1, ProGRP, Osteocalcina, HE-4, FT3, FT4, T3,T4, Testosterona total, Cortisol, Peptídeo C, Insulina, Ácido fólico, NT Pro-BNP, Trab's e Vitamina B12.
BN-pro Spec® da Siemens™	Nefelometria	α 1-Antitripsina, Cadeias leves livres K e L, Fatores do complemento C3 e C4, Haptoglobina, Imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM), hsPCR, Fator reumatóide, Transferrina e Ceruloplasmina.
ImmunoCAP® da ThermoScientific™	Imunoensaio de Fluorescência Enzimática (FEIA)	Anticorpos: anti-dsDNA, anti-MPO, anti-PR3, anti-CCP, anti- β ₁ -Glicoproteína (IgG e IgM), anti-cardiolipina (IgG e IgM), anti-transglutaminase (IgG e IgA), anti-gliadina deaminada (IgG e IgA) e CTD screen.
Hydrasis® da Sebia™	Electroforese e Imunofixação	Electroforese de hemoglobina, Imunofixação do soro, Pesquisa de proteína de Bence Jones e proteinograma sérico.
LKB Wallac 1272 Clini Gamma Counter	Contador de radiação gamma	Técnicas manuais com radioisótopos: TEL, MTP, NMP, Aldosterona e 17 – OH-P.

Para além das técnicas automáticas, efetuam-se também técnicas manuais. A tabela III correlaciona o tipo de amostra, o analito e a técnica utilizada para a sua avaliação.

Tabela III: Analitos avaliados por técnicas manuais.

Amostra	Analito	Técnica
Soro	Aldosterona, Testosterona Livre, Estrona, 17-OH-Progesterona, DHEA	RIA
Plasma	Metanefrinas fracionadas	RIA
Urina 24h	Metanefrinas*	RIA
	Ácido Vanilmandélico*, Ácido 5-Hidroxiindolacético*	Cromatografia de troca iónica

*Os contentores para a colheita da amostra têm de conter ácido clorídrico 6N para evitar degradação do metabolito.

3.2. Marcadores Tumorais

Define-se como marcador tumoral, uma molécula de características muito variáveis produzida ou induzida pela célula neoplásica, que reflete o seu crescimento e/ou atividade e que permite revelar a presença, evolução ou resposta terapêutica a um tumor maligno.⁽¹³⁾ Estes marcadores biológicos, apesar de poderem estar presentes no tumor, no sangue ou noutros líquidos biológicos, podem também ser produzidos na ausência de doença maligna. A síntese destas moléculas decorre da existência de tumor ou ocorre em células de tecido normal que num processo de malignização passam a produzi-la em maior quantidade,⁽¹⁴⁾ daí a necessidade de estabelecer valores limite, designados de *cut-off*. Na ausência de doença neoplásica, algumas patologias benignas e efeitos secundários de tratamentos podem afetar os tecidos produtores de marcadores tumorais, levando ao aumento destas moléculas e a falsos positivos.⁽¹³⁾ Porém, também é possível a ocorrência de falsos negativos.

Os marcadores tumorais podem agrupar-se em:

1. Enzimas: Um aumento da atividade ou da massa de uma enzima não é específico ou sensível o bastante para ser utilizado para identificar o tipo de tumor ou o envolvimento de um determinado órgão. As enzimas estão presentes em concentrações muito maiores dentro da célula e são libertadas na circulação sistémica como resultado da necrose tumoral ou de uma mudança na permeabilidade da membrana das células malignas. Atividades aumentadas de enzimas também são observadas no caso de obstrução dos ductos biliares ou pancreáticos e na insuficiência renal.⁽³⁾ Um exemplo é a Enolase Neuro Específica (NSE).
2. Hormonas: O aumento de uma determinada hormona não constitui diagnóstico de um tumor específico, pois esta pode ser produzida em diferentes circunstâncias.⁽³⁾ A produção excessiva de hormonas pode ter duas causas possíveis, ou o tecido endócrino, que normalmente a expressa, produz quantidades excessivas da hormona, ou a hormona pode ser produzida num local distinto, por um tecido não endócrino, que normalmente não a produz, designando-se síndrome de secreção ectópica. Um exemplo é a Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG).
3. Antigénios Oncofetais: Estas proteínas são produzidas durante a vida fetal. Estão presentes em altas concentrações no soro fetal, diminuindo após o nascimento. Em pacientes com cancro, estas podem reaparecer.⁽³⁾ Um exemplo é a α -Feto-proteína (AFP).

4. Citoqueratinas: As citoqueratinas compõem os filamentos intermédios do citoesqueleto das células epiteliais,⁽³⁾ sejam estas normais ou tumorais, benignas ou malignas. Como exemplo temos a citoqueratina 19, avaliada através do teste Cyfra 21.1.
5. Marcadores hidrocarbonados: São antígenos de superfície da célula tumoral ou excretados pelas células tumorais. Estas moléculas são clinicamente úteis como marcadores tumorais e tendem a ser mais específicos do que outras naturalmente secretadas, tais como enzimas e hormonas.⁽³⁾ Um exemplo é o Antígeno hidrocarbonado 15.3 (CA 15.3).

A determinação dos marcadores tumorais é um processo pouco invasivo e pouco dispendioso, requerendo apenas uma colheita de sangue por punção venosa ou de urina. A sua quantificação pode efetuar-se no soro, plasma ou urina de 24 horas.

Estas determinações podem ser muito úteis, podendo auxiliar no diagnóstico e estadiamento da doença, na avaliação à resposta terapêutica, na deteção de recidivas e no prognóstico, e ainda auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas.⁽¹⁴⁾ Para monitorizar a eficácia terapêutica, o valor do marcador deve aumentar com a progressão tumoral, diminuir com a regressão deste e não se alterar na presença de doença estável. Em muitos casos, as concentrações sanguíneas dos marcadores tumorais refletem a atividade e o volume tumoral.⁽³⁾

Não existe um marcador ideal. Para ser considerado como tal, este teria de reunir características como: deteção precoce de neoplasias ou recidivas, elevada especificidade e sensibilidade, ser indetetável em doenças benignas e em indivíduos saudáveis, ser específico de um órgão, correlacionar-se com o estágio ou massa tumoral, com a resposta terapêutica e com o prognóstico da doença e ter um tempo de semi-vida curto, para assim permitir acompanhar a génese e evolução do tumor.^(2, 13, 14) Tudo isto por meio de uma análise pouco invasiva (sangue ou líquido biológico) e económica.

Na Figura 3 estão representados alguns marcadores tumorais e o órgão a que geralmente estão associados.

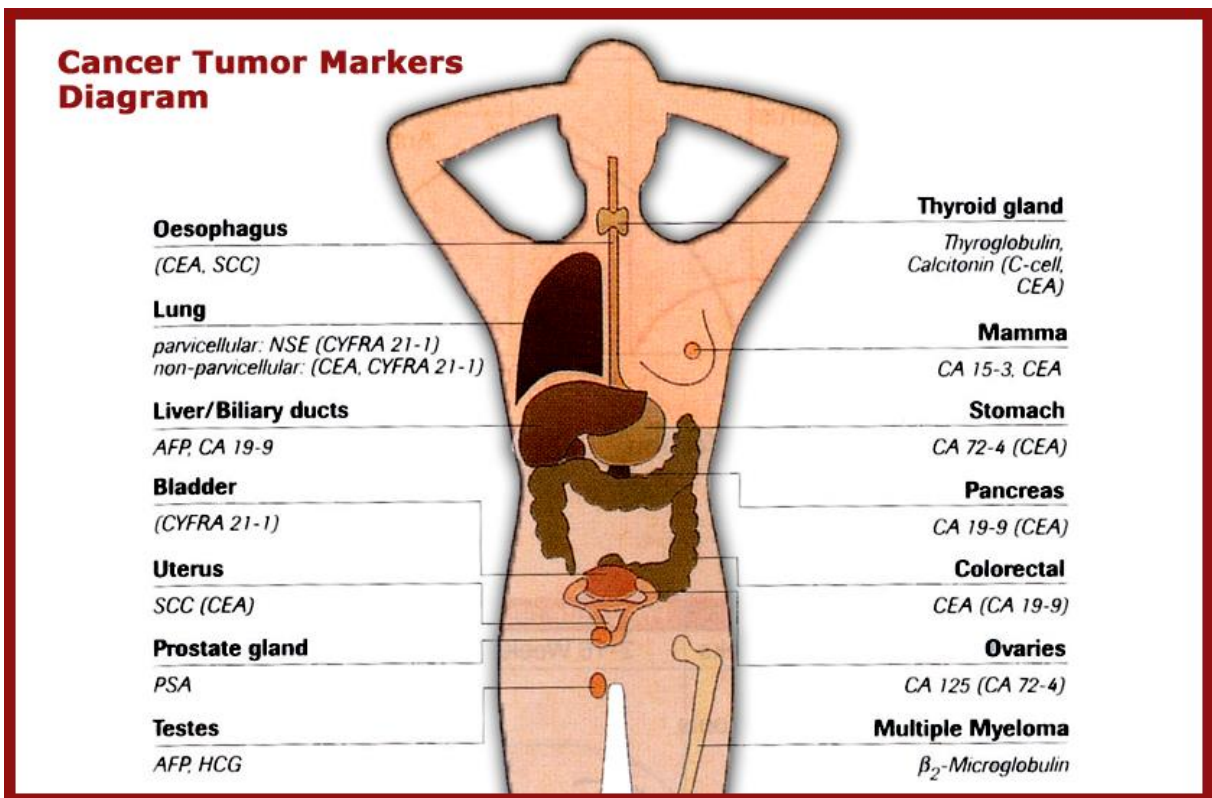


Figura 3: Diagrama de marcadores tumorais (Fonte: http://www.screenoncancer.com/en/diagram_tumor_markers.html).

Seguidamente, descrevo de forma pormenorizada os marcadores tumorais mais requisitados pelos clínicos, durante a minha permanência nestes Setores.

- Antígeno Carcinoembrionário (CEA):

O CEA é uma glicoproteína produzida pelas células da mucosa gastrintestinal. Originalmente foi descrita como presente apenas em carcinomas gastrintestinais e no trato digestivo fetal.⁽¹⁴⁾ A sua função biológica não está bem definida, mas pensa-se ter funções no reconhecimento intercelular e na adesão celular, potencializando a invasão e metastização, tendo sido verificada uma relação entre valores elevados do CEA e a presença de metástases do cancro colorretal.^(3, 14)

Devido às concentrações elevadas deste marcador tumoral em condições malignas e não malignas (lesões inflamatórias) do trato gastrintestinal, em casos de hepatopatias, quistos ováricos, hipertiroidismo, infeções, insuficiência renal e até situações associadas ao consumo de tabaco, a quantificação do CEA não deve ser usada no diagnóstico. É frequentemente utilizado como marcador complementar, associado a outros marcadores mais específicos, sendo encontrados níveis séricos elevados em carcinomas do pulmão, pâncreas, trato biliar, colo do útero, ovário e mama. Em caso de dúvida de malignidade deve-se realizar monitorização contínua.^(13, 14)

Este marcador pode ser utilizado no acompanhamento de doentes durante os tratamentos de quimioterapia, na deteção de possíveis recidivas após cirurgia e existência de metástases.

- Antigénio hidrocarbonado 15.3 (CA 15.3):

O CA 15.3 é uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais glandulares. É o marcador tumoral, por excelência, do cancro da mama, pois é o mais sensível e específico deste órgão. Este varia de acordo com o estadiamento clínico e a massa tumoral, sendo que, o aumento de CA 15.3 correlaciona-se com a progressão da doença e a diminuição com a regressão da mesma.

Este marcador não é útil no rastreio, porque encontra-se elevado em muitas doenças benignas, como hepatite crónica, tuberculose, sarcoidose e lúpus eritematoso sistémico. Porém, é muito utilizado no diagnóstico precoce de recidiva, precedendo os sinais clínicos até 13 meses.⁽³⁾

Podem-se encontrar níveis elevados de CA 15.3 noutras neoplasias, como no cancro do ovário, do pulmão, do colo do útero, hepatocarcinoma e linfomas.^(13, 14)

- Antigénio hidrocarbonado 19.9 (CA 19.9):

É um antigénio de superfície celular sintetizado pelas células dos ductos pancreático e biliar. Associado ao CEA, pode auxiliar no estadiamento e monitorização da terapêutica do cancro do pâncreas e trato biliar. Também pode ter utilidade no carcinoma colorretal, em tumores com metastização hepática ou na vesícula biliar. Concentrações elevadas de CA 19.9 discriminam o cancro pancreático de doença pancreática benigna.

Atualmente, a maior aplicabilidade do CA 19.9 prende-se com a avaliação da resposta à quimioterapia do cancro do pâncreas, já que a utilização de métodos de imagem é muito limitada para este fim.

Algumas doenças não oncológicas, tais como, doenças hepáticas, pancreatites, doenças inflamatórias intestinais e doenças autoimunes podem levar ao aumento do CA 19.9.⁽³⁾

- Antigénio do carcinoma das células escamosas (SCC):

O SCC é uma glicoproteína de superfície celular detetada nos epitélios escamosos. Encontra-se fundamentalmente associado ao carcinoma das células escamosas do colo do útero, ao carcinoma epidermóide do pulmão e a tumores da cabeça e pescoço. Embora não seja um marcador precoce destes carcinomas, é importante no acompanhamento e

monitorização da terapêutica, uma vez que existe uma boa correlação entre o valor estimado e o estágio da doença.

Valores aumentados do SCC, podem estar associados a doenças ginecológicas benignas, doenças dermatológicas (psoríase, eczemas), insuficiência renal crónica, infeções pulmonares e patologias hepáticas.⁽¹³⁾

- Cyfra 21.1:

O Cyfra 21.1 é um teste utilizado como marcador tumoral em que são usados dois anticorpos monoclonais que reconhecem epítomos distintos dos fragmentos solúveis da citoqueratina 19.⁽¹⁵⁾ Tem alta sensibilidade para carcinomas de células escamosas e é um fator de prognóstico maligno no carcinoma das células escamosas do pulmão. É útil no diagnóstico diferencial entre NSCLC (“*Non-small cell lung carcinoma*”) e SCLC (“*Small cell lung carcinoma*”), estando aumentado no NSCLC, e na monitorização do tratamento e evolução da doença. Encontra-se também elevado no carcinoma da bexiga, colo do útero,⁽¹⁶⁾ carcinoma da cabeça e pescoço.⁽¹⁴⁾

Aumenta inespecificamente em algumas patologias benignas pulmonares, gastrintestinais, ginecológicas, urológicas, hepatopatias e na insuficiência renal.^(13, 14)

- Antigénio hidrocarbonado 125 (CA 125):

O CA 125 é uma glicoproteína produzida, principalmente, por células tumorais do ovário.⁽¹⁶⁾ A sua principal função é a monitorização da resposta terapêutica e deteção precoce de recidivas em caso de carcinoma epitelial do ovário, variando de acordo com o tamanho e o estadiamento. Pode haver aumento dos níveis deste marcador entre dois meses a um ano antes da evidência clínica. Este marcador varia com a idade e o ciclo vital. É muito útil na diferenciação entre doença benigna e maligna em doentes com massas ováricas palpáveis.⁽³⁾

Situações não oncológicas podem, no entanto, levar ao aumento do CA 125, como cirrose, quistos no ovário, endometriose, hepatite e pancreatite.^(14, 17)

- Proteína 4 do epidídimo humano (HE-4) e ROMA associado ao CA 125:

A HE-4 é uma proteína precursora da proteína E4, secretada no epidídimo e pertence a uma família de inibidores de proteases envolvidas na função imunológica. O HE-4 está presente maioritariamente no trato genital feminino e masculino.^(16, 18)

O gene que codifica a HE-4 encontra-se sobre expresso em carcinomas do ovário, principalmente em carcinomas serosos e do endométrio, mas não em tumores mucinosos.⁽¹³⁾

Este marcador permite evitar alguns resultados falsos positivos inerentes à determinação do marcador CA 125.

