



Ivo de Souza Ricardo

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Mestre Mário João Gonçalves Roque e pela Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ivo de Souza Ricardo

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pelo Mestre Mário João Gonçalves Roque e pela Professora
Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva e apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Isabel Cristina de Souza e João Ricardo da Silva Neto, por todo o apoio e incentivo que me deram durante a realização deste mestrado.

Os meus agradecimentos ao Dr. Mário Roque e a todos os funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, por todo o conhecimento, companheirismo e risadas durante o estágio curricular.

Agradeço a minha orientadora Professora Doutora Teresa Dinis e também aos professores que tive ao longo do curso, por todo o conhecimento que me foi transmitido.

Por fim, muito obrigado aos amigos que fiz em Coimbra, graças a vocês esta jornada foi bem mais fácil.

Índice

Índice de Figuras.....	VII
Índice de Tabelas.....	VIII
Abreviaturas.....	IX
Resumo/Abstract.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	I
2. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	2
3. HEMATOLOGIA.....	3
3.1 Hemograma.....	3
3.1.1 Eritrograma.....	4
3.1.2 Leucograma.....	7
3.1.3 Plaquetograma.....	8
3.1.4 CELL-DYN® Ruby.....	8
3.1.5 Valores de referência.....	9
3.2 Reticulócitos.....	10
3.3 Análise morfológica.....	11
3.4 Grupos sanguíneos.....	14
3.5 Velocidade de sedimentação.....	14
3.6 Hemostase.....	15
3.6.1 Avaliação da hemostasia.....	18
3.7 Eletroforese de hemoglobinas.....	19
3.8 A minha experiência no setor de hematologia.....	21
4. BIOQUÍMICA.....	23
4.1 Avaliação da função hepática.....	24
4.2 Avaliação da função renal.....	27
4.3 Diabetes <i>mellitus</i>	29
4.4 Ionograma.....	31
4.5 Perfil lipídico.....	32
4.6 Proteínas séricas e eletroforese.....	33
4.7 Marcadores da lesão cardíaca.....	35
4.8 Valores de referência.....	37
4.9 A minha experiência no setor de bioquímica.....	38

5	IMUNOLOGIA.....	39
6	MICROBIOLOGIA.....	40
7	CONCLUSÃO.....	41
8	BIBLIOGRAFIA.....	42

Índice de Figuras

Figura 1: Representação ilustrativa de uma molécula de Hb A ₁	5
Figura 2: CELL-DYN® Ruby.....	9
Figura 3: Reticulócitos em microscopia ótica.....	10
Figura 4: Alterações hematológicas que passam despercebidas pelos analisadores hematológicos automáticos.....	11
Figura 5: Exemplos de alterações na forma dos eritrócitos.....	12
Figura 6: Representação das células do sangue.....	13
Figura 7: Esquema da hemostasia.....	16
Figura 8: Cascata da coagulação, vias intrínseca e extrínseca.....	17
Figura 9: Exemplo de separação eletroforética de hemoglobinas e perfis eletroforéticos.....	20
Figura 10: Cromatogramas de um paciente sem alterações (esquerda) e de um paciente portador de traço falciforme (direita).....	21
Figura 11: Eletroforese de proteínas séricas.....	34
Figura 12: Padrões de libertação temporal de troponinas, CKMB, AST e LDH.....	36

Índice de Tabelas

Tabela 1: Critérios para a realização de esfregaço do sangue periférico.....	4
Tabela 2: Hemoglobinas normais no sangue de um adulto.....	5
Tabela 3: Valores de referência do hemograma de um homem adulto no LACCS.....	9
Tabela 4: Valores de referência para marcadores bioquímicos no LACCSMC.....	37

Abreviaturas

ALP - Fosfatase Alcalina

ALT - Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Aminotransferase

AVC - Acidente Vascular Cerebral

CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

c-HDL - colesterol-Lipoproteína de Alta Densidade, do inglês *High-Density Lipoprotein Cholesterol*

CK - Creatinacinase

CKMB - Creatinacinase-MB

c-LDL - colesterol-Lipoproteína de Baixa Densidade, do inglês do inglês *Low Density Lipoprotein Cholesterol*

c-VLDL - colesterol-Lipoproteína de Muito Baixa Densidade, do inglês *Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol*

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético, do inglês *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EPS - Eletroforese de Proteínas Séricas

FT - Fator Tecidual

GGT - Gama Glutamil Transferase

Hb - Hemoglobina

Hb A_{1c} - Hemoglobina Glicada

Hb F - Hemoglobina Fetal

HCM - Hemoglobina Corpuscular Média

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High-performance liquid chromatography*

IF - Inversão de Fórmula

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IM - Infarto do Miocárdio

ISI - Índice de Sensibilidade Internacional

LACCSMC - Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra

MPV - Volume Plaquetário Médio, do inglês *Mean platelet volume*

PCR - Proteína C-Reativa

PLT - Plaquetas

RBC - Eritrócito, do inglês *Red Blood Cell*

RDW - Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos, do inglês *Red Cell Distribution Width*

RNA - Ácido Ribonucleico, do inglês *Ribonucleic acid*

RPM - Rotações por Minuto

TFGe - Taxa de Filtração Glomerular estimada

TG - Triglicerídeos

TOTG - Teste Oral de Tolerância a Glicose

TP - Tempo de Protrombina

TTPa - Tempo de Tromboplastina Parcial ativada

VCM - Volume Corpuscular Médio

VS - Velocidade de Sedimentação

WBC - Leucócito, do inglês *White Blood Cell*

Resumo

Este relatório refere-se às atividades realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra relativas ao estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Nele estão descritas de forma detalhada as atividades desenvolvidas nos setores de hematologia e bioquímica, bem como a sua fundamentação teórica. Há também um breve resumo da rotina de trabalho nos setores de imunologia e microbiologia.

Palavras-chaves: Hematologia; Bioquímica; Análises Clínicas; Estágio; Laboratório.

Abstract

This report refers to the activities carried out in the Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra due to the curricular internship of the Masters in Clinical Analysis of the Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. In it are described in detail the activities developed in the hematology and biochemistry sectors, as well as their theoretical basis. There is also a brief summary of the work routine in the sectors of immunology and microbiology.

Key-words: Hemathology; Biochemistry; Clinical Analysis; Intership; Laboratory.

I. INTRODUÇÃO

Este relatório é referente ao estágio curricular que ocorreu no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, no período de dezembro de 2017 até final de maio de 2018, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sob a supervisão do Tenente-Coronel Farmacêutico Mestre Mário João Gonçalves Roque. Este laboratório atende na sua maioria, militares e familiares, além de realizar as análises obrigatórias que todos os militares devem fazer durante as provas de aptidão física.

Neste laboratório realizam-se análises no âmbito da hematologia, bioquímica, imunologia, microbiologia e endocrinologia. Faz também a pesquisa de drogas de abuso.

O estágio prevê a passagem por todos os setores que constituem o LACCSMC e a permanência de um mês em cada um deles. Como o estágio tem a duração de seis meses pude escolher um setor para permanecer até ao final.

Durante o tempo que permaneci no laboratório e tive contacto com as várias valências que ele oferece, escolhi a hematologia e a bioquímica como as áreas que pretendo aprofundar neste relatório.

2. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra tem como especialista responsável o Dr. Mário João Roque. Este serviço é composto por uma sala de espera, uma receção, uma secretaria, uma sala de colheitas e pelos setores de Hematologia, Bioquímica/Imunologia e Microbiologia. Na receção ocorre o primeiro contacto com o paciente. Aqui, as requisições dos utentes são registadas no sistema informático e é atribuído um número diferente a cada utente. Dependendo da requisição feita pelo médico, são impressos os códigos de barras que contêm informações sobre o nome e número do utente, análises requisitadas e indicação do tubo para o qual deve ser feita a colheita.

Geralmente chegam ao laboratório cerca de 30 amostras por dia, exceto naqueles em que há atividades do Departamento de Saúde Operacional, que podem ultrapassar, em média, 60 amostras. Na sala de colheitas são feitas as colheitas sanguíneas (o tubo escolhido depende dos parâmetros a analisar). Também lá são recebidas todas as amostras biológicas provenientes de colheitas do exterior, tais como, urina, raspados de unhas, pele, exsudados purulentos e zangaratos contendo material biológico. Porém, se as condições de colheita, armazenamento e/ou transporte forem inadequadas, a amostra é rejeitada.

Após a colheita do sangue pelo técnico designado, as amostras são distribuídas pelos setores onde serão analisadas.

3. HEMATOLOGIA

Neste setor ocorre a análise qualitativa e quantitativa do sangue periférico e seus constituintes (eritrócitos, leucócitos, plaquetas e reticulócitos). Além disso, também é avaliada nesta seção do laboratório a função hemostática, a velocidade de sedimentação eritrocitária (VS), a hemoglobina glicada, a determinação dos grupos sanguíneos (sistema AB0 e Rhesus) e a eletroforese de hemoglobinas e proteínas.

Durante o estágio pude acompanhar e realizar toda a rotina de trabalho desse setor, que consiste em recolher os tubos na sala de colheitas, processar as amostras nos respectivos analisadores, preparar e corar esfregaços sanguíneos, observar e identificar os elementos do sangue ao microscópio, fazer as provas de coagulação (TP, TTPa e fibrinogénio), determinar os grupos sanguíneos, preparar as amostras para a eletroforese de hemoglobinas e/ou proteínas, executar os ensaios referentes aos controlos internos e externos de qualidade, e realizar os procedimentos de manutenção dos autoanalisadores do setor.

Os procedimentos técnicos e a interpretação dos resultados são feitas pelo técnico responsável por esse setor, no entanto, a validação dos resultados é feita pelo diretor do laboratório.

3.1. Hemograma

O hemograma expressa algumas características do sangue periférico num certo momento da vida de um indivíduo. Nele aparecem registados os valores quantitativos das diferentes células do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas). Fazem parte também algumas anotações relativas aos índices hematimétricos, que também podem orientar no diagnóstico de várias patologias (Lorenzi, 2006).

O sangue é colhido para tubos que contêm EDTA como anticoagulante, porém, em alguns casos a colheita é feita para tubos com citrato de sódio como anticoagulante para evitar uma pseudotrombocitopenia, já que em alguns casos o EDTA pode favorecer a formação de agregados plaquetários, provocando uma contagem inadequada das plaquetas na amostra.

A determinação dos vários parâmetros que compõem o hemograma pode ser feita de duas formas: manual e automatizada. Ainda que a contagem automatizada seja mais rápida e mais precisa, os métodos manuais não podem ser de todo abandonados, por serem

necessários em situações específicas (Erichsen *et al.*, 2009). Um dos procedimentos manuais vulgares é a realização de esfregaços do sangue periférico sempre que se verifica um dos critérios apresentados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Critérios para a realização de esfregaços do sangue periférico.

♀ Hb \leq 11.0 g/dL ou \geq 15.0 g/dL
♂ Hb \leq 12.0 g/dL ou \geq 17.0 g/dL
RDW \geq 15.0%
Plaquetas $<$ $150 \times 10^3/\mu\text{L}$ ou $>$ $500 \times 10^3/\mu\text{L}$ sem histórico
WBC \geq $12.0 \times 10^9/\text{L}$
Monócitos \geq 15.0%
Basófilos \geq 3%
Qualquer IF com WBC \geq $8.0 \times 10^9/\text{L}$ ou linfócitos \geq 50.0%
IF com diferença de 10% Linfócitos $>$ Neutrófilos

3.1.1. Eritrograma

O eritrograma é a parte do hemograma que avalia a série vermelha e engloba a contagem de eritrócitos, a quantificação da hemoglobina, a determinação do hematócrito e os índices hematimétricos (Erichsen *et al.*, 2009).

O eritrócito é uma célula que possui a forma de um disco bicôncavo de 8 μm de diâmetro, coloração rósea e sem núcleo. Esta célula vive cerca de 120 dias na circulação sanguínea. Durante a sua vida estima-se que o eritrócito viaja cerca de 480 km por uma vasta rede de vasos sanguíneos, desde os grandes vasos até aos pequenos capilares, cujo diâmetro mínimo é de 3,5 μm . Eles percorrem vasos sanguíneos em que a circulação é lenta, nos quais ocorre uma verdadeira estagnação do sangue, e passam por locais em que o fluxo é muito rápido e turbulento.

O eritrócito possui uma capacidade de deformação muito grande, graças à estrutura anatômica muito especial da membrana, composta por lípidos na porção externa e proteínas, que formam o citoesqueleto adjacente (Hoffbrand, 2013; Lorenzi, 2006).

Após passar por vários tipos de agressões o glóbulo vermelho vai perdendo gradativamente a sua capacidade de deformar-se e a membrana fica cada vez mais rígida. Por

causa disso, o eritrócito acaba por ficar retido no baço onde é fagocitado pelos macrófagos da polpa vermelha.

