



Sónia Simões Antunes

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dr.^a Ana Sofia Jorge e pela Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sónia Simões Antunes

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dr.^a Ana Sofia Jorge e pela Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

Várias foram as pessoas que contribuíram e tornaram possível a realização do meu estágio e consequentemente a apresentação deste relatório. Aqui deixo um especial reconhecimento e agradecimento.

À Doutora Ana Sofia Jorge, por ter permitido que o meu estágio fosse realizado no Hemobiolab-Laboratório de Análises Clínicas, Lda, assim como pela amabilidade, simpatia e boa disposição diária.

A todos os colaboradores do Hemobiolab em especial à Doutora Lídia Magueijo, à Doutora Vera Santos, ao Doutor Marco Amaral e ao Doutor Armindo Fernandes pela disponibilidade demonstrada ao longo do meu estágio.

À Professora Doutora Leonor Martins Almeida, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, pelo apoio prestado ao longo do meu percurso académico neste mestrado.

À Professora Doutora Sara Margarida Domingues, pela ajuda prestada para a realização deste relatório.

Aos meus amigos em especial ao João Luís, pela sua disponibilidade e auxílio prestado com os seus conhecimentos de informática.

À minha família, pelo carinho, apoio e incentivo incondicional.

ÍNDICE

I. – INTRODUÇÃO	1
II. – CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO	2
2.1.- FASE PRÉ - ANALÍTICA	3
2.1.1.- COLHEITA DE SANGUE VENOSO	4
2.1.2.- AMOSTRAS COLHIDAS PELO UTENTE	4
2.2.- FASE ANALÍTICA	5
2.3.- FASE PÓS ANALÍTICA	5
2.3.1.- ARQUIVAMENTO DE AMOSTRAS	5
III. – CONTROLO DE QUALIDADE LABORATORIAL	6
3.1.-CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO	6
3.2.- AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE	6
IV. – SETOR LABORATORIAL DE BIOQUÍMICA CLÍNICA	7
4.1.- PRINCÍPIOS E EQUIPAMENTOS	9
4.1.1.- SIEMENS ADVIA 1800 SISTEMA DE BIOQUÍMICA	9
4.1.2.- AUTION MAX E SEDIMAX	9
4.1.3.- SEBIA SISTEMA DE ELERTOFORSE CAPILAR	10
4.2.- AMOSTRAS EM BIOQUÍMICA CLÍNICA	11
4.3.- AVALIAÇÃO DO RISCO CARDIOVASCULAR	11
4.3.1.- COLESTEROL TOTAL	11
4.3.2.- COLESTEROL HDL	12
4.3.3.- COLESTEROL LDL	13
4.3.4.- TRIGLICÉRIDOS	14
4.4.- AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL	16
4.4.1.-AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO GLOMERULAR	17
4.4.1.1.- DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS AZOTADOS NÃO PROTEICOS	17
4.4.1.1.1.- UREIA	17
4.4.1.1.2.- CREATININA	18
4.4.1.1.3.- CLEARANCE DE CREATININA	18
4.4.1.1.4.- ACIDO ÚRICO	19
4.4.2.- AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE GLOMERULAR	20
4.4.2.1.- MICROALBUMINÚRIA	21
4.4.3.- AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO TUBULAR	21
4.4.3.1.- ANÁLISE SUMÁRIA DA URINA	21
4.4.3.2.- SEDIMENTO URINÁRIO	22
4.5.- AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA	22
4.5.1.- AVALIAÇÃO DA SÍNTESE HEPÁTICA	22
4.5.1.1.- ESTUDO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	23
4.5.1.1.1.- PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS	23
4.5.1.1.2.- ALBUMINA	24

4.5.2.- PROTEÍNOGRAMA/SEPARAÇÃO DAS PREOTÉINAS SÉRICAS POR ELETROFORESE	24
4.5.3.- TEMPO DE PROTROMBINA	25
4.5.4.- ESTUDO DOS LÍPIDOS E LIPOPROTEÍNAS DO PLASMA	25
4.5.5.- UERIA E AMÓNIA	26
4.6.- AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO EXCRETORA	26
4.6.1.- BILIRRUBINA	26
4.7.- LIBERTAÇÃO DE ENZIMAS	28
4.7.1.- LESÃO HEPATOCELULAR	28
4.7.1.1.- ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) E ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)	28
4.7.2.- LESÃO CANALICULAR	30
4.7.2.1.- FOSFATASE ALCALINA	30
4.7.2.2.- GAMA GLUTAMILTRANSFERASE	30
4.8.- AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO PANCREÁTICA	31
4.8.1.- AMILASE	32
4.8.2.- LIPASE	32
4.9.- ESTUDO DE METABOLISMO DOS HISDRATOS DE CARBONO	33
4.9.1.- GLICÉMIA	33
4.9.2.- PROVA DE TOLERÂNCIA À GLUCOSE ORAL	34
4.9.3.- HEMOGLOBINA GLICADA	35
4.10.- ESTUDO DO METABOLISMO DO FERRO	36
4.10.1.- FERRO	36
4.10.2.- CAPACIDADE TOTAL DE FIXAÇÃO DE FERRO	37
4.10.3.- FERRITINA	38
4.10.4.- TRANSFERRINA	39
4.11.- OUTROS	39
4.11.1.- PROTEÍNA C REATIVA	39
4.11.2.- PROTEÍNA CINASE	40
4.11.3.- LACTATO DESIDROGENASE	41
V. – SECÇÃO DE HEMATOLOGIA	43
5.1.- EQUIPAMENTOS E PRINCÍPIOS	43
5.1.1.- HORIBA MEDICAL ABX PentraML	43
5.1.2.-SIEMENS BCS XP	44
5.1.3.- VES-MATIC 30 PLUS	44
5.1.4.- HA-8160 A. MENARINI diagnostics	45
5.2.-AMOSTRAS EM HEMATOLOGIA	46
5.3.- HEMOGRAMA	46
5.3.1.- ERITRÓCITO	48
5.3.2.- HEMOGLOBINA	48
5.3.3.- HEMATÓCRITO	48
5.3.4.- VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO	50
5.3.5.- HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA	50
5.3.6.- CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA COEPUSCULAR MÉDIA	50

5.3.7.- DISTRIBUIÇÃO DO VOLUME ERITROCITÁRIO	50
5.3.8.- CONTAGEM DE RETICULÓCITOS	50
5.3.9.- CONTAGEM DE PLAQUETAS	51
5.3.10.- CONTAGEM DE LEUCÓCITOS	52
5.3.10.1.- CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS	52
5.3.10.2.- DIFERENCIAL LEUCOCITÁRIO	53
5.3.10.3.- NEUTRÓFILOS	53
5.3.10.4.- LINFÓCITOS	54
5.3.10.5.- MONÓCITOS	55
5.3.10.6.- EOSINÓFILOS	56
5.3.10.7.- BASÓFILOS	56
5.4.- ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO	56
5.5.- ALGUMAS PATOLOGIAS ASSOCIADAS À LINHAGEM ERITROIDE	58
5.6.- ALGUMAS PATOLOGIAS ASSOCIADAS A ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE LEUCÓCITOS	61
5.7.- COAGULAÇÃO	63
5.7.1.- TEMPO DE PROTROMBINA	66
5.7.2.- TEMPO DE TROMBOBLASTINA PARCIAL ATIVADO	66
5.7.3.- FIBRINOGENIO	67
5.8.- VELOCIDADE DESEDIMENTAÇÃO	67
5.9.- DETERMINAÇÃO DE HEMOGLOBINAS ESPECÍFICAS	68
5.9.1.- HEMOGLOBINA A1 _c	68
5.9.2.- HEMOGLOBINA A2 E HEMOGLOBINA F	68
5.9.3.- HEMOGLOBINA S	69
5.10.- GRUPO SANGUÍNEO – SISTEMA AB0 E RHESUS	70
5.11.- CONTROLO DE QUALIDADE EM HEMATOLOGIA	71
VI. – CONCLUSÃO	73
VII. – BIBLIOGRAFIA	75

