

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Renata Luís da Silva Machado do Amaral

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

VOLUME 1

Dissertação no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas
orientada pelo/a Professor/a Doutor/a Mário João Gonçalves
Roque e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de
Coimbra.

Julho de 2019

Renata Luís da Silva Machado do Amaral

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Mestrado em Análises Clínicas

Laboratório de Análises Clínicas do Centro
de Saúde Militar de Coimbra

Relatório de estágio no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas orientado
pelo Dr. Mário João Gonçalves Roque e apresentado à Faculdade
de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2019

Índice Geral

Índice de Tabelas.....	5
Índice de Imagens.....	5
Abreviaturas.....	7
Resumo	10
Abstract	10
Introdução.....	11
Caracterização do Laboratório.....	11
Controlos de Qualidade.....	12
I. Sector de Hematologia.....	13
1. Hematopoiese.....	14
1.1. Eritropoiese	15
1.2. Linfopoiese	17
1.3. Granulopoiese.....	17
1.4. Produção de monócitos	18
1.5. Megacariopoiese	19
2. Hemostasia	20
3. Hemograma.....	21
4. Contagem de reticulócitos.....	24
5. Esfregaço sanguíneo.....	26
6. Contagem diferencial.....	29
7. Doseamento da hemoglobina A1c.....	30
8. Electroforese de hemoglobinas	32
9. Velocidade de sedimentação.....	34
10. Grupo sanguíneo AB0 e Rhesus (Rh).....	34
11. Provas da coagulação.....	37
12. Caso Clínico	38
II. Sector de Imunologia.....	40
1. Sistema Imunológico.....	41
1.1. Resposta primária e resposta secundária.....	43
2. Imunoensaios.....	45

2.1. Quimioluminescência.....	45
3. Marcadores serológicos.....	46
3.1. Marcadores de infecção viral.....	46
a) Hepatite A.....	46
b) Hepatite B.....	47
c) Hepatite C.....	49
d) Vírus da imunodeficiência humana (HIV).....	50
3.2. Marcadores de infecção por <i>Treponema pallidum</i>	51
4. Marcadores do cancro da próstata	52
4.1. PSA e PSA livre	53
5. Marcadores cardíacos	53
5.1. Troponina I.....	53
5.2. Mioglobina.....	54
5.3. CKMB.....	54
6. Marcadores da tiróide.....	55
6.1. Anti-TG	56
6.2. Anti-TPO.....	56
6.3. TSH.....	56
6.4. Hormonas da tiróide	57
7. Marcadores de anemia	57
7.1. Vitamina B ₁₂	58
7.2. Folato	58
Conclusão.....	60
Bibliografia	61

Índice de Tabelas

Tabela 1: Listagem de todos os métodos utilizados no sector de hematologia, respectivos analisadores, e os parâmetros avaliados por cada método	14
Tabela 2: Critérios para execução de esfregaço de sangue.....	26
Tabela 3: Os diferentes grupos sanguíneos com a(s) respectiva(s) aglutinogénios e anticorpos associados a cada um deles	35
Tabela 4: Tabela de Punnett mostrando todas as possibilidades de combinação genética para o grupo AB0.....	35

Índice de Imagens

Figura 1: Esquema ilustrativo da eritropoiese. (Fonte: Post-graduate Hematology, 7ª edição)	15
Figura 2: Fases da eritropoiese. (Fonte: http://www.moodle.mouro.com/EVA/picture.php?/2839).....	16
Figura 3: Esfregaço sanguíneo de um indivíduo com leucemia mieloide, mostrando células precursoras da linhagem granulocítica: mieloblastos, mielócitos e células em banda (Fonte: B. Bain, Blood Cells: a practical guide, 5ª edição).....	18
Figura 4: Megacariopoiese. (Fonte: John D. Crispino, <u>Seminars in Cell & Developmental Biology</u> , 2005).....	20
Figura 5: Esquema ilustrativo da cascata de coagulação (Fonte: Cagnolati D, Sankarankutty AK, Rocha JPS, Beer A, Silva OCE. Hemostasia E Distúrbios Da Coagulação)	21
Figura 6: Apresentação dos resultados do hemograma realizado no Cell-DYN Ruby (Fonte: https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/28203/1/Relat%C3%B3rio%20Jorge%20Paiva.pdf	24
Figura 7: Algumas das alterações morfológicas possíveis para os eritrócitos (Fonte: V. Hoffbrand, P.A.H Moss, Fundamentos de Hematologia, 6ª edição)	26
Figura 8: Esfregaço de sangue com um neutrófilo bilobado, um eosinófilo sem lóbulos nucleares, e hipocromia no sangue de um indivíduo com Pelger-Huet (à esquerda); neutrófilo hipersegmentado e anisocitose (à direita) (Fonte: B. Bain, Blood Cells: a practical guide, 5ª edição).....	27

Figura 9: Compatibilidade entre os grupos sanguíneos. (Fonte: https://www.rch.org.au/bloodtrans/about_blood_products/Blood_Groups_and_Compatibilities/)	33
Figura 10: Esfregaço sanguíneo mostrando uma população de eritrócitos microcíticos e hipocrômicos, e outra com eritrócitos normais.....	39
Figura 11: Resposta primária e secundária. (Fonte: Abbas, Abdul K., Lichtman, Andrew H., Pillai, Shiv, Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, 5ª edição).....	41
Figura 12: Serologia de uma infecção por HAV. (Fonte: https://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hepatology/hepatitisA/)	43
Figura 13: Serologia de uma infecção por HBV resolvida, em que há produção de HBsAc que confere imunidade à doença (<i>à esquerda</i>); serologia de uma infecção por HBV crónica, em que o HBsAg se mantém elevado, sem produção de HBsAc (<i>à direita</i>) (Fonte: https://microbeonline.com/serological-diagnosis-of-hepatitis-a-and-hepatitis-bvirusinfection/).....	45
Figura 14: Interpretação dos resultados dos marcadores serológicos da infecção por HBV (Fonte: https://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/pdfs/serologicchartv8.pdf) (editado)	45
Figura 15: Serologia de uma infecção por HCV. Primeiro surge o RNA viral, depois as transaminases (ALT), e, mais tarde, surgem os anticorpos contra HCV. (Fonte: https://www.hepatitisc.uw.edu/pdf/screening-diagnosis/acute-diagnosis/core-concept/all	46
Figura 16: Evolução da serologia de uma infecção por HIV (Fonte: https://www.canada.ca/en/public-	47
Figura 17: Algoritmo para o diagnóstico de infecção por <i>Treponema pallidum</i> . (Fonte: abbott-architect-syphilis-tp-sellsheet.pdf).....	49
Figura 18: Libertação de mioglobina, CKMB e troponina I após enfarte agudo do miocárdio. (Fonte: http://yousense.info/63617264696163/cardiac-marker-an-overview-sciencedirect-topics.html).....	50

Abreviaturas

Ac: Anticorpo

Ag: Antígeno

ALT: Alanina aminotransferase

APTT: Tempo de tromboplastina parcial activado

AST: Aspartato aminotransferase

ATP: Adenosina-trifosfato

BCR: “B-cell receptor”

CK: Creatina-cinase

CKMB: Creatina-cinase isoenzima MB (músculo e cérebro)

CMV: Citomegalovirus

CQE: Controlo de qualidade externo

CQI: Controlo de qualidade interno

DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1

DM2: Diabetes *mellitus* tipo 2

DNA: ácido desoxirribonucleico

FS: Dispersão frontal

FT: Factor tecidual

G6P: Glicose-6-fosfato

HAV: Vírus da hepatite A

HAVAc-IgM: Anticorpos

anti-HAV do tipo IgM

HAVAc-IgG: Anticorpos

anti-HAV do tipo IgG

HbA1c: Hemoglobina glicada

HbcAg: Antígeno do “core” do vírus da hepatite B

HbeAg: Antígeno do envelope do vírus da hepatite B

HbF: Hemoglobina fetal

HbsAg: Antígeno S do vírus da hepatite B

HBV: Vírus da hepatite B

HCT: Hematócrito

HCV: Vírus da hepatite C

HGB: Hemoglobina

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

HPLC: Cromatografia líquida de alta performance

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

INR: Índice normalizado internacional

LDH: Lactato-desidrogenase

MCHC: Concentração de hemoglobina corpuscular média

MCV: Volume corpuscular médio

PLT: Plaquetas

PSA: Antígeno específico da próstata

PT: Tempo de Protrombina

RBC: Eritrócitos

RDW: “Red Cell Distribution Width”

RNA: ácido ribonucleico

SIDA: Síndrome da imunodeficiência humana

SS: Dispersão lateral

ssDNA: DNA de cadeia simples

T3: Triiodotiroxina

T4: Tetraiodotironina

TFPI: Proteína inibidora do factor tecidual

TP: *Treponema pallidum*

TPO: Tiroxina-peroxidase

TRH: hormona reguladora da

tiroide

TSH: hormona estimuladora da tiroide

VE: Valor esperado

VS: Velocidade de sedimentação

VW: Factor Von-Willebrand

WBC: Leucócitos

γ-GT: Gama glutamil-transferase

Resumo

Este relatório debruça-se sobre um estágio curricular, realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas.

O relatório tem por objectivo realçar a importância dos controlos de qualidade para garantir a fiabilidade e reprodutibilidade dos resultados, e descrever todas as metodologias utilizadas nas áreas de hematologia e imunologia, enumerando todos parâmetros avaliados.

Os sectores de bioquímica e microbiologia são referenciados na caracterização do laboratório, mas não serão tão aprofundados.

Palavras-chave: hematologia imunologia eritrócitos anticorpos sangue

Abstract

This report focuses on a curricular internship, held at the Laboratory of Clinical Analysis of the Center for Military Health of Coimbra, within the scope of the Master in Clinical Analyzes.

The report aims to highlight the importance of quality controls to ensure reliability and reproducibility of results and to describe all the methodologies used in the areas of hematology and immunology, enumerating all parameters evaluated.

The sectors of biochemistry and microbiology are referenced in the characterization of the laboratory, but will not be as thorough.

Introdução

No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, é realizado um estágio curricular, no segundo ano, com o objectivo de consolidar os conhecimentos adquiridos. De modo a avaliar os conhecimentos adquiridos durante o estágio, é necessário o desenvolvimento de um relatório, que será, no final, apresentado e discutido.

No relatório, são numeradas todas as técnicas usadas no laboratório, explicam-se os fundamentos de cada técnica e a sua aplicação clínica, nas quatro valências que compõem o laboratório (imunologia, hematologia, bioquímica e microbiologia). Este relatório em particular irá dar ênfase às valências de Imunologia e Hematologia.

Caracterização do Laboratório

O laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra está estruturalmente organizado em vários sectores: sala de espera, secretaria, sala de colheitas, sala de lavagem de materiais, e pelos sectores de hematologia, imunologia e bioquímica, e microbiologia.

Na secretaria é feita a recepção do utente; os dados da requisição do médico são conferidos e passados para o sistema informático. A cada utente vai corresponder um número e um código de barras que vão identificar as amostras.

Na sala de colheitas faz-se a colheita dos produtos biológicos aos utentes, e a recepção de outros tipos de amostras biológicas, como urina, fezes, exsudatos nasais, exsudatos de feridas e raspados de unhas, colhidas externamente.

Os tubos para a colheita de sangue diferem, e são distinguidos pela cor das tampas:

- Tampa roxa: o anticoagulante é o EDTA. É usado para hemogramas, determinação da hemoglobina glicada e eletroforese de hemoglobinas.
- Tampa azul: o anticoagulante é o citrato de sódio. É usado para estudo de coagulação.
- Tampa preta: o anticoagulante é o citrato de sódio. Este tubo é mais delgado e longo comparativamente aos demais. É unicamente utilizado para avaliar a velocidade de sedimentação.

- Tampa amarela: estes tubos são usados para a separação do soro. Os tubos têm que ser centrifugados a 4000 rpm durante 8 minutos. O tubo tem um gel que separa o soro dos componentes celulares do sangue.

As amostras são identificadas com o respectivo código de barras e seguem para os sectores de processamento das amostras, onde vão ser feitas as determinações analíticas.

No sector de hematologia, os parâmetros avaliados são o hemograma, a determinação da HbA1c, a eletroforese das hemoglobinas, a velocidade de sedimentação, a determinação do grupo sanguíneo e o estudo da coagulação (através do PT, APTT e fibrinogénio).

No sector de imunologia e bioquímica, que possui apenas um autoanalisador que está dividido em dois módulos: o módulo 1 faz a determinação de parâmetros com recurso a técnicas de espectrofotometria; o módulo 2 faz a determinação dos parâmetros analíticos com recurso a quimioluminescência.

No sector de microbiologia processam-se todas as amostras biológicas que não o sangue. A análise sumária de urina é feita por espectrofotometria; as restantes análises e técnicas são manuais, e realizadas em meio asséptico, numa câmara de fluxo laminar.

Controlos de Qualidade

Os controlos de qualidade são executados com vista a garantir a exactidão e precisão dos resultados fornecidos pelo laboratório.

Há dois tipos de controlos de qualidade: o controlo de qualidade externo e o controlo de qualidade interno.

O CQE visa avaliar a exactidão dos resultados obtidos. É uma avaliação inter-laboratorial, em que uma amostra é analisada para o mesmo parâmetro por vários laboratórios diferentes. Os valores obtidos pelos diferentes laboratórios são comparados entre si, e comparados com o valor obtido pelo laboratório de referência internacional (RIQAS).

O CQI é feito diariamente. Visa garantir a reprodutibilidade dos resultados. Vai avaliar a precisão dos resultados obtidos, ou seja, garantir que não hajam grandes variações entre os resultados obtidos para uma mesma amostra, para um mesmo parâmetro.

Os resultados devem, portanto, cair dentro de uma determinada gama de valores. Os controlos são passados nos analisadores como amostras, e a cada controlo está associado um valor esperado para o parâmetro em causa. O intervalo de valores que se considera aceitável para um controlo varia entre $VE-2\delta$ e $VE+2\delta$.

Os resultados dos CQIs são analisados numa carta-controlo, onde está representado o gráfico Levey-Jennings, com a escala de valores dos desvios-padrão. A distribuição dos valores obtidos pelo controlo de qualidade na carta-controlo, ao longo do tempo, deve seguir as regras de Westgard, ou os controlos não podem ser validados. A validação dos controlos é necessária para que se possa validar os resultados obtidos posteriormente, para as amostras dos doentes.

I. Sector de Hematologia

O sector de hematologia foca-se no estudo de patologias do sangue, e, para tal, faz-se: a quantificação dos componentes celulares do sangue (eritrócitos, reticulócitos, leucócitos e plaquetas); o doseamento da hemoglobina A1c; a eletroforese das hemoglobinas; a velocidade de sedimentação; e as provas de coagulação e a determinação do grupo sanguíneo AB0 e Rh.