Os eritrócitos têm como principal função transportar o O_2 para os tecidos e levar o CO_2 dos tecidos para os pulmões. Para conseguir executar essa função os eritrócitos possuem uma proteína especializada, a hemoglobina. Ela é composta por duas partes, uma porção não proteica que possui ferro, denominada heme, e uma porção proteica, denominada de globina. O heme pertence a uma classe de moléculas orgânicas denominada de porfirinas. Elas são formadas por quatro anéis pirrólicos ligados entre si e possuem grande afinidade para iões metálicos. Cada molécula de heme combina-se com uma cadeia de globina. Forma-se um tetrâmero de cadeias de globina, cada cadeia com seu próprio núcleo heme agrupado num “bolso” que protege a oxidação do Fe^{2+} (ferroso) a Fe^{3+} (férico).

No adulto a hemoglobina principal é a hemoglobina A_1 (Hb A_1) que é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas α (alfa) e duas β (beta). A figura 1 contém uma representação ilustrativa da Hb A_1 . Além disso o sangue do adulto normal ainda possui outras duas hemoglobinas, a Hb A_2 e a Hb F, as quais possuem cadeias α , porém com cadeias δ e γ , respetivamente, em vez de cadeias β (Tabela 2) (Hoffbrand, 2013; Lorenzi, 2006).

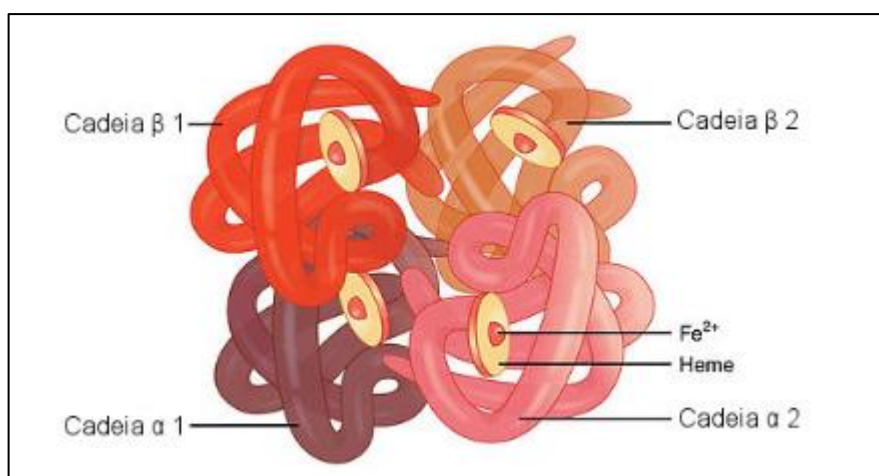


Figura 1: Representação ilustrativa de uma molécula de Hb A_1 . Disponível na internet <https://cnx.org/>

Tabela 2: Hemoglobinas normais no sangue de um adulto

	Hb A_1	Hb A_2	Hb F
Estrutura	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\delta_2$	$\alpha_2\gamma_2$
Normal (%)	96-98	1,5-3,2	0,5-0,8

Após a fagocitose dos eritrócitos no final do seu tempo de vida. As moléculas de hemoglobinas são metabolizadas e ocorre uma “reciclagem” dos seus componentes. Elas são separadas em heme e globina. O grupo heme é oxidado pelo retículo endotelial das células do baço, fígado e medula, através da enzima heme oxigenase. Por ação dessa enzima, o heme fica em cadeia aberta (acíclico), sendo chamado de biliverdina. Por ação da biliverdina redutase essa molécula é reduzida a bilirrubina, composto hidrofóbico que é o produto final da degradação do heme.

A globina é degradada nos seus aminoácidos constituintes, que são reutilizados para suprir necessidades metabólicas gerais (Devlin, 2007).

A quantificação da hemoglobina é muito importante para o diagnóstico da anemia, que é definida como uma situação patológica que se caracteriza por uma diminuição da concentração de hemoglobina abaixo dos valores de referência para a idade e sexo.

Outro componente do eritrograma é o hematócrito, que corresponde à razão entre o volume ocupado pelos eritrócitos e o volume total de sangue. Esse valor pode ser obtido através de técnicas manuais, mas na atualidade os analisadores automáticos de hematologia fornecem esse dado.

Além de quantificar as hemácias e determinar a quantidade de hemoglobina que estão presentes nelas, o eritrograma dá-nos ainda os índices hematimétricos como forma de avaliar a qualidade do eitrócitos. São eles:

- **Volume Corpuscular Médio (VCM):** É calculado dividindo o valor do hematócrito pelo número de eritrócitos presentes num volume unitário de sangue. Atualmente os aparelhos avaliam diretamente o VCM e utilizam este valor para obter o hematócrito. O VCM expressa-se em fL. Este parâmetro é importante para classificar as anemias em microcíticas (VCM abaixo dos valores de referência), normocíticas (VCM dentro dos valores de referência) ou macrocíticas (VCM acima dos valores de referência).
- **Hemoglobina Corpuscular Média (HCM):** Expressa a quantidade média de hemoglobina que existe dentro de uma hemácia, expressa em pg. Este índice é muito utilizado para classificar as anemias em hipocrômicas ou normocrômicas, se o valor estiver diminuído ou normal, respetivamente, em relação aos valores de referência.

- **Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM):** É a concentração média de hemoglobina presente em todos os eritrócitos, expressa-se em g/dL.
- **Red Cell Distribution Width (RDW):** Avalia a variação da distribuição dos eritrócitos quanto ao tamanho e reflete a diferença do tamanho dos eritrócitos (anisocitose).

3.1.2. Leucograma

É a parte do hemograma que expressa as características qualitativas e quantitativas dos leucócitos. Assim como nos eritrócitos, a sua contagem pode ser feita manualmente, porém esta realidade hoje é praticamente inviável, visto que quando feita de forma manual leva um tempo consideravelmente maior que as metodologias automáticas. Entretanto, a avaliação humana ainda é muito importante, pois apesar da tecnologia dos aparelhos automáticos continuarem evoluindo, as células brancas possuem grande diversidade de características e quando fogem ao padrão normal os contadores automáticos não são tão capazes, quanto um profissional devidamente preparado, de realizar a correta identificação e classificação dos leucócitos.

A contagem global e diferencial é muito importante para avaliar o estado de saúde do paciente, principalmente alterações nesta linhagem celular, desde as mais simples, como uma inversão de fórmula (maior percentagem de linfócitos do que neutrófilos) até às mais graves, como as leucemias e linfomas.

A contagem diferencial, também chamada de fórmula leucocitária, visa classificar os leucócitos quanto aos tipos celulares e estado de maturação e identificação das atipias celulares (Erichsen *et al.*, 2009; Lorenzi, 2006).

Quanto à morfologia, os leucócitos são classificados em polimorfonucleares e mononucleares. Polimorfonucleares são os leucócitos que, no seu estado mais avançado, apresentam o núcleo com segmentações e compreendem os seguintes tipos de celulares: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Leucócitos mononucleares são aqueles que não apresentam lobulação nuclear: Monócito e linfócito (Erichsen *et al.*, 2009).

3.1.3. Plaquetograma

Consiste na contagem de plaquetas, manual ou automatizada.

As plaquetas são muito pequenas e com diâmetros de 3 a 4 μm . A sua principal função é a formação do tampão mecânico durante a resposta hemostática normal à lesão vascular. Na sua ausência, pode ocorrer vazamento espontâneo do sangue através dos vasos sanguíneos.

Além da avaliação quantitativa, o analisador hematológico do laboratório também dá informação acerca do volume plaquetário médio (MPV). Este parâmetro encontra-se aumentado em plaquetas grandes, o que pode ocorrer, por exemplo, em hemorragias agudas e em plaquetopenias secundárias à destruição imunológica (Erichsen *et al.*, 2009; Hoffbrand, 2013).

3.1.4. CELL-DYN® Ruby

No LACCSMC existe o equipamento CELL-DYN Ruby (Figura 2), um analisador automático de hematologia para diagnóstico *in vitro* e que realiza a contagem de células por citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a análise multiparamétrica das células sanguíneas, individualmente. Esta técnica, introduzida na metade do século passada, era utilizada apenas na contagem de células e na análise do tamanho celular. Posteriormente, Fulwyler (1965) idealizou o primeiro aparelho que visava a seleção de células específicas (*cell sorter*). Esses instrumentos foram aperfeiçoados na década de 1970, com a combinação de sondas fluorescentes e a separação de células específicas. Iniciava-se então a era da separação de células ativadas por fluorescência (*fluorescence activated cell sorting – FACS*), a princípio restrita à área de investigação. Nas últimas duas décadas, a análise celular tornou-se o principal objetivo da citometria de fluxo, sendo hoje uma técnica de uso rotineiro, tanto em investigação como na área clínica (Lorenzi, 2006).



Figura 2: CELL-DYN® Ruby.

3.1.5 Valores de referência

Na tabela 3 encontram-se os valores de referência, utilizados no laboratório, do hemograma de um homem adulto.

Tabela 3: Valores de referência do hemograma de um homem adulto no LACCSMC.

Valores de Referência para o Eritrograma	
Eritrócitos	4,5 – 6,5 $\times 10^{12}/L$
Hemoglobina	13,0 – 17,0 g/dL
Hematócrito	40 – 50%
VCM	83 – 101 fl
HCM	27 – 32 pg
CHCM	31,5 – 34,5 g/dL
RDW	0,00 – 15,0%
Valores de Referência para o Leucograma	
Leucócitos	4,0 – 11,0 $\times 10^9/L$
Neutrófilos	40 – 80%
Eosinófilos	1 – 6%
Basófilos	< 2%
Monócitos	2 – 10%
Linfócitos	20 – 40%
Valor de Referência para o Parâmetro Plaquetograma	
Plaquetas	150 – 400 $\times 10^9/L$

3.2 Reticulócitos

São eritrócitos jovens que apresentam RNA ribossomal residual. São células que abandonam a medula óssea e terminam a maturação celular (desaparecimento dos ribossomas e síntese da hemoglobina) em aproximadamente 72 horas após a entrada na circulação, em condições normais.

Para a sua visualização ao microscópio é necessário utilizar uma técnica de coloração especial com azul-brilhante-de-cresil, por exemplo, que precipita o RNA em grânulos, que se encadeiam e formam um retículo de fácil observação (Figura 3).

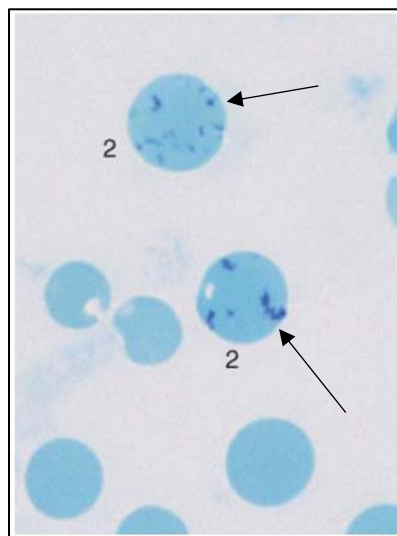


Figura 3: Reticulócitos em microscopia ótica
(Adaptado de *Therml, Color Atlas of Hematology*).

No laboratório, a contagem de reticulócitos é feita de forma automatizada, porém, a amostra deve ser preparada utilizando um *kit* para a contagem de reticulócitos que acompanha o autoanalisador. Os valores de referência são de 0,5 – 2,5% de reticulócitos em relação ao número total de eritrócitos do paciente, logo, deve-se sempre fazer o hemograma da amostra antes da contagem de reticulócitos. De salientar que a contagem manual era muito demorada, com alta variabilidade e apresentava resultados cujos valores serviam apenas para dar uma ideia numérica imprecisa em casos de reticulocitoses óbvias à simples observação microscópica (Failace *et al.*, 2009).

Esta análise permite avaliar a resposta da medula óssea a um quadro de anemia e, com isso, auxiliar na classificação das anemias, dividindo-as em regenerativas e hiporregenerativas, além de permitir avaliar a resposta ao tratamento (Erichsen *et al.*, 2009).

3.3. Análise morfológica

As máquinas não “veem” tudo, e o que não veem pode ser clinicamente significativo ou, pelo menos, biologicamente relevante (Failace et al., 2009).

<p>No eritrograma</p> <ul style="list-style-type: none">PolicromatocitosePecilocitose (de um modo geral)Pecilócitos específicosInclusões (Jolly, pontilhado basófilo, outras)Eritroblastos < 5% (salvo alguns modelos <i>top of line</i>)<i>Rouleaux</i> <p>No leucograma</p> <ul style="list-style-type: none">Desvio à esquerda (há flag <i>Imm Grans/Bands</i> em 80% dos casos com neutrofilia, mas em menos de 40% dos casos sem neutrofilia); a anomalia de Pelger-Huët nunca é notadaGranulações tóxicas e corpos de DöhlePlasmócitosLinfócitos atípicos (há flag <i>Variant lymphs</i> em 80% dos casos com linfocitose, mas, em menos de 30%, sem linfocitose; identificam muitos como monócitos)Linfócitos linfomatosos ou leucêmicos em pequeno número (há <i>Flag Blasts</i> quando mais de 5-10%)Linfócitos com granulação ou vacuolização anormais<i>Hairy cells</i> geralmente aparecem como monócitos <p>No plaquetograma</p> <ul style="list-style-type: none">Agregação, quando discreta (agregação acentuada sempre causa <i>Flag Plt aggregation</i>)Satelitismo plaquetário (há trombocitopenia sem <i>flag</i>)

Figura 4: Alterações hematológicas não identificadas pelos analisadores hematológicos automáticos (Adaptado de Failace et al., 2009).