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- SIEMENS ADVIA 1800 SISTEMA DE BIOQUÍMICA	9
FIGURA 2.- AUTION MAX E SEDIMAX	9
FIGURA 3.- SEBIA SISTEMA DE ELETROFORESE CAPILAR	10
FIGURA 4.- REAÇÕES QUE OCORREM NA DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL TOTAL	12
FIGURA 5.- FÓRMULAS PARA CÁLCULO DE ÍNDICE ATEROGÉNICO	13
FIGURA 6.- REAÇÕES QUE OCORREM NA DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL HDL	13
FIGURA 7.- REAÇÕES OCORREM NA DETERMINAÇÃO DE TG	15
FIGURA 8.- CASO CLÍNICO DE DISLIPIDÉMIA	16
FIGURA 9.- REAÇÕES QUE OCORREM NA DETERMINAÇÃO DE UREIA	17
FIGURA 10.- INTERCONVERSÃO DA CREATININA DA FOSFOCREATININA	18
FIGURA 11.- REAÇÃO QUE OCORRE NA DETERMINAÇÃO DA CREATININA	19
FIGURA 12.- FÓRMULA USADA PARA CÁLCULO DE CREATININA	19
FIGURA 13.- FÓRMULA DE COCKCROLF-GAULT	19
FIGURA 14.- REAÇÕES QUE OCORREM NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO	20
FIGURA 15.- REAÇÃO DO BIURETO USADA PARA DETERMINAR PROTEÍNAS TOTAIS	24
FIGURA 16.- REAÇÃO QUE OCORRE NA DETERMINAÇÃO DE ALBUMINA COM BASE NO COMPLEXO ALBUMINA-PBC/BCG	24
FIGURA 17.- PERFIL ELETROFORÉTICO (DE ZONA) DAS PROTEÍNAS SÉRICAS COM INDICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS EM CADA BANDA ELETROFORÉTICA	25
FIGURA 18.- REAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE BILIRRUBINA TOTAL PELO DIAZO MÉTODO	27
FIGURA 19.- FÓRMULA PARA CÁLCULO DA BILIRRUBINA INDIRETA	28
FIGURA 20.- REAÇÕES NA DETERMINAÇÃO DE ALT	29
FIGURA 21.- REAÇÕES QUE OCORREM NA DETERMINAÇÃO DE AST	29
FIGURA 22.- REAÇÕES QUE OCORREM NA DETERMINAÇÃO DE GGT	30
FIGURA 23.- REAÇÃO DE DETERMINAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA	31
FIGURA 24.- CASO CLÍNICO DE LESÃO CANALICULAR	31
FIGURA 25.- REAÇÃO QUE OCORRE NA DETERMINAÇÃO DE AMILASE	32
FIGURA 26.- REAÇÃO QUE OCORREM NA DETERMINAÇÃO DA LIPASE	33
FIGURA 27.- REAÇÃO QUE OCORRE NA DETERMINAÇÃO DE GLICOSE PELO MÉTODO DE HEXOCINASE	34
FIGURA 28.- CASO CLÍNICO DE INDIVÍDUO COM GLICÉMIA NÃO CONTROLADA	36

FIGURA 29.- REAÇÕES QUE OCORREM NA DETERMINAÇÃO DE FERRO	37
FIGURA 30.- REAÇÕES QUE OCORREM NA DETERMINAÇÃO DE CFPT	38
FIGURA 31.- REAÇÕES NA DETERMINAÇÃO DE CK	41
FIGURA.32.- REAÇÕES QUE OCORREM NA DETERMINAÇÃO DE LDH	42
FIGURA 33.- HORIBA MEDICAL ABX Pentra ML	43
FIGURA 34.- SIEMENS BCS XP	44
FIGURA 35.- VES-MATIC 30 PLUS	44
FIGURA 36.- HA-8160 A. MENARINI diagnostics	45
FIGURA 37.- HISTOGRAMA DE ERITRÓCITOS	49
FIGURA 38.- MATRIZ LMNE	53
FIGURA 39.- NEUTRÓFILO	53
FIGURA 40.- LINFÓCITO	54
FIGURA 41.- LINFÓCITO ATÍPICO	55
FIGURA 42.- MONÓCITO	55
FIGURA 43.- EOSINÓFILO	56
FIGURA 44.- BASÓFILO	56
FIGURA 45.- CÉLULAS COM MORFOLOGIA ANORMAL ASSOCIADAS A DETERMINADAS PATOLOGIAS	57
FIGURA 46.- AGREGADOS PLAQUETÁRIOS	57
FIGURA 47.- TÉCNICA CORRETA PARA REALIZAR UM ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO	58
FIGURA 48.- HEMOGRAMA COM MACROCITOSE	59
FIGURA.49.- DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS PARA CONFIRMAÇÃO DE ANEMIA FERROPÊNICA	60
FIGURA 50.- HEMOGRAMA COM ANEMIA NORMOCÍTICA E NORMOCRÓMICA	60
FIGURA 51.- CASCATA DA COAGULAÇÃO	63
FIGURA 52.- INDIVÍDUOS COM GRUPO SANGUÍNEO A/RH+	71

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.- PARÂMETROS ANALISADOS EM CADA AUTOANALISADOR POR SECÇÃO	3
TABELA 2.- CÓDIGO DE CORES NAS TAMPAS E RESPETIVO ANTICOAGULANTE	4
TABELA 3.- TIPOS DE CÁLCULOS URINÁRIOS	22
TABELA 4.- CRITÉRIOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE CATEGORIAS DE RISCO AUMENTADO PARA DIABETES	34
TABELA 5.- PATOLOGIAS ASSOCIADAS AOS VALORES DE FERRO, TRANSFERRINA E FERRITINA	37
TABELA 6.- VALORES DE REFERÊNCIA PARA HEMOGLOBINAS ESPECÍFICAS	
TABELA 7.- VALORES DE REFERÊNCIA NUM HEMOGRAMA	47
TABELA 8.- CLASSIFICAÇÃO GENÉRICA NAS ANEMIAS EM 3 GRUPOS	49
TABELA 9.- FATORES QUE DIMINUEM A RESPOSTA NORMAL DOS RETICULÓCITOS À ANEMIA	51
TABELA 10.- DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS PARA CONFIRMAÇÃO DE MACROCITOSE	59
TABELA 11.- DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS PARA CONFIRMAÇÃO DE ANEMIA FERROPENICA	60
TABELA 12.- DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS PARA CONFIRMAÇÃO DE ANEMIA POR DOENÇA INFLAMATÓRIA CRÓNICA	61
TABELA 13.- PATOLOGIAS ASSOCIADAS A ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE LEUCÓCITOS	62
TABELA 14.- FATORES DA COAGULAÇÃO	64
TABELA 15.- FATORES ANTICOAGULANTES	65
TABELA 16.- INTERPRETAÇÃO DO GRUPO AB0	70
TABELA 17.- INTERPRETAÇÃO DO GRUPO RH	70

ABREVIATURAS

- ADP.** Adenosina Difosfato
- AEQ.** Avaliação Externa da Qualidade
- Ags.** Antigénios.
- ALP.** Fosfatase Alcalina
- ALT.** Alanina Aminotransferase
- AST.** Aspartato Aminotransferase
- ATP.** Adenosina Trifosfato
- BASO.** Basófilos
- BCG.** Verde de Bromocreseol
- E.C.** Eletroforese Capilar
- CHCM.** Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
- CK.** Creatina Cinase
- CMV.** Citomegalovírus
- CQI.** Controlo de Qualidade Interno
- CTFF.** Capacidade Total de fixação de Ferro
- DCV.** Doença Cardiovascular
- DG.** Diabetes Gestacional
- DGS.** Direção Geral de Saúde
- DM.** Diabetes *Mellitus*
- EBV.** Vírus Epstein-Barr
- EDTA.** Ácido Etilenodiaminotetracético do inglês “*Ethylene Diamine Tetracetic Acid*”
- EFP.** Eletroforese de Proteínas
- ESP.** Esfregaço de Sangue Periférico
- FFUC.** Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
- GGT.** Gama Glutamiltransferase
- Hb A.** Hemoglobina A
- Hb A₂.** Hemoglobina A₂
- Hb F.** Hemoglobina F
- Hb.** Hemoglobina
- HbA1c.** Hemoglobina Glicada
- HCT.** Hematócrito
- HDL.** Lipoproteína de alta densidade, do inglês “*high Density Lipoprotein*”