Tabela I: Listagem de todos os métodos utilizados no sector de hematologia, respectivos analisadores, e os parâmetros avaliados por cada método

Método	Aparelho	Parâmetros analíticos
Citometria de fluxo	CELL-DYN Ruby (Abbott)	Hemograma; contagem de reticulócitos
HPLC	Adams A1c HA-8160 (Arkray)	HbA1c
Electroforese	Pretty (Interlab)	Doseamento das variantes de hemoglobina
Westergren	Vacutainer Sedi-15 (Beckam)	Velocidade de sedimentação eritrocitária
Método cronométrico	Option 2 PLUS (Biomerieux)	PT, APTT e fibrinogénio
Prova de aglutinação	—	Determinação dos grupos sanguíneos AB0 e Rh

1. Hematopoiese

O sangue é um tecido constituído por uma componente celular, onde figuram eritrócitos, leucócitos e plaquetas, e uma fase líquida, o plasma, que serve de suporte às células sanguíneas em circulação, e é constituído por água, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, iões, entre outros.

A hematopoiese é o processo de produção das diferentes células sanguíneas que constituem o sangue. No adulto, a hematopoiese ocorre na medula óssea do esqueleto central e da diáfise dos ossos longos; as células que são encontradas no sangue periférico, num indivíduo saudável, são as células sanguíneas maduras.

A hematopoiese inicia-se com uma célula pluripotente. Esta célula tem a capacidade de autorrenovação, no qual, ao dividir-se, dá origem a uma célula estaminal (o que repõe o pool de células estaminais) e uma célula que se compromete para diferenciação. Esta última pode dar origem a dois tipos de células precursoras: a célula precursora linfoide e a célula precursora mieloide. A célula precursora linfoide dá origem aos linfócitos B, T e NK, e a célula precursora mieloide dá origem aos granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), eritrócitos, plaquetas e monócitos, tal como está ilustrado na figura 1. À medida que o processo de diferenciação progride, as células vão-se tornando mais restritas no que diz respeito às células sanguíneas que podem formar.

O tipo de células que se vai formar no final da diferenciação é determinado pela acção de factores de crescimento e interleucinas, que orientam o curso da diferenciação para a produção de determinado tipo de células, consoante as necessidades do organismo (A. V. Hoffbrand, P. A. H. Moss, 2013).

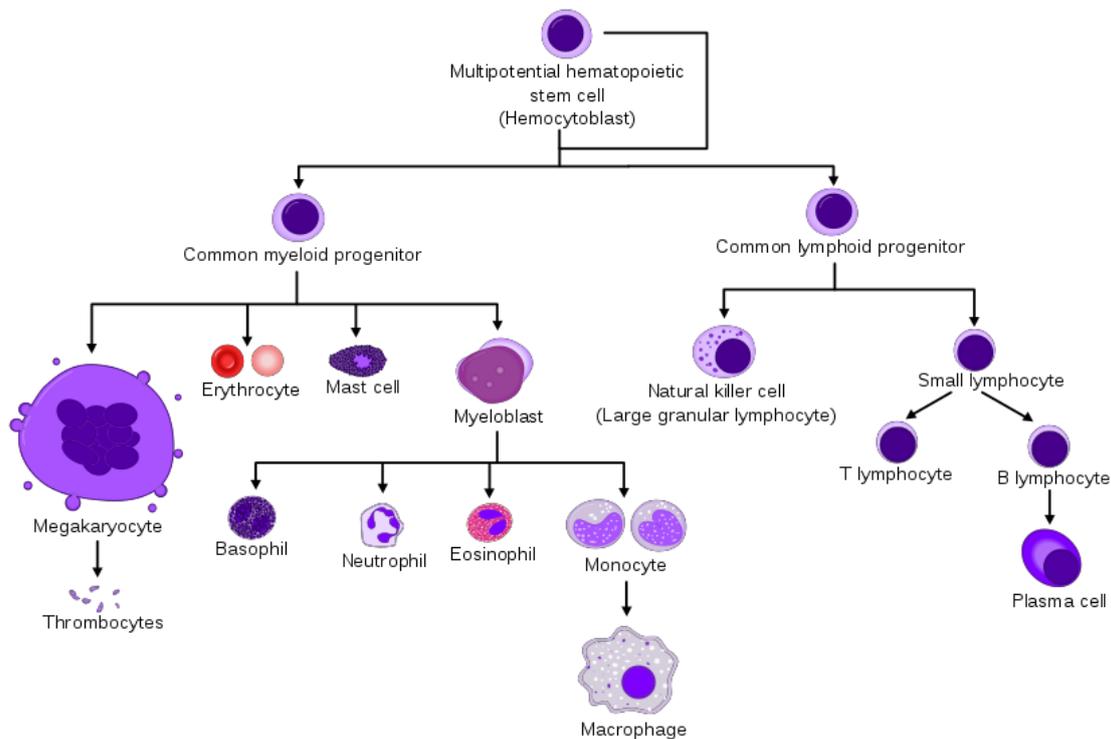


Figura 1: Esquema ilustrativo da hematopoiese. A hematopoiese inicia-se com uma célula pluripotente que, por divisão, origina outra célula estaminal (autorrenovação) e outra célula que se compromete para diferenciação. Esta última dará origem a duas células precursoras: uma da linhagem linfóide (dá origem aos linfócitos B, T e NK) e outra da linhagem mieloide (dá origem às restantes células sanguíneas) (Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:He_matopoiesis_simple.svg)

1.1. Eritropoiese

A eritropoiese é a produção de eritrócitos. Os eritrócitos são as células mais abundantes no sangue, e caracterizam-se por serem anucleados, com formato bicôncavo, e pelo conteúdo celular ser essencialmente preenchido por moléculas de hemoglobina, a proteína responsável pelas trocas gasosas entre o sangue e os restantes tecidos do organismo.

O estímulo para a produção de eritrócitos é a baixa tensão de oxigénio no tecido renal, que se pode verificar em casos de anemia, hemorragias, hemólise, etc. Em resposta, o rim sintetiza a hormona eritropoetina, que estimula a diferenciação das células estaminais da medula em eritrócitos. O primeiro precursor eritroide é o proeritroblasto que, por divisão, origina uma série de blastos sucessivamente menores e com conteúdo em hemoglobina maior. Eventualmente, o eritroblasto picnótico acaba por perder o núcleo, dando origem a uma célula que possui apenas RNA ribossómico a produzir hemoglobina (o reticulócito). Num indivíduo saudável, os

reticulócitos são as únicas células precursoras que podem surgir no sangue periférico; todas as outras se restringem à medula óssea.

O reticulócito vai acabar por catabolizar todo o RNA ribossômico, e forma-se o eritrócito maduro. A figura 2 ilustra as fases da eritropoiese, desde o proeritroblasto até ao eritrócito. Os eritrócitos têm uma vida média, em circulação, de cerca de 120 dias. Por não possuírem núcleo nem organelos celulares, o seu metabolismo é essencialmente anaeróbio: a partir da via glicolítica, o eritrócito produz ATP, que é usado para manter a elasticidade da membrana celular e regular a osmolaridade da célula, e NADH que fornece poder redutor necessário para proteger a célula do stress oxidativo provocado pelo transporte do oxigénio. A glicólise é mediada pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), e uma deficiência nesta enzima torna a célula mais sensível ao stress oxidativo.

A hemoglobina é a proteína maioritária no interior do eritrócito, e é especializada no transporte de oxigénio: é um tetrâmero de cadeias de globina, cada uma ligada a um grupo heme que possui um núcleo com um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}). A hemoglobina maioritária no adulto é a hemoglobina A (HbA), constituída por duas cadeias α e duas cadeias β ($\alpha_2\beta_2$). Em menor percentagem, surgem outros dois tipos de hemoglobinas, a hemoglobina A2 ($\alpha_2\gamma_2$) e a hemoglobina fetal ($\alpha_2\delta_2$). Certas hemoglobinopatias são caracterizadas pelo aparecimento de variantes de hemoglobina, que são detectáveis por electroforese. São exemplos a hemoglobina S na anemia falciforme ou a hemoglobina de Burton (β_4) na alfa-talassémia (A. V. Hoffbrand, P. A. H. Moss, 2013).

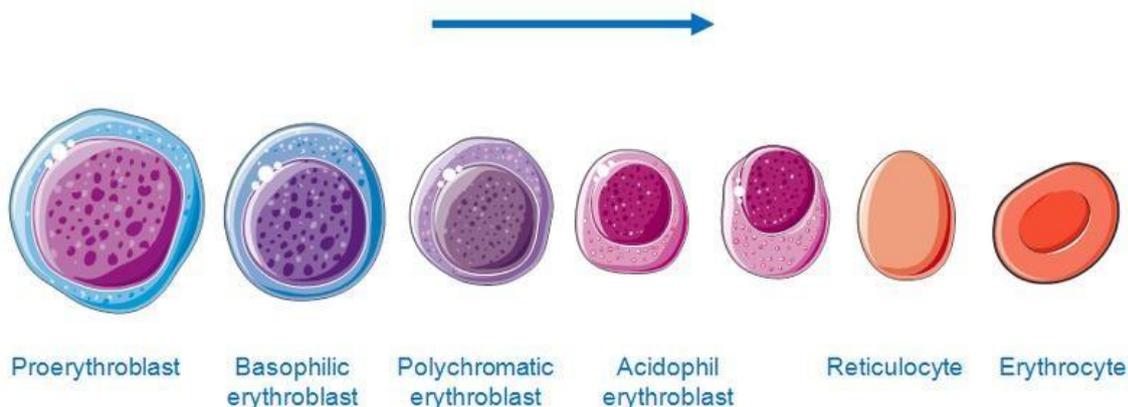


Figura 2: Fases da eritropoiese. A eritropoiese inicia-se com um proeritroblasto que, por divisão, origina uma série de blastos progressivamente menores, e com conteúdo gradualmente maior em hemoglobina. O eritroblasto picnótico perde o núcleo, e forma-se o eritrócito (Fonte: <http://www.moodle.mouro.com/EVA/picture.php?/2839>)

1.2. Linfopoiese

A produção de linfócitos B, T e NK inicia-se com um precursor comum, a partir do qual as duas linhas celulares divergem por caminhos de diferenciação diferentes. Para os linfócitos T, as células precursoras (protimócitos) migram para o timo, onde se dá a maturação para os linfócitos T CD4⁺ (T auxiliares) ou T CD8⁺ (T citotóxicos). Os linfócitos T CD4 são responsáveis por auxiliar a proliferação e diferenciação dos linfócitos B activados; os linfócitos T CD8 estão envolvidos nas respostas citotóxicas a células infetadas por vírus, ou células neoplásicas. (A.V. Hoffman, P. A. H. Moss).

Os linfócitos B são as células responsáveis pela produção de anticorpos (resposta imune humoral). Os linfócitos B naive são produzidos na medula e passam para a linfa; se ligarem a um antígeno específico, eles retornam à medula óssea, onde se diferenciam em plasmócitos produtores de imunoglobulinas.

As células NK são as células “natural-killer” que estão envolvidas em respostas citotóxicas que são induzidas pela perda de expressão de MHCI. O MHCI é expresso em todas as células do organismo, e a ligação do MHCI ao receptor das NK inibe a desgranulação das células NK. Quando há perda de expressão do MHCI (em células tumorais ou infecções virais) deixa de haver esta inibição: as NK libertam os conteúdos citoplasmáticos sobre a célula-alvo, levando à sua destruição (Bessoles S, *et al.*, 2014).

Um aumento do número de linfócitos no sangue (linfocitose) pode ser surgir em infecções bacterianas ou parasitárias, algumas doenças autoimunes, hipertiroidismo, etc.

1.3. Granulopoiese

Os granulócitos são todas as células sanguíneas que possuem grânulos no citoplasma: os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos. Os três tipos de células formam-se a partir de um mieloblasto comum. O mieloblasto é uma célula de núcleo redondo, um ou dois nucléolos visíveis, e sem granulações citoplasmáticas. Durante o processo de diferenciação de um granulócito, começam a surgir grânulos na célula. Estes grânulos são os grânulos primários ou azurofílicos (estado de promielócito); o mielócito que se forma a seguir já tem um núcleo oval, e não tem nucléolos; o metamielócito (ou mielócito em bastão) é caracterizado por possuir um núcleo reniforme, citoplasma acidófilo e presença de grânulos secundários (ou específicos). As células da linhagem mieloide estão representadas na figura 3.

O neutrófilo maduro possui grânulos secundários, e tem um núcleo multilobulado (3-5 lóbulos). O aumento do número de neutrófilos no sangue (neutrofilia) pode ser devido a infecções, inflamação crônica, leucemia mieloide crônica e outras neoplasias mieloproliferativas.

Os eosinófilos maduros possuem núcleo bilobado, e grânulos alaranjados no citoplasma. Eosinofilia pode surgir em casos de infecções parasitárias, reações alérgicas, leucemias ou linfoma de-Hodgkin.

Os basófilos possuem grânulos grandes e escuros, que se sobrepõem ao núcleo. Estes grânulos contêm principalmente histamina. Basofilia geralmente surge associada a inflamação crônica e neoplasias mieloproliferativas (B. Bain, 2015)

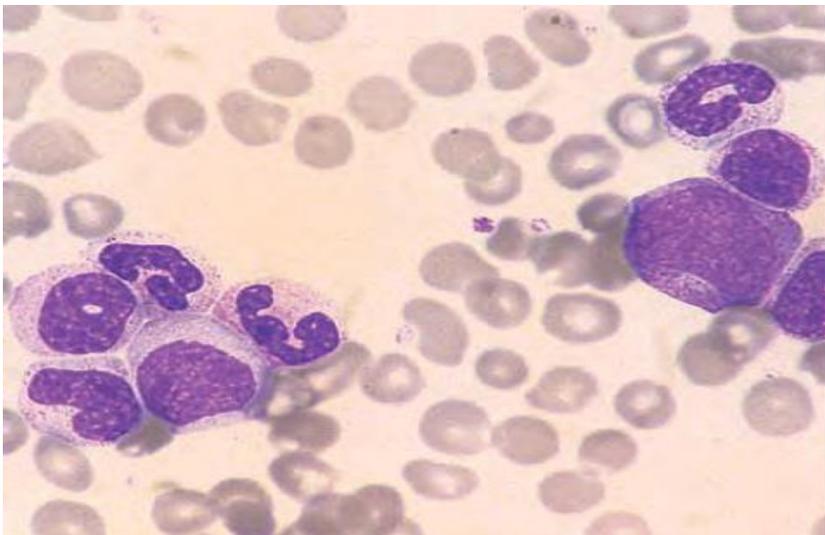


Figura 3: Esfregaço sanguíneo de um indivíduo com leucemia mieloide, mostrando células precursoras da linhagem granulocítica: mieloblastos, mielócitos e células em banda. (Fonte: B. Bain, Blood Cells: a practical guide, 5ª edição).