Outro aspeto importante a considerar é a capacidade de HE-4 em predizer o estágio da doença e o envolvimento do miométrio.⁽¹⁶⁾

A insuficiência renal leva a aumentos inespecíficos do marcador HE-4.

Para uma melhor avaliação do risco de carcinoma do ovário, aplica-se o ROMA (*Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*), um algoritmo que atenta o estado fértil e a relação CA125 e HE-4. Na suspeita de malignidade, o marcador CA125 não é confiável devido à baixa sensibilidade em pacientes com cancro de ovário em estágio inicial e à baixa especificidade em mulheres em idade fértil. O HE-4 isoladamente e em combinação com CA125 no ROMA, aumenta a sensibilidade na distinção de carcinoma do ovário de doença benigna.⁽¹⁷⁾

- Gonadotrofina Coriônica Humana Total (HCG Total):

A gonadotrofina coriônica humana é uma glicoproteína composta por duas subunidades, uma α , partilhada por outras hormonas da hipófise, como a hormona luteinizante (LH), a hormona folículo estimulante (FSH) e a hormona estimulante da tiróide (TSH) e uma β , específica da HCG. Esta glicoproteína é secretada primitivamente pelo trofoblasto durante a implantação do blastocisto no endométrio. O trofoblasto dá origem à placenta, que secreta a HCG necessária à manutenção da viabilidade do corpo lúteo, que produz a progesterona necessária à supressão da maturação de uma nova coorte de folículos e viabilidade do endométrio. A HCG está elevada no período gestacional, daí a sua utilização nos testes de gravidez.⁽¹⁹⁾

A HCG é um marcador tumoral trofoblástico, do tecido das células germinativas, pelo que é utilizada no diagnóstico, monitorização e prognóstico de pacientes com tumores germinativos do testículo e ovário. Complementa a α -feto-proteína no diagnóstico deste tipo de tumores.⁽¹⁴⁾

Pequenos aumentos de HCG são descritos em tumores indiferenciados, principalmente digestivos, mama, pulmão, rins e linfomas. A deteção de HCG na ausência de gravidez deve levar à suspeita da existência de um tumor maligno.⁽¹³⁾

Poderá haver aumentos deste marcador em situações benignas, como cirroses e úlceras duodenais.

- α -Feto-Proteína (AFP):

A AFP é uma proteína sérica fetal, semelhante à albumina, sintetizada pelo saco vitelino, hepatócitos fetais e, em menor grau, pelos rins e trato gastrointestinal fetal. Esta é a proteína

mais abundante no soro do feto e tem como função o transporte plasmático e manutenção da pressão oncótica. Esta atravessa a placenta e pode ser encontrada em altas concentrações no soro das gestantes, atingindo valores 20 a 30 vezes superior ao normal num adulto.⁽²⁰⁾ A sua concentração decresce rapidamente até perto do nascimento.

A principal utilidade da AFP como marcador tumoral é no hepatocarcinoma, em que é utilizada no diagnóstico e monitorização deste tipo de tumor. A combinação de AFP e gonadotrofina coriônica humana (HCG) é usada na classificação e estadiamento de tumores de células germinativas, tendo como principal utilidade a monitorização da terapêutica do carcinoma de testículo, sendo que, a sua presença sugere persistência da doença.⁽¹⁴⁾ Concentrações elevadas de AFP após cirurgia podem indicar remoção incompleta do tumor ou a presença de metástases.⁽³⁾

Aumentos moderados de AFP são encontrados em neoplasias gástricas, sendo indicador de mau prognóstico.

A concentração de AFP aumenta frequentemente em condições hepáticas benignas, como hepatopatias agudas ou crónicas, cirroses, hepatites e gravidez.⁽¹³⁾

- Antígeno Específico da Próstata Total e livre (PSA e fPSA):

O PSA é uma glicoproteína sintetizada pela glândula prostática e secretada no lúmen dos ductos prostáticos, estando presente em grandes concentrações no líquido seminal, com a função de fluidificar o sémen.⁽²¹⁾

Este marcador na corrente sanguínea encontra-se sob duas formas: livre ou ligado, formando complexos estáveis com dois inibidores extra-celulares de proteases, a α -antiquimiotripsina e a α -macroglobulina.⁽²²⁾

A avaliação do PSA tem uma sensibilidade elevada na deteção do cancro da próstata mas uma especificidade baixa (é um marcador específico de órgão mas não específico da doença, podendo estar elevado em patologias benignas).⁽³⁾ Atualmente, a determinação do PSA nas análises de rotina do homem com mais de 50 anos é uma realidade, não sendo necessário o paciente já ter tido este carcinoma ou haver suspeita deste. O PSA é dos poucos marcadores tumorais com interesse no rastreio de uma população previamente definida, tendo um papel relevante no diagnóstico precoce desta patologia.

No caso de se encontrarem situações anormais, a combinação da quantificação do PSA com o exame retal por ultrassonografia, pode constituir um melhor método de deteção de tumor na próstata. A determinação do PSA oferece várias vantagens sobre o toque retal ou a ultrassonografia na deteção do cancro da próstata, pois o resultado é quantitativo e obtido independentemente da perícia do examinador, para além de ser melhor aceite pelos

pacientes.⁽¹⁴⁾ Quando há detecção precoce do tumor, este é potencialmente curável com prostatectomia radical. Também é importante na monitorização do tratamento e da evolução da doença, e é um bom indicador do estágio tumoral. Após prostatectomia radical, o valor de PSA deverá ser indetetável. Nos casos de tratamento com radioterapia externa ou braquiterapia, o valor considerado como normal é bem menor do que o da normalidade, pois estes provocam a redução do volume prostático.⁽¹⁴⁾

Com o aumento da idade, ocorrem modificações no epitélio prostático (hipertrofia benigna da próstata), que levam a aumentos do PSA na corrente sanguínea.^(21, 23, 24) A determinação da relação fPSA, PSA total (PSA livre/ PSA total) pode ajudar a diferenciar uma situação benigna como a hipertrofia benigna da próstata, de uma situação maligna como o carcinoma da próstata. Quanto menor for a razão, maior a probabilidade da existência de carcinoma.⁽²⁵⁾

Prostatites agudas ou crônicas, hiperplasia benigna da próstata, infecções urinárias e uso de algália, podem levar a aumentos de PSA.⁽¹⁴⁾ Os valores deste marcador também são influenciados se a colheita não preceder o exame retal, biópsia ou massagem prostática.⁽²⁶⁾

- Enolase Neuro Específica (NSE):

A NSE é uma enzima glicolítica encontrada predominantemente no tecido neuronal e nas células do sistema neuroendócrino. Existem várias isoenzimas compostas pela combinação de três sub-unidades (α , β , γ), sendo a isoenzima γ - γ específica das células neuroendócrinas e neurónios.⁽²⁷⁾ Os eritrócitos são ricos na forma híbrida α - γ , pelo que se deve rejeitar as amostras hemolisadas antes da determinação da NSE.

Concentrações elevadas de NSE podem ser encontradas em tumores de origem neuroendócrina, incluindo cancro de pequenas células do pulmão (SCLC), neuroblastoma,⁽²⁸⁾ feocromocitoma/paraganglioma, tumores endócrinos pancreáticos e melanoma.⁽³⁾

A NSE é o principal marcador tumoral usado no diagnóstico diferencial entre SCLC e outros tipos de carcinoma do pulmão. Este marcador é de grande utilidade na monitorização dos tratamentos de quimioterapia, em que os valores séricos tendem a subir ou a baixar de acordo com a resposta à terapia. Concentrações elevadas de NSE estão associadas a pior prognóstico.⁽³⁾

Podem-se observar casos de falsos positivos em doentes com pneumonia, choque séptico, traumatismo craniano, trauma cerebral e insuficiência renal.^(13, 14)

- Peptídeo libertador da progastrina (ProGRP):

O peptídeo libertador de gastrina (GRP) é importante na disseminação metastática, por um mecanismo autócrino ou por interação célula a célula.⁽¹³⁾ Contudo, este apresenta um tempo de semi-vida de apenas 2 minutos no sangue, o que dificulta a sua determinação. Assim sendo, é avaliada a presença do seu precursor, o peptídeo libertador da progastrina (ProGRP), que apresenta um tempo de semi-vida mais longo.⁽²⁹⁾ O ProGRP apresenta uma alta sensibilidade e especificidade para o cancro de pequenas células do pulmão (SCLC), sendo adequado na distinção da doença pulmonar benigna, carcinoma de não pequenas células do pulmão (NSCLC) e de cancro do pulmão não metastizado. Esta distinção é de grande relevância, uma vez que a terapêutica a utilizar é também diferente. O diagnóstico diferencial dos nódulos pulmonares indeterminados pode ser melhorado através da utilização de um painel de marcadores pulmonares complementares, como o Cyfra 21.1, o SCC e a NSE.⁽²⁹⁾ Por exemplo, a sensibilidade do peptídeo libertador de gastrina é superior à da NSE para o cancro de pequenas células do pulmão.⁽³⁰⁾

Também são detetados aumentos do ProGRP em tumores neuroendócrinos.

A insuficiência renal, hepatopatias e derrames, podem levar a pequenos aumentos de ProGRP.⁽¹³⁾

- Antígeno hidrocarbonado 72.4 (CA 72.4):

O CA 72.4 é um antígeno glicoproteico mucínico, com elevada especificidade para cancro, mas sem sensibilidade de órgão. No entanto, associado ao CEA, é utilizado para o diagnóstico do cancro do cólon, do estômago, do pâncreas e do trato biliar.⁽³¹⁾ Em combinação com o CA 125, pode ser útil no diagnóstico diferencial de carcinoma do ovário.

Este marcador é muito específico, permitindo a diferenciação entre tumores malignos e benignos, uma vez que surge em baixa percentagem em doenças benignas e noutras neoplasias não digestivas ou ováricas, detetando-se assim poucos falsos positivos.^(13, 14) É utilizado no controlo de remissão e recidiva de carcinomas do trato gastrointestinal.

Ligeiros aumentos deste marcador podem ser encontrados em doentes que estejam sob corticoterapia e terapêutica com inibidores da bomba de prótons.⁽¹³⁾

- Ácido 5-hidroxiacético (5-HIAA):

O 5-HIAA é o principal metabolito da serotonina. Esta pode ser encontrada em muitos locais do corpo, principalmente no trato gastrointestinal (células enterocromafins), cérebro,⁽²⁸⁾ e, em menor grau, na mucosa brônquica, trato biliar e gónadas, sendo o seu metabolito excretado na urina. O 5-HIAA é determinado em amostras de urina de 24 horas combinadas

com um aditivo ácido (HCl 6N) mantendo o pH entre 5 e 6, para evitar a degradação do metabolito.

A serotonina sérica e o 5-HIAA urinário, são os marcadores com maior desempenho no diagnóstico de tumores carcinóides de células enterocromafins e de síndrome carcinóide.⁽²⁸⁾

É muito importante instruir os pacientes sobre as restrições dietéticas a fazer, no mínimo três dias antes da colheita, pois certos alimentos contêm serotonina, como abacate, ameixa, banana, beringela, pickles, nozes e tomate. Também certos medicamentos são proibidos, uma vez que podem causar falsos positivos.^(28, 32)

- Cromogranina A e B (CgA e CgB):

A cromogranina A é uma proteína presente em vários tecidos neuroendócrinos e é um dos principais constituintes dos grânulos secretores das células neuroendócrinas.⁽²⁸⁾ São exemplo de células produtoras de cromogranina, as células cromafins da medula supra-renal, as células β do pâncreas e as pequenas células do pulmão.^(33, 34) A sua concentração correlaciona-se não só com o tamanho do tumor, mas também com a atividade biológica e com a quantidade de vesículas secretoras das células neuroendócrinas.⁽³²⁾

A CgA é o marcador de diferenciação neuroendócrina mais usado na prática clínica. Encontram-se valores elevados nos feocromocitomas, tumores carcinóides gástricos, carcinoma medular da tireoide, carcinoma do pâncreas e carcinoma de pequenas células do pulmão.⁽¹⁴⁾

Este marcador apresenta como desvantagem uma baixa especificidade, pois uma série de processos patológicos levam ao aumento da sua concentração, o que muitas vezes limita a sua utilização. As causas mais comuns de falsos positivos são a gastrite atrófica, o uso de inibidores da bomba de prótons, de antagonistas dos recetores 2 da histamina e outros fármacos supressores de ácido, pois a falta de ácido gástrico leva a hipergastrinemia, estimulando assim as células enterocromafins, o que resulta num aumento da CgA. Para evitar qualquer impacto sobre a análise, a terapêutica com estes fármacos deve ser descontinuada pelo menos 7 dias antes da determinação. Também a insuficiência renal e a colheita 30 ou 90 minutos após refeição podem levar ao aumento de CgA.⁽³²⁾

À semelhança da CgA, a CgB está presente nos grânulos cromafins das células neuroendócrinas. A sua quantificação colmata as limitações da determinação da CgA, que será negativa em situações de células neuroendócrinas não produtoras. Estas células podem no entanto produzir e libertar CgB e estarem presentes em tumores neuroendócrinos como feocromocitomas/paragangliomas. Para além disto, a CgB é menos influenciada pela terapêutica.

- Proteínas S100:

As proteínas S100 pertencem a um grupo de proteínas ácidas intracelulares e fixadoras de cálcio. São componentes de células do sistema nervoso central, melanócitos, células de *Langerhans*, músculo esquelético, miocárdio e tecido renal. A sua função não está bem definida, mas pensa-se que possam participar na divisão celular, na diferenciação e na manutenção do citoesqueleto intracelular na presença de cálcio.

A quantificação destas proteínas é indicada para diagnóstico do melanoma metastizado e a sua determinação permite a monitorização terapêutica e avaliação do prognóstico.