- HIV.** Vírus da Imunodeficiência Humana do inglês “*Human Immunodeficiency Virus*”
- HPLC.** Cromatografia líquida de alta resolução do inglês “*high performance liquid chromatography*”
- hs PCR.** Proteína C Reativa de alta sensibilidade, do inglês “*high sensitivity PCR*”
- INR.** Índice Internacional Normalizado, do inglês “*International Normalized Ratio*”
- LDH.** Lactato desidrogenase
- LDL.** Lipoproteína de baixa densidade, do inglês “*Low Density Lipoprotein*”
- LMNE.** Linfócitos Monócitos Neutrófilos Eosinófilos
- LPL.** Lipoproteína Lipase
- MAC.** Mestrado em Análises Clínicas
- NAD.** Nicotinamida Adenina Dinucleótido
- NK.** Natural Killer
- OF.** Ordem dos Farmacêuticos
- OMS.** Organização Mundial de Saúde
- PBC.** Púrpura de Bromocresol
- PCR.** Proteína C Reativa
- PTGO.** Prova de Tolerância à Glucose Oral
- RBC.** Eritrócitos, do inglês “*Red Blood Cells*”
- RDW.** Distribuição do Volume Eritrocitário
- Rh..** Rhesus
- TFG.** Taxa de Filtração Glomerular
- TG.** Triglicéridos
- TP.** Tempo de Protrombina
- TPPa.** Tempo de Tromboplastina Parcial ativado
- VCM.** Volume Corpuscular Médio
- VLDL.** Lipoproteína de muito baixa densidade, do inglês “*Very Low Density Lipoprotein*”.
- VS.** Velocidade de Sedimentação
- VWF.** *Von Willebrand*

RESUMO

O presente relatório tem como objetivo descrever de forma sucinta as atividades realizadas durante o meu estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade da FFUC realizado no Hemobiolab-laboratório de análises clínicas Lda. É apresentada inicialmente uma breve descrição do local de estágio seguindo-se um especial destaque das valências de Bioquímica Clínica e Hematologia onde explico as metodologias utilizadas no laboratório e os critérios utilizados na interpretação e validação dos resultados analíticos. Descrevo ainda de uma forma sucinta, o processo de controlo de qualidade que permite ao Laboratório garantir a qualidade dos resultados fornecidos aos utentes.

ABSTRACT

This report aims to describe briefly the activities performed during my internship for Master degree in Clinical Analyses of Faculty of FFUC held in Hemobiolab-laboratory of clinical analyses, Lda. Initially it is present a brief description of the place of internship followed by a special highlight of the Clinical Biochemistry and Hematology sections where I explain the methodologies used in the laboratory, as well as the criteria applied in the interpretation and validation of analytical results. Briefly, it also describe the process of quality control that allows the laboratory to ensure the reliability of the results obtained and delivered to users.

I. INTRODUÇÃO

Os laboratórios de Análises Clínicas desempenham um papel fundamental a nível dos cuidados prestados nos serviços de saúde, permitindo não só realizar um diagnóstico clínico com base nos dados fornecidos no boletim, como também prevenir uma possível patologia, orientar bem como monitorizar uma terapêutica.

Toda a informação clínica fornecida, assim como a garantia dos serviços prestados pelo laboratório de Análises Clínicas é da responsabilidade do profissional de saúde, sendo como tal essencial a existência de profissionais qualificados para que os diversos métodos usados ao longo de todo o processo analítico, a interpretação e posterior validação dos resultados obtidos seja realizada de forma correta.

O estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas (MAC) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) tem como objetivo permitir aos alunos que estabeleçam um contacto com a realidade laboratorial, através da passagem pelas valências de Bioquímica Clínica, Imunologia/Endocrinologia, Hematologia e Microbiologia; de modo a possibilitar a aquisição de competências práticas, nomeadamente a nível das técnicas e equipamentos utilizados, assim como aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo deste Mestrado.

Segue neste relatório uma breve descrição do meu estágio curricular realizado no Hemobiolab-Laboratório de Análises Clínicas, realizado no âmbito do MAC na FFUC, com especial ênfase nas valências de Bioquímica Clínica e Hematologia.

II. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O meu estágio curricular foi realizado no laboratório Hemobiolab - Laboratório de Análises Clínicas, Lda; cuja Direção Técnica está a cargo da Dra. Ana Sofia Clemente Jorge, Farmacêutica e especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos (OF). Da equipa de trabalho fazem parte: 2 Farmacêuticos, também eles especialistas em análises clínicas pela OF, a Dra. Lídia Magueijo, que exerce a função de Diretora Técnica Adjunta, e o Dr. Marco Amaral; 1 Técnico Superior de Saúde, a Dra. Vera Santos; e vários Técnicos de Análises Clínicas.

O Hemobiolab é um dos quatro laboratórios centrais que pertencem ao grupo Affidea, designado por Euromedic até inícios de 2015, e está organizado em vários postos de colheitas situados nos distritos de Guarda, Castelo Branco, Santarém, Portalegre e Beja, sendo cerca de 600 o número de amostras diárias. Está aberto ao público de segunda a sexta-feira das 8h00 às 18h00 e aos sábados das 8h30 às 13h00, período de tempo no qual não só exerce atividade no âmbito do Serviço Nacional de Saúde Português e de outras entidades, como também a qualquer utente a título particular. Também presta serviços a empresas sob a legislação referente a Higiene e Saúde no Trabalho.

Encontra-se dividido em diferentes espaços onde são realizadas atividades específicas: sala de atendimento ao público; duas salas de colheitas com casa de banho; quatro gabinetes distribuídos pela direção técnica; controlo de qualidade, administração e sala de reuniões; uma copa para descanso e refeições dos funcionários e o laboratório propriamente dito, também ele dividido em espaços onde são executadas as valências de Bioquímica, Imunologia/Endocrinologia, Hematologia e Microbiologia.

O Hemobiolab deu-me a possibilidade de realizar o meu estágio em todas as valências acima descritas assim como contactar com os diversos equipamentos (Tabela I).

Tabela I - Parâmetros analisados em cada autoanalisador por secção.

Secção	Autoanalisadores	Parâmetros
Bioquímica Clínica	ADVIA1800 Siemens	Bioquímicos, fármacos, proteínas específicas
	Capillarys Sebia	Perfil eletroforético
Imunologia/endocrinologia	Centaur Xp Siemens	Marcadores endócrinos, tumorais, anemia e de infeciologia
	Immulite 2000 Siemens	Marcadores virais e endócrinos
	Zenit sp e Zenit ra	Autoanticorpos específicos
Hematologia	Horiba ABX Pentra PmL	Hemograma com diferencial leucocitário e contagem de reticulócitos
	BCS Siemens	Provas de hemóstase e de coagulação
	Vesmatic Cube 80 diese	Velocidade de sedimentação
Microbiologia	Aution Max Ax-4280	Análise sumária da urina/urina tipo II
	Vitek Biomeriex	Identificação de microrganismos. Teste de suscetibilidade a antimicrobiano.

O trabalho diário está dividido em 3 fases: fase pré-analítica, analítica e pós analítica.