Analisando as informações da figura 4 é possível notar que apesar da automatização ser um recurso indispensável na rotina de trabalho dos laboratórios de análises clínicas, a microscopia ainda é necessária para verificar características morfológicas das células do sangue.

Ao longo do dia, conforme as amostras vão sendo processadas pelo autoanalisador, é necessário verificar se algum dos parâmetros dos respectivos hemogramas (Conforme a Tabela I) torna aquela amostra suscetível de análise morfológica.

A técnica utilizada pelo laboratório para corar as lamina com esfregaço sanguíneo é a técnica de May Grünwald – Giemsa, que permite a visualização de todos os elementos celulares do sangue periférico. Esta técnica contém uma mistura de corantes que coram os eritrócitos, as plaquetas e os núcleos e citoplasmas dos glóbulos brancos de tons avermelhados (quando ácidos) ou azulados (quando básicos). A coloração de May Grünwald

– Giemsa também é usada para corar esfregaços de medula óssea (Graça, 2007; Piaton, 2015).

A avaliação morfológica dos eritrócitos é feita observando-se a zona de transição entre “corpo e cauda” do esfregaço. Nesta zona eles apresentam-se próximos uns dos outros, mas não estão sobrepostos, salvo alguma situação atípica. Deve-se avaliar tamanho, forma, coloração e inclusões citoplasmáticas. Como a microscopia é sempre feita após o hemograma, ao analisar os índices hematimétricos já é possível ter uma noção de como os eritrócitos estarão em relação a cor (hipo ou normocrômicos) e tamanho (micro, normo ou macrocíticos), porém só com a microscopia é possível verificar alterações na sua forma.

No esfregaço de sangue normal os eritrócitos são, na sua maioria, ligeiramente ovais com palidez central, causada pela sua forma de disco bicôncavo. Em condições anormais podem assumir diferentes formas, situação esta denominada de poiquilocitose. Algumas dessas formas alteradas (tais como ovalócitos e equinócitos) são comuns a várias condições diferentes, portanto, não possuem relevância clínica, por vezes, não sendo mencionada no relatório final da análise para não induzir o clínico em erro. Já os esferócitos e os drepanócitos (eritrócitos falciformes), fornecem informações clínicas importantes. Na figura 5 é possível observar algumas dessas alterações.

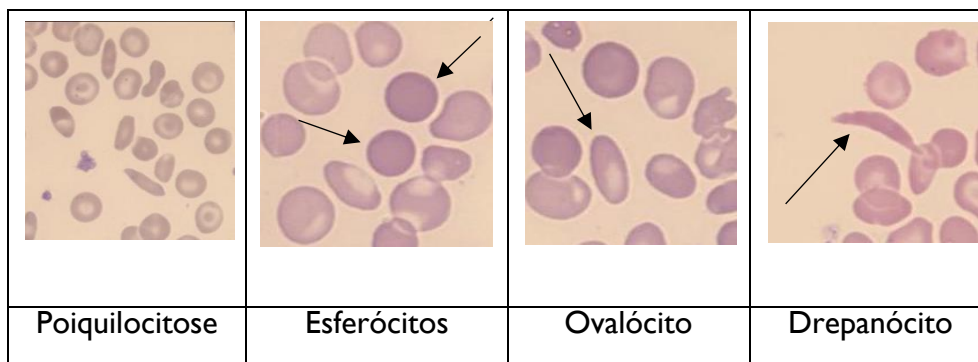


Figura 5: Exemplos de alterações na forma dos eritrócitos.
(Disponível na internet: <http://www.cellavision.com/en/cellavision-cellatlas>).

A contagem diferencial de leucócitos manual é obtida pela observação ao microscópio de 100 leucócitos e anotação da percentagem de cada tipo. Na rotina do laboratório, esta análise é apenas feita para confirmar ou corrigir a contagem feita pelo aparelho.

Para a correta identificação dos leucócitos é importante saber bem as suas características. Os neutrófilos, em condições normais, são os leucócitos que aparecem em maior número no esfregaço. É classificado quanto à sua segmentação nuclear em bastonete (núcleo em forma de bastão, geralmente curvado) ou segmentado (geralmente com dois a

cinco lóbulos, podendo apresentar maior número em determinadas patologias). Os linfócitos possuem núcleo arredondado, cromatina densa e homogênea, geralmente apresentam citoplasma escasso, mas podem apresentar citoplasma mais amplo de cor azul-pálido. Eosinófilos são leucócitos com grânulos alaranjados, brilhantes, grandes e individualizados no citoplasma e com núcleo geralmente bilobulado. Já os basófilos caracterizam-se pela presença de grânulos de cor azul escuro, grandes e que encobrem completa ou parcialmente o núcleo. Por fim, o monócito é caracterizado pelo tamanho grande, núcleo ovalado ou reniforme, com cromatina de padrão delicado e citoplasma mais amplo, de cor azul-acinzentado. Eventualmente podem apresentar vacúolos citoplasmáticos (Erichsen *et al.*, 2009). A figura 6 contém uma representação das células sanguíneas normais.

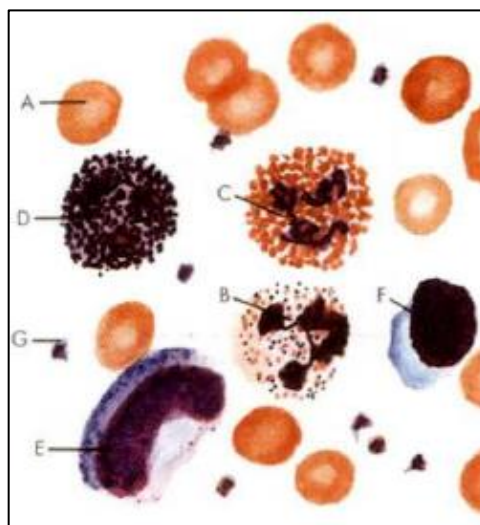


Figura 6: Representação das células do sangue. A: eritrócito; B: neutrófilo segmentado; C: eosinófilo; D: Basófilo; E: monócito; F: linfócito; G: plaqueta (Adaptado de Erichsen *et al.*, 2009).

Assim como os eritrócitos, os leucócitos possuem uma extensa variedade de alterações na sua forma normal, as mais comuns são alterações nos neutrófilos, que podem apresentar: granulações tóxicas; corpúsculo de Döhle; vacuolização citoplasmática; hipogranulação; hipersegmentação.

As plaquetas também são observadas durante a análise morfológica do sangue periférico. Há um risco potencial para contagens falsamente baixas ou altas nos analisadores hematológicos. Assim, agregados plaquetários, macroplaquetas e plaquetas gigantes podem conduzir a resultados falsamente diminuídos na contagem feita pelo equipamento. No entanto, fragmentos de eritrócitos e micrócitos com volume próximo do limite de corte das plaquetas, lipémia, bactérias e leveduras podem conduzir a resultados falsamente aumentados (Comar *et al.*, 2009).

3.4. Grupos sanguíneos

Algumas proteínas da superfície dos eritrócitos funcionam como antígenos, tendo sido descrito cerca de 400 tipos diferentes. Esses antígenos agrupam-se em 29 sistemas, sendo o mais importante clinicamente o: ABO, Rhesus, MNS, I, P, Lewis, Lutheran, Kell, Duffy, Kidd e Xg.

No laboratório faz-se a determinação do grupo sanguíneo de acordo com os sistemas ABO e Rhesus.

O sistema ABO classifica os tipos sanguíneos em: tipo A (antígeno A), tipo B (antígeno B) tipo AB (antígenos A + B) e tipo O (ausência de A e de B).

Aos antígenos eritrocitários A e B correspondem anticorpos naturais (aglutininas naturais) anti-A e anti-B. Assim, nos indivíduos do grupo O são encontrados anticorpos anti-A e anti-B. Os anticorpos naturais são imunoglobulinas, geralmente IgM e IgG, e a reação com os antígenos correspondente é ótima a temperaturas baixas (4°C), por isso são chamados de anticorpos frios, apesar de também serem reativos a 37°C. Ao entrar em contacto com um tipo de sangue diferente do seu, o organismo produzirá anticorpos contra o antígeno eritrocitário estranho, que dará uma reação antígeno/anticorpo violenta.

O sistema Rhesus (normalmente designado de Rh) é composto por dois genes estruturais relacionados, RhD e RhCE, que codificam proteínas de membrana que possuem os antígenos D, Cc e Ee. O gene RhD pode estar presente ou ausente, resultando nos fenótipos Rh D+ e Rh D-, respectivamente. Anticorpos Rh raramente ocorrem de forma natural. A maioria é resultado de transfusão ou gravidez anterior. Anticorpos anti-D (IgG) são capazes de atravessar a placenta durante a gravidez, caso a mãe seja Rh- e tenha tido uma gravidez anterior com um feto Rh+, pelo que numa posterior gravidez com um feto Rh+ podem surgir graves complicações que se não forem tratadas podem levar à morte deste (Hoffbrand, 2013; Lorenzi, 2006).

3.5 Velocidade de sedimentação

O teste da velocidade de sedimentação das hemácias (VS) foi idealizado para auxiliar no diagnóstico da gravidez, sendo posteriormente empregado como indicador de doenças inflamatórias ou infecciosas e até mesmo da condição geral de saúde ou doença. Atualmente, mesmo com a disponibilidade de exames complementares mais sofisticados, a VS continua a ser solicitada com muita frequência.

Entre as técnicas existentes para a determinação da VS, a de referência é a técnica de *Westergren* a qual exige que o tubo com a amostra de sangue seja mantido exatamente na vertical e permaneça em repouso pelo menos durante uma hora. A leitura é dada pela altura da coluna de plasma, no limite de separação com as hemácias sedimentadas. O resultado é expresso em milímetros por hora (mm/h).

No laboratório, esse exame é feito utilizando um instrumento automatizado BD Vacutainer® Sedi-15™ utilizando um tubo de colheita de sangue específico para essa análise. Valores aumentados de VS geralmente estão associados com hemodiluição (anemias agudas ou crônicas), aumento de proteínas de fase aguda (erisipela, doença reumática), presença de proteínas plasmáticas anormais (mieloma múltiplo), aumento de imunoglobulinas (processos infecciosos ou inflamatórios) e uma associação desses mecanismos (neoplasias malignas). É importante salientar que os valores normais da VS aumentam com a idade do paciente.

Note-se que a VS é um exame muito inespecífico, pois várias situações clínicas e fisiológicas alteram os seus valores normais, portanto, esse exame deve ser usado apenas como auxílio no diagnóstico, embora possa ser utilizado para a monitorização de pacientes com doença já diagnosticada (Santos *et al.*, 2009).

3.6. Hemostase

Hemostasia é o processo pelo qual o organismo procura controlar a perda de sangue devido a lesão de um vaso sanguíneo. Essa resposta deve ser eficiente e rápida para estancar o sangramento e garantir a sobrevivência do indivíduo. No entanto, precisa de ser estritamente controlada para evitar desenvolvimento de coágulos extensos, assim como destruí-los após a reparação do vaso. O sistema hemostático é um equilíbrio entre mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes, aliado a um processo de fibrinólise. Os cinco principais componentes desse processo são: plaquetas, fatores de coagulação, inibidores da coagulação, componentes do sistema fibrinolítico e vasos sanguíneos.

O mecanismo de hemostasia pode ser dividido em duas fases. A primeira, denominada de hemostasia primária, ocorre logo após a lesão do vaso sanguíneo. Há imediata constrição deste com a finalidade de diminuir o fluxo local e de permitir maior contacto entre as plaquetas circulantes e o ponto onde o endotélio sofreu a lesão. Ao entrar em contacto com o local lesado, as plaquetas aderem (adesão plaquetária) e são ativadas. Essa acumulação de plaquetas é chamada de tampão plaquetário e é o primeiro mecanismo de defesa do organismo contra a perda de sangue. Fora isso, as plaquetas ativadas libertam uma série de

substâncias que: promovem a agregação das plaquetas; ativam o mecanismo de coagulação; diminuem a permeabilidade vascular e mantêm o tónus da rede vascular.

A fase secundária da hemostasia compreende os eventos que se destinam à formação de um coágulo consistente, que se forma graças a deposição de uma rede de fibrina nas plaquetas agregadas. A fibrina é formada pela ativação dos fatores da coagulação sanguínea, desencadeada pela lesão do vaso.

A última etapa da hemostasia, é o processo de fibrinólise, que tem a função de destruir a fibrina formada quando esta já não é mais necessária. A fibrinólise também é importante para lisar qualquer coágulo que surja na circulação sanguínea (Figura 7) (Hoffbrand, 2013; Lorenzi, 2006).