Aumentos da S100 podem estar associados a lesões do sistema nervoso central, insuficiência renal, hepatopatias, lesões cutâneas e doenças autoimunes.⁽¹³⁾

- β -2-Microglobulina (BMG):

A β -2-Microglobulina é uma glicoproteína de baixa massa molecular, identificada como cadeia leve do complexo major de histocompatibilidade classe I (MHC-I). Está presente em todas as células nucleadas, abundantemente nos linfócitos, e em muitas células tumorais. A sua função está relacionada com processos inflamatórios, mais concretamente com o recrutamento e ativação dos linfócitos T.⁽³⁵⁾

Níveis elevados poderão ocorrer em doenças linfoproliferativas, tais como: mieloma múltiplo, leucemia linfocítica crónica⁽³⁶⁾ e linfomas. A sua principal aplicação é a monitorização da terapêutica e da progressão da doença em pacientes com mieloma múltiplo. Valores aumentados de BMG correlacionam-se com o volume tumoral.⁽¹⁴⁾

Podem-se observar aumentos inespecíficos deste marcador em casos de insuficiência renal e em doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide e no Síndrome de Sjögren.⁽³⁷⁾

- Calcitonina:

A calcitonina é um polipeptídeo produzido pelas células parafoliculares da tiróide. Em conjunto com a paratormona, a calcitonina controla o metabolismo do cálcio e do fósforo no organismo. Tem como principal função a inibição da reabsorção óssea, mediada pelos Osteoblastos.^(13, 14)

A sua maior utilidade como marcador tumoral é no diagnóstico e seguimento de doentes com carcinoma medular da tiróide. Aumentos da calcitonina são também encontrados em vários tumores neuroendócrinos e frequentemente em doenças mieloproliferativas. Os níveis deste marcador estão relacionados com a extensão da doença, com o volume tumoral e com a presença de metástases.⁽³⁸⁾

Outras patologias não tumorais podem gerar falsos positivos, como a insuficiência renal, doenças pulmonares, pancreatite, hiperparatireoidismo, hipergastrinemia, anemia perniciosa e também na gravidez.⁽¹³⁾

- Tiroglobulina (TG):

A tiroglobulina é uma iodoglicoproteína produzida pelas células foliculares da tiróide. A tiroglobulina é a molécula precursora das iodotironinas T3 e T4. Existe uma relação direta entre a concentração da tiroglobulina e a massa do tecido folicular presente, daí a importância da sua determinação sérica. Qualquer patologia associada ao aumento da atividade do tecido tiroideu leva a um aumento dos níveis séricos da TG. Como este aumento ocorre em todas as patologias tiroideias, não há diferenciação entre doença benigna e maligna. A sua maior valia é a monitorização da existência e/ou progressão de doença, nos carcinomas diferenciados da tiróide, após tireoidectomia total com ablação do tecido remanescente por terapêutica com ¹³¹I. O valor pós-terapêutico deverá ser inferior ao limite de quantificação da técnica, indiciando a não existência de tecido tiroideu funcional.

É de salientar que a quantificação de TG deve ser acompanhada da quantificação de anticorpos anti-tiroglobulina para excluir falsos negativos,⁽¹³⁾ uma vez que os auto-anticorpos podem interferir na determinação da TG.

Qualquer patologia benigna que afete a tiróide provoca aumentos da TG, como as tireoidites autoimunes, o bócio e a doença de Basedow-Graves.⁽¹³⁾

- Ácido Vanilmandélico (VMA):

O ácido Vanilmandélico é o principal catabolito urinário da adrenalina e da noradrenalina. A sua determinação auxilia o diagnóstico de tumores secretores de catecolaminas, como neuroblastomas, feocromocitomas⁽³⁹⁾ e melanoblastomas. Para uma recolha ideal de amostra - urina de 24 horas - é necessário, cinco dias antes da quantificação, suspender todos os medicamentos contendo catecolaminas (broncodilatadores, descongestionantes nasais, levodopa) ou inibidores da mono-amino-oxidase (IMAO). É prudente evitar, nos dois ou três dias precedentes, certos alimentos como a baunilha, o chá, o café e o chocolate, uma vez que também podem originar falsos positivos.

Outros metabolitos das catecolaminas, metanefrina, normetanefrina e ácido Homovanílico (HVA), podem ser avaliados em simultâneo.

- Metanefrina, Normetanefrina Plasmáticas e Metanefrinas Urinárias:

Estas são produtos do catabolismo das catecolaminas. A metanefrina é produto do catabolismo da adrenalina e a normetanefrina da noradrenalina, sendo ambas convertidas, posteriormente, em ácido Vanilmandélico.

Estes metabolitos estão normalmente presentes em pequenas quantidades na urina, aumentando durante e após o organismo ser exposto a uma situação de *stress*. Um aumento considerável da excreção destes produtos ocorre em casos de feocromocitomas, ganglioneuromas e outros tumores neurogénicos que produzem grandes quantidades de catecolaminas, resultando num aumento dos seus metabolitos tanto na corrente sanguínea como na urina.⁽⁴⁰⁾

A metanefrina e a normetanefrina são quantificadas em amostras de plasma obtido a partir de sangue colhido para tubo com EDTA tripotássico refrigerado e as metanefrinas urinárias em urina de 24 horas.

No IPOCFG os marcadores tumorais são requisitados de acordo com a origem da neoplasia e a avaliação clínica. Estes podem ser requeridos individualmente ou em associação de forma a fornecer um resultado mais completo, como apresento na tabela IV.

Tabela IV: Marcadores tumorais requisitados para as diferentes neoplasias.

Carcinomas	Marcadores Tumores
Carcinoma da Mama	CEA e CA 15.3
Cancro Colorretal	CEA e CA 19.9
Carcinoma da Orofaringe	CEA, SCC e Cyfra 21.1
Carcinoma do Ovário	CA 125, HE-4, ROMA e CA 19.9
Carcinoma epitelial do Ovário	CA 125, HE-4 e ROMA
Carcinoma mucinoso do Ovário	CA 125 e CA 19.9
Carcinoma do Colo do Útero	CEA e SCC
Carcinoma do Endométrio	CEA e CA 125
Carcinoma do Trofoblasto	HCG total
Carcinoma do Testículo	AFP e HCG total
Carcinoma da Próstata	PSA e fPSA
Carcinoma do Pâncreas	CA 19.9
Hepatocarcinoma	AFP
Carcinoma do Pulmão	CEA, SCC, CA 15.3
	Carcinoma de pequenas células do pulmão: NSE e ProGRP
	Carcinoma de não pequenas células do pulmão: Cyfra 21.1

Tabela IV: Marcadores tumorais requisitados para as diferentes neoplasias. (Continuação)

Carcinoma da Bexiga	Cyfra 21.1
Carcinoma Gástrico	CEA, CA19.9 e CA 72.4
Tumores Neuroendócrinos	5-HIAA, CgA, CgB e NSE
Melanoma metastizado	SI00
Doenças Linfoproliferativas	BMG
Carcinoma Medular da Tiróide	CEA e Calcitonina
Carcinoma Diferenciado da Tiróide	TG
Feocromocitomas	VMA, Metanefrina, Normetanefrina plasmática e Metanefrinas urinárias

Os valores de referência dos parâmetros avaliados nestes Setores encontram-se em anexo (Anexo I).

3.3. Controlo de Qualidade

Todos os dias, durante a rotina laboratorial, é realizado o controlo de qualidade interno da BioRad. São avaliados 2 níveis, um normal e um patológico para cada parâmetro. Nestes Setores há possibilidade dos controlos de qualidade internos serem comparados e consultados através de um *software* que armazena e trata estatisticamente os resultados obtidos, mensalmente, por outros laboratórios que possuem os mesmos equipamentos e utilizem os mesmos *kits*. Assim, é possível avaliar o desempenho do laboratório e efetuar medidas corretivas, como uma calibração, caso se justifique.

O controlo de qualidade externo é realizado periodicamente. Estes Setores participam em dois programas, o da *Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS)* e o do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

Para as técnicas manuais, o controlo apropriado é realizado em simultâneo com as amostras. Caso os resultados obtidos do controlo não se encontrem dentro dos valores de referência, é realizado novamente todo o procedimento, pois só com o controlo dentro dos valores esperados é possível a garantia do resultado.

4. Setor de Hematologia

O Setor de Hematologia tem como responsável a Dr^a Joana Diamantino, e apresenta como colaboradores um médico, um técnico superior de saúde e três técnicos de diagnóstico e terapêutica.

Este Setor, através das variadas abordagens analíticas que efetua, hemograma, estudo da hemóstase, velocidade de sedimentação, identificação de células (imunofenotipagem), estudos moleculares, estudo citológico (esfregaço de sangue periférico e medulograma) e estudo citoquímico (coloração de Perls), contribui de forma valiosa no diagnóstico e na avaliação da terapêutica implementada.

Os diversos parâmetros hematológicos são determinados recorrendo a diferentes tipos de amostras como sangue total (após colheita por punção venosa, colocado em tubo com EDTA tripotássico), plasma pobre em plaquetas (obtido através da colheita de sangue venoso para tubo contendo anticoagulante citrato trissódico e centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos) e aspirados de medula óssea.

Para a realização destas análises são utilizados os equipamentos apresentados na tabela V.

Tabela V: Equipamentos utilizados no Setor de Hematologia do SPC do IPOCFG.

Equipamentos	Descrição
Beckman Coulter [®] LH750 Analyzer	Hemograma
BCL da Alifax [®] SPA	Velocidade de sedimentação
Aerospray [®] 7150 Hematology Slide Stainer Cytocentrifuge da WESCOR [®]	Coloração de esfregaços
ACL TOP [®] CTS 500 da Instrumentation Laboratory	Hemóstase
Cytomics FC 500 Beckman Coulter [®]	Imunofenotipagem
GeneXpert [®] da Cepheid	RT-PCR em tempo real
Microscópio ótico	Observação de esfregaços

No seguimento deste capítulo, descrevo as análises mais requisitadas ao Setor de Hematologia, durante a minha permanência.

4.1. Hemograma

O hemograma é um exame complementar de diagnóstico realizado em sangue total colhido para tubo com o anticoagulante EDTA tripotássico que, na quantidade correta, não provoca hemólise nem alterações morfológicas das células.⁽⁴¹⁾ Pela formação de complexos irreversíveis com o cálcio, o EDTA tripotássico impede a coagulação e tem capacidade anti-agregante plaquetar,⁽⁴²⁾ permitindo a análise quantitativa e qualitativa dos elementos celulares do sangue: leucócitos, eritrócitos e plaquetas.

Como consequência da própria patologia ou do tratamento a que os doentes são sujeitos, as células sanguíneas podem sofrer alterações a nível quantitativo ou morfológico, tornando o hemograma fundamental no diagnóstico e monitorização do estado de saúde dos pacientes.

No hemograma completo são determinados vários parâmetros:

- Número de leucócitos totais e contagem diferencial;
- Número de eritrócitos e índices eritrocitários;
- Concentração de hemoglobina;
- Número de plaquetas e índices plaquetares.

Todas estas determinações são efetuadas no autoanalisador Beckman Coulter® LH750 Analyzer.

Para a contagem de células utiliza:

- Princípio de COULTER (impedância elétrica): Quando uma suspensão de células é introduzida num campo elétrico, a passagem das células irá promover interrupções no sinal elétrico. Esta alteração de sinal será proporcional ao tamanho da célula e o número de pulsos detetados será indicativo do número de células. Este princípio permite efetuar a contagem de leucócitos, eritrócitos e plaquetas, sendo que para diferenciar eritrócitos de plaquetas, o equipamento está calibrado para dois intervalos de volume: um, entre 36-360 fL para os glóbulos vermelhos e outro, entre 2-20 fL para as plaquetas.⁽⁴³⁾
- Tecnologia VCS (Volume, Conductivity and Scatter/ Volume, Condutividade e dispersão): Após a lise dos eritrócitos, uma suspensão de células atravessa um canal de fluxo, que só permite a passagem de uma célula de cada vez. Neste canal de fluxo os leucócitos são avaliados individualmente com base no seu volume, condutividade e dispersão de luz do laser incidente. A deteção destes três parâmetros em simultâneo para cada leucócito, permite a

obtenção de um gráfico de distribuição tridimensional, o *Scattergrama* (Figura 4), e da fórmula leucocitária. Esta tecnologia é também utilizada para a contagem de reticulócitos.⁽⁴³⁾

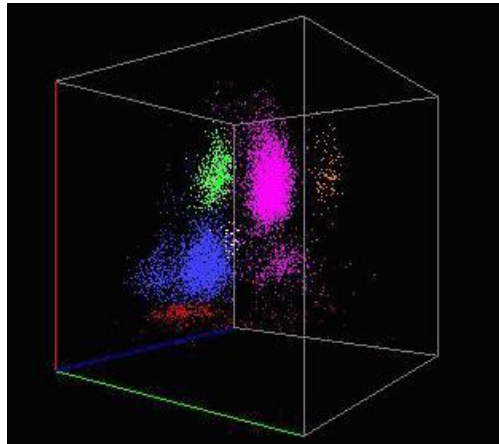


Figura 4: Imagem representativa do *scattergrama*, obtida durante o estágio.

4.1.1.LEUCÓCITOS

- **Contagem leucocitária:** Inclui o número de leucócitos por volume de sangue e o leucograma, que discrimina a percentagem relativa dos diferentes tipos celulares que constituem o número total de leucócitos. Sempre que se justificar (presença de alarmes no autoanalisador, número elevado de células, avaliação clínica e história clínica do doente), efetua-se a contagem diferencial por observação do esfregaço de sangue ao microscópio ótico utilizando a coloração de Wright-Giemsa. Na tabela VI estão identificadas as diferentes populações leucocitárias e possíveis alterações de contagem.

Tabela VI: Identificação de células leucocitárias e alterações dos valores de contagem.

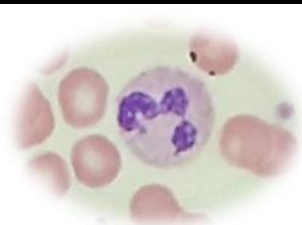
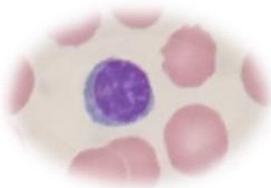
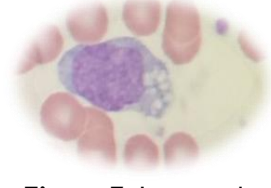
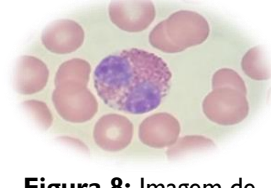

Leucócitos	Imagem em ESP	Alteração da contagem
Neutrófilos: células com núcleo lobulado e cromatina densa (entre 3 a 5 lóbulos). Citoplasma acidófilo contendo grânulos neutrófilos. ^(44,45)	 <p>Figura 5: Imagem de um esfregaço de sangue com um neutrófilo no centro, obtida durante o estágio.</p>	Neutropenia; Infecções por vírus (exemplo Hepatites), intoxicação por drogas, doenças autoimunes, leucemias agudas, síndrome mielodisplásico e quimioterapia. ^(46,47)
		Neutrofilia; Infecção bacteriana, administração de fatores de crescimento, doença mieloproliferativa. ^(46,47)

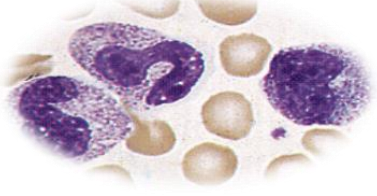
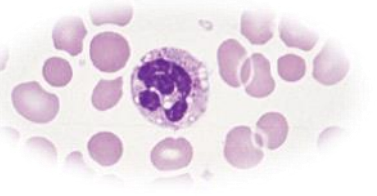
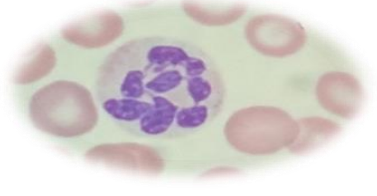
Tabela VI: Identificação de células leucocitárias e alterações dos valores de contagem. (Continuação)