2.1. FASE PRÉ-ANALÍTICA

Nesta fase procede-se a todos os passos antecedentes à análise das amostras. É feita uma análise cuidada da prescrição médica para identificar quais os parâmetros que devem ser determinados; o utente é preparado e segue-se a colheita dos produtos biológicos que são corretamente identificados.

No Hemobiolab, esta fase corresponde essencialmente ao período da manhã, onde no laboratório propriamente dito se faz a preparação dos vários equipamentos (calibrações, controlos, manutenções) de forma a garantir a qualidade da execução técnica das amostras; enquanto na receção os utentes são atendidos por 2 assistentes administrativos que fazem o preenchimento da ficha do utente e seu registo no sistema informático *Edeia*, e quais as análises a efetuar para de seguida se proceder à colheita das amostras.

As colheitas são feitas em salas próprias e são efetuadas por técnicos competentes devidamente habilitados, com a formação e experiência adequadas.

2.1.1. COLHEITA DE SANGUE VENOSO

No Hemobiolab é usado um código de cores nas tampas que permite identificar os tubos com o seu respetivo anticoagulante, para assim poder proceder à sua escolha consoante a análise pretendida (Tabela 2).

Tabela 2 - Código de cores nas tampas e respetivo anticoagulante

Cor	Anticoagulante
Azul	Citrato de Sódio
Verde	Heparina
Lilás	EDTA
Cinzento	Fluoreto de Sódio

2.1.2. AMOSTRAS COLHIDAS PELO UTENTE

O procedimento correto para a colheita de amostras pelo utente deve ser explicado de forma clara, e depois deste a ter feito, deve ser questionado quanto à forma como procedeu. Caso percebamos que esta não foi realizada de forma correta ou caso a amostra não esteja nas devidas condições, deverá ser rejeitada e repetida a colheita com os cuidados adequados, de modo a evitar falsos resultados.

Durante o meu período de estágio as amostras mais frequentemente colhidas pelo utente foram a primeira urina da manhã, a urina de 24 horas e as fezes.

Para a recolha da primeira urina da manhã, o jato intermédio de urina deve ser colhido em recipiente estéril após lavagem da zona genital. Esta última também poderá ser colhida nas casas-de-banho existentes nas salas de colheitas, caso o indivíduo não tenha urinado nas 3 a 4 horas anteriores.

Para a colheita da urina das 24 horas, o intervalo de tempo durante o qual todas as micções realizadas ao longo desse mesmo dia têm de ser recolhidas, começa a contar a partir do momento em que o indivíduo esvazia a bexiga. Findo esse tempo, obtém um recipiente com toda a urina das 24 horas, cujo volume obtido irá ser importante na expressão dos resultados.

As fezes eram frequentemente examinadas na análise microbiológica e na deteção de sangue oculto. O utente deve ter o cuidado de colher uma pequena quantidade, não contaminada com urina ou com outro fluido ou material para um recipiente estéril. Para a realização da coprocultura, uma única amostra é suficiente, enquanto para os exames parasitológico de fezes e de sangue oculto, devem ser colhidas três amostras em dias alternados ou consecutivos, respetivamente.

Após a colheita e receção das amostras, todas são identificadas através de etiquetas com um código de barras interno, nas quais também consta: o nome do utente, a data e o número da amostra sendo este precedido de uma sigla composta por duas letras que permite identificar o local onde foi feita a colheita, e de uma extensão constituída por um código interno de 3 algarismos, que corresponde a determinada análise.

As amostras provenientes dos postos de colheitas são transportadas para o Hemobiolab através de viaturas próprias, refrigeradas e protegidas da luz dentro de malas isotérmicas.

2.2. FASE ANALÍTICA

Esta fase consiste no processamento da amostra de modo a se poder ter resultados das análises realizadas.

2.3. FASE PÓS ANALÍTICA

Nesta fase é feita a interpretação e validação dos resultados obtidos pelo Técnico Superior de Saúde, sendo depois o boletim analítico confirmado e assinado pela Diretora Técnica, Diretora Técnica-Adjunta e pelo Farmacêutico Especialista em Análises Clínicas.

2.3.1. ARQUIVAMENTO DE AMOSTRAS

No final de cada dia de trabalho, as amostras de soro e de sangue total são arquivadas em suportes próprios, identificados por uma sequência numérica, tapadas e armazenadas durante uma semana. No sistema informático, fica registado qual a posição de cada amostra, para o caso de ser necessário repetir alguma análise.

Os tubos de soro são congelados e os de sangue total refrigerados.

As amostras de urina e fezes são eliminadas no final do dia.

III. CONTROLO DE QUALIDADE LABORATORIAL

É crucial assegurar que se trabalha com qualidade no laboratório de Análises Clínicas pois a decisão do médico depende do resultado obtido, sobretudo quando envolve valores críticos.

Para atingir elevados níveis de qualidade quer em termos éticos como técnicos, devem seguir-se as boas práticas profissionais. O Hemobiolab tem uma política de qualidade, cuja direção está a cargo da Dra. Ana Margarida Martinho, na qual está implementado:

- ❖ O Controlo de Qualidade Interno (CQI), necessário para a monitorização diária da precisão dos métodos analíticos e dos equipamentos do laboratório;
- ❖ A Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), realizado por uma entidade externa, na qual é realizada uma análise retrospectiva do desempenho do laboratório, mais concretamente da exatidão dos métodos, de forma a promover o desenvolvimento de estratégias para uma melhoria constante.

3.1. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

O controlo de qualidade interno pode definir-se como um conjunto de procedimentos postos em prática num laboratório, quer sejam na fase pré-analítica, quer analítica e pós-analítica, que se destinam a assegurar a qualidade dos resultados obtidos para a amostra (1).

Na fase analítica do CQI, os produtos do controlo de qualidade deveriam ser, idealmente, materiais semelhantes à amostra real (2). Quando um sistema analítico apresenta diferentes respostas (resultados estatisticamente diferentes) para a mesma quantidade de analito presente em materiais processados (controlos e calibradores) e em amostras humanas, esta diferença é denominada efeito da matriz. Por isso, do ponto de vista ideal, os materiais processados (calibradores ou controlos) e amostras deveriam gerar a mesma resposta num sistema de medição utilizado na rotina. Assim, nesta fase, o CQI permite reduzir a imprecisão e é feito, diariamente em todos os equipamentos antes do processamento das amostras dos utentes, utilizando dois ou três níveis de controlo de qualidade diferentes (2). Sempre que um novo *kit* ou lote de reagente é utilizado, em cada nova calibração, após manutenção específica ou procedimentos de resolução rápida de problemas no equipamento ou quando se verifica alguma tendência dos resultados, deve proceder-se igualmente a novo controlo do equipamento. Os dados resultantes são registados e analisados, estabelecendo o laboratório os critérios de aceitação segundo as Regras de *Westgard* e *Levey-Jennings* (3).

O Hemobiolab possui um programa informático que permite a integração dos dados obtidos e a sua análise.

De modo a que os métodos analíticos forneçam resultados rigorosos e reprodutíveis, é essencial que as variáveis analíticas estejam controladas. Na fase analítica, é feito o CQI de acordo com o manual de boas práticas laboratoriais (4). Isto inclui a verificação da linearidade e a precisão do ensaio e, para tal, é necessária a análise de soluções de concentração conhecida – os controlos internos - com a consequente construção e interpretação das cartas de controlo de qualidade com os valores observados, segundo as regras de *Westgard*. Os controlos são introduzidos no início de cada dia de trabalho, sendo usado consoante o aparelho, entre os 2 e os 3 níveis de controlo. No CQI é feita a validação técnica dos resultados obtidos nos controlos internos e pela deteção de não conformidades. Caso isso aconteça, será necessário tomar medidas corretivas, tais como a calibração dos reagentes com calibradores próprios, a verificação do estado dos reagentes ou de outras situações de ordem técnica. A análise com os controlos é de seguida repetida até se encontrarem dentro dos valores de referência contidos nas bulas do fornecedor. Apesar de o CQI estar exclusivamente focado na fase analítica, o controlo da qualidade envolve igualmente as restantes fases laboratoriais, nomeadamente o controlo das variáveis pré-analíticas e pós-analíticas.