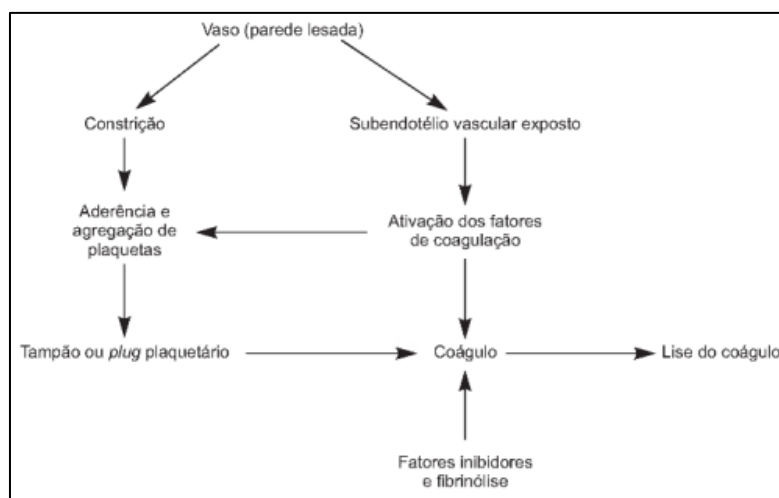


Figura 7: Esquema da hemostasia (Adaptado de Lorenzi, 2006).

A coagulação do sangue envolve um sistema de proteínas precursoras circulantes (os fatores enzimáticos da coagulação), que têm por finalidade a transformação da trombina e posterior transformação do fibrinogénio em fibrina. Ela rodeia os agregados plaquetários nos locais da lesão vascular e converte os tampões primários e instáveis de plaquetas em tampões firmes, definitivos e estáveis.

Antigamente, considerava-se que o mecanismo de coagulação se processava por duas vias distintas: a via intrínseca e a via extrínseca, que ocorriam segundo uma série de acontecimentos ou de sequências de reações, chamada de cascata da coagulação (Figura 8). Atualmente sabe-se que *in vivo* o mecanismo de coagulação é dividido em duas fases: iniciação e amplificação. Na iniciação são produzidas pequenas quantidades (concentrações picomolares) de trombina e na fase de amplificação a concentração de trombina atinge valores micromolares, um milhão de vezes maiores que a fase de iniciação (Hoffbrand, 2013).

Atendendo a que as reações que ocorrem na fase de iniciação se confunde com as da via extrínseca e que as da fase de amplificação com as da via intrínseca, continua a usar-se essas designações, sobretudo a nível laboratorial pois permite uma mais fácil interpretação dos resultados dos testes de *screening* da coagulação.

Assim a fase de iniciação é capaz de gerar trombina após o contacto do fator tecidual (FT) com o fator VII ativado (VIIa), ativando o fator X (fator Xa) (Hoffbrand, 2013; Lorenzi, 2006), responsável pela transformação da protrombina em trombina, juntamente com o fator Va.

A seguir na fase de amplificação, os fatores VIII e V são ativados pela trombina formada anteriormente. Nesta fase o fator Xa, juntamente com o fator Va, fosfolípidos e Ca^{2+} , formam o complexo protrombinase o que resulta na grande produção de trombina. Esta age no fibrinogénio para formar o coágulo de fibrina (Hoffbrand, 2013).

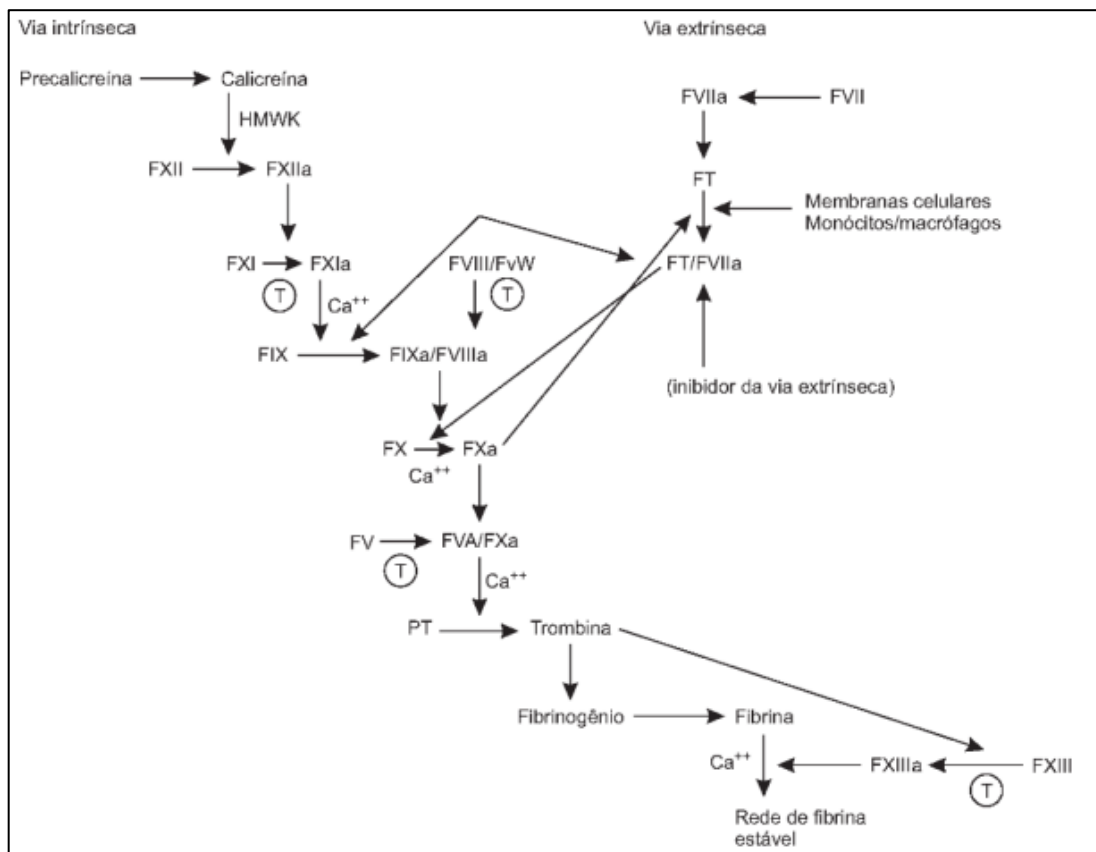


Figura 8: Cascata da coagulação, vias intrínseca e extrínseca (Adaptado de LORENZI, 2006).

3.6.1. Avaliação da hemostasia

A hemostase desempenha um papel muito importante para o bem-estar do paciente, visto que o seu bom funcionamento é essencial para evitar hemorragias ou a formação de trombos desnecessários na circulação sanguínea. Assim, ao longo do tempo vários testes foram desenvolvidos para avaliar a função hemostática.

O hemograma, apesar de não ser um teste específico para a avaliação da hemóstase, informa acerca do número de plaquetas existente na circulação sanguínea. Como estas desempenham um papel muito importante na coagulação, quando o seu número está abaixo dos valores de referência (trombocitopenia) o paciente pode apresentar hemorragias.

Para o diagnóstico dos desvios da hemostasia e coagulação o laboratório possui o equipamento semi automatizado Option[®]4 Plus da BioMérieux, que permite calcular o tempo de protrombina (TP), o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa) e quantificar o fibrinogénio.

O TP avalia a via extrínseca da coagulação, possuindo valores aumentados nas deficiências isoladas ou conjuntas dos fatores II, V, VII, X e fibrinogénio. Esses quatro fatores são sintetizados no fígado, dos quais três são vitamina K-dependentes (II, VII e X). Esta análise é usada para auxiliar no estudo das coagulopatias secundárias às doenças hepatobiliares, monitorizar pacientes que utilizam varfarina, como fármaco anticoagulante e quando há suspeita de deficiência da vitamina K. Os resultados podem ser expressos em segundos, mas o ideal é que sejam expressos como razão internacional normalizada (INR), que é a razão entre o TP do paciente e o TP de um plasma controlo normal, elevado ao índice de sensibilidade internacional (ISI), que é um índice de aferição da tromboplastina usada como reagente:

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

Para pacientes que não fazem uso de terapia anticoagulante, os valores de referência para o INR estão entre 0,9 e 1,1. Já para pacientes em uso de anticoagulantes orais, os valores de referência estão entre 2 e 3.

O tempo de tromboplastina parcial ativado avalia a via intrínseca da coagulação e os valores de referência vão de 30 a 40 segundos. É utilizado para a monitorização terapêutica

de pacientes que utilizam heparina clássica, pacientes hemofílicos e pacientes com insuficiência hepática.

A quantificação do fibrinogénio faz-se por um método que determina a taxa de conversão do fibrinogénio em fibrina, na presença de um excesso de trombina. Numa amostra de plasma diluído, a concentração de fibrinogénio é inversamente proporcional ao tempo de coagulação. Os valores de referência são 200 a 400 mg/dL de fibrinógeno no plasma humano.

3.7. Eletroforese de hemoglobinas

O LACCSMC possui um equipamento de eletroforese semi automatizado, o Pretty da INTERLAB, que é utilizado para realizar eletroforese de hemoglobinas e proteínas séricas.

A eletroforese de hemoglobinas tem como principal objetivo a deteção e quantificação da hemoglobina S (Hb S).

A Hemoglobina S é uma das mais comum das alterações hematológicas hereditárias conhecidas no homem. É causada por mutação no gene beta da globina, produzindo alteração estrutural na molécula. Há troca de uma base nitrogenada do codão GAG para GTG, resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 da cadeia da β -globina. Os eritrócitos com a variante Hb S sofrem falcização, fisiologicamente provocado pela baixa tensão de oxigénio, acidose e desidratação. As células falcizadas passam então a apresentar a forma de foice ou de lua em quarto crescente, com consequências variáveis no seu portador, dependentes da quantidade de hemoglobina S. A presença de hemoglobina Fetal no eritrócito com hemoglobina S oferece proteção a esta célula, contra o processo de falcização, pois não interage com hemoglobina S quando esta precipita.

O traço falciforme caracteriza o portador assintomático, heterozigótico para Hb S, representado laboratorialmente pela presença das hemoglobinas A e S. Os portadores não apresentam a doença, nem possuem anormalidades no número e forma das hemácias, geralmente evidenciados por análises de rotina. Porém, o portador do traço falciforme pode apresentar sinais clínicos quando estiver em condições que propiciam o processo de falcização, como hipoxia, acidose e desidratação (Murao *et al.*, 2007). Por outro lado, no estado homozigótico (Hb SS), chamado também de anemia falciforme, as alterações clínicas e hematológicas são bem evidentes (Tomé-Alves *et al.*, 2000).

Os glóbulos vermelhos em forma de foice não circulam adequadamente na microcirculação, resultando tanto em obstrução do fluxo sanguíneo capilar como na sua

própria destruição precoce. Este mecanismo fisiopatológico acarreta graves manifestações clínicas, com maior frequência após os 3 meses de idade, as mais comuns e conhecidas são: hemólise, anemia e acidente vascular cerebral (AVC) (Di Nuzzo *et al.*, 2004).

A pesquisa de Hb S é um exame obrigatório para militares que pretendem fazer parte das tropas especiais, sendo de caráter eliminatório caso o candidato seja homozigótico (Hb SS) ou heterozigótico (Hb AS), pois militares das tropas especiais tem de estar aptos a passar por condições em que essa patologia os impede de atuar de forma plena, além de ser um risco para a saúde do militar.

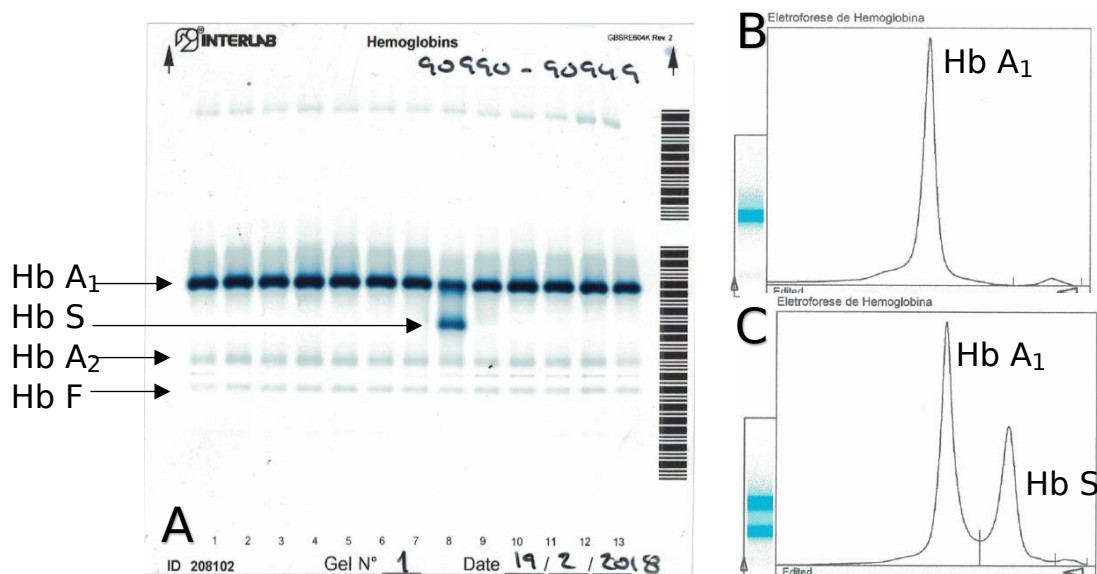


Figura 9: Exemplo de separação eletroforética de hemoglobinas e perfis eletroforéticos. (A) Gel de separação eletroforética de hemoglobinas. (B) Perfil eletroforético normal. (C) Perfil eletroforético de um paciente com Hb S (Heterozigótico). (Material cedido pelo LACCSMC).