<p>Linfócitos: células nucleadas, geralmente pequenas e com cromatina densa. Alta relação núcleo/citoplasma. Citoplasma basófilo com ausência ou presença de grânulos azurófilos apenas na periferia do citoplasma.⁽⁴⁴⁾</p>	 <p>Figura 6: Imagem de um esfregaço de sangue com um linfócito no centro, obtida durante o estágio.</p>	<p>Linfocitopenia; Imunodeficiência.</p> <p>Linfocitose; Infeções virais como sarampo, varicela e mononucleose, situações de tosse convulsa e em patologias linfoproliferativas, como Leucemia Linfocítica Crônica (LLC).^(46,47)</p>
<p>Monócitos: células com núcleo grande não lobulado e de forma variável, cromatina fina e distribuída uniformemente. Citoplasma basófilo de tamanho e forma variável, podendo ainda haver presença de vacúolos.⁽⁴⁴⁾</p>	 <p>Figura 7: Imagem de um esfregaço de sangue com um monócito no centro, obtida durante o estágio.</p>	<p>Monocitose; Infeções provocadas por bactérias e micobactérias (tuberculose) ou pelo <i>plasmodium falciparum</i>, doenças autoimunes e Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC).^(46,47)</p>
<p>Eosinófilo: células com núcleo lobulado, cromatina densa e citoplasma com granulações eosinófilas características.⁽⁴⁴⁾</p>	 <p>Figura 8: Imagem de um esfregaço de sangue com um eosinófilo no centro, obtida durante o estágio.</p>	<p>Eosinofilia; Infeções provocadas por helmintas, reações alérgicas, intoxicação por metais pesados (chumbo).^(46,47)</p>
<p>Basófilo: célula com núcleo lobulado (entre 2 a 3 lóbulos) que tendem a sobrepor-se, levando a uma cromatina densa e irregular. Citoplasma acidófilo, com grânulos grandes que estão distribuídos pelo citoplasma e sobrepostos ao núcleo.⁽⁴⁴⁾</p>	 <p>Figura 9: Imagem de um esfregaço de sangue com um basófilo no centro, obtida durante o estágio.</p>	<p>Basofilia; Reações alérgicas e Leucemia Mieloide Crônica (LMC).^(46,47)</p>

É importante salientar, que nem sempre as células se apresentam com as características principais, devendo-se analisar detalhadamente a forma e coloração de todas as estruturas celulares, de forma a fazer uma correta identificação celular.

Para além das alterações quantitativas nos leucócitos, também podem ocorrer alterações morfológicas. As alterações mais frequentes são encontradas nos neutrófilos, como apresentado na tabela VII.

Tabela VII: Alterações morfológicas dos neutrófilos.

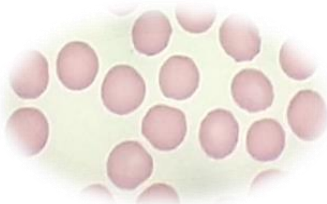
Alterações Morfológicas	Imagem de ESP	Causas
Granulação tóxica	 <p>Figura 10: Imagem de um esfregaço de sangue, onde se observa neutrófilos com granulação tóxica no centro. (Fonte: (44))</p>	Aparecimento de granulação basófila mais escura que o normal no citoplasma, associada a infeções severas e/ou situações de intoxicação. ⁽⁴¹⁾
Presença de vacúolos no citoplasma	 <p>Figura 11: Imagem de um esfregaço de sangue, onde se observa neutrófilos com vacúolos no citoplasma no centro. (Fonte: (44))</p>	Observados em situações de infeções severas e/ou intoxicação. ⁽⁴¹⁾
Neutrófilos hiperlobulados	 <p>Figura 12: Imagem de um esfregaço de sangue com um neutrófilo hiperlobulado no centro, obtida durante o estágio.</p>	Neutrófilos com mais de 5 lóbulos, ocorre em situações de anemias megaloblásticas, infeções bacterianas ou transtornos metabólicos por intoxicação. ⁽⁴¹⁾

4.1.2. ERITRÓCITOS

- **Contagem eritrocitária:** Determina o número de eritrócitos por unidade de volume de sangue (T/L).

Na tabela VIII é apresentado o eritrócito e as possíveis alterações de contagem.

Tabela VIII: Eritrócito e alterações de contagem.

Imagem de ESP	Alteração na contagem
<p>Eritrócito: célula anucleada com forma arredondada e bicôncava. A sua coloração deriva da presença de hemoglobina no seu interior.⁽⁴⁴⁾</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Figura 13: Imagem de um esfregaço de sangue com eritrócitos, obtida durante o estágio.</p> </div> <p>Eritropenia; Anemias, distúrbios medulares, doenças renais.⁽⁴⁷⁾</p> <hr/> <p>Eritrocitose; Policitemia Vera, doenças pulmonares, tumores produtores de eritropoietina.⁽⁴⁷⁾</p>

• **Índices eritrocitários:**

- **Volume Corpuscular Médio (VCM):** corresponde ao volume médio dos eritrócitos (fL). De acordo com o VCM é possível classificar as anemias em normocíticas (valores de VCM dentro da normalidade), microcíticas (o VCM encontra-se reduzido) e macrocíticas (quando o VCM está elevado).^(45,48)

- **Hemoglobina Corpuscular Média (HCM):** conteúdo de hemoglobina presente, em média por eritrócito (pg).

Permite o diagnóstico de anemias normocrômicas (HCM dentro dos valores de referência) e hipocrômicas (HCM abaixo dos valores de referência). Parâmetro calculado a partir de:^(46, 48)

$$HCM = \frac{\text{concentração de hemoglobina (g/L)}}{\text{n}^\circ \text{ eritrócitos (L)}}$$

- **Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM):** concentração média de hemoglobina por eritrócito (g/dL). A CHCM é calculada pela fórmula:⁽⁴⁶⁾

$$CHCM \text{ (g/dL)} = \frac{\text{concentração de hemoglobina (g/dL)}}{\text{hematócrito (\%)}} \times 100$$

- **Índice de dispersão do volume celular (RDW):** corresponde à amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos, ou seja, permite avaliar a anisocitose, considerando o volume celular médio dos eritrócitos.⁽⁴⁷⁾

Existem vários tipos de anemias com diferentes etiologias, mas se as caracterizarmos de acordo com os parâmetros eritrocitários VCM e HCM, obtém-se a classificação apresentada na tabela IX.

Tabela IX: Caracterização das anemias. (Fonte: (45))

Classificação Morfológica	Anemia hipocrômica Microcítica	Anemia Normocrômica Normocítica	Anemia Macroscítica	
		VCM: < 80 fL HCM: < 27 pg	VCM: 80 – 96 fL HCM: 27 – 33 pg	VCM: > 96 fL
Causas	Sideropenia	Algumas anemias hemolíticas	<u>-Anemia megaloblástica:</u>	<u>-Anemia não megaloblástica:</u>
	Talassémias	Hemorragia aguda	Deficiência em vitamina B12	Hepatopatias
	Anemia sideroblástica congênita	Falência medular	Deficiência em ácido fólico	Álcool
	Intoxicação por chumbo	Anemias das doenças crônicas	Anemia perniciosa	Medicamentos

As alterações nas proteínas da membrana ou no citoesqueleto dos eritrócitos, podem estar na origem de patologias associadas à morfologia anormal do eritrócito, que conseqüentemente afeta a vida média do eritrócito, repercutindo-se no transporte de oxigênio aos tecidos. Durante o estágio observei algumas alterações morfológicas dos eritrócitos que estão representadas na tabela X:

Tabela X: Alterações morfológicas dos eritrócitos.


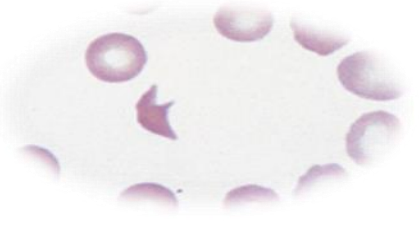

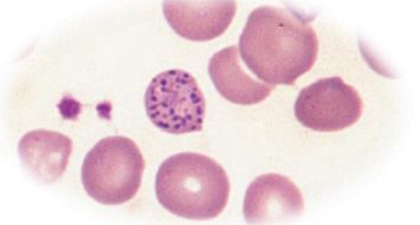
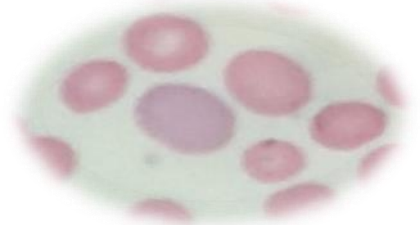
Alterações morfológicas	Imagem ESP
<p>Acantócito: eritrócito com espículas dispostas irregularmente sobre a superfície da célula. Frequentemente associado ao metabolismo anômalo dos fosfolípidos ou a anomalias hereditárias nas proteínas da membrana dos eritrócitos. Células similares são encontradas em patologias hepáticas.⁽⁴⁴⁾</p>	 <p>Figura 14: Imagem de um esfregaço de sangue com acantócito, obtida durante o estágio.</p>

Tabela X: Alterações morfológicas dos eritrócitos. (Continuação)

<p>Esquizócito: fragmentos eritrocitários que se encontram em muitas doenças sanguíneas. Podem resultar da perda de parte da membrana dos eritrócitos normais.⁽⁴⁴⁾</p>	 <p>Figura 15: Imagem de um esfregaço de sangue com esquizócito no centro. (Fonte: (44)).</p>
<p>Células em Alvo (Codócitos): apresentam-se como células que possuem uma zona descorada em redor de um ponto central corado, devendo-se esta característica a uma elevada relação superfície/volume celular. Resultam, principalmente, de hepatopatias crónicas em que as membranas celulares se encontram carregadas de colesterol.⁽⁴⁴⁾</p>	 <p>Figura 16: Imagem de um esfregaço de sangue com codócitos, obtida durante o estágio.</p>

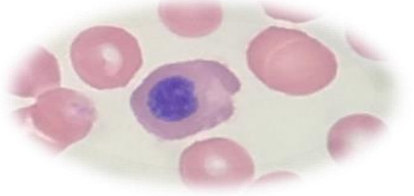

Os eritrócitos, de uma forma geral, apresentam uma coloração homogénea, mas por vezes estes apresentam inclusões. Durante o estágio tive oportunidade de observar algumas inclusões, que estão representadas na tabela XI.

Tabela XI: Inclusões eritrocitárias.

Inclusões eritrocitárias	Imagem do ESP
<p>Pontuado basófilo: presença de numerosos grânulos basofílicos, distribuídos por toda a célula, resultado da precipitação de ribossomas que ainda se encontram presentes no eritrócito. Podem surgir em situações de anemias hemolíticas, intoxicações por metais pesados, deficiências nutricionais e ainda uso de drogas citotóxicas. ⁽⁴⁴⁾</p>	 <p>Figura 17: Imagem de um esfregaço de sangue onde se observa um eritrócito com pontuado basófilo no centro. (Fonte:(44)).</p>
<p>Policromasia: diferente coloração de alguns eritrócitos em relação aos restantes, apresentando uma coloração ligeiramente mais azulada/acinzentada, na coloração Wright-Giemsa, supostamente representando a população de reticulócitos existentes na amostra. Ocorre em situações de intensa atividade eritropoética ou quando há uma eritropoiese extra-medular.⁽⁴⁴⁾</p>	 <p>Figura 18: Imagem de um esfregaço de sangue onde se observa policromasia, obtida durante o estágio.</p>

Outras alterações dos eritrócitos, frequentemente encontradas nos esfregaços de sangue periférico, estão representadas na tabela XII.

Tabela XII: Alterações eritrocitárias.

Outras alterações	Imagem de ESP
<p>Eritroblastos: células nucleadas precursoras de eritrócitos que podem estar presentes no sangue periférico no decurso de grandes processos regenerativos eritrocitários ou na infiltração medular.⁽⁴⁴⁾</p>	 <p>Figura 19: Imagem de um esfregaço de sangue com eritroblasto no centro, obtida durante o estágio.</p>
<p>Fenômeno de Rouleaux: caracteriza-se pela observação de eritrócitos em “pilha de moedas”. Geralmente associado a situações de aumento de proteínas plasmáticas como as imunoglobulinas, que levam a alterações da carga da superfície dos eritrócitos, favorecendo a sua agregação.⁽⁴⁴⁾</p>	 <p>Figura 20: Imagem de um esfregaço de sangue com fenômeno <i>Rouleaux</i> no centro, obtida durante o estágio.</p>

- **Concentração de Hemoglobina (HGB):** consiste na avaliação de hemoglobina por unidade de volume (g/dL).

A hemoglobina é uma proteína dotada de uma coloração forte que permite a sua quantificação por métodos espectrofotométricos. No Setor de Hematologia a concentração de hemoglobina é obtida, após oxidação da hemoglobina a cianometahemoglobina, por medida da absorvância a 525 nanómetros.

O seu valor de referência varia de acordo com a idade, género e localização geográfica (altitude).

Este parâmetro é normalmente utilizado no diagnóstico e seguimento de anemias.

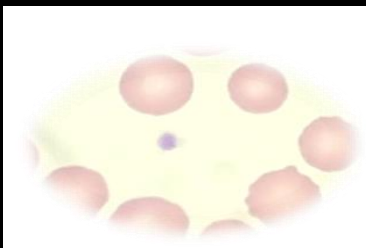
- **Hematócrito (HTC):** o hematócrito é a relação entre o volume dos eritrócitos e o volume de sangue total (v/v). No LH 750, o hematócrito é obtido a partir da fórmula de Winthrobe:⁽⁴⁶⁾

$$HTC = VCM (10^{-9} \mu l) \times RBC (10^6/\mu l) \times 100$$

4.1.3.PLAQUETAS

- **Contagem plaquetar:** Determina o número de plaquetas por unidade de volume de sangue. A tabela XIII caracteriza as plaquetas e as possíveis alterações de contagem.

Tabela XIII: Plaquetas e possíveis alterações na contagem.

	Imagem de ESP	Alteração na contagem
Plaquetas: fragmentos do citoplasma de megacariócitos. Apresentam tamanho pequeno (2 – 20 fL) e forma irregular. Presença de grânulos finos no interior, que podem estar dispersos ou centralizados. ⁽⁴⁴⁾	 <p>Figura 21: Imagem de um esfregaço de sangue com uma plaqueta no centro, obtida durante o estágio.</p>	Trombocitopenia; Terapia com heparina, trombocitopenia idiopática, alcoolismo crônico, infecções virais, neoplasias e deficiência em vitaminas. ^(46, 47)
		Trombocitose; Resposta a diversos tumores, inflamações crônicas, trombocitêmia essencial. ^(46, 47)

Quando uma amostra evidencia trombocitopenia severa e/ou a contagem de plaquetas não se encontra de acordo com o histórico do doente, é necessário efetuar uma avaliação macroscópica, no sentido de excluir a presença de coágulos. Se necessário é efetuado esfregaço de sangue periférico para pesquisar ao microscópio ótico a presença de agregados de plaquetas (Figura 22). Após esta avaliação pode ser necessário a repetição de colheita.

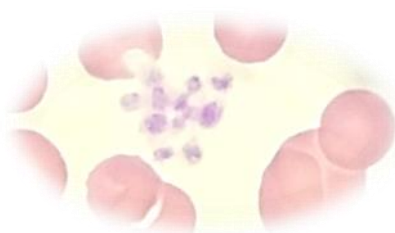


Figura 22: Imagem de um esfregaço de sangue com agregado de plaquetas no centro, obtida durante o estágio.