Ao nível da Fase Pré-Analítica existe um manual de colheitas, onde estão contemplados os procedimentos para uma colheita correta dos vários produtos biológicos analisados, seu transporte e acondicionamento. Visto que 70% de todos os erros laboratoriais se registarem nesta fase, torna-se assim necessário o seguimento deste manual, contribuindo para um maior controlo de algumas variáveis inerentes a este processo.

Para a fase pós-analítica, como a maioria dos erros resulta de lapsos na transcrição de resultados, para os minimizar, é feita uma verificação pela diretora técnica, antes de esta assinar o boletim analítico.

3.2. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE

Para além do CQI, o Hemobiolab ainda participa ativamente no Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P. por forma a avaliar a exatidão dos métodos utilizados com a deteção de erros sistemáticos. Portanto, esta constitui uma forma de monitorizar retrospectivamente a competência do laboratório em dar resultados credíveis, ao mesmo tempo que os compara com outros laboratórios.

Com uma certa periodicidade, o Hemobiolab recebe amostras desconhecidas fornecidas por essa entidade externa certificada. Estas são analisadas nas mesmas condições de trabalho a que são sujeitas as amostras dos utentes. Estes valores são posteriormente reportados ao seu provedor, que faz a análise dos resultados e os torna disponíveis aos vários laboratórios participantes. De acordo com as informações daí obtidas, poderá ser necessária a implementação de medidas corretivas e/ou preventivas de modo a melhorar os níveis de desempenho do laboratório.

IV. SETOR LABORATORIAL DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

4.1. EQUIPAMENTOS E PRINCÍPIOS

4.1.1. SIEMENS ADVIA I 800 SISTEMA DE BIOQUÍMICA

O sistema bioquímico ADVIA® I 800 (Figura 1) é um analisador automatizado de química clínica que pode processar amostras de soro humano, plasma ou urina. Destina-se a ser usado no diagnóstico *in vitro* de parâmetros bioquímicos, descritos posteriormente.

Neste equipamento as determinações são feitas por espectrofotometria em que o espectrofotômetro mede a quantidade de luz absorvida pelos líquidos contidos nas cuvets de reação, em 14 comprimentos de onda específicos. A cada seis segundos o prato de reação (RRV) desloca as cuvets que contêm líquido de reação (amostra e reagente) à frente de uma lâmpada de halogêneo, que envia luz através das cuvets. De cada vez é medido um comprimento de onda diferente. Em seguida o fotômetro mede a absorvência com base na energia da lâmpada e na densidade ótica das cuvets. Este processo é repetido durante todas as vezes e comprimentos de onda exigidos pelas condições do ensaio.



Figura 1 - Siemens Advia I 800 Sistema de Bioquímica.

4.1.2. AUTION MAX E SEDIMAX

O Aution Max (A. Menarini Diagnostics) (Figura 2) é um equipamento destinado à primeira fase da análise sumária de urina. Executa as determinações de: densidade, cor, turvação, glicose, bilirrubinas, proteínas, pH, sangue, corpos cetônicos, urobilinogênio, nitritos e leucócitos.



Figura 2 - Aution Max e Sedimax A. Menarini Diagnostics.

Os métodos de leitura utilizados são:

- Refletância em biocromatismo através do uso de tiras reagentes que são introduzidas no equipamento: glicose, bilirrubinas, pH, sangue, corpos ctônicos, urobilinogénio e nitritos;
- Índice de refração: densidade;
- Refletância em 4 comprimentos de onda: cor;
- Método de dispersão de luz: turvação.

Sedimax (A. Menarini Diagnostics) (Figura 2) é um equipamento usado para analisar o sedimento urinário. Capta imagens de microscopia de alta definição das amostras, faz uma análise morfológica e contagem das partículas, assim como uma interpretação dos resultados. Todas as imagens são armazenadas no *software* o que permite uma reavaliação por parte do operador.

As partículas detetadas por microscopia digital de campo completo são: glóbulos vermelhos, glóbulos brancos, cilindros hialinos, cilindros patológicos, células epiteliais escamosas, células epiteliais renais e células de transição, bactérias, leveduras, cristais de oxalato de cálcio mono-hidratado e oxalato de cálcio di-hidratado, ácido úrico, trifosfatos, muco e espermatozoides.

4.1.3. SEBIA-SISTEMA DE ELETROFORESE CAPILAR

É um sistema de eletroforese capilar (CE) (Figura 3) automatizado para análise de proteínas. Este sistema é termorregulado, impedindo oscilações de temperatura, assegurando melhor reprodutibilidade da análise.

Na CE, a eletroforese é realizada num tubo capilar de sílica fundida de



Figura 3 - Sebia Sistema de eletroforese capilar.

diâmetro interno pequeno, coberto externamente com uma camada polimérica (poliimida) fina. Este tubo capilar funciona como uma câmara eletroforética capilar que é ligado a um detetor na sua extremidade terminal e, através de reservatórios de tampão, a uma fonte de alta voltagem. A CE tem como principal vantagem a dissipação eficiente de calor o que permite a aplicação de voltagens na faixa de 25-30 kV, o que aumenta a eficiência não só da separação como reduz o tempo desta última.

4.2. AMOSTRAS EM BIOQUÍMICA CLÍNICA

Na secção de bioquímica clínica as amostras são de soro, obtidas após centrifugação do sangue, sendo a colheita feita para tubos sem anticoagulante que permite manter a estabilidade das amostras durante uma semana, quando estas são refrigeradas a uma temperatura compreendida entre 2-8 °C (4).

4.3. AVALIAÇÃO DO RISCO CARDIOVASCULAR

As doenças cardiovasculares (DCV) representam a principal causa de morte em Portugal, havendo diversos fatores que contribuem para o seu desenvolvimento, como a aterosclerose caracterizada por ser um processo inflamatório crónico devido à acumulação de lípidos na íntima das artérias, que levam à formação de placas ateroscleróticas e, consequentemente ao estreitamento do lúmen da artéria. Estas placas têm tendência a tornarem-se instáveis, e quando o seu conteúdo é exposto, a coagulação é ativada originando trombos que interrompem o fluxo sanguíneo dessa artéria ou de outros vasos sanguíneos em locais diferentes do organismo, que por sua vez leva a uma situação de isquémia, à qual se pode seguir necrose dos tecidos circundantes que causam enfarte agudo do miocárdio ou acidente vascular cerebral.

Através do perfil lipídico que consiste em dosear o colesterol total, o colesterol-LDL (lipoproteína de baixa densidade do inglês: “*low density lipoprotein*”), o colesterol-HDL (lipoproteínas de alta densidade do inglês “*high density lipoprotein*”) e os triglicéridos (TG), é avaliado o risco cardiovascular de utentes de modo a tentar diminuir o desenvolvimento de DCV. Para determinar o perfil lipídico, é importante que seja feito um jejum de 10 a 12 horas por parte do utente para evitar interferências com os lípidos da dieta.