Na figura 9 pode observar-se um gel com separação eletroforética de hemoglobinas em amostras de treze militares, dos quais apenas uma (amostra 8) apresenta Hb S (imagem A). A imagem B representa o perfil eletroforético normal e a imagem C o perfil eletroforético da amostra 8, onde pode se ver claramente a elevada percentagem de Hb S.

O laboratório possui ainda um cromatografo (ADAMS A_{1c}®HA-8160 da ARKRAY) que faz a separação e a quantificação das Hb A_{1c}, Hb F e Hb S, utilizando a técnica de HPLC. Desta forma, o sangue do paciente é analisado por duas técnicas diferentes garantindo a confiabilidade do resultado final. Na figura 10 mostra-se um cromatograma de um paciente normal (esquerda) e de um paciente com traço falciforme (direita).

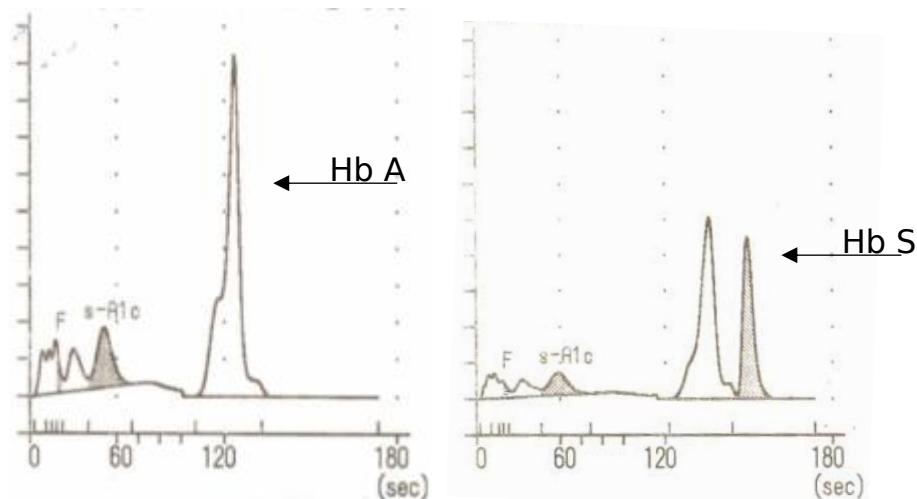


Figura 10: Cromatogramas de um paciente sem alterações (esquerda) e de um paciente portador do traço falciforme (direita). (Imagens cedidas pelo LACCSMC).

3.8. A minha experiência no setor de hematologia

A primeira coisa a ser feita no início da rotina laboratorial é ligar os analisadores. A seguir são processados os controlos internos de hematologia, embora para a coagulação e Hb A_{1c} seja só processado uma vez por semana (segunda-feira). Caso algum teste de parâmetro analítico não esteja dentro dos valores de referência é necessário tomar as medidas corretivas, que vão desde a simples repetição do teste até ao contacto com a assistência técnica do aparelho.

Após o controlo dos analisadores, as amostras dos pacientes podem ser processadas, sempre atentos para qualquer valor muito alto, muito baixo ou discrepante do histórico do paciente.

Nos hemogramas as alterações mais comuns durante a minha permanência no setor foram anemia, trombocitopenia, inversão da fórmula leucocitária e monocitose. Assim, eram sempre feitos esfregaços sanguíneos desses pacientes, porém eu tinha a liberdade de preparar laminas de pacientes que não se enquadravam nos critérios estabelecidos pelo laboratório (Ver Tabela I). A análise morfológica do sangue era feita pelo diretor técnico do laboratório, que aproveitava o momento em que observava as laminas para me ensinar ou testar os meus conhecimentos em hematologia, desde temas muito básicos até assuntos pouco comuns. Também pedia para eu fazer a identificação do que estava no campo do microscópio e a contagem diferencial dos leucócitos sem o resultado do hemograma do respetivo paciente previamente obtido no autoanalisador.

Um caso interessante aconteceu quando, ao tentar processar o hemograma de uma paciente idosa, o aparelho mostrava vários sinais de erro que persistiam ao tentar repetir a análise. Quando fui preparar o esfregaço do sangue notei que o mesmo apresentava vários grânulos, que transmiti ao diretor e que ele suspeitou que a paciente tivesse crioaglutininas. Assim, sugeri que o tubo com o sangue da paciente ficasse na estufa à 37°C por algumas horas. Após esse tempo, a amostra foi novamente analisada e desta vez, todos os parâmetros estavam de acordo com os valores de referência.

Muitas vezes foi necessário que um dos técnicos do laboratório fosse fazer a colheita de amostras externa, a militares que estavam em treino ou em quartéis que ficavam longe de hospitais militares. Nessa situação algumas amostras vinham mal colhidas ou com volume insuficiente para as análises requeridas. Houve uma situação em que o sangue coagulou no tubo com EDTA, pelo que o hemograma foi feito utilizando a amostra do tubo da VS, só que este apresenta um volume de anticoagulante maior que o tubo de EDTA, pelo que é necessário multiplicar os valores do hemograma por 1,2 para evitar resultados falsamente diminuídos.

Avalio como positiva as experiências que tive neste setor. Pude pôr em prática os conhecimentos adquiridos nas aulas teóricas, melhorar as minhas capacidades na análise morfológica do esfregaço sanguíneo e desenvolver sentido crítico para a análise dos resultados.

4. BIOQUÍMICA

A Bioquímica Clínica cobre aspectos relevantes para a medicina e explica o funcionamento do organismo como um grande sistema de reações químicas. Foca-se nas alterações bioquímicas que ocorrem em situações patológicas e orienta no sentido do que deve ser feito para restaurar as funções normais. Além disso, a bioquímica clínica consegue explicar como o estilo de vida tem influência na saúde.

O organismo humano é, por um lado, um sistema metabólico integrado, cuidadosamente controlado e, por outro lado, um sistema que é aberto e se comunica com o ambiente. Apesar destas duas características aparentemente contraditórias, o organismo funciona no sentido de manter a composição química do seu meio interno constante. Assegura regularmente as necessidades energéticas (consumo de alimento) e de água, e a captação de oxigênio requerido para o metabolismo oxidativo (a respiração é, de fato, uma reação de combustão a baixa temperatura e controlada). A energia gerada pelo metabolismo assegura normalmente as necessidades energéticas e mantém a temperatura corporal. O organismo elimina dióxido de carbono, água e resíduos nitrogenados mantendo o equilíbrio azotado. A quantidade e a composição dos alimentos que consumimos têm impactos significativos na nossa saúde. Tanto a desnutrição, quanto a obesidade, são atualmente os principais problemas de saúde pública no mundo. Um dos aspectos relevantes da Bioquímica Clínica é a compreensão das interações entre a nutrição, o metabolismo e a genética na saúde e na doença (Baynes e Dominiczak, 2010).

Com o avanço da ciência foi possível identificar marcadores bioquímicos que permitem avaliar o estado de saúde, bem como desenvolver técnicas (no início manuais, hoje automatizadas) que permitem avaliar esses marcadores que servem de auxílio para o diagnóstico de uma patologia, ou para acompanhar a evolução do estado de saúde do paciente durante a terapêutica.

No LACCSMC, as análises nos âmbitos da Bioquímica e da Imunologia são efetuadas no mesmo espaço físico, designado “Setor de Bioquímica e Imunologia”, pois o aparelho automatizado ARCHITECT ci8200 é composto por dois módulos, um que realiza os ensaios bioquímicos e o outro, os imunoensaios.

As amostras para análises bioquímicas e/ou imunológicas devem ser colhidas para um tubo que contém um ativador da coagulação, que faz com que o processo de coagulação seja acelerado, e também um gel separador. Após a colheita deve-se deixar o tubo em repouso

por uns quinze minutos, em média, para que haja a completa retração do coágulo. A seguir, a amostra é centrifugada para a separação do soro e análise posterior.

4.1. Avaliação da função hepática

O fígado é um órgão que desempenha múltiplas funções metabólicas, excretoras e secretoras, de armazenamento, circulatórias e funções críticas na coagulação sanguínea.

A síntese e o metabolismo dos hidratos de carbono estão centralizados no fígado. O glicogénio é sintetizado a partir da glicose proveniente dos hidratos de carbono ingeridos e armazenados no fígado, com posterior reconversão a glicose, quando necessário. Uma importante função também localizada no fígado, é a gliconeogénese, definida como a obtenção de glicose a partir de aminoácidos e outros compostos. Além disso, outras hexoses são convertidas em glicose pelas células hepáticas.

A maioria das proteínas plasmáticas são sintetizadas no fígado. Entre elas estão a albumina, fibrinogénio, α_1 -antitripsina, haptoglobina, transferrina, α_1 -fetoproteína e protrombina. No fígado, ocorre também a desaminação do glutamato como a principal fonte de amónia, convertida posteriormente em ureia.

A síntese das lipoproteínas plasmáticas VLDL e HDL, assim como a conversão da acetil-CoA em ácidos gordos, triglicerídios e colesterol são realizadas no fígado. Este órgão é o principal local de remoção dos quilomicrons “remanescentes”, assim como do metabolismo ulterior do colesterol a ácidos biliares.

A formação de corpos cetónicos estimulada pela acumulação de acetil-CoA ocorre, quase exclusivamente, no fígado.

O local de armazenando das vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e várias vitaminas hidrossolúveis como a vitamina B12 é o fígado. Outra função relacionada com as vitaminas é a conversão do caroteno a vitamina A.

O fígado é a fonte de somatomedina e angiotensina além da depuração metabólica de outras hormonas. Como fonte de transferrina, ceruloplasmina e metalotioneína, este órgão, exerce papel fundamental no transporte, armazenamento e metabolismo do ferro, cobre, zinco e outros metais.

O mecanismo mais importante na atividade desintoxicante é o sistema microssomial de metabolização de xenobióticos. Este sistema é induzido por vários compostos e é responsável por mecanismos de desintoxicação (biotransformação) que incluem oxidação, redução, hidrólise, hidroxilação, carboxilação e desmetilação. Estes mecanismos atuam na

conversão de compostos nocivos ou pouco solúveis em substâncias menos tóxicas ou mais solúveis em água e, portanto, excretadas pelo rim.

A conjugação com o ácido glicurônico, glicina, ácido sulfúrico, glutamina, acetato, cisteína e glutatona, converte substâncias insolúveis em formas solúveis passíveis de excreção renal.

O fígado secreta a bile, que é composta de pigmentos biliares (fundamentalmente, ésteres da bilirrubina), ácidos e sais biliares, colesterol e outras substâncias extraídas do sangue (alguns corantes, metais pesados, enzimas). Os ácidos biliares primários são formados no fígado a partir do colesterol. Os ácidos biliares são conjugados com a taurina ou glicina, formando os sais biliares. Estes sais atingem os intestinos quando a vesícula biliar contrai após cada refeição. Aproximadamente 600 mL de bile é vertida por dia no duodeno, onde participa na digestão e absorção dos lípidos.

Tendo em mente a grande versatilidade do fígado é evidente que quando esse órgão começa a trabalhar de forma anormal várias funções do nosso organismo começam a operar, por consequência, com ineficiência. Logo, é importante a existência de vários biomarcadores da função hepática, para averiguar a sua funcionalidade (Motta, 2003).

As aminotransferases (transaminases) fazem parte dos biomarcadores mais comuns da função hepática. A alanina aminotransferase (ALT/TGP) é encontrada principalmente no fígado e nos rins e em menores quantidades no coração e músculo esquelético. A aspartato aminotransferase (AST/TGO) é encontrada principalmente no coração, fígado, músculo esquelético e rins. Quando ocorre o aumento dessas enzimas para além dos valores de referência é sinal que há lesão hepatocelular, no entanto, é importante monitorizar a evolução desses valores para conseguir um diagnóstico mais exato (Williamson *et al.*, 2013).

Outro dado relevante é a relação AST/ALT, que geralmente é superior a um na doença hepática alcoólica, e inferior a um na esteatohepatite não-alcoólica. (Zamin Jr *et al.*, 2002).

A albumina é a proteína plasmática mais abundante, sendo responsável por aproximadamente metade da quantidade total de proteínas plasmáticas. Por causa de sua alta concentração plasmática e do seu tamanho relativamente pequeno, a albumina também é o principal componente proteico da maioria dos líquidos corporais extravasculares, incluindo o líquido intersticial, a urina e o líquido amniótico. Aproximadamente 60% do total da albumina do corpo encontra-se no espaço extravascular. Ela não tem cadeias laterais de hidrato de carbono, mas é altamente solúvel em água devido à sua elevada carga global negativa a pH fisiológico (Burtis; Bruns, 2008). Possui grande influência no efeito osmótico

do plasma e é responsável pelo transporte de várias substâncias pouco solúveis em água. Valores aumentados geralmente indicam desidratação, enquanto que valores diminuídos podem ser causados por síntese diminuída, reação de fase aguda, inflamação, doença crônica, excesso de perda pela superfície corporal, aumento do seu catabolismo e expansão do volume plasmático (Motta, 2003; Williamson *et al.*, 2013).