1.4. Produção de monócitos

A diferenciação dos monócitos inicia-se com um monoblasto precursor. O monoblasto apresenta um núcleo redondo com dois nucléolos. Por diferenciação vai dar depois origem ao promonócito, que possui um núcleo oval, excêntrico e sem nucléolos, e pequenos grânulos citoplasmáticos. Por fim forma-se o monócito maduro, que possui um núcleo difuso, e citoplasma abundante, com vacúolos. Monocitose pode verificar-se em leucemias mielomonocíticas, em que há, paralelamente, o aparecimento de células precursoras no sangue periférico.

1.5. Megacariopoiese

A formação de megacariócitos precede a formação de plaquetas sanguíneas. O estímulo para a diferenciação de megacariócitos é a trombopoetina, uma hormona produzida a nível hepático e renal. O megacarioblasto é o primeiro precursor da linhagem megacariocítica. Este começa a sofrer endomitoses sucessivas (processo em que o núcleo se divide, mas não o citoplasma), e dá origem ao promegacariócito, uma célula multinucleada e com produção de grânulos citoplasmáticos.

O megacariócito maduro é uma célula grande, que contém vários núcleos lobulares, e grânulos citoplasmáticos. A partir da fragmentação do citoplasma, cada megacariócito dá origem a milhares de plaquetas. As plaquetas são as únicas estruturas que abandonam a medula para entrar na circulação periférica. Elas têm um papel importante na hemóstase, estando envolvidas na formação do trombo plaquetar primário (que antecede a formação de um coágulo) quando há ruptura de um vaso. A figura 4 ilustra as fases da megacariopoiese, desde o megacarioblasto à formação das plaquetas.

Os termos trombocitose e trombocitopenia são usados para descrever um aumento ou uma diminuição do número de plaquetas no sangue, respectivamente. Ambas as condições estão associadas a coagulopatias: enquanto a trombocitose agrava o risco de trombose, a trombocitopenia provoca hemorragias prolongadas (após um corte, por exemplo) e hemorragia interna. (A. V. Hoffbrand, P. A. H. Moss, 2013).

Trombocitose associa-se à trombocitémia essencial, em que há uma produção exacerbada de plaquetas [n° plaquetas $> 450 \times 10^9/L$, IR: 140-440 ($\times 10^9/L$)]. A trombocitopenia é usualmente secundária a outras patologias, tais como leucemias ou doenças autoimunes (A.V. Hoffbrand, P. A. H. Moss, 2013).

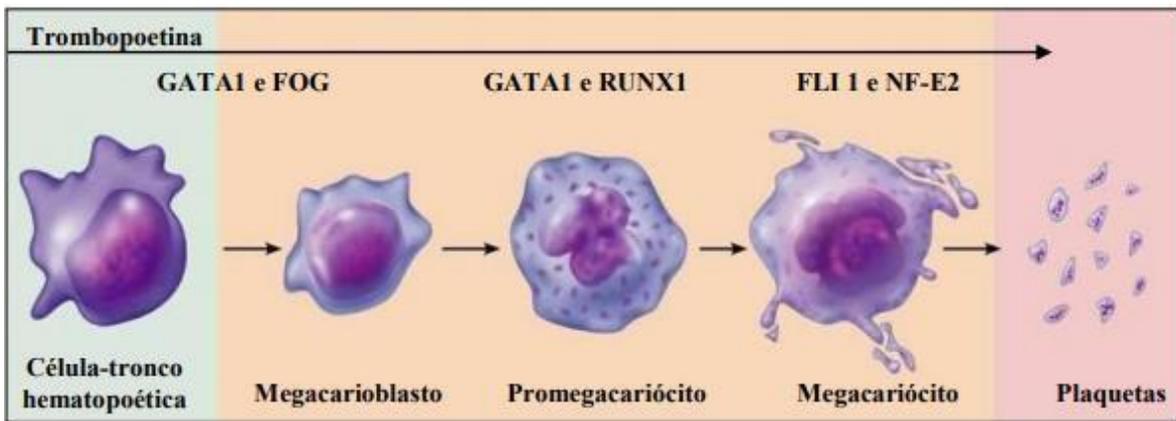


Figura 4: Megacariopoiese. O primeiro precursor identificável da linhagem megacariocítica é o megacarioblasto que, por um processo de endomitose (divisão do núcleo sem divisão do citoplasma) vai originando uma célula maior, multinucleada, e com produção de grânulos (promegacariócito), que por sua vez dará origem ao megacariócito maduro. As plaquetas resultam de fragmentos citoplasmáticos do megacariócito. (Fonte: John D. Crispino, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2005).

2. Hemostasia

A hemostasia é um processo fisiológico que visa manter a fluidez do sangue no interior dos vasos, e impedir que ocorra trombose (oclusão de vasos por um trombo) ou hemorragias, quando há lesão de um vaso, o que levaria a perda de sangue.

Quando há lesão de um vaso, é exposto o factor tecidual (FT), expresso nas células endoteliais da túnica íntima, e o fator Von-Willebrand (VW) presente nas moléculas de colagénio. O VW interage com as plaquetas, e promove a sua activação e agregação no local da lesão, formando um trombo plaquetar primário; o FT activa os factores IX e X da coagulação. A interação entre Xa e Va (produzida nas plaquetas activadas) contribui para a formação inicial de trombina. A trombina formada nesta fase inicial vai estimular a activação dos factores V, VIII e XI. O fator XIa ativa fator IX. A interação IXa-VIIIa promove activação do fator X; o fator Xa, em conjunto com Va estimulam a produção mais de trombina, tal como está representado na figura 5. Esta, por sua vez, converte o fibrinogénio (forma solúvel no plasma) em fibrina (forma insolúvel), que vai formar um retículo que envolve as hemácias, formando o coágulo.

Paralelamente ocorrem reações que estimulam a fibrinólise (estas, porém, ocorrem numa forma mais lenta e gradual do que as da cascata da coagulação). Estas reações vão permitir

restringir o local da formação do coágulo ao local da lesão. São exemplos de proteínas anti-coagulantes a anti-trombina e a TFPI (inibidora do factor Va). (D. Cagnolati *et al.*, 2005)

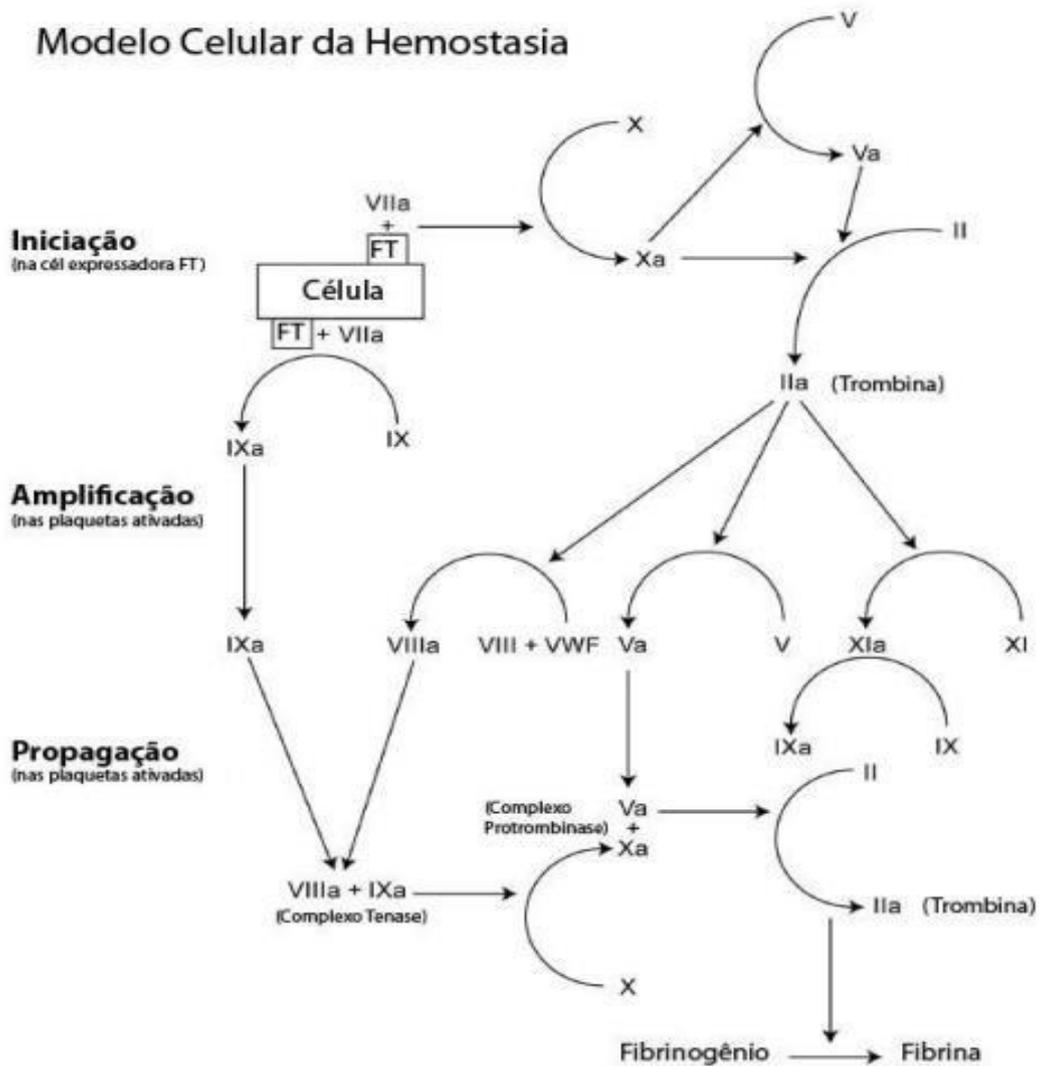


Figura 5: Esquema ilustrativo da cascata de coagulação (Fonte: Cagnolati D, Sankarankutty AK, Rocha JPS, Beer A, Silva OCE. Hemostasia E Distúrbios Da Coagulação).

3. Hemograma

O hemograma permite fazer a quantificação das diferentes células sanguíneas, incluindo a contagem diferencial dos diferentes tipos de leucócitos; avalia parâmetros hematimétricos, e o doseamento da hemoglobina.

O hemograma é avaliado no CELL-DYN Ruby, um analisador que faz a contagem de células com recurso a citometria de fluxo. Nesta técnica, as células presentes na amostra fluem por um capilar de modo a passarem uma a uma por um feixe luminoso. O aparelho tem dois receptores que vão detectar a quantidade de



Fonte: <https://www.corelaboratory.abbott/int/en/offerings/brands/cell-dyn/cell-dyn-ruby>

luz que é dispersa sempre que uma célula passa pelo feixe: um dos receptores está posicionado a 180° da fonte luminosa (dá a dispersão frontal ou forward-scatter) e o outro está posicionado a 90° da fonte luminosa (dá a dispersão lateral, ou side-scatter).

A intensidade da dispersão luminosa que é captada pelos diferentes receptores apresenta uma correlação directa com certos parâmetros celulares:

- O forward-scatter (FS) está correlacionado com o tamanho celular.
- O side-scatter (SS) está correlacionado com a complexidade celular.

É a partir dos valores de FS e SS que o aparelho vai conseguir discriminar os diferentes tipos de células sanguíneas presentes na amostra.

A determinação da hemoglobina é feita por espectrofotometria, num circuito à parte: os eritrócitos são lisados, e é lida a absorvância do hemolisado.

A contagem dos eritrócitos é feita pelo método da impedância: os eritrócitos circulam num capilar que possui um fluido que é condutor de corrente eléctrica. A corrente eléctrica é captada por um detetor. Quando um eritrócito passa pelo detetor, o sinal da corrente eléctrica anula-se (uma vez que as células são más condutoras de corrente eléctrica). A cada vez que o sinal eléctrico baixa, o aparelho conta uma célula.

Os parâmetros avaliados no hemograma são:

- Contagem de eritrócitos (RBC).
- Quantificação da hemoglobina (HGB). Valores de hemoglobina abaixo dos valores de referência para a idade e para o sexo são definidos como anemia.
- Hematócrito (HCT): volume eritrócitos/volume total sangue (expresso em %).
- Volume corpuscular médio (MCV): volume total eritrócitos/ n° eritrócitos. Este critério, na presença de HGB baixa, permite distinguir se a anemia é microcítica

(eritrócitos pequenos), normocítica (eritrócitos de tamanho normal) ou macrocítica (eritrócitos grandes).

- Hemoglobina corpuscular média (MCH): hemoglobina total/nº eritrócitos. Este parâmetro encontra-se usualmente diminuído se em casos de anemia.
 - Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC).
 - “Red distribution width” (RDW): é um valor relacionado com a variação do tamanho dos eritrócitos na amostra. Valores elevados reflectem uma anisocitose.
- Contagem de plaquetas (PLT).
- Volume plaquetar médio (MPV).
- Contagem de leucócitos.
 - Contagem diferencial de leucócitos dá a percentagem relativa de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

Os resultados do hemograma são apresentados tal como na Figura 6. Para a contagem diferencial, o aparelho dá dois gráficos: um relaciona tamanho e complexidade celulares; o outro relaciona a lobularidade e a granularidade celulares. Para os índices hematimétricos, e para os parâmetros das plaquetas (PTL e MPV), os resultados são fornecidos sob a forma de dois histogramas.



Figura 6: Apresentação dos resultados do hemograma realizado no Cell-DYN Ruby (Fonte:<https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/28203/1/Relat%C3%B3rio%20Jorge%20Paiva.pdf>)

4. Contagem de reticulócitos

A contagem de reticulócitos normalmente está aumentada nas anemias, em que o organismo reage à baixa concentração de hemoglobina, aumentando a produção de eritropoetina, e, portanto, a eritropoiese. Isto acontece uma vez que o principal órgão produtor da eritropoetina é o rim. Na anemia, a diminuição da concentração de hemoglobina vai dificultar o aporte de oxigênio aos tecidos, nomeadamente ao rim, que vai, por sua vez, aumentar a produção de eritropoetina em resposta a baixa tensão de oxigênio.

A eritropoiese não é um processo 100% eficaz, pelo que uma parte das células precursoras morre na medula. A eritropoiese eficaz (ou seja, a proporção de células precursoras que deram origem a eritrócitos maduros) pode diminuir em certas doenças, nomeadamente na anemia hemolítica, e a sua avaliação é feita com recurso à contagem dos reticulócitos. (A. V. Hoffbrand, P. A. H. Moss, 2013).