- **Índice de dispersão do volume plaquetar e volume plaquetar:** Corresponde à amplitude de distribuição do tamanho das plaquetas, baseado no desvio padrão do volume plaquetar.⁽⁴⁷⁾ Permite suspeitar de anisocitose plaquetar. No entanto, é necessário verificar a presença de plaquetas gigantes (Figura 23) e outras características plaquetares, através da observação do esfregaço do sangue periférico.

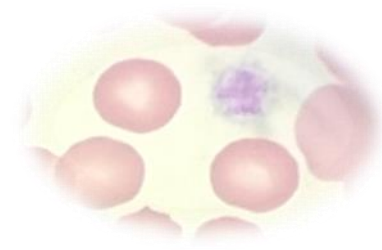


Figura 23: Imagem de um esfregaço com plaqueta gigante no centro, obtida durante o estágio.

4.1.4.RETICULÓCITOS

- **Contagem de Reticulócitos:** Os reticulócitos, células precursoras dos eritrócitos, têm características semelhantes à célula madura, mas com RNA remanescente no citoplasma. O seu número aumenta quando a produção medular de glóbulos vermelhos aumenta. A sua contagem é muito útil para distinguir situações hipoproliferativas e hiperproliferativas. A contagem dos reticulócitos pode ser feita de modo automático pelo Beckman Coulter® LH 750 ou de forma manual através da observação do esfregaço de sangue, após coloração supravital com azul brilhante de cresil, e contagem do número de reticulócitos em 1000 glóbulos vermelhos.

A contagem de reticulócitos permite avaliar a existência de uma eritropoiese eficaz.⁽⁴⁵⁾

A tabela XIV caracteriza os reticulócitos e as possíveis alterações de contagem.

Tabela XIV: Reticulócitos e possíveis alterações na contagem.

Imagem de ESP		Alteração na contagem
Reticulócitos: célula anucleada, com citoplasma policromatófilo. Precursores imediatos dos eritrócitos. ⁽⁴⁴⁾	 <p>Figura 24: Imagem de um esfregaço de sangue com reticulócitos. (Fonte: (44)).</p>	Reticulocitopenia; Supressão da medula óssea.
		Reticulocitose; Anemia hemolítica.

4.2. Citologia

4.2.1. Esfregaço de Sangue Periférico: Consiste na formação de uma fina película de sangue, realizado manualmente (Figura 25), sob uma lâmina, de modo a permitir a observação ao microscópio ótico, sem sobreposição de células. Após secagem do esfregaço, as lâminas são coradas de forma automática utilizando a citocentrífuga Aerospray[®] de Wescor, com coloração de Wright-Giemsa.

Posteriormente, o esfregaço é observado ao microscópio ótico, na objetiva de 100x, na zona intermédia do ESP, onde as células se encontram relativamente afastadas entre si, e são contadas 100 células pela técnica zig-zag.

O estudo citológico por observação do ESP é frequentemente realizado no SPC. Esta avaliação é realizada sempre que solicitado pelo clínico, mas também para diagnóstico ou seguimento de pacientes com síndrome mielodisplásicos ou mieloproliferativos, com leucemia linfóide crónica ou com infiltração por células de linfoma. Os resultados fornecidos pelo autoanalisador, por vezes podem ser sugestivos para a realização de ESP, como forma de confirmação dos resultados, exemplo disso são hemogramas com neutrofilia elevada e citopénias (leucocitopénias e/ou trombocitopénias) e histograma suspeito.

Esta é uma ferramenta muito útil, pois permite a contagem diferencial de leucócitos, observação da morfologia de todas as linhagens sanguíneas e identificação de células anormais ou alterações morfológicas significativas, que por métodos automáticos não são detetadas, o que auxilia no diagnóstico de diversas patologias.

No IPO, as células atípicas podem surgir em consequência das próprias patologias ou como resultado dos tratamentos a que os doentes estão sujeitos.

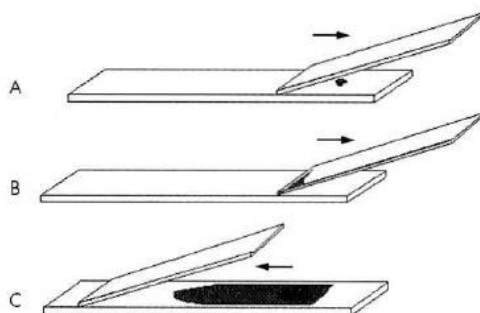


Figura 25: Execução de um esfregaço de Sangue periférico. (Fonte: (47)).

4.2.2. Medulograma: A medula óssea é o principal órgão hematopoiético, sendo fundamental à maturação das diferentes linhas celulares (eritroide, mieloide, linfoide e plaquetar).

Os medulogramas são, geralmente, realizados em situações de suspeita de leucemias ou mieloma múltiplo, esclarecimento de anemias, leucopenia ou trombocitopenia e avaliação dos depósitos de ferro.

A amostra deve ser colhida para tubo com EDTA tripotássico. Os esfregaços de medula óssea (Figura 26 A) são corados utilizando a citocentrífuga Aerospray[®] de Wescor, com coloração de Wright-Giemsa (Figura 26 B), por forma a avaliar quantitativa e qualitativamente as células presentes na medula óssea e com coloração de Perls (Figura 26 C) - procedimento descrito no Anexo II - para quantificar as reservas de ferro.

A observação do esfregaço de medula deve iniciar-se com baixa ampliação (10x – 25x), avaliando os fragmentos de medula óssea e os megacariócitos. A observação das linhas celulares e contagens devem ser efetuadas com ampliação de 100x.

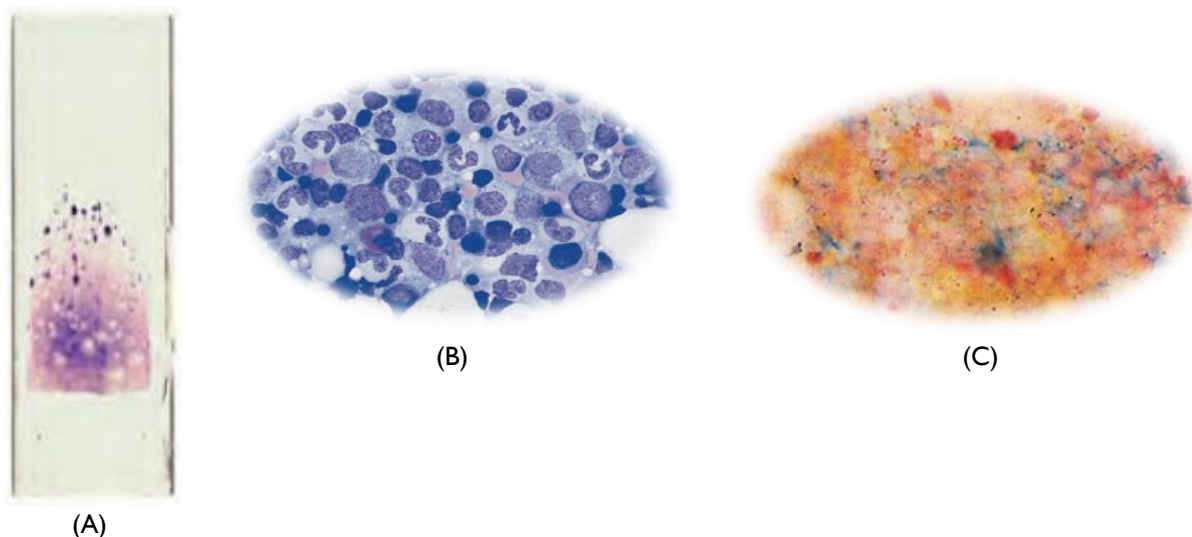


Figura 26: Esfregaço de medula óssea⁽⁴⁵⁾ (A); Imagem obtida com coloração Wright-Giemsa⁽⁴⁶⁾ (B); Imagem obtida com coloração de Perls⁽⁴⁸⁾ (C).

4.3. Velocidade de sedimentação (VS)

Os eritrócitos presentes numa amostra em repouso sedimentam de forma diferente consoante a sua forma e concentração de proteínas. Desta forma, a VS pode ser utilizada para avaliar e seguir indivíduos com doença inflamatória, pois esta é influenciada por proteínas de fase aguda, como o fibrinogénio, as imunoglobulinas e pela forma dos eritrócitos. Um aumento de proteínas diminui as forças de repulsão entre os eritrócitos e

consequentemente leva a uma aglutinação mais fácil e rápida dos mesmos (formação de *Rouleaux*).

Situações como infecções bacterianas ou virais, inflamações (exemplo artrite reumatóide) e neoplasias, como mieloma múltiplo, leucemias e linfomas, apresentam uma VS aumentada, permitindo assim utilizar esta determinação como controlo e monitorização do tratamento. Doentes com patologias hereditárias, como a drepanocitose, têm uma sedimentação mais rápida, pois as alterações no formato dos eritrócitos favorecem a sua sedimentação. O mesmo em caso de macrocitose, que devido ao seu maior tamanho, facilita a deposição dos mesmos.⁽⁴⁵⁾

Em caso de insuficiência hepática e carcinomas, que levem a uma incapacidade de produção destas proteínas, há uma diminuição da velocidade de sedimentação.⁽⁴⁶⁾

No SPC a velocidade de sedimentação é realizada de forma automática no BCL da Alifax[®] SPA, com base no princípio da fotometria de fluxo capilar (análise cinética). Neste sistema, ocorre inicialmente uma homogeneização das amostras e os resultados são obtidos num intervalo de 20 segundos entre amostras.

Em casos de amostra insuficiente, recorre-se ao método de referência, de Westergren. Segundo este método, a amostra é colocada numa coluna descartável de plástico, graduada em mm, disposta verticalmente. Ao fim de 60 minutos o resultado é obtido macroscopicamente pela medição da altura da coluna de sangue inicial sem eritrócitos.⁽⁴¹⁾

Ambas as técnicas fornecem o resultado em mm/h.

4.4. Imunofenotipagem – Citometria de Fluxo

O hemograma e o ESP fornecem dados importantes para o diagnóstico clínico, mas em casos em que há suspeita de hemopatias, especialmente proliferativas, torna-se necessário exames mais completos, como a imunofenotipagem.⁽⁴⁹⁾

O estudo imunofenotípico, por citometria de fluxo, baseia-se na identificação de proteínas presentes no citoplasma e nas membranas celulares, por meio da utilização de anticorpos monoclonais específicos, conjugados com fluorocromos. No SPC os fluorocromos utilizados são: fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina “Texas Red” (ECD), ficoeritrina 5.1 (PC5) e ficoeritrina 7 (PC7).

Um número crescente de anticorpos monoclonais têm sido utilizados, permitindo escolher os mais específicos para definir o tipo de célula proliferante e distinguir as patologias linha mieloide ou linha linfoide.

O diagnóstico de uma doença maligna hematopoética, deve ser realizado utilizando um painel de anticorpos monoclonais, adequadamente selecionados para a determinação da linhagem celular. A imunofenotipagem também nos permite determinar:

- Grau de diferenciação celular (células maduras ou imaturas);
- Heterogeneidade da população tumoral;
- Expressão antigénica anormal nas populações celulares malignas;
- Presença ou ausência de clonalidade.⁽⁴⁹⁾

As amostras analisadas são:

- Sangue periférico colhido para tubo com EDTA tripotássico;
- Medula óssea colhida para tudo com EDTA tripotássico e, se necessário, efetuar diluição com PBS;
- Gânglios linfáticos excisados cirurgicamente, analisados após maceração e diluição das células em suspensão com PBS.

As informações fornecidas por esta técnica são amplamente utilizadas no diagnóstico, pois permitem identificar as populações celulares, de forma rápida, sensível e quantitativa, orientando o clínico nas decisões terapêuticas.⁽⁴⁹⁾

4.5. Estudos Moleculares

Dos estudos moleculares efetuados no SPC, o mais frequentemente requerido é a pesquisa do gene de fusão BCR-ABL, importante em doentes com Leucemia Mieloide Crónica (LMC). A pesquisa é executada através do sistema automatizado Xpert BCR-ABL Monitor, que consiste num ensaio *real time*-RT-PCR (*real time* – Transcriptase Reversa - *polimerase chain reaction*).

A LMC é uma doença mieloproliferativa, em que mais de 95% dos pacientes possuem o cromossoma Philadelphia, que advém de uma translocação recíproca do gene Abelson (ABL) do braço longo do cromossoma 9 para o gene BCR (“*Breakpoint cluster region*”) do braço longo do cromossoma 22, resultando num gene BCR-ABL de fusão. Este gene codifica a proteína p210, uma tirosina cinase com atividade desregulada, que fosforila os resíduos de tirosina, levando à alteração da função das proteínas e perda da capacidade de regulação dos ciclos celulares.⁽⁵⁰⁾

4.6. Hemóstase

A hemóstase compreende uma série de processos fisiológicos cuja finalidade é a reparação de lesões no sistema vascular permitindo a circulação adequada de sangue. Um conjunto de mecanismos atuam de modo integrado contribuindo para a rápida resolução da hemorragia, atuando localmente e de modo autolimitado, de forma a não comprometer o normal fluxo sanguíneo. Apresenta três componentes: células endoteliais (parede do vaso), plaquetas e proteínas plasmáticas (fatores de coagulação, inibidores da coagulação e sistema fibrinolítico).^(51, 52)

As plaquetas estão implicadas numa resposta primária à lesão ocorrida num vaso, de forma a estancar a hemorragia. Estas vão atuar através da sua agregação e adesão ao endotélio, de modo a formar um tampão que vai permitir não só a paragem da hemorragia, mas uma base sustentada para a formação posterior do coágulo. Também são responsáveis pela libertação de fatores ativadores da cascata de coagulação e libertação de substâncias pró-coagulantes, através da sua desgranulação.⁽⁵²⁾

A cascata de coagulação *in vitro*, envolve proteínas ativadas consecutivamente separadas em duas vias que culminam numa via comum (Figura 27).