Outro parâmetro que avalia a função hepática é a concentração das proteínas séricas circulantes, chamado de proteína total. Valores aumentados indicam normalmente hipergamaglobulinemias (mono ou policlonal) ou estados hipovolêmicos. Valores diminuídos são sugestivos de: síntese diminuída ou ineficaz de proteínas (doença hepática grave), perda aumentada, catabolismo aumentado e aumento do volume plasmático (Motta, 2003; Williamson *et al.*, 2013).

A bilirrubina provém do processo natural de morte dos eritrócitos. É uma substância muito apolar e é transportada para o fígado através da circulação sanguínea ligada à albumina (bilirrubina indireta ou não-conjugada). Neste órgão, a UDP-glicuronil transferase catalisa a rápida conjugação com o ácido UDP-glicurônico, produzindo a bilirrubina conjugada que é excretada na bile. O aumento dos valores dessas bilirrubinas no soro pode ser indicativo de alteração da função hepática.

A fosfatase alcalina (ALP) é, na verdade, uma família de enzimas relativamente inespecífica, que catalisam a hidrólise de vários fosfomonoésteres a pH alcalino. O pH ótimo da reação *in vitro* situa-se próximo de 10, mas depende da natureza e concentração do substrato utilizado. Esta enzima está amplamente distribuída nos tecidos humanos, nomeadamente na mucosa intestinal, fígado (canalículos biliares), túbulos renais, baço, ossos (osteoblastos) e placenta. A forma predominante no soro em adultos normais provém, principalmente do fígado e esqueleto. Uma diversidade de patologias pode levar a valores elevados de ALP no soro, mas a que mais se relaciona com o fígado é a obstrução do ducto biliar.

A gamaglutamiltransferase (GGT) tem um papel fundamental no ciclo da glutatona (GSH), o principal antioxidante das células. Esta enzima metaboliza a GSH presente nos fluídos extracelulares nos seus aminoácidos constituintes, que são o ácido glutâmico, a cisteína e a glicina. A cisteína é utilizada pelas células para a produção de uma nova GSH (Whitfield, 2001). A atividade desta enzima ligada à membrana provém principalmente do fígado. Ela é um indicador sensível da presença de doença hepatobiliar, estando elevada na maioria dos indivíduos com doença hepática independentemente da causa. A sua utilidade clínica, entretanto, é limitada pela falta de especificidade. Assim como com a ALP, a GGT

encontra-se mais elevada nos casos de obstrução biliar intra e pós-hepática, alcançando atividades que variam de 5 a 30 vezes o limite de referência superior. Valores muito elevados da GGT também são observadas em pacientes com neoplasmas hepáticos primários ou metastáticos. Nessas condições, as variações podem ocorrer precocemente e são mais pronunciadas do que aquelas de outras enzimas hepáticas. Elevações moderadas (duas a cinco vezes o limite de referência superior) ocorrem em hepatites infecciosas. Pequenos aumentos da atividade de GGT são observados em pacientes com esteatose hepática e aumentos similares, mas transitórios, são notados em casos de intoxicação por drogas. Na pancreatite aguda ou crônica e alguns tipos de malignidades pancreáticas (especialmente se associadas a obstrução hepatobiliar), a atividade enzimática pode ser de 5 a 15 vezes o limite de referência superior.

Atividades aumentadas de GGT são encontradas nos soros de pacientes com hepatite alcoólica e na maioria dos soros de pessoas que são alcoólicos crônicos. Concentrações aumentadas da enzima também são encontradas no soro de indivíduos que fazem uso de fármacos anticonvulsivantes, tais como a fenitoína e o fenobarbital. Este aumento na atividade da GGT no soro pode refletir a indução da atividade enzimática pela ação do álcool e de fármacos e/ou pelos seus efeitos tóxicos nas estruturas microssomais das células hepáticas (Burtis; Bruns, 2008).

4.2. Avaliação da função renal

O sistema renal atua na regulação dos fluídos, eletrólitos e na eliminação dos resíduos metabólicos. Os rins são os componentes mais importantes desse sistema pois têm a capacidade de: eliminar os resíduos metabólicos, reter nutrientes, regular o equilíbrio eletrolítico e sintetizar substâncias (eritropoetina, renina, prostaglandinas e a forma ativa da vitamina D).

No laboratório, a função renal é avaliada pela quantificação da ureia e creatinina, análise da urina e pela taxa de filtração glomerular (TFG) que pode ser determinada através da clearance da creatinina ou calculada – taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). A determinação sérica da creatinina é o método mais usado para avaliação da função renal, embora apresente limitações, como interferências na determinação e baixa sensibilidade na detecção de graus menos avançados de perda de função renal. Somente após a perda de aproximadamente 50% da função renal é que a concentração da creatinina sérica começa a aumentar e não há proporcionalidade entre a perda da função e os valores séricos.

A concentração da creatinina sérica pode ser influenciada não só pela taxa de filtração glomerular, mas também pela massa muscular e atividade física. Valores reduzidos são observados na distrofia muscular, paralisia, anemia e leucemia, enquanto que valores aumentados ocorrem na glomerulonefrite, insuficiência cardíaca congestiva, desidratação e choque hipovolêmico (Ross *et al.*, 1998).

A TFG é considerada a melhor medida global da função renal, ajudando a determinar se existe alguma lesão renal. Se a taxa de filtração glomerular se encontra diminuída, indica que os rins não estão a funcionar de forma adequada. Na prática clínica é muitas vezes determinada por cálculo, com base em várias fórmulas, nomeadamente, a CKD-EPI:

$$\text{TFGe(mL/min/1,73 m}^2\text{)} = 141 \times \min(\text{Cre/k, 1})^\alpha \times \max(\text{Cre/k, 1})^{-1,209} \times 0,993^{\text{idade}}$$

Nesta fórmula “Cre” é a creatinina sérica, “k” é 0,7 para mulheres e 0,9 para homens, “ α ” é 0,329 para mulheres e 0,411 para homens, “min” indica o mínimo de Cre/k ou 1, “max” indica o máximo de Cre/k ou 1. Caso seja uma paciente do sexo feminino, deve-se multiplicar o resultado por 1,018. Quando for um paciente afro-americano, o resultado final deve ser multiplicado por 1,159 (Levey *et al.*, 2009).

O catabolismo das proteínas e dos ácidos nucleicos resulta na formação de ureia e amônia. A ureia é sintetizada principalmente no fígado, e mais de 90% são excretados pelos rins. A determinação da ureia é o teste de triagem mais comum para avaliação da função renal e valores superiores aos de referência indicam que a função renal está comprometida.

Embora a análise da urina seja realizada noutra parte do laboratório, é importante mencioná-la. É constituída por um conjunto de provas não invasivas e baratas que fornecem informações sobre várias funções metabólicas do organismo. É útil no diagnóstico e tratamento de doença renal ou do trato urinário como, também, na deteção de doenças metabólicas ou sistémicas não relacionadas com o rim. O teste consiste na verificação da cor e aspeto da amostra; determinação do pH e densidade; pesquisa de proteínas, glicose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina, sangue, nitrito e leucócitos. Estes parâmetros são analisados utilizando tiras reagentes que são lidas pelo aparelho Uritest 300A. Também é feita a análise do sedimento urinário. Durante a observação do sedimento ao microscópio deve estar-se atento para a presença de células epiteliais, leucócitos, hemácias e cristais.

Outro exame relevante é a avaliação de baixas concentrações de albumina (microalbuminúria) em amostra de urina espontânea ou urina de 24 horas. É um indicador do aumento da permeabilidade capilar e serve como um marcador inicial da lesão renal.

Conclui-se que a avaliação da função renal não é simples, pois é necessário a análise de vários parâmetros para que seja possível a sua correta avaliação.

4.3. Diabetes *mellitus*

O corpo humano, bem como o de outros seres vivos, necessita de um fornecimento constante de energia que, é obtida primariamente através da nossa alimentação. Os substratos energéticos mais importantes em mamíferos são a glicose e os ácidos gordos. Após a ingestão de alimentos o seu excesso é armazenado para ser novamente libertado, caso necessário. Isto salvaguarda a falta de energia entre as refeições e, em circunstâncias extremas, pode garantir a sobrevivência de um organismo por semanas e meses.

Em circunstâncias normais, a glicose é o único combustível usado pelo cérebro, pelo que, o seu suprimento contínuo é essencial para a sobrevivência. A glicose também é preferencialmente usada pelo músculo durante os períodos iniciais de exercício. Se o jejum é mais longo, outro mecanismo de aporte de glicose entra em jogo, a sua síntese a partir de moléculas que não são hidratos de carbono (gliconeogénese). A garantia de um fornecimento contínuo de glicose é uma das principais funções do metabolismo energético.

A homeostase da glicose é controlada, por um lado, pela hormona anabólica insulina e, por outro, por hormonas catabólicas (glucagon, catecolaminas, cortisol e hormona do crescimento), conhecidas também como hormonas hiperglicemiantes (Baynes e Dominiczak, 2010).

A insulina é produzida e armazenada nas células β do pâncreas- Após uma refeição o aumento da concentração de glicose nessas células funciona como um estímulo para que a insulina seja secretada. Ela tem como principal função permitir a entrada de glicose nas células.

A diabetes *mellitus* caracteriza-se por um estado de intolerância à glicose e hiperglicémia em jejum resultante da ação deficiente da insulina. Apresenta, também, anormalidades no metabolismo dos hidratos de carbono, proteínas e lípidos.

Atualmente a diabetes é dividida em dois tipos: tipo I e tipo II. Na diabetes tipo I ocorre destruição das células β do pâncreas, normalmente devido a um processo autoimune (forma autoimune; tipo IA) ou menos comumente de causa desconhecida (forma idiopática; tipo IB). Na forma autoimune há um processo de insulite e estão presentes autoanticorpos circulantes.

A diabetes tipo II é mais comum do que a tipo I, perfazendo cerca de 90% dos casos de diabetes. É uma entidade heterogéna, caracterizada por distúrbios da ação e secreção da insulina, com predomínio de um ou outro componente (Gross *et al.*, 2002).

Atualmente, 415 milhões vivem com diabetes no mundo e a perspectiva é de que esse número aumente para 642 milhões até 2040, segundo o relatório de 2015 da Federação Internacional de Diabetes.

De acordo com a Norma da Direcção-Geral da Saúde N° 002/2011 o diagnóstico da diabetes é feito com base nos seguintes parâmetros e valores para plasma venoso na população em geral: glicémia de jejum ≥ 126 mg/dL (ou $\geq 7,0$ mmol/L); ou sintomas clássicos + glicémia ocasional ≥ 200 mg/dL (ou $\geq 11,1$ mmol/L); ou glicémia ≥ 200 mg/dL (ou $\geq 11,1$ mmol/L) às 2 horas na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75 g de glicose; ou hemoglobina glicada $A_{1c} \geq 6,5\%$.

Além da determinação da glicémia em jejum, é feito no laboratório a PTGO, que também auxilia no diagnóstico da diabetes. O paciente, em jejum, ingere uma solução que contém 75 g de glicose e após duas horas é feita a determinação da glicémia. Diferente da glicémia em jejum, este teste requer um cuidado adicional. Antes do início do teste é determinada a glicémia capilar. Caso o paciente apresente valores iguais ou superiores a 150 mg/dL fica impossibilitado de realizar a PTGO. Outra situação especial é no diagnóstico da diabetes gestacional, em que a PTGO é feito com a ingestão de 75 g de glicose e a medição da glicémia é feita após 2 horas. É critério para diagnóstico de diabetes gestacional um valor de glicémia ≥ 153 mg/dL (ou $\geq 8,5$ mmol/L).

No caso de pacientes com diagnóstico de diabetes já confirmado um excelente exame para fazer o controlo dos níveis da glicémia é a quantificação da hemoglobina glicada. Esta é formada pela reação entre a hemoglobina A e a glicose. A membrana da hemácia é altamente permeável à molécula de glicose, fazendo com que a hemoglobina presente no seu interior fique exposta praticamente à mesma concentração da glicose plasmática. A glicação ocorre em maior ou menor grau, conforme o nível de glicémia. A hemoglobina glicada permanece dentro das hemácias e a sua concentração, num determinado momento, depende, basicamente, do valor da glicémia média e da meia-vida das hemácias (Sumita *et al.*, 2008).

Apesar de ser um parâmetro bioquímico, esta análise é realizada no setor de hematologia do laboratório, em que a amostra de sangue total colhido para o tubo com EDTA. A determinação da Hb A_{1c} é utilizada para avaliar a glicémia média dos 2-3 meses anteriores. Assim, mesmo que a glicémia de jejum apresente valores normais, a Hb A_{1c} não vai deixar o paciente enganar o médico. Se os valores da hemoglobina glicada estiverem

dentro dos valores de referência, o clínico possui uma indicação confiável relativamente à terapia usada e probabilidade de lesões microvasculares (Saudek, 2009).