A anemia hemolítica é um tipo de anemia caracterizada pela diminuição do tempo de vida dos eritrócitos, subjacente a aumento da destruição de eritrócitos. A destruição exacerbada de eritrócitos pode ter várias origens: pode ser de foro autoimune, a partir da produção de autoanticorpos contra os eritrócitos; problemas inerentes ao metabolismo do próprio eritrócito que o tornam mais susceptível ao *stress* osmótico (defeitos na piruvato-cinase ou na G6PD); defeitos da membrana do eritrócito (ex: esferocitose hereditária); e presença de hemoglobinas modificadas, como a HbS da anemia falciforme.

Na anemia hemolítica, geralmente há uma resposta compensatória por parte da medula, na medida em que aumenta a eritropoiese em resposta à diminuição do número de eritrócitos. Este aumento da eritropoiese é refletido num aumento na contagem dos reticulócitos no sangue periférico (A. V. Hoffbrand, P. A. H. Moss, 2013).

A contagem de reticulócitos é feita por citometria de fluxo, à semelhança de um hemograma normal, mas a amostra exige preparação prévia:

- Vão ser usados pelo menos três tubos contendo um corante específico para os reticulócitos.

A) Um tubo é lido no aparelho tal e qual. Vai funcionar como o branco, ou seja, vai dar o sinal que é lido no aparelho na ausência de células (e que é portanto devido à presença de quaisquer interferentes associados ao corante), e que vai ser subtraído ao sinal lido para a amostra.

B) Ao segundo tubo são adicionados 20 µl de um dos controlos usados no aparelho.

C) Ao(s) outro(s) tubo(s) adicionam-se 20 µl do sangue do(s) doente(s).

- Os tubos são colocados a agitar durante pelo menos dez minutos.

A contagem de reticulócitos é feita no Cell Dyn Ruby em sistema aberto (os hemogramas processam-se em sistema fechado), pelo que os tubos são processados um a um. Os tubos são sempre colocados na ordem indicada (A□B□C), e devem preferencialmente ficar sempre a agitar até ao momento em que vão ser processados.

5. Esfregaço sanguíneo

O esfregaço sanguíneo é feito para todas as amostras que, no hemograma, apresentem uma ou mais das seguintes alterações:

Tabela 2: Critérios para execução de esfregaço de sangue

HGB	<11.0 ou >15.0 ♀	g/dl
	<12.0 ou >17.0 ♂	
RDW	>15.0	%
PTL	<150 ou >500	$\times 10^9/\mu\text{l}$
MCV	<75 ou >105	fl
MCHC	>37.0	g/dl
Basófilos	>3.0	%
Monócitos	>15.0	%
Eosinófilos	>15.0	%
WBC	>12.0	$\times 10^9/\text{L}$
Inversão defórmula leucocitária	% linfócitos > % neutrófilos (com WBC > $8.0 \times 10^9/\text{L}$ ou LYN > 50% ou diferença entre LYN e NEU > 10%)	

Para a execução do esfregaço, é colocada uma gota de sangue na lâmina e a gota é estendida ao longo da lâmina com o auxílio de uma lamela. O objectivo é a obtenção de uma monocamada de células, que permita a visualização da morfologia das células e contagem diferencial (se necessário) em microscopia ótica.

O esfregaço é depois fixado com metanol, o que permite a adesão das células à lâmina e impede que o esfregaço saia após lavagem. A lâmina é coberta com metanol durante 3 minutos.

Após este tempo, retira-se o metanol e coloca-se a solução corante. A solução corante é preparada misturando corante de Giemsa, corante de Grunwald e tampão de fosfato numa proporção de 1:2:3. Deixa-se o corante actuar durante 2 minutos e de seguida lava-se o corante com água destilada e deixa-se a lâmina secar ao ar.

Ao microscópio, deve-se atentar a quaisquer alterações morfológicas, nomeadamente nos glóbulos vermelhos, onde estas ocorrem com maior frequência. Na figura 7 estão ilustradas algumas das alterações morfológicas que podem ocorrer nos eritrócitos.

Anomalias eritrocitárias	Causas	Anomalias eritrocitárias	Causas
 Normal	-	 Microesferócito	Esferocitose hereditária, anemia hemolítica autoimune, septicemia
 Macrócito	Hepatopatia, alcoolismo Oval na anemia megaloblástica	 Fragmentos	CIVD, microangiopatia, síndrome hemolítico-urêmica, PTT, queimaduras, válvulas cardíacas
 Células em alvo	Deficiência de ferro, hepatopatia, hemoglobinopatia, pós-esplenectomia	 Eliptócito	Eliptocitose hereditária
 Estomatócito	Hepatopatia, alcoolismo	 Pecilócito em lágrima	Mielofibrose, hematopoese extramedular
 Célula em lápis	Deficiência de ferro	 Célula em cesto	Dano oxidante (p. ex., deficiência de G6PD, hemoglobina instável)
 Equinócito	Hepatopatia, pós-esplenectomia Artefato de conservação	 Célula falciforme	Anemia de células falciformes
 Acantócito	Hepatopatia, abetalipoproteinemia, insuficiência renal	 Micrócito	Deficiência de ferro, hemoglobinopatia

Figura 7: Algumas das alterações morfológicas possíveis para os eritrócitos (Fonte: V. Hoffbrand, P.A.H Moss, Fundamentos de Hematologia, 6ª edição)

Alterações na morfologia também podem surgir nos leucócitos, embora em situações mais raras. É o caso, por exemplo, de neutrófilos hipersegmentados nos casos de anemia perniciosa; ou de granulócitos hiposegmentados em casos de doença de Pelger–Huët (figura 8).

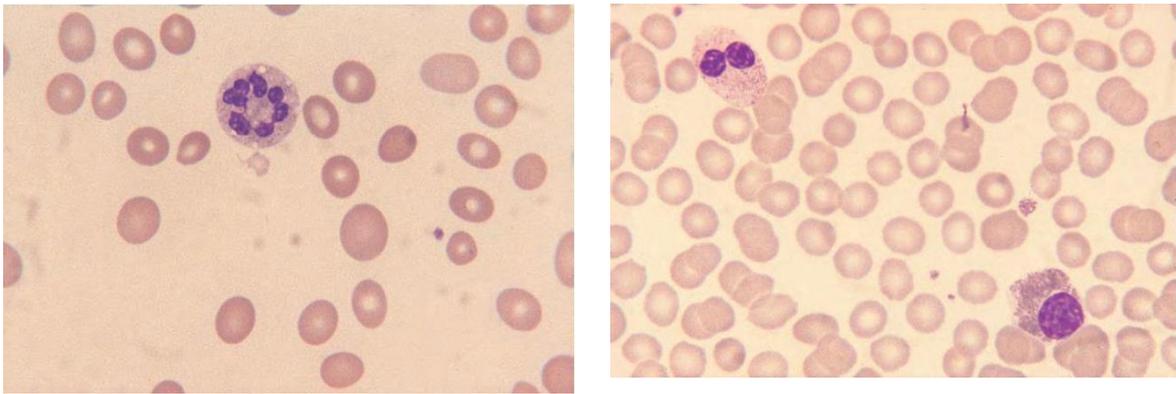


Figura 8: Esfregaço de sangue com um neutrófilo bilobado, um eosinófilo sem lóbulos nucleares, e hipocromia no sangue de um indivíduo com Pelger-Huet (à esquerda); neutrófilo hipersegmentado e anisocitose (à direita) (Fonte: B. Bain, Blood Cells: a practical guide, 5ª edição).

6. Contagem diferencial

A contagem diferencial permite saber a proporção relativa de neutrófilos (NEU), linfócitos (LYN), monócitos (MONO), eosinófilos (EOS) e basófilos (BASO), no sangue.

Alterações na fórmula leucocitária são quantitativas, em que os valores de um ou mais tipos de células estão acima ou abaixo dos valores de referência.

- NEU: 50-70%
- LYN: 11-30%
- MONO: 7-13%
- EOS: 2-4%
- BASO: 0.5-1.0%

As possíveis alterações são:

- **Neutrofilia:** Um aumento de neutrófilos no sangue ocorre devido a várias situações: infecções bacterianas, certas doenças hereditárias, queimaduras, pancreatite, hepatite aguda, síndrome hemolítica-urêmica, etc.
- **Neutropenia:** Diminuição da quantidade de neutrófilos; entre as causas estão doenças hereditárias e doenças autoimunes.

- **Linfocitose:** Aumento de linfócitos pode ser devido a doenças hereditárias, doenças autoimunes, infecções virais, reacção alérgica a fármacos, hemoglobinopatias, síndromes linfoproliferativas, etc.
- **Linfopenia:** Diminuição dos linfócitos ocorre em: infecções por HIV, linfomas, carcinomas, etc.
- **Monocitose:** Aumento de monócitos; por infeção crónica, infeção parasitária (ex: *Rickettsia*, *Babesia*...), carcinoma, etc.
- **Monocitopenia:** A diminuição dos monócitos pode ter causa autoimune, hereditária, ou secundária a uma infeção (nomeadamente por infeção intrauterina, por CMV ou HIV)
- **Eosinofilia:** Aumento da percentagem de eosinófilos. Pode dever-se a doenças alérgicas (ex: asma, rinite alérgica, urticária...), hipersensibilidade a drogas ou metais, infecções parasitárias, e doenças de pele (ex: pêfigo vulgar, penfigoide bolhoso...)
- **Eosinopenia:** Diminuição de eosinófilos pode ter como causas trauma, queimaduras ou drogas.
- **Basofilia:** Aumento da percentagem de basófilos. As causas podem ser: síndromes mieloproliferativas, basofilia reactiva (ex: hipersensibilidade, artrite reumatoide juvenil...) ou causa idiopática.
- **Trombocitose:** Aumento de plaquetas pode ser devido a doença hereditária, trombocitemia essencial, policitemia vera, leucemia, síndrome mielodisplásica, etc.
- **Trombocitopenia:** Diminuição da quantidade de plaquetas pode surgir: na síndrome de Bernard-Soulier, anemia aplásica, deficiência de cobre, doenças autoimunes, etc.

(A. Hoffbrand *et al.*, 2017)

7. Doseamento da hemoglobina A1c

A HbA1c é um parâmetro avaliado para o controlo de indivíduos com diabetes *mellitus*. Contrariamente à determinação da glicose, cuja concentração no sangue varia ao longo do dia, o doseamento da HbA1c permite estimar, em média, a concentração da glicose no sangue ao longo dos últimos 4 meses (coincidente com o tempo de vida do eritrócito).

Se a concentração da glicose sanguínea se mantiver elevada ao longo do tempo (e.g. diabetes não controlada), as proteínas, nomeadamente a hemoglobina, sofrem reação de glicação. Logo, quanto mais elevados forem os níveis da HbA1c num indivíduo, mais elevados terão sido os valores da glicose, em média, nos últimos quatro meses.

A diabetes *mellitus* é uma condição metabólica em que o organismo falha em manter a homeostasia da glicose. A diabetes pode ser classificada como tipo 1 ou tipo 2. A diabetes tipo 1 é caracterizada pela destruição das células β do pâncreas, que são as responsáveis pela produção de insulina, por intermédio de autoanticorpos. Como resultado da destruição das células β pancreáticas, deixa de haver produção de insulina, razão pela qual os doentes afetados devem fazer um controlo da glicémia várias vezes ao dia, e estão dependentes de injeções de insulina exógena para manter os níveis de glicose controlados.

A diabetes tipo 2 caracteriza-se por um aumento da resistência do organismo à insulina, como resultado de vários factores ambientais (hábitos alimentares, sedentarismo, etc.) em indivíduos com predisposição genética. Quer isto dizer que um indivíduo com DM2 necessita de quantidades superiores de insulina, relativamente a um indivíduo normal, para manter a homeostasia da glicose.

Em qualquer um dos casos verifica-se uma perda de resposta à insulina. Isto implica que, no período pós-prandial não vai haver alteração no metabolismo no sentido de armazenar energia, e as concentrações de glicose no plasma mantêm-se elevadas.

ADAMS A1c[®] HA-8160, ARKRAY



Fonte: http://biopdc.qcreative.com.tr/cozumlerimiz/diagnostik_cozumler/arkray/hba1c_analizorleri/adams_ha8160

O doseamento da HbA1c é feito por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Em cromatografia líquida, os componentes da amostra são separados em colunas que contêm uma fase estacionária, sólida (enchimento) e uma fase líquida (eluente). A amostra, ao deslocar-se ao longo da coluna, cada um dos seus componentes vai estabelecendo uma interação com a fase estacionária até que se estabeleça um equilíbrio dinâmico entre ambas.

Quanto mais forte for esta interação, mais lentamente o componente se desloca ao longo da coluna.

As colunas de cromatografia podem ser divididas em secções nas quais se estabelece o equilíbrio entre o componente a ser analisado na amostra e a fase estacionária: a cada uma destas secções dá-se o nome de prato teórico. Uma coluna de cromatografia diz-se tanto mais eficiente quanto maior for o número de pratos teóricos que possuir.

No HPLC consegue-se um elevado número de pratos teóricos, pela diminuição do tamanho das partículas da fase estacionária. Isto aumenta grandemente a eficiência da separação dos diferentes constituintes da amostra, mas, no entanto, exige pressões elevadas na coluna para que a amostra se desloque ao longo da mesma.

No final da coluna haverá um recetor electro fotométrico. A cada constituinte, ou soluto, presente na amostra, corresponde um pico no cromatograma. A área dos picos é proporcional à concentração de cada componente.

8. Eletroforese de hemoglobinas

A eletroforese pode ser aplicada à hemoglobina, e é de particular interesse no diagnóstico de hemoglobinopatias.

Existem várias variantes da hemoglobina, consoante as cadeias que constituem o tetrâmero da proteína. As hemoglobinas normais num adulto são a HbA (~90%), HbA2 e HbF. Outras variantes da hemoglobina podem surgir em resultado de certas hemoglobinopatias, como a HbS na anemia falciforme ou a HbH na alfa-talassémia major. A electroforese das



Fonte: <http://www.medicaexpo.com/pt/prod/interlab/product-68888-571473.html>

hemoglobinas permite fazer o perfil das hemoglobinas de um indivíduo. No Centro de Saúde Militar de Coimbra, é usada principalmente para despiste de traço falciforme nos candidatos a tropas especiais, uma vez que indivíduos com traço falciforme têm risco acrescido de trombose quando sujeitos a exercício físico intenso ou treinos a alta altitude.

As variantes da hemoglobina vão ser separadas de acordo com o ponto isoelétrico, formando diferentes bandas. O controlo estabelece a posição relativa das bandas correspondente às variantes de hemoglobina. O padrão de bandas é depois comparado com os perfis em estudo.

É de salientar que, para a eletroforese de hemoglobina, a hemoglobina tem que ser primeiramente libertada dos eritrócitos. Para tal, para cada amostra, 200 µl de sangue são misturados a 1 ml de solução lisante. Os tubos são agitados no vórtex, e colocados a centrifugar, o que vai promover a precipitação de quaisquer outros componentes celulares que se encontrem em suspensão, que não a hemoglobina.