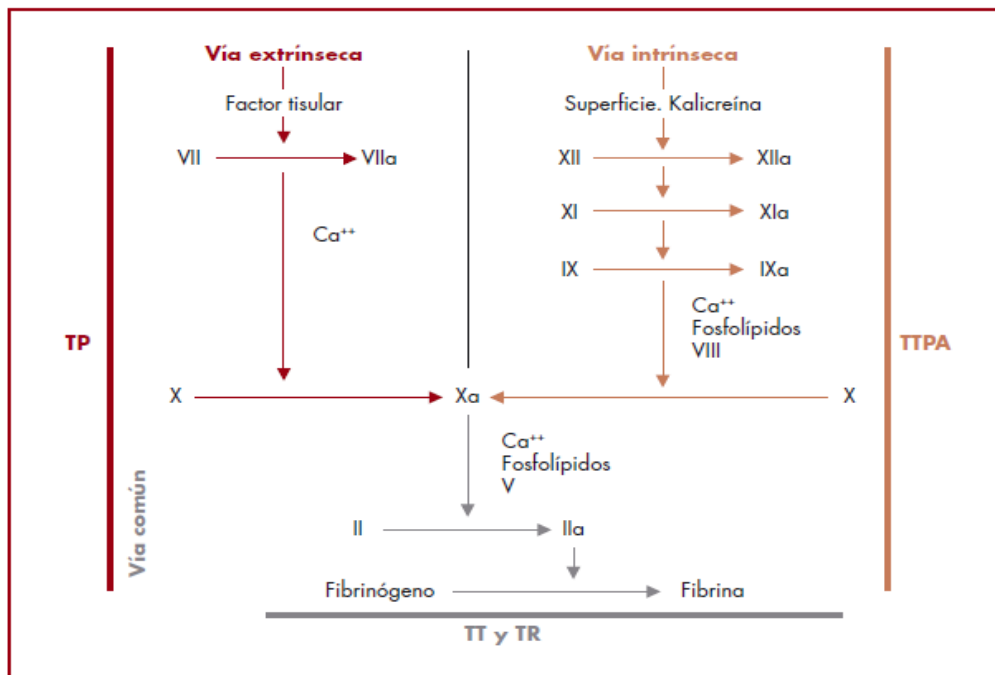


Figura 27: Cascata de coagulação. (Fonte: Dasí M.A., et al., *Trombosis y Hemostasia*. Sociedad Espanola de Trombosis y Hemostasia. (2007), pp 59)

As amostras utilizadas para o estudo da hemóstase, devem ser colhidas para um tubo com citrato de sódio na proporção de 1:9 (anticoagulante: sangue). As amostras devem ser centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos para se obter o plasma pobre em plaquetas.⁽⁴¹⁾

Os resultados dependem da qualidade da colheita e da amostra e do tempo decorrido entre a colheita e a realização do estudo.

O estudo da hemóstase é efetuado no ACL TOP[®] CTS 500 da *Instrumentation Laboratory*. Seguidamente descrevo as provas de coagulação mais requisitadas ao Setor de Hematologia.

4.6.1. Tempo de Protrombina (TP): prova de coagulação usada para controlo da via extrínseca da cascata da coagulação (fator VII) e da via comum (fatores X, V, II e fibrinogénio). Esta prova de coagulação consiste na adição de um reagente com concentração ótima de tromboplastina (equivalente à tromboplastina tecidular) e cálcio, à amostra de plasma citratado.⁽⁵¹⁾

Os resultados são expressos sob a forma de tempo de formação de coágulo, em segundos, em percentagem e em INR, isto é, Razão Internacional Normalizada.

$$INR = \left(\frac{TP \text{ (doente)}}{TP \text{ (controlo)}} \right)^{ISI}$$

O INR, foi introduzido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na tentativa de diminuir a discrepância entre os resultados obtidos pelos diferentes tipos de testes que avaliam o TP e é definido como a razão entre o TP do doente e o TP de um controlo, elevado ao índice de sensibilidade internacional (ISI), valor atribuído a cada lote de reagente após comparação com a tromboplastina padrão da OMS.⁽⁴¹⁾

A determinação do TP é requisitado pelos clínicos na avaliação pré-operatória, no despiste de alterações hereditárias da coagulação e na monitorização de doentes que efetuem terapêutica com antagonistas de vitamina K, como a Varfarina, uma vez que a vitamina K é fundamental para a atividade funcional dos fatores II, VII, IX e X.⁽⁴⁵⁾

4.6.2. Tempo de Trombina (TT): prova de coagulação que determina o tempo necessário para a conversão do fibrinogénio em fibrina, pela adição do reagente contendo trombina.⁽⁴¹⁾ O tempo de coagulação, após a adição de trombina ao plasma, é inversamente proporcional à concentração plasmática de fibrinogénio. Na presença de anticoagulantes, como a heparina, e nas deficiências quantitativas ou qualitativas do fibrinogénio plasmático, o TT é superior.⁽⁵¹⁾

4.6.3. Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativada (TTPa): Prova de coagulação usada para medir o tempo de coagulação do plasma, depois da ativação dos fatores de contacto (sem adição do fator tecidual), indicando globalmente a eficácia da via intrínseca (fatores XII, XI, IX, VIII) e via comum (fatores X, V II e fibrinogénio).⁽⁵²⁾ Para esta prova, utiliza-se um reagente que contém um agente que simula a superfície de contacto (sílica coloidal), fosfolípidos sintéticos e iões de cálcio, que levam à ativação da cascata da coagulação.

O TTPa é o método apropriado para investigar causas hemorrágicas hereditárias, como a hemofilia e para o controlo de doentes heparinizados (inibição da formação de trombina).⁽⁵¹⁾

No caso de o TTPa se encontrar alargado, é efetuado teste de mistura do plasma do doente com plasma normal, na proporção de 1:1. Se o valor de TTPa corrigir, é sugestivo de défice de fatores. Se se mantiver alargado, podemos estar na presença de um inibidor da cascata, nomeadamente o anticoagulante lúpico.

Na tabela XV estão indicadas as alterações mais comuns relativamente à hemóstase.

Tabela XV: Alterações dos parâmetros da hemóstase e condições clínicas mais vulgares.

(Fonte: adaptado (51))

TTPa anormal isoladamente	<ul style="list-style-type: none"> - Deficiência dos fatores VIII, IX, XI, XII e pré-caliceína, - Anticoagulante-lúpico
TP anormal isoladamente	Deficiência do fator VII
TTPa e TP anormais	<ul style="list-style-type: none"> - Anticoagulantes - Coagulação intravascular disseminada, - Deficiência na vitamina K - Afibrinogenemias, - Deficiência de fatores X, V e I

4.6.4. Anticoagulante Lúpico (AL): O anticoagulante Lúpico é um auto-anticorpo dirigido contra proteínas e fosfolípidos da membrana. A sua presença está associada ao aumento do tempo de TTPa não corrigido no teste de mistura com plasma normal, que contém todos os fatores necessários à coagulação. É uma situação descrita em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico.

Para avaliação do AL as amostras requerem um processamento especializado, para garantir a ausência total de contaminação plaquetar. Assim, a amostra deverá ser centrifugada duas vezes a 3000 rpm, durante 10 minutos.

A detecção do AL no ACL TOP[®] CTS 500, consiste na determinação do TTPa com recurso a reagente de veneno de víbora de Russel diluído (dRVV), para ensaio de screening e com recurso a reagente dRVV enriquecido com fosfolípidos, para ensaio de confirmação da presença do AL.⁽⁵³⁾

A existência de AL também se encontra associada a um aumento de risco trombótico, pois impede a ação dos inibidores naturais da cascata de coagulação.

4.6.5. Fibrinogénio: A determinação do fibrinogénio é efetuada pelo método de Clauss. Segundo este método, o tempo de coagulação é inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio, quando se adiciona uma elevada concentração de trombina ao plasma citratado diluído em solução tamponada.

O seu valor permite avaliar situações de doenças hepáticas, situações de inflamação e patologias relacionadas com a coagulação. O seu aumento está relacionado com o maior risco de doenças cardiovasculares.⁽⁴⁵⁾

4.6.6. D-Dímeros (DD): A presença de D-Dímeros reflete o processo de destruição do coágulo de fibrina. Após a fibrinólise, por ação da plasmina, encontram-se em circulação os produtos de degradação da fibrina que, posteriormente, serão eliminados pelo fígado e pelo sistema reticuloendotelial. De entre estes produtos, os D-Dímeros são referenciados como específico da fibrinólise.

A sua detecção é executada de forma automática no ACL TOP[®] CTS 500. Esta determinação baseia-se na aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com um anticorpo monoclonal anti-DD, que não reage com o fibrinogénio. A quantificação é feita por turbidimetria.

A determinação de DD auxilia na avaliação do risco de trombose e na monitorização de terapêuticas trombóticas. As quantidades de DD podem aumentar em situações de trombose venosa profunda, embolia pulmonar e tumores.⁽⁵⁴⁾

Os valores de referência das diferentes determinações efetuadas no Setor de Hematologia do SPC do IPOCFG encontram-se em anexo (Anexo II).

4.7. Controlo de Qualidade

Diariamente, é realizado o controlo de qualidade interno do hemograma, utilizando três níveis de controlo (um para valores baixos, outro para normais e outro para elevados). Semanalmente é também realizado um controlo de contagem de partículas.

Para a hemóstase, o controlo interno também é diário, mas utiliza apenas dois níveis (valores normais e valores patológicos).

O controlo de qualidade externo segue as normas do RIQAS (*Randox International quality assesement scheme*), com o processamento de uma amostra por mês, e do INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge), que consiste em quatro amostras para processamento de hemograma e hemóstase, e duas para reticulócitos por ano. Neste controlo, também é avaliada a observação de esfregaços em lâminas (três esfregaços, três vezes por ano).

Ainda, neste Setor, é realizado o controlo de qualidade externo da citometria de fluxo. Este segue as normas do *United Kingdom - National External Quality Assessment Service* (UK-NEQAS), recebendo 6 amostras por ano.

5. Setor de Química Clínica

O Setor de Química Clínica tem como responsável o Dr. Luís Nina e como colaboradores um técnico superior de saúde e quatro técnicos de diagnóstico e terapêutica.

Também conhecido como Setor de Bioquímica, é neste que se realizam as determinações de parâmetros bioquímicos diversos, nomeadamente iões, enzimas e metabolitos que fornecem ao clínico informações fundamentais para a interpretação do funcionamento e da dinâmica dos diferentes órgãos. Os principais órgãos monitorizados são o fígado, rim, pâncreas e coração.

Para as diferentes determinações analíticas, a amostra mais frequente é o soro. Este é obtido a partir de sangue total, colhido para tubo contendo esferas de poliestireno, que aceleram a formação e retração do coágulo. Segue-se uma centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos e separação do soro. No entanto, certas determinações, como a hemoglobina glicosilada, são realizadas em sangue total colhido para tubo com EDTA tripotássico. Urina, LCR e outros fluidos biológicos, são processados após centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos, de forma a obter uma amostra límpida.

Após preparação da amostra e correta etiquetagem, estas são encaminhadas para os diferentes autoanalisadores conforme os parâmetros requeridos para análise. Os autoanalisadores utilizados em Química Clínica estão referidos na tabela XVI.

Tabela XVI: Autoanalisadores existentes no Setor de Química Clínica do SPC do IPOCFG.

Equipamento	Descrição
<i>ABL 800 FLEX</i> da Radiometer®	Gasómetro
<i>Rapidlab</i> ® 1265 da Siemens™	
<i>Cobas</i> ® 6000 Analyser series <i>HITACHI</i> da Roche Diagnostics™	Autoanalisador fotométrico/ potenciométrico
<i>Cobas</i> ® c311 da Roche Diagnostics™	Autoanalisador fotométrico
<i>Reflotron</i> ® Plus da Roche Diagnostics™	Analizador de química seca
<i>Shimadzu Spectrophotometer UV-1800</i>	Espectrofotómetro

5.1. Controlo de Qualidade

O controlo de qualidade interno é realizado diariamente, no início do dia, em cada instrumento, com recurso a controlos comerciais, que devem apresentar todos os parâmetros dentro dos valores de referência. O controlo utilizado tem dois níveis, um normal e um patológico. O controlo interno pode ser repetido durante o dia, sempre que se justifique.

Este Setor participa em dois programas de controlo de qualidade externo, um nacional, do Instituto Nacional de saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), que consiste num ciclo anual de 6 ensaios e, um internacional, da *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS), que compreende 12 amostras por ciclo anual.

6. Setor de Microbiologia

O Setor de Microbiologia encontra-se sob a responsabilidade da Dr^a Paula Gama e possui como recursos humanos um técnico superior de saúde e três técnicos de diagnóstico e terapêutica.

Neste Setor são efetuados estudos bacteriológicos, micológicos, parasitológicos e micobacteriológicos em diversos tipos de amostras. As mais frequentes são sangue, urina, exsudatos, expetorações e lavados brônquicos. Com menor regularidade são analisadas amostras como LCR e outros fluidos biológicos, fezes, escamas da pele e unhas e dispositivos médicos como catéteres. As diferentes amostras requerem colheita, transporte e processamento em condições de assepsia adequadas.

Este é o Setor que mais depende do técnico, desde o trabalho manual da sementeira dos produtos, às colorações, realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), observação de exames diretos (corados e a fresco) ao microscópio ótico, observação e valorização das culturas.

Na tabela XVII são apresentados os equipamentos do Setor de Microbiologia:

Tabela XVII: Equipamentos existentes no Setor de Microbiologia do SPC do IPOCFG.

Equipamento	Descrição
<i>BD Bactec™ 9050 Blood Culture System</i>	Incubação e deteção de crescimento em hemoculturas
<i>Vitek® 2 Compact 15 da bioMérieux™</i>	Identificação de microrganismos e TSA
<i>Cobas® u411 da Roche Diagnostic™</i>	Sumária de urina tipo II
<i>ATB Expression® da bioMérieux™</i>	Identificação de microrganismos e TSA
Câmara de fluxo laminar Forma Scientific	Manipulação de amostras
<i>GeneXpert® da Cepheid</i>	Pesquisa de toxinas de <i>Clostridium difficile</i> por PCR em tempo real
Estufas	25°C, 37°C e 42°C
Microscópio ótico	Observação de esfregaços de exames diretos a fresco e após coloração; bem como de sedimentos urinários

6.1. Controlo de Qualidade

O controlo de qualidade interno é efetuado periodicamente com estirpes comerciais conhecidas (*American Type Culture Collection, ATCC*), utilizando as técnicas da rotina para a sua identificação e TSA. O Setor efetua também controlo de qualidade externo, fornecido pelo INSA. São executados, por ano, 4 ensaios bacteriológicos, 4 ensaios micológicos e 3 ensaios parasitológicos. Os resultados obtidos são enviados ao INSA e depois comparados com os esperados e obtidos por outros laboratórios participantes.

7. Casos clínicos

Apresento, neste capítulo, dois dos casos clínicos que mais despertaram o meu interesse durante o estágio nesta instituição. O primeiro caso clínico surgiu durante a minha permanência no Setor de Imunologia e Hormonologia, destacando-se pelo estado avançado de doença à data do diagnóstico. O segundo caso ocorreu aquando da minha colaboração no Setor de Hematologia e descrevo-o no presente relatório por se tratar de uma situação complexa onde se revelou de extrema importância a experiência do técnico.

7.1. Caso clínico nº 1

Homem, 70 anos de idade, deu entrada no serviço de urgência com queixas de dores torácicas anteriores após crise esternutatória. Efetuaram radiografia ao tórax com evidência de uma fratura numa costela, patológica. Foi também realizada radiografia ao crânio, onde se detetaram lesões líticas multifocais em “saca bocados”. O doente referia queixas de dores ósseas há seis meses e letargia. Apresentava palidez evidente, febre e tosse. Foi encaminhado para o IPOCFG, com suspeita de mieloma múltiplo.

Nas tabelas XVIII, XIX e XX estão apresentadas as análises requeridas ao SPC do IPOCFG e os respetivos resultados.