É de salientar que a determinação de Hb A_{1c} pode apresentar resultados falsamente aumentados ou diminuídos. Pacientes que possuem anemia ou alguma patologia que diminua o tempo de vida média dos eritrócitos, deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase por exemplo, apresentam determinações com resultados falsamente diminuídos. Por outro lado, o uso excessivo de suplementos de vitaminas C, B e E, colesterol elevado, doenças hepáticas e renais podem levar a resultados falsamente aumentados (Sherwani *et al.*, 2016).

4.4. Ionograma

Os eletrólitos são os aniões ou catiões com cargas elétricas negativas ou positivas, respetivamente. Os principais eletrólitos encontrados no homem são: sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto, fosfato, bicarbonato e sulfato.

A sua função no organismo vivo é bastante variável. Praticamente não existe nenhum processo metabólico que não seja afetado pelos eletrólitos. No laboratório faz-se a determinação do sódio, potássio, cálcio e cloreto.

O sódio, que é o principal catião extracelular, exerce uma importante influência sobre a osmolalidade plasmática. Desempenha um papel central na manutenção da distribuição normal da água e pressão osmótica.

O sódio é livremente filtrado pelos glomérulos. Setenta a oitenta por cento da quantidade de Na⁺ filtrada é então ativamente reabsorvida nos túbulos proximais com o cloreto, e a água segue passivamente de maneira isosmótica e eletricamente neutra.

As alterações no sódio sérico refletem, com mais frequência, alterações do equilíbrio hídrico, do que do equilíbrio do sódio. É ajustado pela hormona antidiurética e pelos recetores de sede para manter a osmolalidade e o volume do plasma. Apresenta valores elevados na desidratação e no hiperaldosteronismo.

O cloreto é o principal anião extracelular. Juntos, sódio e cloreto representam a maior parte dos constituintes osmoticamente ativos do plasma. Ele está envolvido de forma significativa na manutenção da distribuição da água e na pressão osmótica. Em contraste às suas altas concentrações no fluido extracelular, a concentração de Cl⁻ nos fluidos intracelulares é muito baixa.

Os iões cloreto da alimentação são quase que completamente absorvidos no trato intestinal, filtrados do plasma pelos glomérulos e passivamente reabsorvidos, junto com o

Na^+ , nos túbulos proximais. No ramo ascendente da ansa de Henle, o Cl^- é ativamente reabsorvido pela bomba de cloreto, cuja ação promove a absorção passiva de Na^+ . Os diuréticos de ansa, como a furosemida, inibem a bomba de cloreto. O Cl^- excedente é excretado na urina e também é eliminado no suor. A determinação deste íon é usada como um indicador de fibrose quística (Burtis; Bruns, 2008).

O potássio é um íon intracelular primário. As concentrações intracelulares elevadas são mantidas pela Na^+/K^+ ATPase, que transporta continuamente potássio para dentro da célula contra um gradiente de concentração. Antes de quantificar o potássio é importante observar se a amostra apresenta hemólise, uma vez que os glóbulos vermelhos contêm potássio que vai aumentar o potássio sérico. A quantificação do potássio sérico ajuda na avaliação do equilíbrio eletrolítico, arritmias cardíacas, fraqueza muscular, encefalopatia hepática e insuficiência renal. Hipercaliemia e hipocaliemia funcionam como parâmetros auxiliares para o diagnóstico de várias patologias.

A determinação do cálcio é muito útil para o diagnóstico e monitorização de uma ampla variedade de distúrbios, incluindo distúrbios das proteínas e da vitamina D, bem como doenças ósseas, do rim, das glândulas paratiróides ou do trato gastrointestinal.

4.5 Perfil lipídico

Os lípidos são moléculas orgânicas insolúveis em água, porém solúveis em solventes apolares. Estão presentes em todos os tecidos e apresentam grande importância em vários aspectos da vida. Atuam como hormonas ou precursores hormonais, substrato metabólico, componentes estruturais e funcionais das biomembranas, isolante que permite a condução nervosa e previne a perda de calor. Os lípidos principais no plasma humano são o colesterol, ésteres de colesterol, triglicerídeos, fosfolípidios e os ácidos gordos não esterificados (Motta, 2003).

As lipoproteínas são complexos lipoprotéicos que transportam os lípidos apolares (insolúveis em água) no seu núcleo. Estes complexos são constituídos por quantidades variáveis de colesterol e seus ésteres, triglicerídeos, fosfolípidios e apoproteínas, sendo solúveis no plasma devido à natureza hidrofílica da parte proteica. Com base na densidade, as lipoproteínas plasmáticas são separadas em: quilomicrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Motta, 2003).

Os ensaios de rotina disponíveis no laboratório para a análise dos lipídios e lipoproteínas são: concentrações séricas do colesterol (total, c-LDL e c-HDL) e triglicerídeos (TG).

Os triglicerídeos, constituem uma importante fonte de energia para o organismo, sendo armazenados no citosol dos adipócitos e transportados no plasma integrados nas lipoproteínas, em particular nas VLDL e quilomicrons. Após a ingestão de alimentos, os níveis sanguíneos de TG aumentam devido ao aumento de quilomicrons. Os níveis elevados de triglicerídeos no sangue estão associados a risco aumentado de doença cardiovascular e aterosclerose.

O colesterol é o esteroide em maior quantidade nos tecidos humanos. É transportado na corrente sanguínea incorporado nas lipoproteínas. É necessário para a constituição das membranas celulares e como precursor dos ácidos biliares, progesterona, vitamina D, estrogénios, glicocorticóides e mineralocorticóides. Valores de colesterol total aumentados ocorrem, principalmente, em pacientes com uma dieta, ao longo da vida, com alto teor de colesterol e gorduras, e em pacientes com vários defeitos genéticos, entre os quais a hiperexpressão do gene PCSK9, que diminui o número de recetores hepáticos para as LDL, causando hipercolesterolemia (Horton *et al.*, 2009).

O c-HDL é conhecido como bom o colesterol, tendo múltiplas funções benéficas, nomeadamente o transporte reverso do colesterol. Valores elevados podem indicar que o paciente sofreu perda de peso e/ou que pratica exercícios físicos regulares, mas valores elevados também podem indicar doença hepática crónica.

O c-LDL é popularmente conhecido como o mau colesterol e os seus níveis elevados estão associados a aterosclerose e coronariopatias. Diferente dos parâmetros anteriores, o c-LDL não é doseado por ensaio químico no LACCSMC, mas pelo uso da equação de Friedewald:

$$\text{LDL (mg/dL)} = \text{colesterol total} - (\text{colesterol HDL}) - (\text{TG} \times 0,20)$$

Esta fórmula só é válida para valores de TG inferiores a 400 mg/dL.

4.6 Proteínas séricas e eletroforese

A proteína sérica total refere-se à concentração das proteínas circulantes. A determinação da proteína total no soro é uma análise que mede as quantidades de proteína total, albumina e globulinas no sangue. É útil no diagnóstico e tratamento de doenças que

acometem o fígado e os rins, bem como outros distúrbios metabólicos ou nutricionais e na triagem para deficiências nutricionais e gamopatias.

A eletroforese das proteínas séricas (EPS) é um método que permite a separação das moléculas de proteína, com base na carga elétrica ou na carga e tamanho molecular. As alterações que ocorrem nas proteínas, quando separadas por eletroforese, possibilitam ao médico detectar e monitorizar vários estados fisiopatológicos. A EPS, complementada por procedimentos como quantificação das proteínas e imunofixação, fornece uma melhor ferramenta para a triagem geral do estado de saúde do ser humano.

As proteínas são classificadas pela sua posição final, uma vez concluída a eletroforese, em 5 regiões gerais: albumina, α_1 -globulinas, α_2 -globulinas, β -globulinas e γ -globulinas. As várias classes de imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE) exibem habitualmente mobilidade gama e ocupam a maior parte da região gama; entretanto, podem ser também encontradas nas regiões beta-gama e beta e, em certas ocasiões, podem estender-se à área da α_2 -globulinas.

A EPS mostra-se bastante útil para o diagnóstico e monitorização das gamopatias monoclonais.

Enquanto que a determinação das proteínas totais é feita no setor de bioquímica, a EPS é feita no setor de hematologia do laboratório.

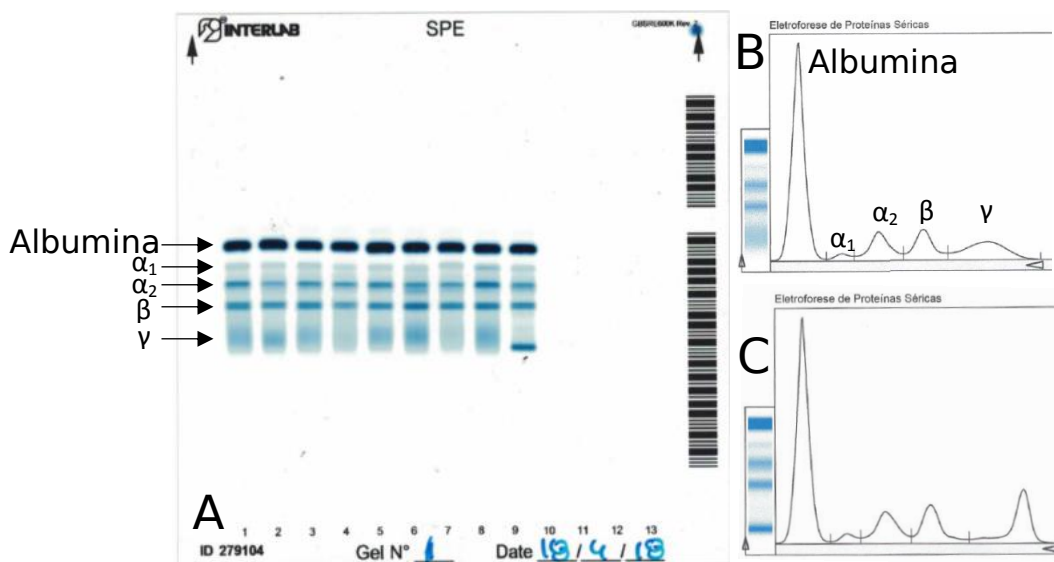


Figura 11: Eletroforese de proteínas séricas. (A) Separação eletroforética em gel de agarose das proteínas séricas de vários pacientes. (B) Perfil eletroforético normal. (C) Perfil eletroforético típico de uma gamopatia. (Imagens cedidas pelo LACCSMC).

Na figura 11 temos um exemplo de uma separação eletroforética de 9 amostras distintas. As amostras 1 a 8 apresentam perfis normais, enquanto a amostra 9 apresenta um pico monoclonal, na região das γ -globulinas,

4.7. Marcadores bioquímicos de lesão cardíaca

O infarto do miocárdio (IM) é o resultado do bloqueio do fluxo sanguíneo para o coração, levando a necrose irreversível deste órgão. Há a diminuição no volume de ejeção sanguínea e, portanto, um aumento da atividade cardíaca, como mecanismo compensatório, que aumenta a isquemia no tecido cardíaco.

A consequência inicial, bioquímica, da isquemia no miocárdio, consiste na cessação da glicólise aeróbica e conseqüentemente no estabelecimento da glicólise anaeróbica dentro de poucos segundos. Isso leva a uma produção insuficiente de fosfatos de alta energia (fosfato de creatinina e trifosfato de adenosina) e à acumulação de ácido láctico, o que resulta na diminuição do pH celular e em alterações metabólicas. Sem energia para a manutenção da atividade metabólica normal e integridade da membrana celular a célula morre por necrose, libertando as suas macromoléculas na circulação (Robbins *et al.*, 2000).

A lesão tecidual resulta na liberação de enzimas intracelulares para o sangue. Entre estas estão a lactato desidrogenase (LDH), creatinacina (CK), AST e troponina.

Atualmente, a AST não é utilizada na rotina laboratorial, como auxiliar no diagnóstico do IM devido à sua inespecificidade e por ser pouco sensível em relação a marcadores recentemente descobertos, como a troponina.

Apesar da determinação isolada da LDH também ser muito inespecífico de lesão cardíaca, combinada com outros marcadores, torna-se eficiente para o diagnóstico do IM.

A CK é uma enzima predominante em células musculares (músculo liso, cardíaco e esquelético) e cérebro. Por ser uma molécula dimérica, constituída por monómeros distintos denominados de M e B, a sua associação possibilita a formação de três isoenzimas a BB, a MB (mais específica do musculo cardíaco) e a MM.

A CK pode apresentar valores elevados em situações em que não há lesão do musculo cardíaco, por exemplo, traumas, cirurgias, intoxicações por barbitúricos, uso de anfotericina B, meningite bacteriana, encefalite, acidentes vasculares cerebrais, após exercício físico moderadamente intenso, ou ainda, devido a ingestão de álcool, entre outras condições. Deste modo, não se deve usar a CK de forma isolada como um marcador da lesão cardíaca.

A troponina é uma proteína estrutural, localizada no filamento fino do aparelho contráctil do músculo esquelético e cardíaco, que regula a interação cálcio-dependente entre a actina e a miosina. É constituída por três frações: troponina C (TnC), que se une ao cálcio; troponina I (TnI), molécula inibitória, que previne a contração na ausência do cálcio; troponina T (TnT), que se liga à tropomiosina.