São colocados 20 µl do hemolisado no poço do gel de eletroforese, para cada amostra. Como as proteínas possuem carga negativa, quando se lhes é aplicada voltagem, as proteínas migram para o ânodo. A velocidade de migração das proteínas vai depender de vários factores, como o peso molecular, a porosidade do gel e a voltagem aplicada ao gel. Os resultados são expressos em percentagem.

9. Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação é um parâmetro que não é específico de nenhuma patologia, podendo surgir aumentada em casos de inflamação crónica (ex: artrites), infeções, insuficiência hepática, renal ou cardíaca, ou neoplasias.

BD Vacutainer® Sedi I 5, BECTON DICKINSON



Fonte: <https://www.dotmed.com/listing/chemistry-analyzer/bectondickinson/bdvacutainer%C2%A%E-sedi%20I%205/674055>

Os tubos de colheita para a VS são tubos mais delgados e longos, em que o anticoagulante usado é o citrato. A velocidade de sedimentação é lida no Vacutainer Sedi I 5 pelo método de Westergren: o sangue é agitado, de modo a ficar bem homogeneizado, e por fim os tubos são deixados a repousar na vertical, e o aparelho lê a velocidade a que as hemácias sedimentam em mm/h.

10. Grupo sanguíneo AB0 e Rhesus (Rh)

A determinação do grupo sanguíneo é de extrema importância em indivíduos sujeitos a transfusões sanguíneas (tanto o dador como o recetor) e nas grávidas (particularmente no que diz respeito ao grupo Rh).

Os eritrócitos podem ser classificados fenotipicamente consoante a presença ou ausência de aglutinogénios, antigénios que revestem a sua superfície. O tipo de aglutinogénios vai determinar o tipo de anticorpos que são produzidos:

- Tipo A: hemácias revestidas com antigénio A; soro possui anticorpos anti-B
- Tipo B: hemácias revestidas com antigénio B; soro possui anticorpos anti-A
- Tipo AB: hemácias revestidas com antigénios A e B; sem produção de anticorpos
- Tipo 0: hemácias sem aglutinogénios; soro possui anticorpos anti-A e anti-B

Tabela 3: Os diferentes grupos sanguíneos com a(s) respectiva(s) aglutinogénios e anticorpos associados a cada um deles

Fenótipo	Sangue grupo A	Sangue grupo B	Sangue grupo AB	Sangue grupo 0
Agglutinogénios	A	B	A e B	Sem aglutinogénios
Anticorpos	Anti-B	Anti-A	Sem anticorpos	Anti-A e anti-B

Geneticamente o grupo sanguíneo é herdado segundo uma distribuição mendeliana. Sendo A o gene para o fenótipo “sangue com aglutinogénio A”, B o gene para o fenótipo “sangue com aglutinogénio B” e 0 o gene para o fenótipo “sangue sem aglutinogénio”:

Ao fenótipo “sangue com aglutinogénio A” correspondem os genótipos AA ou A0

Ao fenótipo “sangue com aglutinogénio B” correspondem os genótipos BB ou B0

Ao fenótipo “sangue sem aglutinogénio” corresponde o genótipo 00

Ao genótipo AB resulta um fenótipo “sangue com aglutinogénios A e B”

Tabela 4: Tabela de Punnett mostrando todas as possibilidades de combinação genética para o grupo AB0

	Gene A	Gene B	Gene 0
Gene A	AA	AB	A0
Gene B	AB	BB	B0
Gene 0	A0	B0	00

Os genes A e B são co-dominantes entre si, o que significa que a herança de ambos os caracteres dá origem a um fenótipo misto (neste caso, hemácias com os dois tipos de aglutinogénios). O gene 0 é recessivo e só tem expressão fenotípica se forem herdadas duas cópias do gene (A e B são dominantes relativamente a 0).

Se uma transfusão sanguínea se der entre indivíduos com grupos sanguíneos opostos (um do tipo A e outro do tipo B), os anticorpos do receptor vão reagir contra os eritrócitos do sangue do dador, e levar a reação de aglutinação (há rejeição do tecido). Indivíduos com sangue do tipo AB, por não possuírem anticorpos no plasma, podem receber sangue de todos os grupos sanguíneos (são receptores universais); já os indivíduos com sangue do grupo 0, por terem hemácias sem aglutinogénios, estas são inócuas para qualquer indivíduo receptor, independentemente do grupo sanguíneo (são dadores universais).

Patient Type	Compatible Red Cell Types
A	A, O
B	B, O
O	O
AB	AB, A, B, O
RhD Positive	RhD Positive RhD Negative
RhD Negative	RhD Negative

Figura 9: Compatibilidade entre os grupos sanguíneos. (Fonte: https://www.rch.org.au/bloodtrans/about_blood_products/Blood_Groups_and_Compatibilities/)

O grupo sanguíneo é caracterizado, em laboratório, por prova directa: numa lâmina, colocam-se duas gotas do sangue do utente: na primeira adiciona-se anticorpo anti-A, e na outra adiciona-se anticorpo anti-B. Se os eritrócitos possuírem o aglutinogénio correspondente na superfície, vai haver aglutinação.

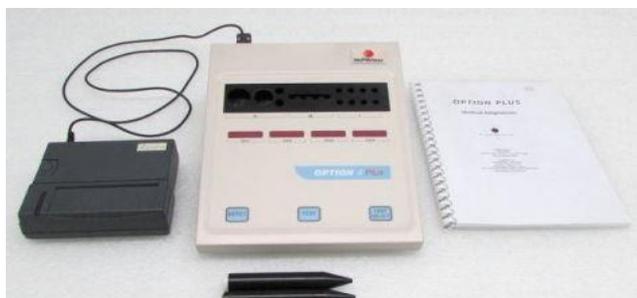
- Aglutinação com anti-A: Sangue grupo A
- Aglutinação com anti-B: Sangue grupo B
- Aglutinação com anti-A e anti-B: Sangue grupo AB
- Sem aglutinação: Sangue grupo 0

Pelo mesmo método, é determinado, em paralelo, noutra gota de sangue, o grupo Rh. A determinação deste grupo tem importância nas grávidas. O antigénio D (factor discriminante dos grupos Rh-positivos e Rh-negativos) é altamente imunogénico, e pessoas que sejam Rh- negativas (sem Ag D) só produzem anticorpos anti-D (do tipo IgG) se contactarem com o antigénio.

Quer isto dizer que se uma grávida Rh-negativo tiver contacto com o antigénio D na primeira gravidez, vai sofrer imunização; numa posterior gravidez, se o feto for Rh-positivo, os anticorpos anti-D da mãe vão reagir contra o sangue do feto, dando origem à doença hemolítica do recém-nascido.

11. Provas de coagulação

As provas de coagulação visam avaliar a hemostasia do indivíduo, avaliando se existem defeitos na coagulação em resultado da deficiência de um ou mais factores da coagulação. Para tal mede-se o tempo que uma amostra de soro demora a coagular.



Fonte: <https://www.dotmed.com/listing/chemistryanalyzer/bectondickinson/bdvacutainer%C2%AEsedi15/674055>

Os tubos da colheita para este tipo de testes são tubos que têm citrato como anticoagulante. As amostras têm de ser centrifugadas, e, para as determinações, é usado o sobrenadante.

As provas da coagulação são parâmetros cronométricos. São avaliadas no laboratório:

a) Tempo de protrombina: avalia a actividade dos factores VII (FT), X, V, II (protrombina) e I (fibrinogénio). Tem que ser adicionados tromboplastina e cálcio (que foram sujeitos a acção anticoagulante do citrato) para iniciar a reacção. O PT, a partir do qual se calcula o INR, é útil para monitorizar doentes sujeitos a terapêutica com anticoagulantes antagonistas da vitamina K, como a varfarina.

b) Tempo de tromboplastina parcial activado: avalia a actividade dos factores XII, XI, X, VIII, V, II e I. É usado para monitorizar indivíduos sujeitos a terapêutica com heparina.

c) Tempo de fibrinogénio: permite quantificar o fibrinogénio presente no plasma. O fibrinogénio surge aumentado em indivíduos com doença cardiovascular, e está associado a um aumento do risco de trombose, através do aumento da viscosidade do sangue, do aumento da densidade do retículo de fibrina, e do aumento da resistência do coágulo formado à fibrinólise (Robert Ariéns, Blood Journal, 2011).

Em todos estes parâmetros, o tempo de coagulação é inversamente proporcional à actividade dos factores de coagulação.

Caso clínico

A uma amostra de sangue de uma mulher de 83 anos foi feito o hemograma, que revelou as seguintes alterações:

Parâmetro	Resultado	Intervalo de referência	Unidade
RBC	3.74*	4.00-6.10	$\times 10^{12}$ g/L
HGB	7.5*	11.5-13.5*	g/dl
HCT	24.3*	37.0-53.7	%
MCV	65.0*	80-100	fL
MCH	20.1*	27.0-32.5	pg
MCHC	30.9*	31.8-35.4	g/dl
PLT	251	142-424	$\times 10^3$ /uL
RDW	17.1*	10.5-15.0	% CV
WBC	7.79	3.70-11.0	$\times 10^9$ g/L
NEU	67.4	37.0-80.0	%
LYM	19.1	10.0-50.0	%
MONO	12.5	0.0-12.0	%
EOS	0.9	0.0-7.0	%
BASO	0.1	0.0-2.5	%

*Resultados a **laranja** estão abaixo do intervalo de referência.

*Resultados a **roxo** estão acima dos valores de referência.

*Intervalo de referência para o sexo feminino.

O valor de hemoglobina abaixo dos valores de referência define anemia; paralelamente, o valor da hemoglobina corpuscular média (MCH) e diminuição do volume corpuscular médio (VCM) são parâmetros indicativos da presença de eritrócitos hipocrômicos e microcíticos, respectivamente.

A descida do valor do hematócrito (definido como sendo o volume de sangue que é ocupado pelas hemácias) vai de encontro à descida do número de eritrócitos (RBC).

Os resultados são indicativos de uma anemia microcítica. A principal causa da anemia microcítica é a deficiência em ferro, uma vez que este elemento necessário à síntese de hemoglobina. Esta deficiência pode ser devida a carência de ferro alimentar, fármacos quelantes de ferro, ou perda de ferro por hemorragia.

Dada a existência de vários critérios para esfregaço, foi feito esfregaço sanguíneo. A análise ao microscópio revelou duas populações de eritrócitos, uma de eritrócitos microcíticos (pequenos) e hipocrômicos (pálidos) e outra de eritrócitos de tamanho e hemoglobinização normais, o que confirma o valor elevado da RDW (“red cell distribution width”), que usualmente reflete uma maior disparidade entre o tamanho dos eritrócitos.

Dado que a deficiência em ferro é a causa mais comum de anemia, determinaram-se os valores do ferro sérico e da ferritina: ambos os parâmetros se encontravam baixos.

Concluiu-se que o indivíduo tinha, de facto, uma anemia por deficiência em ferro, sendo que o surgimento, no esfregaço, de eritrócitos de aspecto normal é devido a tratamento com suplemento de ferro.

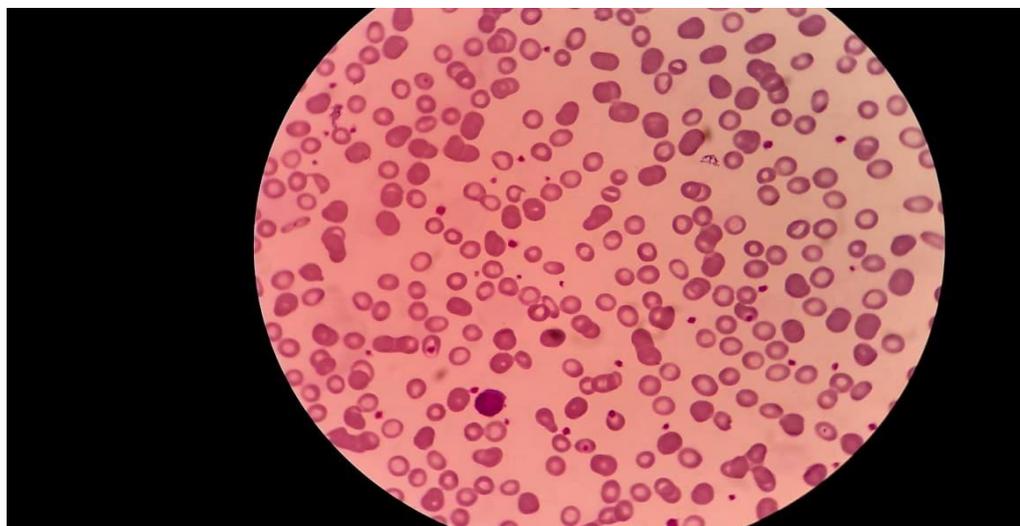


Figura 10: Esfregaço sanguíneo mostrando uma população de eritrócitos microcíticos e hipocrômicos, e outra com eritrócitos normais

II. Sector de Imunologia

O sector de imunologia dispõe de um único autoanalisador, o Architect ci 1800 da Abbott Diagnostics. O aparelho é composto por dois módulos que funcionam de forma independente: um dos módulos faz o doseamento de parâmetros analíticos por espectrofotometria (módulo 1), o outro módulo processa as amostras com recurso a um imunoensaio de quimioleminescência (módulo 2).

No módulo 2 faz-se o despiste de infeções virais, infeção bacteriana por *Treponema pallidum*, pesquisam-se biomarcadores cardíacos, biomarcadores do cancro da próstata, biomarcadores da tiroideia e biomarcadores de anemia.

1. Sistema imunitário

O sistema imunitário tem como função a protecção do organismo contra agentes patogénicos, e a sinalização e destruição de células do organismo que estejam modificadas (células neoplásicas, ou células infetadas por vírus). Para desempenhar esta função, o sistema imunitário tem que ser capaz de distinguir as moléculas próprias do organismo, das moléculas “não-próprias”, e, para isso, possui a capacidade de reconhecer antígenos, e reagir especificamente contra eles.

Um antígeno é uma molécula que é capaz de despoletar resposta imunológica, através da interação com diferentes efectores do sistema imunológico, como os linfócitos B (que reconhecem antígenos na forma nativa), os linfócitos T (só têm capacidade de reconhecer antígenos ligados a moléculas do MCH) e moléculas do complemento. Um antígeno é tão mais eficaz na geração de uma resposta imunológica quanto maior for a sua complexidade (ex: proteínas), pois terá mais epítopos (unidades constituintes dos antígenos) diferentes que conseguem interagir com vários elementos do sistema imune. No entanto, antígenos constituídos por subunidades semelhantes (ex: polissacarídeos) também são capazes de desencadear uma resposta imunológica, embora esta seja uma resposta primária, em que há produção de anticorpos do tipo IgM, caracterizados por uma elevada avidéz (têm cinco locais de ligação para Ag) mas uma especificidade relativamente baixa.