- **Hematologia:**

Tabela XVIII: Resultados de Hematologia – caso clínico nº 1

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
LEUCÓCITOS	3.8	4.0 – 11.0	G/L
Neutrófilos	48.7	45 – 70	%
Linfócitos	37.4	20 – 40	%
Monócitos	9.2	3 – 10	%
Eosinófilos	4.2	1 – 5	%
Basófilos	0.5	0 – 2	%
ERITROCITOS	3.5	4.5 – 6.5	T/L
Hemoglobina	9.8	13 – 18	g/dL
Hematócrito	30.4	35 – 47	%
VCM	87	85 – 95	fl
HCM	28	27 – 32	pg
CHCM	32.2	32 – 36	g/dL
RDW	14	11.5 – 14.5	%
PLAQUETAS	143	150 – 450	G/L
VS	77	0 – 20	mm/h

- Esfregaço de sangue periférico: presença de células linfoplasmocíticas (Figura 28 A) e fenômeno de “*Rouleaux*” (Figura 28 B).

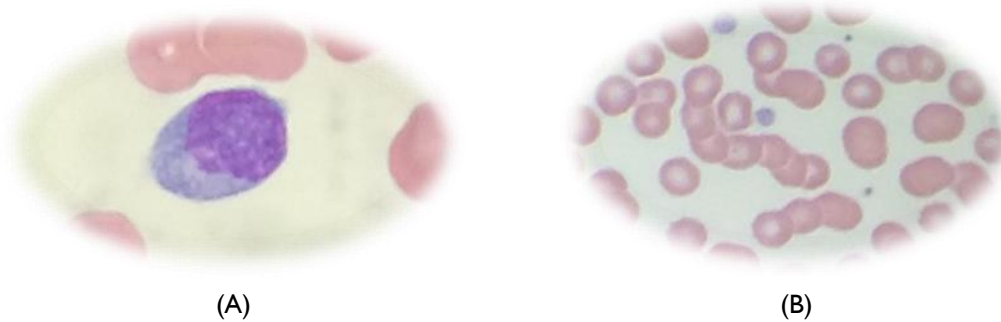


Figura 28: Imagem de um esfregaço de sangue com célula linfoplasmocítica no centro (A); Imagem de um esfregaço de sangue com fenômeno *Rouleaux* (B). Ambas as imagens foram obtidas durante o estágio.

- **Química Clínica:**

Tabela XIX: Resultados Bioquímica – caso clínico nº1

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
Ureia	80	10 – 50	mg/dL
Creatinina	4.2	0.5 – 1.2	mg/dL
Sódio	142	135 – 150	mmol/L
Cálcio total	11.5	8.6 – 10.5	mg/dL
Proteínas totais	10.7	6.0 – 8.0	g/dL
Albumina	2.3	3.5 – 5	g/dL
Fosfatase Alcalina	158	≤ 117	U/L
LDH	527	240 – 480	U/L

- **Imunologia e Hormonologia:**

Tabela XX: Resultados Imunologia e Hormonologia – caso clínico nº1

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
β2-Microglobulina	3.00	< 2.50	mg/L

- Electroforese de proteínas séricas: pico monoclonal IgG. (Figura 29 A)
- Imunofixação sérica: bandas IgG K. (Figura 29 B)

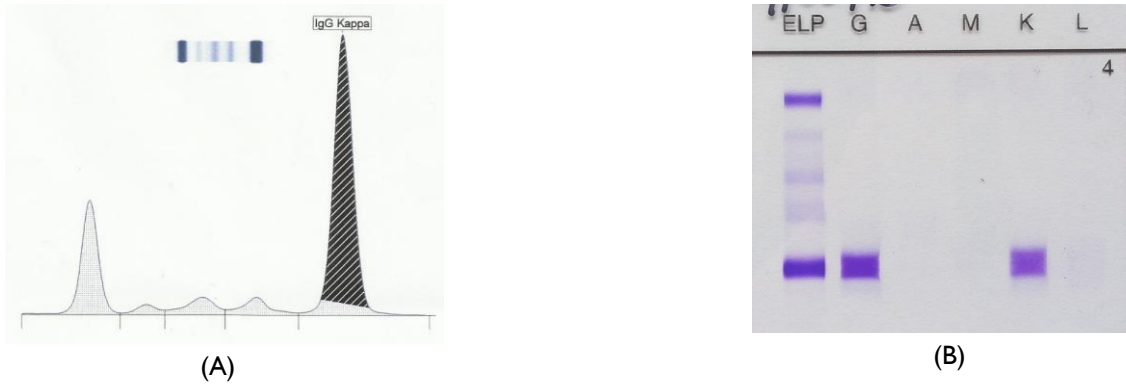


Figura 29: Eletroforese de proteínas (A); Imunofixação sérica (B). Ambas as imagens foram obtidas durante o estágio.

Relação Albumina/Globulinas < 1 (0.30)

- Pesquisa de proteína de Bence Jones: presença de cadeias leves livres K com características de monoclonalidade. (Figura 30)

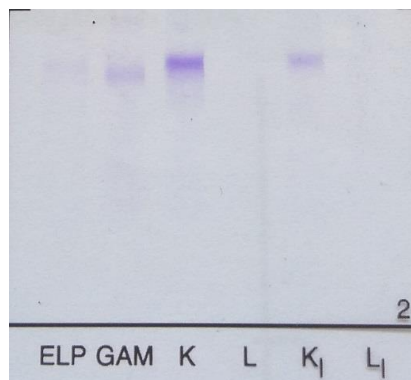


Figura 30: Pesquisa de proteína de Bence Jones. Imagem obtida durante o estágio.

• Microbiologia:

- Amostra: expetoração.
- Gram: frequentes leucócitos, raras células epiteliais e diplococos Gram positivo lanceolados;
- Exame cultura em gelose de sangue: colónias mucosas e α -hemólise;
- Identificação por TSA: *Streptococcus pneumoniae*.

Face aos resultados obtidos, verificamos a existência de uma leucocitopenia (Leucócitos= 3.8 G/L), acompanhada de uma anemia moderada (Hemoglobina= 9.8 g/dL)

normocítica (VCM= 87 fl) e normocrômica (HCM= 28 pg), e trombocitopenia ligeira (Plaquetas= 143 G/L).

O aumento da velocidade de sedimentação (VS= 77 mm/h) e a observação do fenómeno de *Rouleaux* no esfregaço de sangue é uma consequência da hiperproteinémia, pois esta irá facilitar a agregação dos eritrócitos. Também no ESP é possível identificar raras células linfoplasmocitárias, o que está de acordo com a suspeita de mieloma múltiplo.

Na avaliação dos resultados de Química Clínica, é evidente hipercalcemia e hiperfosfatemia, que podem ser explicadas pela existência de lesões ósseas líticas, o que está de acordo com as radiografias efetuadas. O aumento dos valores de creatinina e ureia séricos são indicativos de uma função renal comprometida, possivelmente devido a danos nos túbulos renais e na membrana basal glomerular, que, por sua vez, levam à perda de proteína na urina, resultando numa diminuição da albumina sérica.

A β 2-Microglobulina encontra-se elevada em pacientes com mieloma múltiplo, sendo mesmo utilizada para avaliar o estadiamento dos pacientes. Analisando os valores de β 2-Microglobulina e de albumina, podemos comprovar que o paciente se enquadra no estadiamento II da *International Staging System*.⁽⁵⁵⁾

No proteinograma verifica-se a existência de um pico monoclonal na região das γ globulinas, com redução da albumina e das α e β globulinas. Por isso, há uma diminuição da relação albumina/globulinas (0.30), sendo considerado uma relação normal valores superiores a 1. A imunofixação sérica identificou este pico como correspondendo a bandas IgG e inferindo características de banda IgG K. A pesquisa de proteína de Bence Jones na urina de 24 horas foi positiva.

O *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria oportunista que se encontra presente no trato respiratório da maioria dos adultos, sendo patogénica em doentes imunocomprometidos. A presença de leucócitos e raras células epiteliais no exame direto corado pela técnica de Gram indica-nos que a amostra tem qualidade e não apresenta contaminação por secreções da orofaringe.

Perante estes resultados a principal suspeita de diagnóstico é de mieloma múltiplo. Como tal, foi sugerido ao clínico a realização de medulograma e imunofenotipagem.

- **Medulograma:**

Para o diagnóstico conclusivo de mieloma múltiplo é necessária a quantificação de plasmócitos na medula óssea (Figura 31), sendo obrigatória a execução de medulograma. Neste caso reportado, os plasmócitos representam 33% das células da medula óssea,

evidenciando uma infiltração por plasmócitos que estará na base das alterações nas restantes linhas celulares.

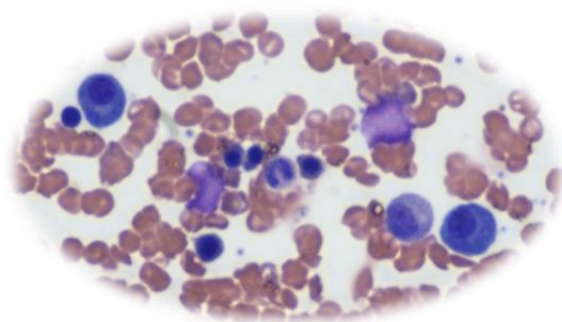


Figura 31: Imagem de medulograma com presença de plasmócitos, obtida durante o estágio.

- **Imunofenotipagem:**

A imunofenotipagem permite estudar a natureza fenotípica dos plasmócitos e avaliar a clonalidade destes através da caracterização das cadeias leves kappa e lambda das imunoglobulinas intracitoplasmáticas.

Para a identificação dos plasmócitos é essencial usar os anticorpos anti-CD38 e anti-CD138.

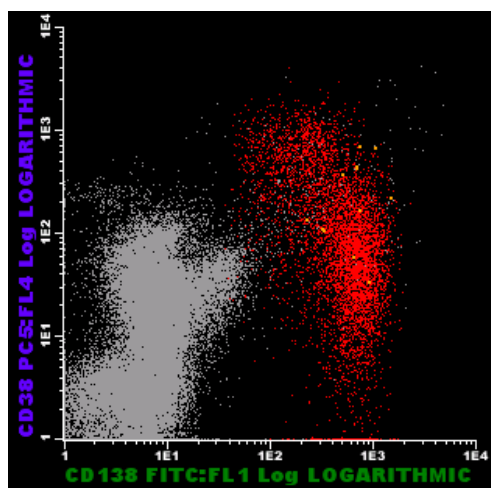


Figura 32: Imunofenotipagem: histograma de CD38/CD138. Imagem obtida durante o estágio.

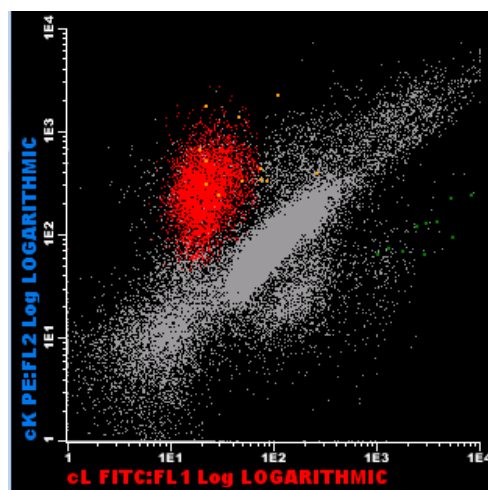


Figura 33: Imunofenotipagem: histograma de cadeias Kappa/Lambda intracitoplasmáticas. Imagem obtida durante o estágio.

Nas figuras 32 e 33 verificamos a presença de células CD38 e CD138 positivas, imunofenotipagem típica de plasmócitos no mieloma múltiplo e cadeias maioritariamente kappa, o que vai de encontro ao obtido na eletroforese de proteínas e na imunofixação.

Assim foi confirmado o diagnóstico de mieloma múltiplo. O paciente mantém o acompanhamento necessário em consulta de hematologia, tendo sido implementada terapêutica.

7.2. Caso clínico nº2

Homem de 79 anos acompanhado no IPOCFG na sequência de uma Leucemia Linfocítica Crônica (LLC). O paciente apresentava-se icterico e com palidez mucocutânea. Admitiu uma fraqueza severa e urina mais escura desde há alguns dias. Análises requisitadas ao SPC e respectivos resultados estão apresentados nas tabelas XXI e XXII.

- **Hematologia:**

Tabela XXI: Resultados Hematologia – caso clínico nº2

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
LEUCÓCITOS	26.3	4.0 – 11.0	G/L
Neutrófilos	12.1	45 – 70	%
Linfócitos	86.2	20 – 40	%
Monócitos	1.3	3 – 10	%
Eosinófilos	0.0	1 – 5	%
Basófilos	0.4	0 – 2	%
ERITRÓCITOS	4.0	4.5 – 6.5	T/L
Hemoglobina	11.6	13 – 18	g/dL
Hematócrito	36	35 – 47	%
VCM	90	85 – 95	fl
HCM	29	27 - 32	pg
CHCM	32.2	32 – 36	g/dL
RDW	16.7	11.5 – 14.5	%
PLAQUETAS	137	150 - 450	G/L

- Esfregaço de sangue periférico: frequentes linfócitos maioritariamente pequenos, com citoplasma escasso e núcleo com cromatina grumosa (Figura 34 A); algumas sombras nucleares (Figura 34 B). Ligeira policromasia.

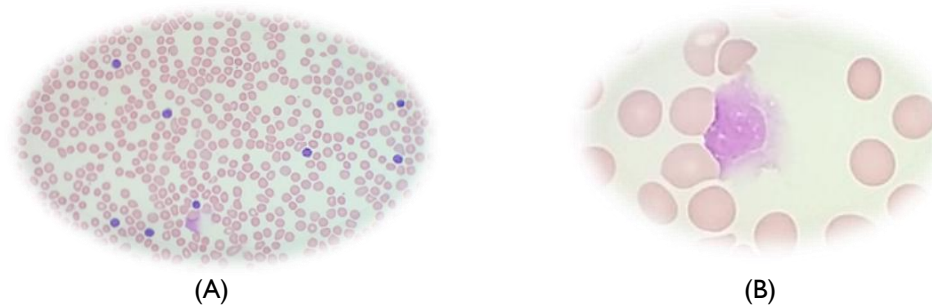


Figura 34: Imagem de um esfregaço de sangue com linfocitose (A); Imagem de um esfregaço de sangue com sombras nucleares (B). Ambas as imagens foram obtida durante o estágio.

- **Química Clínica:**

Tabela XXII: Resultados Bioquímica – caso clínico nº2

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
Ureia	33	10 – 50	mg/dL
Creatinina	1.0	0.5 – 1.2	mg/dL
Bilirrubina Total	3.1	0 – 1.0	mg/dL
Bilirrubina Direta	0.2	0 – 0.25	mg/dL
Fosfatase Alcalina	69	≤117	U/L
Gama GT	23	11 – 49	U/L
Albumina	4.4	3.5 – 5	g/dL
LDH	400	240 – 480	U/L

Ao analisar o hemograma verifica-se a existência de uma leucocitose (Leucócitos= 26.3 G/L) com linfocitose absoluta (Linfócitos= 22.67 g/dL), o que vai de encontro ao diagnóstico já conhecido de LLC.

A diminuição do número de glóbulos vermelhos (Eritrócitos= 4.0 T/L) e da hemoglobina (Hemoglobina= 11.6 g/dL) correspondem a uma anemia ligeira e a avaliação plaquetar a uma ligeira trombocitopenia. Estas alterações sugerem uma ocupação medular por parte dos linfócitos como consequência da LLC.

Na observação do ESP, observa-se a presença de frequentes linfócitos maioritariamente pequenos, com citoplasma escasso e com cromatina nuclear grumosa; algumas sombras nucleares, provavelmente resultantes da lise dos linfócitos maduros e ainda policromasia.