4.3.1. COLESTEROL TOTAL

O colesterol é fundamental ao organismo humano porque é um componente essencial na estrutura de biomembranas, é precursor não só de todas as hormonas esteroides como também dos ácidos biliares. No organismo, o colesterol total tem como origem a dieta (cerca de 15%), sendo incorporado nos Quilomicrons de modo a poder ser absorvido a nível intestinal, ou ser sintetizado no fígado (cerca de 85%). Antes de ser absorvido, o colesterol é solubilizado, processo designado por emulsificação, através da formação de micelas mistas que contêm: sais biliares, ácidos gordos, monoacilgliceróis, colesterol livre, lisofosfolípidos e fosfolípidos (5). Os sais biliares que atuam como detergentes são o fator mais crítico na formação de micelas visto que na sua ausência a

absorção do colesterol é prejudicada. A quantidade de colesterol proveniente da dieta também influencia a absorção, visto que quanto maior for a quantidade de gordura ingerida, maior é a formação de micelas mistas, e conseqüentemente mais colesterol é absorvido a nível intestinal (5). A absorção do colesterol no intestino, assim como a sua biossíntese no fígado são processos autorregulados. Quando no interior do hepatócito a quantidade de colesterol fica acima de um determinado valor, este excesso extracelular não só inibe a enzima Hidroxi-metil-glutamil-CoenzimaA redutase de modo a inibir a sua síntese endógena, como também inibe a síntese de recetores LDL no interior do hepatócito e conseqüentemente a expressão deste recetor à superfície do hepatócito. Isto faz com que haja aumento de colesterol na circulação, nomeadamente o colesterol-LDL.

Princípio da deteção: O colesterol livre presente na amostra sofre oxidação por ação da colesterol oxidase, obtendo-se H_2O_2 . Este reage com dois compostos existentes no reagente formando-se a quinoneimina por ação de uma peroxidase. Por espectrofotometria é feita a leitura da absorvência da quinoneimina a 500 nm, sendo este valor proporcional à quantidade de colesterol presente na amostra (5) (Figura 4).

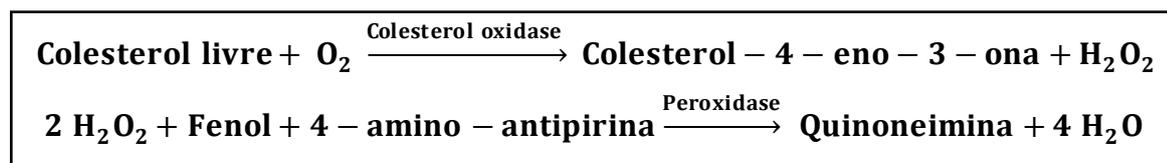


Figura 4 - Reações que ocorrem na determinação de colesterol total (5).

São usados como referência para adultos, valores inferiores a 200 mg/gl (18).

4.3.2. COLESTEROL-HDL

No fígado o colesterol pode ser incorporado em VLDL, catabolizado ou ser excretado para a bÍlis. No entanto na maioria das células periféricas, o colesterol não é catabolizado nem é incorporado em lipoproteínas, o que pode levar a que seja acumulado e tornar-se nocivo. As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são responsáveis pelo transporte reverso que consiste em remover o excesso de colesterol das células periféricas e retorná-lo para o fígado, onde é transformado em sais biliares para depois ser eliminado pelas vias biliares para o intestino e ser excretado juntamente com algum colesterol livre (6). A determinação da concentração plasmática de HDL é feita em termos de colesterol-HDL (Col-HDL), em que a obtenção de valor baixo é considerado como sendo um fator de risco para o desenvolvimento de DCV comparativamente a valores elevados.

O risco de desenvolver DCV pode ser obtido através do índice aterogénico, que pode ser calculado através da seguinte fórmula (Figura 5):

$$\text{índice aterogénico} = \frac{\text{Colesterol total}}{\text{Colesterol} - \text{HDL}}$$

Figura 5 - Fórmula para cálculo do índice aterogénico.

Valores acima de 5 indicam propensão para o desenvolvimento de DCV.

Princípio da deteção: Após a adição de um detergente específico as lipoproteínas de maior dimensão não precipitam, sendo o colesterol HDL no sobrenadante quantificado por um método colorimétrico. A intensidade da cor do corante formado é medida a 600 nm, e é diretamente proporcional à concentração sérica de col-HDL (Figura 6) (5).

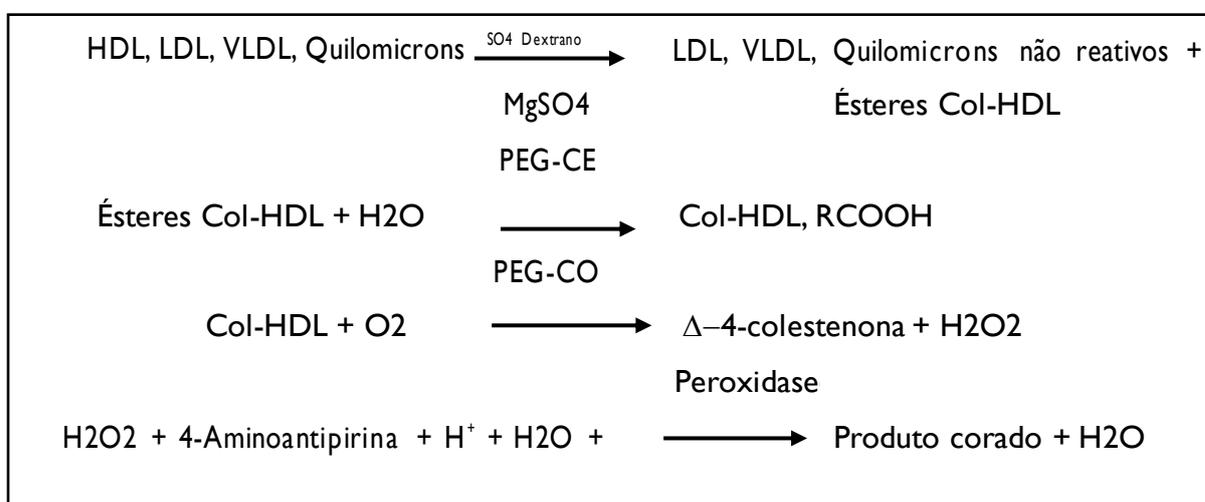


Figura 6 - Reações que ocorrem na determinação de colesterol- HDL.

É usado como referência para adultos valores superiores a 40 mg /dl (6).

4.3.3. COLESTEROL-LDL

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são os principais transportadores de esteres de colesterol para os tecidos periféricos, e derivam das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), que são sintetizadas no fígado.

A remoção das LDL do plasma para o interior do hepatócito onde são catabolizadas é feita por recetores específicos para as LDL cujo bom funcionamento permite a manutenção da colesterolémia dentro dos valores de referência. Uma diminuição no número destes recetores ou na sua capacidade funcional faz com que haja menor captação das LDL plasmáticas levando a aumento da sua concentração no plasma (6). Quando há hipercolesterolemia-LDL, estas lipoproteínas penetram através do endotélio e são retidas na matriz intercelular da íntima, onde são sujeitas à ação de diversas espécies altamente reativas

com capacidade oxidativa, sintetizadas pelas células endoteliais, musculares lisas e macrófagos. As LDL oxidadas têm propriedades pró-ateroscleróticas tais como atrair os monócitos de circulação, induzir a sua adesão ao endotélio, estimular a formação das *foam cells*, lesar as células endoteliais, induzir a migração das células musculares lisas e a sua proliferação, interferir com a vasodilatação dependente do endotélio e promover a trombose (6).

A determinação do colesterol-LDL é normalmente feita de forma indireta através da fórmula de *Friedwald*, na qual se assume que o colesterol das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL do inglês “*very low density lipoprotein*”), está presente numa concentração equivalente a um quinto dos triglicéridos (TG) circulantes no plasma. Esta fórmula pode ser utilizada sempre que o valor de TG não ultrapasse os 400 mg/dl (5).

$$\text{Col-LDL} = \text{Colesterol total} - [(\text{TG}/5) + \text{Col-HDL}]$$

É usado como referência para adultos valores inferiores a 100 mg/dl (5).

4.3.4. TRIGLICÉRIDOS

Os triglicéridos são constituídos por uma molécula de glicerol e 3 de ácidos gordos. Para circular na corrente sanguínea necessitam de lipoproteínas. Consoante a sua origem, através da dieta ou sintetizadas no fígado, assim são incorporados nos Quilomicrons ou VLDL, respetivamente. Estas lipoproteínas transportam os TG para os tecidos periféricos, nomeadamente para o tecido adiposo, onde, por ação da Lipoproteína Lipase (LPL), são hidrolisadas, e depois armazenadas sob a forma de gotículas de gordura, até ser necessário sofrerem β -oxidação para fornecer energia às células restantes.