É considerado um dos marcadores mais específicos na detecção do IM a longo prazo, porém tem a sua sensibilidade reduzida durante as primeiras 6 horas a partir do início dos sintomas. Apresentando-se negativo, deve-se realizar novamente até 12 horas depois. Por isso, é recomendável para avaliação do paciente que se apresentam depois de 24 horas do IM (López-Sendón, 2003).

Na figura 12 apresenta-se a variação dos níveis dos marcadores acima descritos ao longo dos dias após o IM. Nota-se que deve haver muito cuidado na hora de ser feita a requisição para avaliar estes marcadores, devido à sua grande variação ao longo do tempo após o infarto.

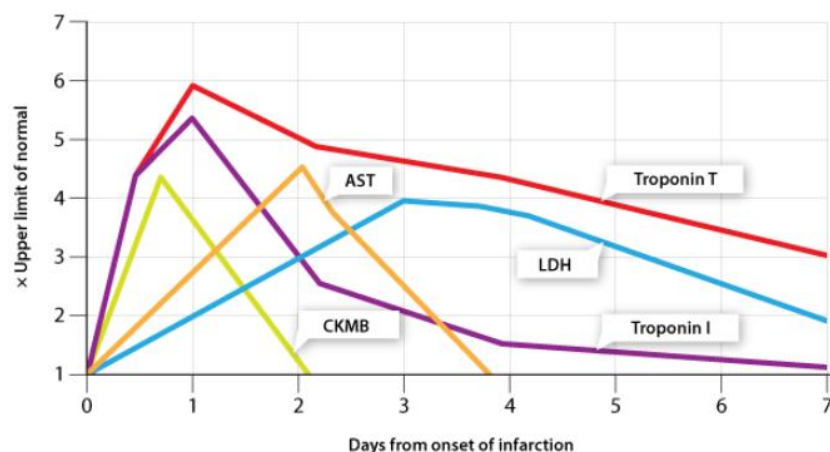


Figura 12: Padrões de libertação temporal de troponinas, CKMB, AST e LDH (adaptado de: <https://bpac.org.nz/BT/2009/December/troponin.aspx>).

No LACCSMC também é feito a determinação da homocisteína e da proteína C-reativa (PCR) que são indicadores de risco para doença cardiovascular.

A homocisteína é um aminoácido sulfurado produzido intracelularmente pela desmetilação da metionina. Evidências epidemiológicas mostram que a hiperhomocisteinemia é um fator de risco independente para a doença vascular, doença cerebral e arterial periférica, além de poder contribuir para a manifestação prematura e para a severidade da doença arterial e de representar um preditor de mortalidade, independentemente dos fatores de risco tradicionais conhecidos (Vannucchi, 2009).

A PCR é uma proteína hepática, produzida sob estímulo da interleucina-6, que desempenha papel primordial na resposta imune inata humana. Atualmente existem muitas evidências sobre o papel do processo inflamatório na fisiopatogenia da aterosclerose, sendo amplamente aceite que a inflamação a nível endotelial é o seu fator desencadeador. Níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios, particularmente a proteína C-reativa, mostram-se preditivos para angina instável, infarto do miocárdio e morte súbita em indivíduos adultos e idosos, com ou sem doença cardiovascular estabelecida, com mais eficiência do que poderia ser estimado pelos fatores de risco tradicionais (Blauth *et al.*, 2008).

4.8. Valores de referência

Na tabela 4 apresenta-se os valores de referência (para indivíduos do sexo masculino) de alguns marcadores bioquímicos avaliados no LACCSMC.

Tabela 4: Valores de referência para marcadores bioquímicos no LACCSMC.

Ensaio	Unidade	Intervalo de referência
Albumina	g/dL	3,4 – 4,8
ALP	U/L	< 150
ALT	U/L	< 55
AST	U/L	< 34
Bilirrubina Direta	mg/dL	< 0,50
Bilirrubina Total	mg/dL	0,29 – 1,20
Cálcio	mmol/L	2,10 – 2,55
CK	U/L	29 – 200
Cloreto	mm/dL	98 – 107
Colesterol Total	mg/dL	< 200
Creatinina	mg/dL	0,7– 1,3
GGT	U/L	< 64
Glicose	mg/dL	83–110
c-HDL	mg/dL	40 – 60
LDH	U/L	125 - 220
c-LDL	mg/dL	< 100
Potássio	mmol/L	3,4 – 5,1
Sódio	mmol/L	136–145
Triglicéridos	mg/dL	< 150

4.9. A minha experiência no setor de bioquímica

Assim como na hematologia, o trabalho diário tem início com a preparação do autoanalisador ARQUITECT ci8200. No LACCSMC o setor de bioquímica e imunologia estão no mesmo espaço, pois o equipamento realiza as determinações de química clínica e os ensaios imunoquímicos. No entanto, enquanto que o módulo de química clínica tem de ser calibrado diariamente, o módulo para os ensaios imunoquímicos é apenas calibrado uma vez por semana.

Dada a instabilidade dos reagentes da bioquímica, nem sempre todos os parâmetros produziam resultados dentro dos limites dos controlos logo na primeira tentativa, pelo que havia necessidade de repetir o teste, trocar o reagente, ou mesmo, trocar a amostra controlo. Após um certo tempo nesse setor consegui perceber qual era a melhor abordagem quando os controlos apresentavam erros.

Após todos os parâmetros estarem devidamente controlados, a rotina seguia com a análise dos soros dos pacientes. Era preciso ficar atento às requisições que acompanhavam as amostras, pois frequentemente apareciam análises que não eram feitas no LACCSMC, mas enviadas para outro laboratório com o qual possuía parceria. Assim, era preciso fazer a correta identificação do soro, bem como o seu armazenamento (refrigeração ou congelação, dependendo da análise) até ao envio para o outro laboratório.

Ao fim do dia era retirada uma alíquota dos soros dos pacientes, e guardada em arca congeladora à -80°C , onde essas alíquotas ficam armazenadas pelo tempo mínimo de cinco anos.

Acompanhar a rotina deste setor, bem como analisar e discutir os resultados das amostras com o técnico do setor e o diretor técnico do laboratório, foram muito importantes para firmar os conhecimentos adquiridos ao longo das cadeiras teóricas do curso.

5. IMUNOLOGIA

O setor de Imunologia ficava junto do setor de bioquímica, logo, a rotina diária era bastante semelhante. Os ensaios imunoquímicos executados no LACCSMC permitiam a avaliação e análise de marcadores da: anemia, infarto agudo do miocárdio, função endócrina, carcinomas, serologia de infecções bacterianas e víricas e alergias.

Apesar de não possuir um fluxo de amostras muito grande, tornou possível uma análise mais calma e detalhada dos resultados apresentados nas análises.

Foi uma mais valia, ter os dois setores no mesmo local, assim era possível cruzar os dados da bioquímica e imunologia para verificar se os valores encontrados eram concordantes.

6. MICROBIOLOGIA

A Microbiologia clínica é a especialidade que estuda os principais agentes microbianos causadores de doenças infecto-contagiosas em humanos (vírus, bactérias, parasitas ou fungos). Neste setor pude aperfeiçoar e adquirir autonomia na realização de culturas bacteriológicas, saber escolher o meio correto para a pesquisa de bactéria pretendida, identificar corretamente a bactéria em estudo, executar e interpretar o antibiograma e executar exames parasitológicos de fezes.

O exame mais requisitado eram as uroculturas, mas também haviam requisições para coproculturas, exame parasitológico de fezes e cultura de exsudatos nasais, além de pesquisa e cultura de fungos em raspados de pele.

7. CONCLUSÃO

A realização deste estágio foi de suma importância para o bom aproveitamento do Mestrado. No LACCSMC tive a oportunidade de aplicar todo o conhecimento teórico que adquiri ao longo do curso, fora os conhecimentos em novos procedimentos, técnicas, conceitos e métodos. Isso só foi possível graças à ótima equipa técnica do laboratório, sempre disposta a ensinar e ajudar.

O estágio também fez com que eu percebesse a grande responsabilidade que os funcionários de um laboratório de análises clínicas possuem, principalmente no que diz respeito aos controlos de qualidade interno e externo. Sem eles ficamos impossibilitados de lançar um resultado com a segurança que os valores, determinados representam, para a realidade do paciente.

8. Bibliografia

Baynes, J.W., Dominiczak, M.H., *Bioquímica Médica*, Elsevier, Rio de Janeiro, 3rd Ed. (2010).

Blauth, F., Lara, G.M., Wagner, S.C., Reichert, C.L., Associação entre fatores de risco cardiovascular e proteína C-reativa em mulheres idosas. *Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial* 44 (2008) 83-88.

Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008).

Comar, S.R., Danchura, H.S.M., Silva, P.H., Platelet count: evaluation of manual methodologies and application in the laboratory routine. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 31 (2009) 431-436.

Costa, M.J., Batalha Reis, A., Silva, C., Fernandes, I., Lopes, S., Júnior, E., Avaliação do Cell-Dyn 3500. *Acta Médica Portuguesa* 9 (1996) 309-318.

Devlin, T.M., *Textbook of biochemistry: with clinical correlations*, John Wiley & Sons, New Jersey, 6th Ed. (2007).

Di Nuzzo D.V.P., Fonseca S.F., Anemia falciforme e infecções. *Jornal de pediatria* 80 (2004) 347-354.

Erichsen, M., Viana, L., Faria, R., Santos, S., *Medicina Laboratorial para o Clínico*, Coopmed, Belo Horizonte, 1st Ed. (2009).

Failace, R., Fernandes, F.B., Failace, R., *Hemograma manual de interpretação*, Artmed, Porto Alegre, 4th Ed. (2009).

Graça, R.F., Citologia para clínicos: como utilizar esta ferramenta diagnóstica. *Acta Scientiae Veterinariae* 35 (2007) 267-269.

Gross J.L., Silveiro, S.P., Camargo, J.L., Reichelt, A.J., Azevedo, M.J., Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 46 (2002) 16-26.

Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H., *Fundamentos em hematologia*, Artmed, Porto Alegre, 6th Ed. (2013).

Horton, J.D., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *Journal of Lipid Research* 50 (2009) 172-177.

Levey, N.S., Stevens, L.A., Schmid, C.H., Zhang, Y., Castro, A.F., Feldman, H.I., et al., A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Annals of Internal Medicine* 150 (2009) 604-612.

López-Sendón J., Troponinas y otros marcadores de daño miocárdico. Mitos y realidades. *Revista Española de Cardiología* 56 (2003) 9-16.

Lorenzi, T.F., *Manual de Hematologia – Propedêutica e Clínica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4th Ed. (2006).

Motta, V.T., *Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações*. Missau, Porto Alegre, 4th Ed. (2003).

Murao, M., Ferraz, M.H.C., Sickle cell trait: heterozygous for the hemoglobin S. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 29 (2007) 223-225.

Norma da DGS N° 002/2011, de 14/01/2011;” Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus”

Piaton, E. et al, Technical recommendations and best practice guidelines for May-Grünwald-Giemsa staining: literature review and insights from the quality assurance; *Anales de Pathologie* 35 (2015) 294-305.

Robbins, S.L., Cotran, R.S., Kumar, V.Y., *Patologia estrutural e funcional*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 6th Ed. (2000).

Ross, J.W., Miller, W.G., Myers, G.L., Praestgaard, J., The accuracy of laboratory measurements in clinical chemistry: a study of 11 routine chemistry analytes in the College of American Pathologists Chemistry Survey with fresh frozen serum, definitive methods, and reference methods. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 122 (1998) 587-608.

Santos, V.M., Cunha, S.F.C., Cunha, D.F., Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. *Revista da Associação Médica Brasileira* 46 (2000) 232-236.

Saudek, C.D., Brick, J.C., The Clinical Use of Hemoglobin A1c. *Journal of diabetes science and technology* 4 (2009) 629-634.

Sherwani, S.I., Khan, H.A., Ekhzaimy, A., Masood, A., & Sakharkar, M K., Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomarker Insights* 11 (2016) 95-104.

Sumita, N.M., Andriolo, A., Importância da hemoglobina glicada no controle do diabetes mellitus e na avaliação de risco das complicações crônicas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 44 (2008) 169-174.

Tomé-Alves, R., Marchi-Salvador, D.P., Orlando, G.M., Palharini, L.A., Imperial, R.E., Naoum, P.C., Bonini-Domingos, C.R., Hemoglobins AS/alpha thalassemia: diagnostic importance. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 22 (2000) 388-394.

Vannucchi, H., Melo, S.S., Hyperhomocysteinemia and cardiometabolic risk. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 53 (2009) 540–549.

Whitfield, J.B., Gamma Glutamyl Transferase. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 38 (2001) 263-355.

Williamson, M.A., Snyder, L.M., Wallach interpretação de exames laboratoriais. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 9th Ed. (2013).

Zamin Jr, I., Mattos, A.A., Perin, C., Ramos, G.Z., A importância do índice AST/ALT no diagnóstico da esteatohepatite não-alcoólica. *Arquivos de Gastroenterologia* 39 (2002) 22-26.