Existem dois tipos de imunidade: a imunidade inata e a imunidade adquirida (que pode ser subdividida em imunidade humoral mediada pelos linfócitos B, e imunidade mediada pelos linfócitos T).

A imunidade inata é aquela que não é dependente de anticorpos. Os efectores são:

- Revestimentos do organismo, como a pele e as mucosas.
- Compostos antimicrobianos presentes nas secreções, como a lisozima, ácido clorídrico-péptico, defensinas, etc.
- Microbiota do organismo, que impede a fixação e a proliferação de microrganismos patogénicos.
- Citotoxicidade mediada pelo complemento e pelas células NK.
- Fagocitose mediada pelos macrófagos.

A imunidade adquirida é aquela que é despoletada através da interação com os antígenos. Pode ser subdividida em:

- Resposta humoral, mediada por anticorpos produzidos por linfócitos B em resposta a um determinado antígeno.
- Resposta mediada pelos linfócitos T. Os dois tipos principais de linfócitos T são os T auxiliares, que expressam moléculas CD4, que têm por função auxiliar na proliferação e seroconversão dos linfócitos B (passar da produção de anticorpos IgM para IgG); e os T citotóxicos, que expressam moléculas CD8 e estão envolvidos nas respostas citotóxicas. Também existem os linfócitos T reguladores, envolvidos no controlo e supressão das respostas imunitárias.

Os anticorpos são os efectores da resposta humoral, e são constituídos por uma porção Fab (que se liga aos Ag) e uma porção Fc, não específica. Os macrófagos possuem vários receptores para a porção Fc, daí que a fagocitose de componentes revestidos por anticorpos seja facilitada (I. Roitt et al., 2017).

Existem vários tipos de anticorpos:

- IgM é o primeiro tipo de anticorpo a ser produzido primeiro em resposta a um antígeno. Esta imunoglobulina é caracterizada por ter elevada avidéz, uma vez que possui cinco locais de ligação para o antígeno.
- IgG é o anticorpo produzido após seroconversão. São anticorpos com uma especificidade muito superior à IgM, e é aquele que é produzido maioritariamente durante uma resposta imunesecundária.
- IgA é uma imunoglobulina associada às mucosas do organismo.
- IgE está associada a reações alérgicas e eliminação de parasitas.
- IgD é a imunoglobulina que reveste os linfócitos B, e é responsável pelo reconhecimento dos antígenos.

I.1. Resposta primária e resposta secundária

Os linfócitos B são os únicos linfócitos com a capacidade de reconhecer antígenos na forma nativa. Numa resposta imunitária primária, quando os linfócitos B reconhecem o antígeno, através da ligação do antígeno ao BCR, os linfócitos são activados e diferenciam-se em células produtoras de anticorpos (plasmócitos) que começam a produzir imunoglobulinas do tipo IgM. Esta produção é lenta, e não se atingem grandes quantidades de anticorpo. Os anticorpos IgM, apesar de terem uma avidéz elevada, são relativamente pouco específicos.

Já os linfócitos T só conseguem reconhecer antígenos ligados a moléculas do complexo maior da histocompatibilidade (MHC). As células apresentadoras de antígenos (APC) são as únicas que conseguem apresentar Ag aos linfócitos T naive. Os linfócitos T CD8 reconhecem Ags ligados a MHC I, e os linfócitos T CD4 (auxiliares) reconhecem Ags ligados ao MHC II. No entanto, a ligação ao Ag-MHC não é, por si só, suficiente para a activação dos linfócitos T: a activação, para se completar, necessita de um segundo sinal, que é a interacção entre o CD28 expresso nos linfócitos T e o B7 expresso nas células dendríticas.

O B7 é também expresso à superfície dos linfócitos B ativados (via interacção BCR-Ag) conferindo-lhes capacidade de activar linfócitos T. Para além de expressarem B7, estes linfócitos B activados também expressam MHC II. A importância disto prende-se com o facto de os linfócitos B necessitarem de sinais co-estimuladores dos linfócitos T CD4 para produzirem anticorpos.

A interacção entre os linfócitos B e T ocorre nos folículos primários dos órgãos linfoides secundários, e envolve ligação entre CD40 (expresso nos linfócitos B) e CD40L (expresso nos linfócitos T), e a ligação B7-CD28. No final desta interacção, os linfócitos B migram para os folículos e sofrem uma reacção de centro germinativo, em que há a proliferação celular a partir de um linfócito B, formando um folículo secundário. Estas células vão-se diferenciar em plasmócitos, e vai ocorrer um *switch* de classe, em que os anticorpos que vão ser produzidos serão da classe IgG. Estes anticorpos distinguem-se dos IgM por possuírem uma maior especificidade para o antígeno. Os plasmócitos migram para a medula óssea, e são determinantes na resposta imunológica se houver segundo contacto com o antígeno (memória imunológica).

A resposta imunitária secundária é aquela que se dá quando há segundo contacto com o mesmo antígeno: é uma resposta muito mais rápida do que a primária, tem uma produção

de anticorpos muito maior, e o tipo de anticorpo produzido é do tipo IgG, tal como está apresentado na figura 12 (A.Abbas *et al.*, 2016).

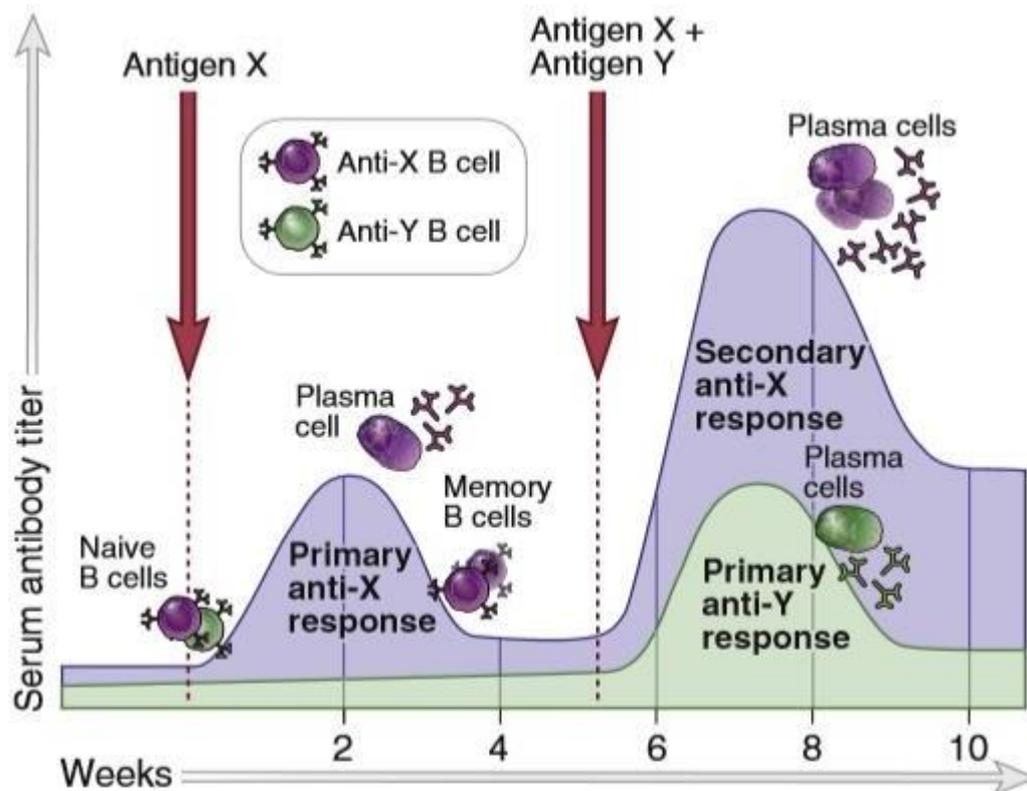


Figura 11: Resposta primária e secundária. Na resposta primária a um antígeno X, há a produção inicial de anticorpos do tipo IgM. Esta produção é lenta, e não atinge grandes concentrações no soro. Após a expansão clonal de linfócitos B e seroconversão, são produzidos anticorpos IgG (mais específicos para o antígeno) em maior quantidade. (Fonte: Abbas, Abdul K., Lichtman, Andrew H., Pillai, Shiv, Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, 5ª edição).

2. Imunoensaios

Os imunoensaios são ensaios em que um determinado parâmetro analítico é detetado e quantificado por intermédio de reacções antígeno-anticorpo. O princípio destes métodos centra-se na capacidade de um anticorpo reconhecer um antígeno específico. O complexo antígeno-anticorpo é estável uma vez formado, e é depois marcado com outras moléculas que vão permitir a deteção deste complexo. O modo de como se detetam estes complexos Ag-Ac é que varia entre os vários imunoensaios.

2.1. Quimioluminescência

Architect ci 800, Abbott Diagnostics

O autoanalisador Architect ci 800 é um analisador que utiliza o método de quimioluminescência para avaliar o perfil serológico de infecções virais e infecções por *Treponema pallidum* (sífilis); e pesquisar também vários tipos de biomarcadores que avaliam a função da glândula tiroide, biomarcadores de dano cardíaco e biomarcadores tumorais (para deteção de cancro da próstata).



Fonte: <https://www.corelaboratory.abbott/int/pt/offerings/brands/architect>

No método de quimioluminescência, são usados como reagente anticorpos, que são adicionados ao meio reativo associados a nano-partículas. Se houver, no soro, os antigénios que lhes são específicos, vai haver ligação dos Ags às partículas revestidas com anticorpo. É feita uma lavagem para retirar do meio todos os componentes que não se ligaram, e depois é adicionado o conjugado, um segundo anticorpo, que está ligado a acridina, que se vai ligar ao complexo Ag-Ac formado na etapa anterior. Há uma segunda lavagem para retirar o conjugado não ligante, e, por fim, são adicionados os *triggers*, que vão ser os responsáveis por uma reacção química que culmina com a formação de luz. O resultado é dado em função da intensidade da luz (em unidades relativas de luz, ou RLU) que é detectada por um luminímetro.

3. Marcadores serológicos

Os marcadores serológicos são anticorpos produzidos pelo organismo em resposta a infecções. O seu doseamento baseia-se na condição de que, se um indivíduo possui anticorpos, no soro, contra um dado patogénio, então é porque foi infetado (com a exceção de indivíduos que tenham sido vacinados, uma vez que as vacinas estimulam a resposta imunitária primária e o desenvolvimento de células de memória).

3.1. Marcadores de infecção viral

As infecções virais que são pesquisadas são aquelas provocadas por vírus hepatotrópicos (hepatite A, B e C) e a infecção por HIV.

a) HEPATITE A

Causada por um vírus não envelopado com genoma de RNA de cadeia simples. A transmissão do vírus é por via fecal-oral. Numa fase inicial, o vírus replica no trato gastrointestinal (virémia transitória), sendo depois transportado para o fígado via corrente sanguínea. O fígado é o órgão principal em que ocorre replicação e exocitose dos viriões. Os vírus vão ser libertados conjuntamente com a bÍlis, nos intestinos, e são excretados nas fezes. (Tu T., Satchel N. A, et al, 2014)

A hepatite A tem a particularidade de nunca evoluir para doença crónica. Na serologia, os primeiros biomarcadores a elevarem-se são a AST (indicadora de dano nos hepatócitos) e a HAVAc-IgM (indicadora de infecção ativa). Mais tarde, ocorre seroconversão: HAVAc-IgM começa a baixar, e a HAVAc-IgG aumenta (figura 12). Esta última confere imunidade contra o vírus da hepatite A.

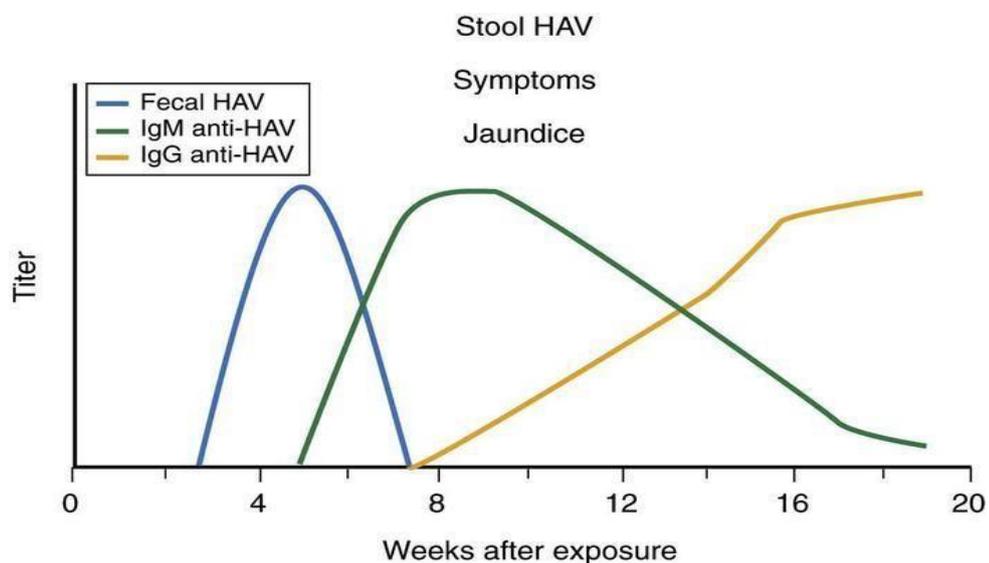


Figura 12: Serologia de uma infecção por HAV: os primeiros anticorpos a elevarem-se no soro são do tipo IgM; depois ocorre seroconversão, e à medida que a HAV-IgM baixa, a HAV-IgG aumenta (Fonte: <https://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hepatology/hepatitis-A/>)

b) HEPATITE B

A hepatite B é causada por um vírus envelopado de DNA de cadeia dupla incompleta que é transmitido por via sexual, parentérica ou vertical (transmissão mãe-filho). O vírus é constituído por um envelope (com HBsAg), cápside (HBcAg), possui um genoma pequeno, e produz HBeAg durante a fase de replicação viral, que é libertado para o sangue. O genoma do vírus codifica uma DNA- polimerase-DNA-dependente e uma transcriptase reversa (RT). O DNA viral incompleto é “completado” pelos mecanismos de reparação do DNA celulares, e é transcrito em RNA pré-genómico (que vai dar origem às cadeias de DNA dos novos víriões através da ação da RT – que converte RNA em DNA – seguido da acção da DNA-polimerase-DNA-dependente, que a partir de uma cadeia ssDNA forma uma cadeia dsDNA) e RNA sub-genómico, que codifica o HBsAg do envelope. Os novos viriões, uma vez formados, saem das células por exocitose.