Aumento nos níveis plasmáticos de TG acima dos valores de referência é designado por hipertrigliceridemia que também contribui para o desenvolvimento de DCV. Este aumento pode ser devido a deficiências nas enzimas que os metabolizam, consistindo em causas genéticas, ou aumento na produção das VLDL e diminuição do seu catabolismo, *stress*, *Diabetes Mellitus*, ou dietas ricas em hidratos de carbono e de ácidos gordos saturados e insaturados que vão integrar os TG.

Princípio da deteção: método colorimétrico (6).

Os TG sofrem hidrólise por ação da LPS formando-se glicerol e ácidos gordos. O glicerol obtido é transformado em glicerol-3-fosfato pela ação da glicerolcinase, seguindo-se a conversão deste em dihidroxiacetona-fosfato e H_2O_2 por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. O peróxido de hidrogénio obtido reage com 4-clorofenol e amino-4-antipirina,

numa reação catalisada por uma peroxidase, originando quinoneimina e H₂O. A formação do produto quinoneimina é detetada por leitura da absorvência a 510 nm, e o valor obtido é proporcional à quantidade de TG presentes no soro (Figura 7).

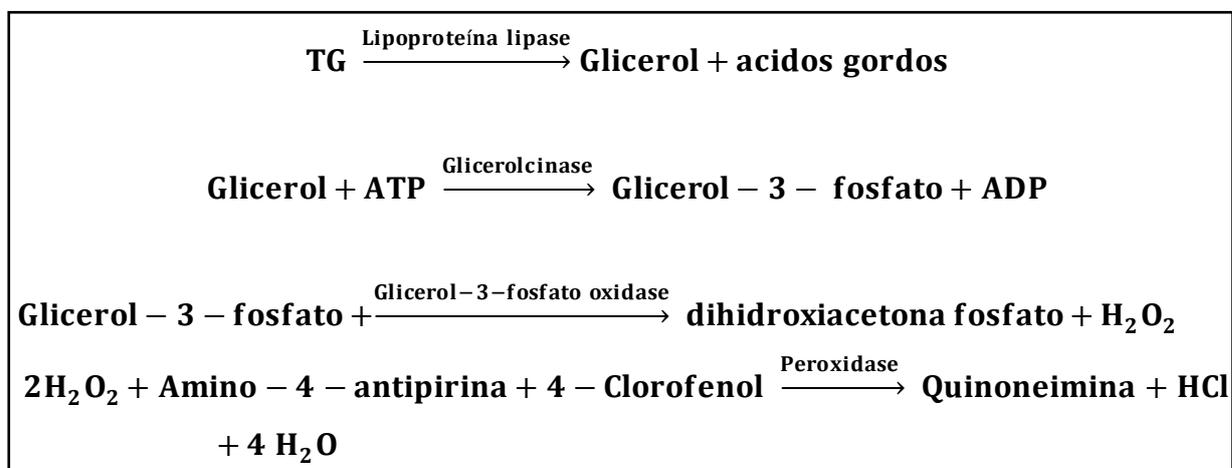


Figura 7 - Reações que ocorrem na determinação de TG (6).

São usados como referência, nas mulheres valores entre 40-140 mg/dl e nos homens valores entre 60-160 mg/dl (6).

Caso clínico de dislipidémia

Indivíduo do sexo masculino em que nas análises feitas para avaliar o risco cardiovascular, foram observados valores aumentados de colesterol total e de TG, e baixos valores de colesterol-HDL com índice aterogénico aumentado, o que significa que este indivíduo tem grandes probabilidades de desenvolver uma DCV. O boletim analítico apresenta um histórico desta dislipidémia (ano de 2014). Desconhece-se se o indivíduo está sujeito a algum tipo de terapêutica (Ex: estatinas ou fenofibrato), por forma a diminuir esta dislipidémia e consequentemente reduzir o risco de doença cardiovascular. Estão apresentados os valores de referência seguidos pelo Hemobiolab, para cada parâmetro (Figura 8).

Colesterol Total	314	mg/dL	< 190	29-04-2014 253
Colesterol HDL	43	mg/dL	> 40	29-04-2014 42
Índice Aterogénico	7,30		< 5,00 (Directiva da Sociedade Portuguesa de Aterosclerose)	6,02
Triglicéridos	473	mg/dL	< 150	29-04-2014 361

Figura 8 - Caso clínico de dislipidémia.

4.4. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

Os rins são órgãos responsáveis pela homeostase dos fluidos e dos eletrólitos no corpo humano. Tem como unidade funcional o nefrónio e como principais funções: formação de urina; regulação do equilíbrio hidro-electrolítico; regulação do equilíbrio ácido-base; excreção de produtos do metabolismo proteico; função endócrina; e conservação de proteínas (7,8).

Existem dois grupos de testes para avaliar a função renal que são o estudo da função glomerular e o estudo da função tubular.

4.4.1. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO GLOMERULAR

4.4.1.1. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS AZOTADOS NÃO PROTEICOS

4.4.1.1.1. UREIA

No catabolismo das proteínas, à medida que os aminoácidos são desaminados, é produzida amónia. Esta é convertida a ureia no fígado, de modo a se prevenirem níveis tóxicos. No sangue a ureia é transportada até aos rins onde é filtrada pelo glomérulo, sendo 40-50% reabsorvida passivamente nos túbulos proximais. Quando um grande número de aminoácidos é metabolizado no fígado, há aumento de síntese de ureia, situação que pode ocorrer com dietas hiperproteicas (causa extra-renal), danos tecidulares ou diminuição da síntese de proteínas (causa renal). Situação inversa é verificada com dietas hipoproteicas e lesão hepática grave. Deste modo a concentração de ureia no plasma é condicionada pela função e perfusão renal, teor proteico da dieta e pelo catabolismo das proteínas. A ureia não deve de ser utilizada como marcador da função glomerular de modo isolado, pois pode estar aumentada devido às causas acima citadas, sem que haja envolvimento renal primário. É importante ter em consideração que um aumento de ureia não acompanhado de aumento de creatinina possa ser devido a causa pré-renal. A determinação da Taxa de Filtração Glomerular (TFG) permite confirmar essa situação (8).

Princípio da deteção: A enzima urease hidrolisa a ureia a amónia, que por ação da glutamatodesidrogenase oxiredutase origina glutamato. A ureia é quantificada por espetrofotometria a 340 nm, sendo que o decréscimo de absorvência devido ao desaparecimento de NADH é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra (9) (Figura 9).

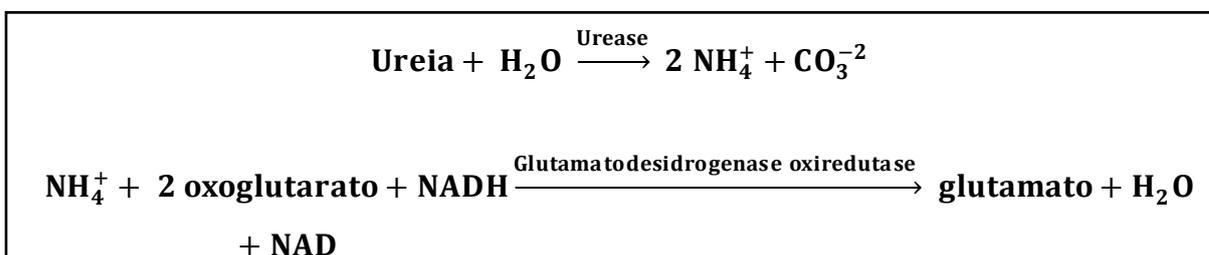


Figura 9 - Reações que ocorrem na determinação de ureia.