Na avaliação bioquímica, verifica-se a existência de uma bilirrubina total elevada (3.1 mg/dL), à custa da bilirrubina indireta, não havendo alterações dos restantes parâmetros da função hepática. A presença de urina acastanhada pode ser consequência do aumento da bilirrubina não conjugada.

A observação de policromasia no esfregaço de sangue periférico e a hiperbilirrubinémia são sugestivas de anemia hemolítica. Como tal, efetuou-se a contagem

reticulocitária, obtendo-se o valor de 18,43%. Isto indica-nos que estamos perante uma medula responsiva, como forma de compensar a anemia.

O desenvolvimento de auto-anticorpos dirigidos contra células hematopoiéticas, ocorre em aproximadamente 10% a 25% de pacientes com LLC.⁽⁵⁶⁾ Assim sendo, solicitou-se os resultados do teste de Coombs direto ao serviço de Imunoterapia, onde se verificou a existência de auto-anticorpos reativos para uma proteína membranar eritrocitária, confirmando assim o diagnóstico de anemia hemolítica autoimune num doente com LLC já diagnosticada. O doente mantém seguimento na consulta de hematologia e fará tratamento de suporte e quimioterapia quando necessário.

8. Conclusão

Apesar de ser licenciada numa área vocacionada para a investigação, sentia necessidade da minha formação ter uma componente mais clínica, como as Análises Clínicas. O plano curricular do Mestrado em Análises Clínicas despertou o meu interesse, uma vez que abrange áreas essenciais, por forma a fornecer as bases suficientes para a realização do estágio nas quatro valências, formando assim bons profissionais.

Durante o estágio no SPC do IPOCFG foi possível consolidar e adquirir novos conhecimentos. Neste serviço a formação é muito valorizada, e todos os profissionais estão dispostos a transmitir os seus conhecimentos, para que o estágio seja o mais enriquecedor possível e a tornar cada aluno autónomo e capaz de resolver imprevistos possíveis de ocorrer no quotidiano de um laboratório. Esta foi, sem dúvida, uma experiência muito enriquecedora, pois demonstrou-me a grande responsabilidade necessária para estar num laboratório de Análises Clínicas, assim como a relevância de uma constante atualização e consolidação de conhecimentos, de forma a interligar as diversas áreas clínicas. Tive oportunidade de acompanhar o controlo de qualidade, interno e externo, dos diferentes Setores e compreender as ações a tomar em caso de alguma anomalia dos resultados esperados, por forma a fornecer um resultado fiável.

Este relatório corresponde a uma ínfima parte do que aprendi durante este estágio, pois para além do conhecimento teórico e prático, também evoluí a nível pessoal. Aqui aprendi a trabalhar em equipa, a ter iniciativa, a participar ativa e criticamente na tomada de decisões.

9. Bibliografia

1. Direcção-Geral de Saúde. 2016. *Doenças oncológicas em números - 2015*. Disponível em: http://www.apah.pt/media/publicacoes_tecnicas_Setor_saude_2/Doencas_Oncologicas.pdf [acedido a 18 de abril de 2016]
2. Meany, D.L., L.J. Sokoll, and D.W. Chan, *Early Detection of Cancer: Immunoassay for Plasma Tumor Markers*. *Expert Opin Med Diagn.* (2009), pp 597-605.
3. Chan D., Booth R., Diamandis E., *Tumor Markers*. In Burtis, Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 337-362.
4. Kricka L., et al., *Principles of Immunochemical Techniques*. In Burtis, Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 155-170.
5. Bagazgoitia, F.J., et al., *Chemiluminescent immunoassay (CLIA) for urinary albumin*. *J Biolumin Chemilumin.* (1989), pp 169-74.
6. Prieto, B., et al., *New quantitative electrochemiluminescence method (ECLIA) for interleukin-6 (IL-6) measurement*. *Clin Chem Lab Med.* (2010), pp 835-8.
7. Prieto, B., et al., *Plasma procalcitonin measured by Time-Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE) in liver transplant patients. A prognosis marker of early infectious and non-infectious postoperative complications*. *Clin Chem Lab Med* (2008), pp 660-6.
8. Llorente E., et al., *Umbilical cord blood serum procalcitonin by Time-Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE) technology: reference values of a potential marker of vertically transmitted neonatal sepsis*. *Clin Chem Lab Med.* (2007), pp 1531-5.
9. Konishi H., et al., *Underestimation of rat serum vancomycin concentrations measured by an enzyme-multiplied immunoassay technique and the strategy for its avoidance*. *Drug Test Anal.* (2014), pp 350-6.
10. Hospital Universiti Sains Malaysia. 2014. *Standard Technical Manual for Allergen Specific IgE*. Disponível em: http://www.medic.usm.my/immunology/index.php?option=com_phocadownload&view=category&download=13:standard-technical-manual-6-ige&id=2:standard-technical-manual [acedido a 2 de julho de 2016]
11. Gacci M., et al., *Pre and postoperative quantitative detection of fragments of cytokeratins 8 and 18 (UBC IRMA) as markers of early recurrence of superficial bladder tumor*. *Arch Ital Urol Androl.* (2006), pp 5-10.
12. Kricka L., et al., *Optical Techniques*. In Burtis, Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 63-83.
13. Molina R., Fillella X., Augé J.M., Escudero J.M., *Utilidade Clínica de los Marcadores tumorales – Estado Actual y Perspectiva de Futuro III*. Roche Diagnostics S.L. (2011), pp 3-43.

14. Almeida J.R.C., et al., *Marcadores Tumorais: revisão de literatura*. Revista Brasileira de Cancerologia. (2007), pp 305-313.
15. Duan X[”] et al., *High preoperative and postoperative levels of carcinoembryonic antigen and CYFRA 21-1 indicate poor prognosis in patients with pathological Stage I nonsmall cell lung cancer*. Indian J Cancer. (2015) Dec 52 Suppl 3:E158-63.
16. Angioli R., et al., *A critical review on HE4 performance in endometrial cancer: where are we now?* Tumour Biol. (2014), pp 881-7.
17. Leandersson P., et al., *A Biomarker Panel Increases the Diagnostic Performance for Epithelial Ovarian Cancer Type I and II in Young Women*. Anticancer Research. (2016), pp 957-966.
18. Bie Y. and Z. Zhang, *Diagnostic value of serum HE4 in endometrial cancer: a meta-analysis*. World J surg Oncol. (2014), pp 169.
19. Szczerba A, et al., *hCG - related molecules and their measurement*. Ginekol Pol. (2016), pp 65-70.
20. Ren F., et al., *Second trimester maternal serum triple screening marker levels in normal twin and singleton pregnancies*. Biomed Rep. (2016), pp 475-478.
21. Pezaro C., H.H. Woo, and I.D. Davis, *Prostate cancer: measuring PSA*. Intern Med J. (2014), pp 433-40.
22. Zhou A.M., et al., *Multiple forms of prostate-specific antigen in serum: differences in immunorecognition by monoclonal and polyclonal assays*. Clin Chem. (1993), pp 2483-91.
23. Rosa G.D., et al., *Marcadores tumorais em urologia*. Acta Médica. (2005), pp 155-65.
24. Wolff J.M., et al., *Age related changes of free and total prostate specific antigen in serum*. Anticancer Res. (1999), pp 2629-32.
25. Moyer V.A., et al., *Screening for Prostate Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement*. Ann Intern Med. (2012), pp 120-134.
26. Tarhan F., et al., *Effect of ejaculation on Serum Prostate-Specific Antigen concentration*. Int Braz J Urol (2016) pp 472-8.
27. Yan H., et al., *NSE can predict the sensitivity to definitive chemoradiotherapy of small cell carcinoma of esophagus*. Med Oncol. (2014), pp 796.
28. Özaslan E., et al., *An Overview of Neuroendocrine Tumour Markers*. Turk Jem. (2014), pp 132-136.
29. Holdenrieder S., et al., *Progastrin-releasing peptide – a useful and reliable biomarker in small cell lung cancer*. Medicine Section (2014), pp 1-9.
30. Nisman B., et al., *The Diagnostic and Prognostic Value of ProGRP in Lung Cancer*. Anticancer Research. (2009), pp 4827-4832.
31. Liu P., et al., *Elevated serum CA72-4 levels predict poor prognosis in pancreatic adenocarcinoma after intensity-modulated radiation therapy*. Oncotarget, (2015) Vol. 6, No. 11.
32. Gut P., et al., *Chromogranin A- unspecific neuroendocrine marker. Clinical utility and potential diagnostic pitfalls*. Arch Med Sci. (2016), pp 1-9.

33. Gruson D., et al., *Chromogranin-A levels measured with automated immunoassay. Int J Biol Markers.* (2014), 30(1).
34. Rehfeld J.F., et al., *An evaluation of chromogranin A versus gastrin and progastrin in gastrinoma diagnosis and control. Biomark Med.* (2014), pp 571-80.
35. Yoo C., et al., *Prognostic impact of beta-2 microglobulin in patients with extranodal natural killer/T cell lymphoma. Ann Hematol.* (2014), pp 995-1000.
36. Chen C., Puvvada S., *Prognostic Factors for Chronic Lymphocytic Leukemia. Curr Hematol Malig Rep.* (2016), pp 37-42.
37. Rozzatti M.S., et al., *Clinical usefulness of Beta2microglobulin in patients with Primary Sjögren Syndrome. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* (2015), pp 7-15.
38. Hillyard C., et al., *Immunoreactive calcitonin in leukaemia. Br Med J.* (1979), pp 1392-93.
39. Shen Y., et al., *Rapid, easy analysis of urinary vanillylmandelic acid for diagnostic testing of pheochromocytoma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* (2015), pp 92-7.
40. Babinska A., et al., *Primary malignant lymphoma combined with clinically "silent" pheochromocytoma in the same adrenal gland. World J Surg Oncol.* (2015), pp 13:289.
41. Zambrano M., Cortijo C., *Manual de Procedimentos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología. Ministerio de Salud – Instituto Nacional de Salud.* (2005), pp 24-72.
42. Jury C., Nagai Y., Tatsumi N., *Collection and handling of blood. In Houston M, editor. Dacie and Lewis Practical Hematology. 11th Ed.* (2011), pp 1-9.
43. Fernandez T., Domack L., Montes D., *Performance Evaluation of the Coulter LH 750 Hematology Analyzer. Laboratory Hematology.* (2001), pp 217-228.
44. Bain B., *Blood cell morphology in health and disease. In Houston M, editor. Dacie and Lewis Practical Hematology. 11th Ed.* (2011), pp 69-98.
45. Hoffbrand A.V., Moss P.A.H., *Essential Haematology. 6th Ed. Wiley-Blackwell.* (2011).
46. Thelm H., Diem H., Hafelach T., *Color Atlas of Hematology practical Microscopic and Clinical Diagnosis. 2th Ed.* (2004), pp 2-172.
47. Souza M.E., Faria R.M., *O estudo do sangue periférico através de hemograma. Coopmed editor.* (2009), pp 241-257.
48. Bain b., et al., *Erythrocyte and leucocyte cytochemistry. In Houston M, editor. Dacie and Lewis Practical Hematology. 11th Ed.* (2011), pp 333-352.
49. Buccheri V., *Citometria de Fluxo em Hematologia. Guanabara Koogan, editor. Manual de Hematologia – Propedênci a e Clínica. 4th Ed.* (2006), pp 595-613.
50. Ren R., *Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* (2015), pp 221-4.
51. Ministério da Saúde, *Manual de diagnóstico laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias. Brasilia.* (2012).
52. Laffan M., Manning R., *Investigation of haemostasis. In Houston M, editor. Dacie and Lewis Practical Hematology. 11th Ed.* (2011), pp 392-445.

53. Pengo V., et al. *Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.* Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. (2009), pp 1737-40.
54. Kwangsoo K., Lee J., *Risk Factors and Biomarkers of Ischemic Stroke in Cancer Patients.* Journal of Stroke. (2014), pp 91-96.
55. Palumbo A, et al., *Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group.* J Clin Oncol. (2015), pp:2863-9.
56. Efremov D.G., et al., *Restricted immunoglobulin VH region repertoire in chronic lymphocytic leukemia patients with autoimmune hemolytic anemia.* Blood. (1996), pp:3869-76.

Anexo I. Imunologia e Hormonologia

- Valores de referência:

Marcador Tumoral	Valor de referência	Unidades
CEA	Não fumador: < 3.4	ng/mL
	Fumador: ≤ 5.2	
CA 15.3	< 35.0	U/mL
CA 125	< 35.0	UI/mL
SCC	< 1.5	ng/mL
CA 19.9	< 37.0	U/mL
CA 72.4	< 6.9	U/mL
AFP	< 5.0	UI/mL
Cyfra 21.1	< 3.3	ng/mL
NSE	< 12.5	µg/L
BMG	< 2.50	mg/L
HCG total	< 5.0	mUI/mL
PSA total	< 4.0	µg/mL
PSA livre	Risco elevado de CAP: < 10%	%
	Risco reduzido de CAP: ≥ 25%	
HE-4	40 anos: < 70	pmol/L
	40 – 50 anos: < 100	
	50 – 65 anos: < 125	
	>65 anos: < 150	
TG	Com tiróide: < 55.0	µg/mL
CgA	19.4 – 98.1	nmol/L
CgB	< 2.1	nmol/L
SI00	< 0.15	µg/L
Calcitonina	Mulher: < 1.5	pg/mL
	Homem: < 18.2	
ProGRP	< 84.0	pg/mL
Ácido Vanilmandélico	< 13.6	mg/ 24h
Metanefrinas plasmáticas	< 65.0	pg/mL
Normetanefrinas plasmáticas	< 196.0	pg/mL
Metanefrinas Urinárias	< 350.0	µg/ 24h
Ácido 5-Hidroxiindolacético	2.0 – 6.0	mg/ 24h

Anexo II. Hematologia

- Valores de referência:

Parâmetro	Valores de referência	Unidades
HEMOGRAMA		
Leucócitos	4.0 – 11.0	G/L
Neutrófilos	45 – 70	%
Linfócitos	20 – 40	%
Monócitos	3 – 10	%
Eosinófilos	1 – 5%	%
Basófilos	0 – 2%	%
Eritrócitos	Mulher: 4.0 – 5.5	T/L
	Homem: 4.5 – 6.5	
Hemoglobina	Mulher: 12 – 16	g/dL
	Homem: 13 – 18	
Hematócrito	35 – 47	%
VCM	85 – 95	fL
HCM	27 – 32	pg
CHCM	32 – 36	g/dL
RDW	11.5 – 14.5	%
Plaquetas	150 – 450	G/L
Reticulócitos	0.5 – 1.5	%
HEMOSTASE		
Tempo de protrombina	11.3±3	Segundos
INR	< 1.2	
TTPa	28.0±6	Segundos
TT	13±3	Segundos
Fibrinogênio	200 – 400	mg/dL
D-Dímeros	< 278	ng/mL
VS	0 – 20	mm/h

- Coloração de Perls:

1. Colocar sob os esfregaços de medula óssea fixados com solução de metanol puro;
2. Adicionar solução de ferrocianeto de potássio e ácido clorídrico, durante 10 minutos;
3. Lavar com água desionizada;
4. Efetuar contracoloração com solução de pararrosanilina, durante 5 minutos;
5. Passar por água desionizada e deixar secar ao ar.