A probabilidade da hepatite B aguda evoluir para a forma crónica da doença é tanto menor quanto maior for a idade do indivíduo. A hepatite aguda e a hepatite crónica apresentam uma serologia diferente, daí que os marcadores serológicos forneçam informação sobre a fase em que a doença se encontra.

Dos marcadores serológicos, o HBsAc é aquele que confere imunidade à doença, surgindo, paralelamente com o HBsAg negativo, em indivíduos que tenham tido contacto com o vírus (infecção resolvida), ou que tenham sido vacinados contra o HBV. Estas duas situações distinguem-se pelo HbcAc: um indivíduo que tenha tido contacto com o vírus é positivo para estes anticorpos; um indivíduo que tenha sido vacinado contra HBV só é positivo apenas para HBsAc.

Se o HBsAg for positivo, o indivíduo apresenta infecção por HBV. A infecção pode ser aguda ou crónica, e ambas as situações distinguem-se através da determinação do HBcAc do tipo IgM: HBsAg positivo com HBcAc (IgM) negativo dão a indicação de que o indivíduo tem uma infecção crónica; HBsAg positivo com HBcAc (IgM) positivo indica que o indivíduo tem infecção aguda. (Tu T., Satchel N. A, et al, 2014).

Os perfis serológicos estão ambos representados na figura 13.

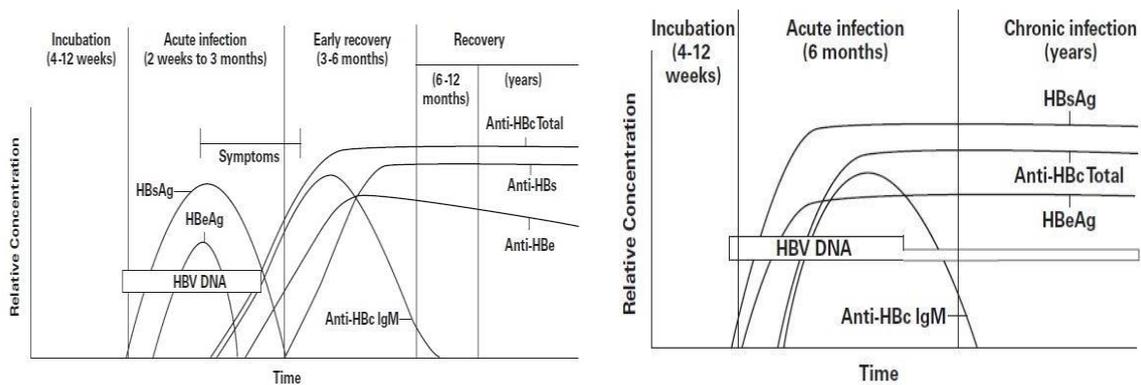


Figura 13: Serologia de uma infeção por HBV resolvida, em que há produção de HBsAc que confere imunidade à doença (à esquerda); serologia de uma infecção por HBV crónica, em que o HBsAg se mantém elevado, sem produção de HBsAc (à direita) (Fonte: <https://microbeonline.com/serological-diagnosis-of-hepatitis-a-and-hepatitis-b-virus-infection/>)

HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativo Negativo Negativo	Indivíduo susceptível
HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativo Positivo Positivo	Imunizado através do contacto com o vírus
HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativo Negativo Positivo	Indivíduo vacinado contra hepatite B
HBsAg anti-HBc IgM anti-HBc anti-HBs	Positivo Positivo Positivo Negativo	Infeção aguda
HBsAg anti-HBc IgM anti-HBc anti-HBs	Positivo Positivo Negativo Negativo	Infeção crónica

Figura 14: Interpretação dos resultados dos marcadores serológicos da infeção por HBV (Fonte: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/pdfs/serologicchartv8.pdf>) (editado)

c) HEPATITE C

A hepatite C é causada por um vírus envelopado com cadeia de RNA de cadeia simples, e cuja via de transmissão principal é por via parentérica. O genoma viral codifica uma RNA- polimerase-RNA-dependente, o que lhe vai permitir a replicação da cadeia de RNA inicial. Algumas das cadeias de RNA são transcritas, pelos mecanismos da célula hospedeira, nas

proteínas da cápside e do envelope. A “montagem” dos novos vírus é feita no reticulo endoplasmático. Os vírus saem da célula por exocitose. (Tu T., Satchel N. A, et al, 2014)

Na hepatite C, a maioria dos casos evolui para doença crónica. Na serologia, o primeiro marcador a surgir é o RNA viral, seguido de um aumento das transaminases (indicativo de dano hepatocelular) e, por fim, o aumento de HCVAc (figura 15).

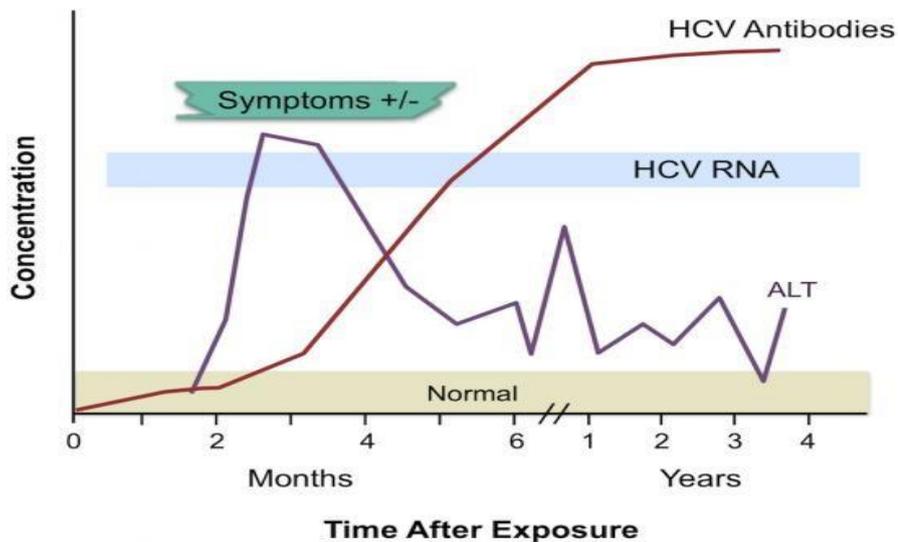


Figura 15: Serologia de uma infecção por HCV. Primeiro surge o RNA viral, depois as transaminases (ALT), e, mais tarde, surgem os anticorpos contra HCV. (Fonte: <https://www.hepatitisc.uw.edu/pdf/screening-diagnosis/acute-diagnosis/core-concept/all>)

d) Vírus da imunodeficiência humana (HIV)

O síndrome da imunodeficiência humana é causado pelo vírus HIV, um retrovírus que se replica preferencialmente nas células T CD4⁺. O vírus possui um genoma de RNA de cadeia simples, e, durante o seu ciclo de replicação, forma uma cadeia de DNA de cadeia simples pela acção da RT. Esta cadeia passa para o núcleo da célula hospedeira, onde vai ser “reparada” pelos mecanismos celulares, e formar DNA de cadeia dupla. O dsDNA viral vai ser depois integrado no genoma do hospedeiro.

O vírus pode ser transmitido por via sexual, parenteral ou vertical. A infecção por HIV é uma doença em que se distinguem três fases, que podem ser verificadas pelo gráfico da figura 16:

I – Infecção aguda ou primária, em que os sintomas, caso surjam, são semelhantes aos de uma gripe viral. É caracterizada por:

- Aumento do RNA viral
- Aumento HIVAg
- Diminuição inicial da contagem dos linfócitos T CD4⁺, que volta a aumentar após final da fase aguda.

2 – Fase de latência, em que não há sintomatologia aparente, mas há replicação viral.

Tal implica:

- Perda gradual de linfócitos T CD4⁺
- Aumento gradual do RNA viral
- Aumento do risco de ocorrência de infecções oportunistas, decorrente da destruição dos linfócitos.

3 – Fase de SIDA:

- Reactividade para HIVAc, HIVAg (p24) e RNA viral
- Contagem de linfócitos T CD4⁺ < 200 células/mm³
- Surgimento de doenças oportunistas, que vão sendo cada vez mais frequentes à medida que os linfócitos se vão perdendo.

Um doente em fase de SIDA tem também risco acrescido para a ocorrência de certas neoplasias, nomeadamente o sarcoma de Kaposi. (A.V. Hoffman, P. A. H. Moss, 2013)

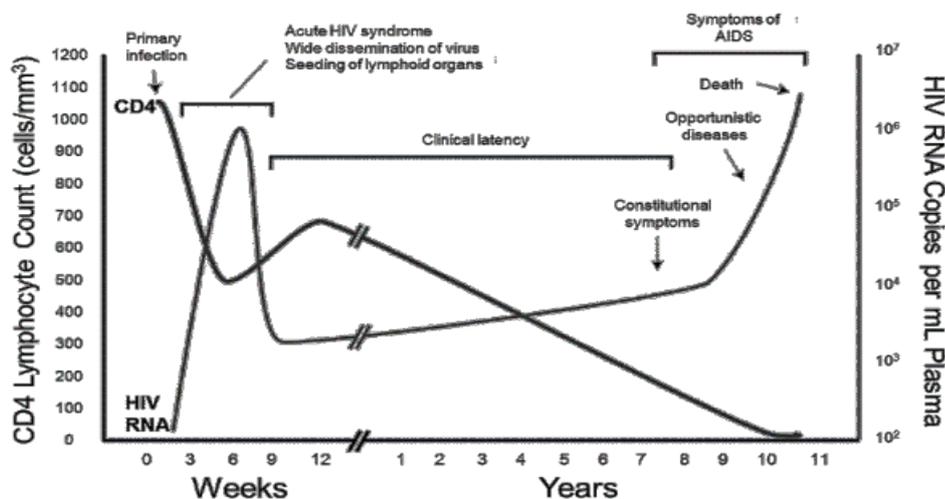


Figura 16: Evolução da serologia de uma infecção por HIV (Fonte: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/hiv-aids/hiv-screening-testing-guide.html>)

4. Marcadores de infeção por *Treponema pallidum*

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível causada pela espiroqueta *Treponema pallidum*. A doença   trifásica: na primeira fase, forma-se uma úlcera no local de inóculo. Na segunda fase, a bactéria passa para a corrente sanguínea e atinge outros tecidos do organismo;   característico o aparecimento de erupções cutâneas. Tanto a fase primária como a secundária se caracterizam por um elevado risco de contágio da doença. A fase terciária   uma fase assintomática e em que já não existe risco de transmissão.

No laboratório, faz-se a deteção de anticorpos anti-TP no soro do doente (teste treponêmico). Este teste serve para fazer o *screening* da doença, mas não é suficiente para dar o diagnóstico: se houver anticorpos anti-TP numa amostra de soro, tem que se fazer um teste de confirmação, não-treponêmico (como a VDRL); se o teste não treponêmico também for positivo, então confirma-se que o utente tem sífilis (S. Ratman *et al.*, 2019). Um esquema do algoritmo utilizado para o diagnóstico da sífilis está ilustrado na figura 17.

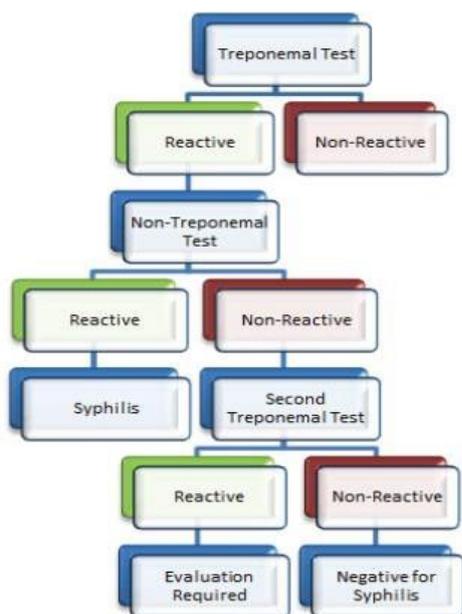


Figura 17: Algoritmo para o diagnóstico de infeção por *Treponema pallidum*: Fazer teste treponêmico (teste 1); se der positivo, fazer teste não treponêmico (teste 2). Se ambos os testes 1 e 2 derem positivo, então confirma-se que o indivíduo tem sífilis. Se o teste 1 der positivo e o teste 2 der negativo, então deve-se fazer novo teste treponêmico. (Fonte: [abbott-architect-syphilis-tp-sellsheet.pdf](#))

5. Marcadores de cancro da próstata

5.1. PSA total e PSA livre

O PSA, ou antigénio específico da próstata, é uma enzima produzida na próstata que existe sob duas formas: uma fracção livre (forma activa) e uma fracção ligada a inibidores de prot ase (forma

Este marcador, no entanto, apesar de ter grande sensibilidade para o cancro da próstata, é pouco específico desta patologia, visto que o seu valor pode surgir aumentado noutras situações, como na hipertrofia benigna da próstata, e prostatites. (R. Prcic *et al.*, 2016)

A determinação do PSA livre, e o cálculo do rácio PSA total/PSA livre permite aumentar a sensibilidade e a especificidade do PSA para o cancro da próstata.

No laboratório, sempre que o valor do PSA total é superior a 3,0, determina-se o PSA livre. Se a razão PSA/PSA livre for inferior a 0,23, deve-se investigar a possibilidade de carcinoma da próstata; se o PSA/PSA livre for superior a 0,23, deve ser investigada a possibilidade de uma hipertrofia benigna da próstata.

6. Marcadores cardíacos

Quando há um enfarte agúdo, ocorre dano nas células do miocárdio, levando à libertação de enzimas e proteínas para a corrente sanguínea. Consideram-se marcadores cardíacos a troponina I, a CKMB e a mioglobina, que se libertam quando há necrose das células cardíacas. No entanto, nenhum destes marcadores é específico do músculo cardíaco, surgindo também no músculo-esquelético. Um aumento destes marcadores no sangue, embora possa ser em consequência dum enfarte do miocárdio, pode surgir também em casos de rabdomiólise (devido a esforço físico intenso, indução por fármacos, etc.) ou insuficiência renal (Aldous S. J. *et al.*, 2013). O perfil da libertação dos diferentes marcadores cardíacos está representado na figura 18.

6.1. Troponina I

As troponinas são proteínas envolvidas no processo de contração muscular, e que, portanto surgem associadas quer ao músculo cardíaco quer ao músculo-esquelético. Das três isoformas existentes, aquela que existe em maior quantidade no músculo cardíaco é a troponina I. A troponina I atinge um pico na concentração 20-24 horas após enfarte, e pode manter-se elevada durante cerca de 10 dias. (Aldous S. J. *et al.*, 2013)

6.2. Mioglobina

A mioglobina é uma heme-proteína também associada ao músculo. Pelo facto de ter um peso molecular baixo, é o marcador que se eleva mais rapidamente após enfarte. A mioglobina começa a ser libertada 2-4 horas após enfarte, atingindo o pico máximo ao fim de 6 horas. (Aldous S. J. *et al.*,2013)

6.3. CKMB

A creatina-cinase é uma enzima que surge preferencialmente nos tecidos com metabolismo elevado, e participa na produção de ATP a partir da creatina (produzida no rim). (Theo Wallimann *et al.*, 1992) Níveis elevados de CK podem ser encontrados no músculo-esquelético, músculo cardíaco, cérebro, retina, etc. Das várias isoformas da enzima, a CKMB é aquela que surge em maior quantidade no miocárdio. Os níveis de CKMB já são aparentes entre as 4 e as 8 horas após enfarte, e atingem pico máximo entre as 15 e as 24 horas. (Aldous S. J. *et al.*,2013)

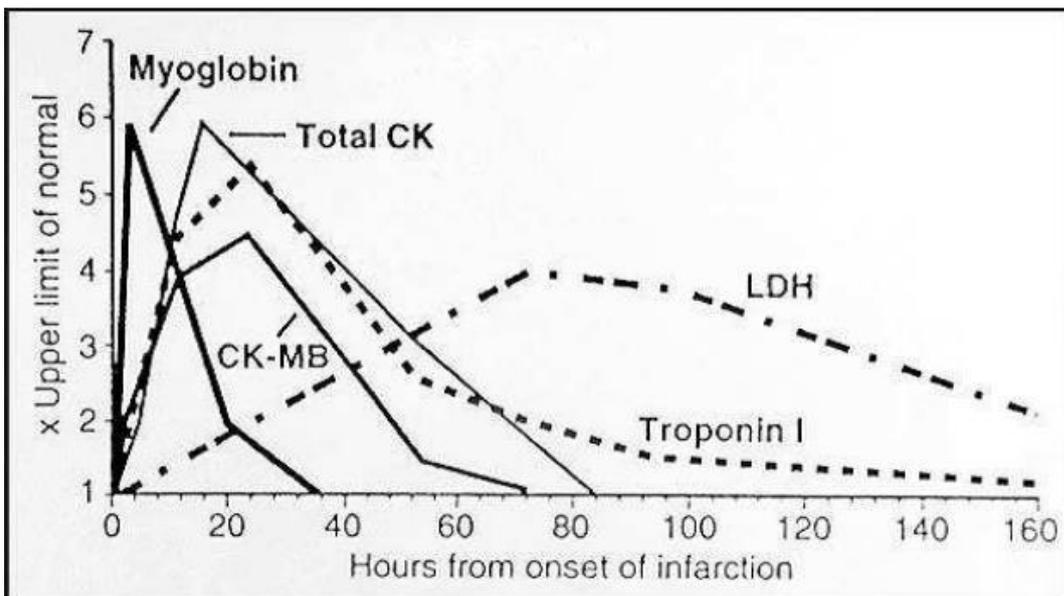


Figura 18: Libertação de mioglobina, CKMB e troponina I após enfarte agudo do miocárdio. A mioglobina, por ser de baixo peso molecular, atinge a concentração máxima mais cedo. A CKMB e a troponina I atingem a concentração máxima praticamente ao mesmo tempo, mas a troponina mantém níveis elevados durante mais tempo (Fonte: <http://yousense.info/63617264696163/cardiac-marker-an-overview-sciencedirect-topics.html>)

7. Marcadores da tiróide

A tiroide é uma glândula que produz hormonas que regulam diversas funções do organismo. Estas hormonas são a triiodotironina (T3) e a tetraiodotironina (T4), e a sua síntese envolve a captação de iodeto e a sua incorporação numa proteína, a tiroglobulina, por intermédio da enzima tiroxina-peroxidase (TPO). Cada precursor hormonal da tiroide é constituído por uma molécula de tiroglobulina, que pode conter até quatro átomos de iodeto ligados. (Markus Luster *et al.*, 2013)

Quando ocorre estimulação da tiroide pela TSH (hormona estimuladora da tiroide), as moléculas de tiroglobulina entram nas células da tiroide por pinocitose, e as moléculas são clivadas, no interior de lisossomas, para formar as hormonas T3 e T4.

A TSH estimula a produção das hormonas tiroideias, e é produzida na glândula pituitária. Esta, por sua vez, é regulada por uma outra hormona, a TRH (hormona reguladora da tiroide), produzida no hipotálamo. A concentração de T3 e T4 no sangue vai actuar como um mecanismo de feedback negativo sobre a produção da TRH. A produção de TRH atua por um mecanismo de feedback positivo na síntese de TSH. Quer isto dizer que, quando há, por exemplo, uma diminuição na concentração de T3 e T4, os níveis de TRH diminuem, e, por consequência, diminuem também os níveis de TSH: como resultado, o efeito estimulante na tiroide é diminuído, de modo a baixar os níveis hormonais.

A T3 e a T4, uma vez libertadas para a corrente sanguínea, a maioria circulam ligadas a proteínas transportadoras, como a globulina-ligante de tiroxina (TBG) e a albumina; outra parte circula na forma livre. (Markus Luster *et al.*, 2013)

Os marcadores da tiroide avaliados no laboratório são anticorpos anti-TG e anti-TPO, hormona TSH e as hormonas da tiroide: T3, T3 livre, T4 e T4 livre.

7.1. **Anti-TG**

A tiroglobulina é uma proteína sintetizada nos folículos da tiroide, formando colóides. Esta incorpora iodeto na sua constituição, e é a molécula precursora das hormonas tiroideias. A tiroglobulina pode ser alvo de autoanticorpos anti-TG, o que diminui a sua biodisponibilidade, o que leva a hipotiroidismo.

7.2. Anti-TPO

A TPO é a enzima responsável pela incorporação do iodeto na estrutura da tiroglobulina. A actividade desta enzima pode diminuir devido a: presença de anticorpos anti-TPO, deficiência de iodeto, ou deficiência de pendrina, uma molécula envolvida no transporte de iodeto (Markus Luster et al., 2013).

7.3. TSH

A TSH regula a produção de hormonas pela tiroide por feedback negativo. Quando a concentração de T3 e T4 no sangue aumenta, a TSH diminui; níveis baixos de T3 e T4 resultam num aumento da TSH. (Markus Luster et al., 2013).

7.4. Hormonas da tiroide

A T3 e a T4 são produzidas a partir da tiroglobulina, e circulam no sangue ou ligadas a outras proteínas, como a TBG (forma inativa), ou na forma livre (forma activa). Os níveis destas hormonas correlacionam-se com a actividade da glândula tiroide.

Uma grande parte das doenças da tiroide são de foro autoimune, e o tipo de autoanticorpos produzidos gera diferentes efeitos na produção de hormonas: anticorpos anti-TG e anti-TPO reduzem a biodisponibilidade da tiroglobulina enquanto precursora das hormonas tiroideias, e reduzem a actividade da TPO responsável pela incorporação do iodeto na tiroglobulina, respetivamente. Globalmente, estes dois tipos de anticorpos associam-se a uma diminuição da actividade da tiroide (hipotiroidismo). Já anticorpos anti-TSHr (anti-receptor do TSH) são anticorpos que, ao ligarem a este receptor, mimetizam os efeitos da TSH na estimulação da tiroide: isto aumenta a quantidade de T3 e T4 produzidas, e leva a hipertiroidismo. (Markus Luster et al., 2013).

8. Marcadores de anemia

O ácido fólico e a vitamina B₁₂ são dois elementos cujo metabolismo está intimamente associado. Ambos são adquiridos através da dieta (origem exógena), e participam em várias vias metabólicas, como a síntese de ácidos nucleicos, e o metabolismo das proteínas. São, portanto, dois elementos essenciais para tecidos do organismo com elevado turnover celular, como é o caso da medula óssea.

A anemia que está particularmente associada a uma deficiência em cobalamina e/ou folato é a anemia megaloblástica: uma anemia macrocítica, e em que os eritroblastos na medula apresentam um atraso na maturação do núcleo relativamente ao citoplasma. A bilirrubina indirecta pode surgir aumentada, assim como a LDH, pela destruição de células na medula óssea (A. V. Hoffbrand, P. A. H. Moss 2013).

8.1. Vitamina B₁₂

A vitamina B₁₂ é uma vitamina hidrossolúvel que é absorvida através da digestão de produtos de origem animal. A absorção da vitamina dá-se pela sua ligação ao factor intrínseco (IF) presente nas células parietais gástricas. O complexo B₁₂-IF liga ao recetor cubilina, no íleo, e é internalizado. Uma vez dentro do enterócito, há a dissociação do complexo: o IF é destruído, e a B₁₂ é absorvida, sendo transportada aos tecidos do organismo ligada a uma proteína transportadora, a transcobalamina.

A vitamina B₁₂ é co-factora de duas enzimas: a metionina-sintetase (MS) e a metilmalonilCoA mutase (MUT). A MS converte homocisteína em metionina, e usa, para a reacção o tetrahydrofolato como dador de um grupo metilo. A metionina formada é um aminoácido usado na síntese de purinas, que por sua vez integram a estrutura dos ácidos nucleicos.

A MUT converte a metilmalonilCo-A em succinilCoA, que é importante para o catabolismo de certos aminoácidos, (ex: valina, metionina e tionina), em substrato para as reacções metabólicas das mitocôndrias.

Uma deficiência em B₁₂ associa-se com casos de gastrite atrófica, em que a agressão da mucosa gástrica, por intermédio de autoanticorpos, resulta numa diminuição da absorção da

vitamina. Esses autoanticorpos podem ser contra o fator intrínseco ou contra o receptor cubilina. (A. V. Hoffbrand, P. A. H. Moss).

8.2. Folato

O folato é absorvido na forma livre, e é depois sujeito a reacções de redução e metilação para formar 5-metiltetrahydrofolato (5M-THF). É nesta forma que o folato circula no organismo, ligado à albumina.

O folato é co-factor das reacções de várias vias metabólicas, incluindo na síntese de ácidos nucleicos, nas vias metabólicas mitocondriais (ex: OCP, ou “one-carbon pathway”), e no metabolismo da homocisteína (Froese, D. S. et al., 2019).

Níveis baixos de ácido fólico podem causar anemia uma vez que a medula óssea é um tecido com elevado turnover celular.

Conclusão

Este estágio deu-me a oportunidade de, por um lado, consolidar alguns dos conhecimentos que adquiri no primeiro ano de mestrado; e por outro, permitiu aplica-los na prática laboratorial.

Tive a oportunidade de aprender, e executar, novas técnicas e metodologias, nomeadamente no sector da microbiologia, realçando sempre os cuidados básicos a ter no laboratório de modo a evitar contaminações, que para além de poderem interferir com os resultados das amostras, são sempre um perigo potencial para o técnico.

Em todos os sectores, demarcou-se a importância de verificar os valores obtidos em relação aos que constam no histórico do utente (que são os valores obtidos para o mesmo parâmetro em determinações anteriores). Tal nos dá a perceção se um valor anormal (acima ou abaixo do intervalo de referência) está de acordo com os resultados obtidos anteriormente (como no caso das doenças crónicas); se deve ser valorizado do ponto de vista patológico, ou se ocorreu algum erro na determinação do parâmetro.

Referências

1. **Key NS, Derebail VK.** - Sickle-cell trait: novel clinical significance. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2010; **2010**:418–422. DOI: 10.1182/asheducation-2010.1.418.
2. **Aldous SJ.** - Cardiac biomarkers in acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 2013; **164**:282–294. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20529285> [Accessed June 4, 2019]. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.01.081.
3. **Dean L.** - Blood Groups and Red Cell Antigens. *Blood Groups Red Cell Antigens.* 2005:1–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2264/#ch2.1.1>.
4. **Delves, P., Martin, S., Burton, D. and Roitt, I.** - (2017). *Roitt's essential immunology.* 13th ed. Chichester: Wiley Blackwell.
5. **Hoffbrand, A. and Moss, P.** - (2013). *Fundamentos em hematologia.* 6th ed. Porto Alegre: Artmed.
6. **Hoffbrand, A., Higgs, Douglas, Keeling, David and Mehta,** - Atul (2017), *Postgraduate Haematology,* 7th ed. Willey Blackwell.
7. **Froese DS, Fowler B, Baumgartner MR.** - Vitamin B 12 , folate, and the methionine remethylation cycle-biochemistry, pathways, and regulation. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2019. DOI: 10.1002/jimd.12009.
8. **Santos V, Da Cunha S, Da Cunha D.** - Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2000; **46**:232–236.
9. **Ucar K.** - Clinical presentation and management of hemolytic anemias. *Oncol. (willist. Park.* 2002; **16**:163–170. Available at: <http://www.physicianspractice.com>.
10. **Prcic A, Begic E, Hiros A.** - Actual Contribution of Free to Total PSA Ratio in Prostate Diseases Differentiation. *Med. Arch.* 2016; **70**:288. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27703291> [Accessed June 28, 2019]. DOI:

11. **Key, Nigel S., Makris, Michael, Lillicrap, David.** - *Practical Hemostasis and Thrombosis*, 3ª edição. 2007.DOI: 10.1002/9780470988633.

12. **Abbas, Abdul K., Lichtman, Andrew H., Pillai, Shiv,** - *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*, 5th ed. (2016) ELSEVIER

13. **Tu T, Patel K, Shackel N.** - *Viral Hepatitis*, 4th ed. (2017) Willey Blackwell .DOI: 10.1016/B978-0-12-800685-6.00017-5.

14. **B. DL.**- Blood cell morphology. *Int. J. Lab. Hematol.* 2014; **36**:28–29. Available at: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L71603534%0Ahttp://dx.doi.org/10.1111/ijlh.12265/abstract>.DOI:10.1111/ijlh.12265/abstract

15. **Ratnam S.** - The laboratory diagnosis of syphilis. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* = *J. Can. des Mal. Infect. la Microbiol. medicale.* 2005; **16**:45–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18159528> [Accessed June 28, 2019].DOI: 10.1155/2005/597580.

16. **Bain, Barbara.** - *Blood Cells: a Practical Guide*, 5th ed. (2015). Willey Blackwell

17. **Bessoles S, Grandclément C, Alari-Pahissa E, Gehrig J, Jeevan-Raj B, Held W.** - Adaptations of natural killer cells to self-MHC class I. *Front. Immunol.* 2014; **5**:1–6.DOI: 10.3389/fimmu.2014.00349.

18. **Ariëns RAS.** - Elevated fibrinogen causes thrombosis. *Blood.* 2011; **117**:4687–4688. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546470> [Accessed July 11, 2019].DOI: 10.1182/blood-2011-03-340422.

19. **Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM.** - Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* 1992; **281** (Pt 1):21–40. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1130636/pdf/biochemj00144-0029.pdf> [Accessed July 11, 2019].DOI: 10.1042/bj2812