São usado como referência para adultos, valores entre 9-200 mg/dl (9).

4.4.1.1.2. CREATININA

A creatinina é sintetizada nos rins, fígado e pâncreas por duas reações enzimáticas. Na primeira a transaminação da arginina e da glicina forma o ácido guanidinoacético. Na segunda reação, a metilação do ácido guanidinoacético ocorre com a S-adenosilmetionina como dador de grupo metilo. A creatina é transportada através do sangue para outros órgãos, como músculos e cérebro, onde é fosforilada a fosfocreatina.

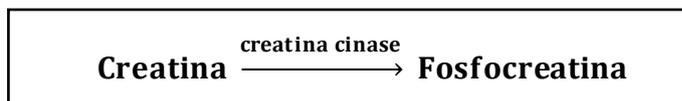


Figura 10 - Interconversão da creatinina a fosfocreatinina.

A interconversão da creatina a fosfocreatina (Figura 10) é característica da contração muscular, e uma determinada proporção de creatina livre converte-se espontaneamente em creatinina. A quantidade de creatinina produzida por dia é constante e depende da massa muscular, sendo que existe em maiores concentrações nos homens do que nas mulheres.

A creatinina é removida da circulação por filtração glomerular e não é praticamente absorvida pelos túbulos renais. Assim, apenas uma pequena quantidade deste composto na urina provém da secreção tubular.

Princípio da deteção: A creatinina reage com picrato a pH alcalino formando o complexo creatinina-picrato. O aumento da absorvência a 500 nm devido à formação do complexo é diretamente proporcional à concentração de creatinina na amostra (7) (Figura 11).

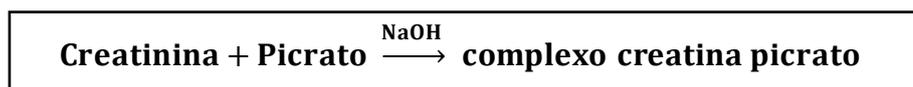


Figura 11 - Reação que ocorre na determinação de creatinina.

São usados como referência nas mulheres valores entre os 0.7-1.3 mg/dl e nos homens valores entre os 0.6-1.1 mg/dl (7).

4.4.1.1.3. CLEARANCE DE CREATININA

A clearance renal é o volume de plasma do qual uma determinada quantidade de substância pode ser completamente eliminada para a urina por unidade de tempo. Isto depende da concentração plasmática da substância e da sua taxa de excreção, que por sua vez depende da TFG e do fluxo sanguíneo renal.

O teste de clearance de creatinina permite detetar alterações na TFG, é mais sensível que o da determinação da creatinina, e não se justifica fazer caso o doseamento da creatinina plasmática apresente resultados acima dos valores de referência, o que significa que esta última não está a ser eliminada. O teste de clearance faz-se quando ainda não há sinais visíveis de doença renal, em que os valores de concentração de creatinina e de ureia no plasma ainda estão dentro dos valores de normalidade.

Para determinar a clearance de creatinina deve-se proceder do seguinte modo: 1- Colheita de urina de 24 horas ou de 12 horas (urina de um dado período de tempo certo); 2- Colher uma amostra de sangue venoso durante este período de tempo para obter o soro e nele se fazer o doseamento da creatinina; 3- Determinar a concentração de Creatinina na urina; 4- Calcular a Clearance de Creatinina.

Para o cálculo da clearance de creatinina é usada a seguinte fórmula (Figura 12).

$$\text{Clearance de creatinina ml/min} = \frac{U}{P} \times V$$

Figura 12 - Fórmula usada para cálculo de Clearance de Creatinina.

U → Concentração de creatinina urinária (mg/dl)

V → Volume de urina excretado por unidade de tempo (ml/min.)

P → Concentração de Creatinina plasmática

São usados como referência, nas mulheres valores entre os 65-123 ml /min e nos homens valores entre 74-129 ml/min (18).

Através da utilização da fórmula de *Cockcroft-Gault*, a clearance de creatinina é estimada com base na creatinina sérica e dados adicionais como a idade, peso e sexo. Sendo que no sexo feminino a massa muscular é cerca de 15% inferior à do sexo masculino, o valor da clearance de creatinina tem de ser multiplicado por 0,85 no caso das mulheres (Figura 13).

$$\text{Clearance de creatinina estimada (ml/min)} = \frac{140 - \text{idade (anos)} \times \text{peso (Kg)}}{72 \times [\text{Creatinina}]_{\text{soro (mg/dl)}} \times 0,85$$

Figura 13 - Formula de Cockcroft-Gault.

4.4.1.1.4. ÁCIDO ÚRICO

O ácido úrico resulta do catabolismo das purinas dos ácidos nucleicos, quer sejam ingeridos quer sejam resultantes da destruição celular. Parte deste processo ocorre essencialmente no fígado, sendo o ácido úrico depois transportado no plasma até ao rim,

onde é filtrado pelo glomérulo e secretado nos túbulos distais para a urina. A maioria do ácido úrico é reabsorvido nos túbulos proximais e reutilizado.

Nas situações de insuficiência renal, há menor eliminação de ácido úrico pela urina, o que leva ao aumento da sua concentração sérica. O excesso de ácido úrico pode precipitar nos túbulos renais formando cálculos renais que obstruem a passagem da urina, e depositar-se nas articulações, causando inflamação e dor, desencadeando uma patologia designada por gota. Se houver hiperuricemia sem haver aumento da concentração sérica de ureia e de creatinina acima dos valores normais de referência, isto significa que o ácido úrico está aumentado devido a uma alteração no catabolismo das purinas. No entanto, se o seu valor se encontrar elevado, juntamente com a ureia e/ou creatinina, pode significar disfunção renal (7,10).

Princípio da deteção: O ácido úrico é convertido a alantoína e peróxido de hidrogénio por ação da enzima uricase. O peróxido de hidrogénio reage com outros dois compostos e na presença de uma peroxidase, forma quinoneimina sendo esta última quantificada por espectrofotometria a 548 nm. A quantidade de quinoneimina é proporcional à quantidade de ácido úrico presente na amostra (7) (Figura 14).

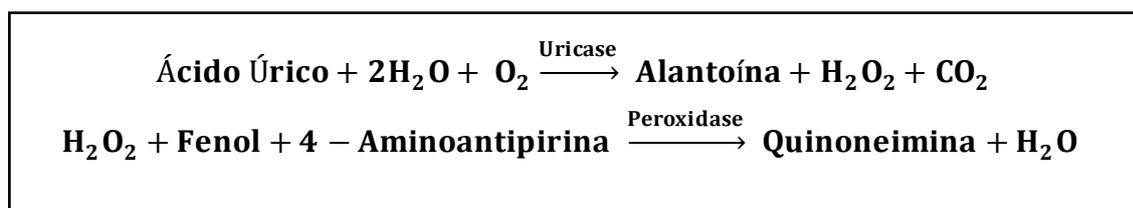


Figura 14 - Reações que ocorrem na determinação de ácido úrico.

São usados como referência nas mulheres valores entre 2.60-6.0 mg/dl e nos homens valores entre 3.5-7.2 mg/dl (7).

4.4.2. AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE GLOMERULAR

A permeabilidade glomerular controla a quantidade de proteína excretada na urina. O glomérulo atua como um filtro seletivo de sangue que passa pelos seus capilares. Esta ação de filtro restringe a passagem de macromoléculas dependendo do tamanho, carga e forma. De um modo geral, as proteínas de elevado peso molecular cuja massa molecular é superior à da albumina são retidas pelo glomérulo. No entanto também há retenção de proteínas de baixa massa molecular (11).

De forma a averiguar se o rim está a cumprir a sua função de conservação de proteínas sanguíneas de modo a manter a pressão oncótica, é importante avaliar a permeabilidade glomerular.

4.4.2.1. MICROALBUMINÚRIA

A microalbuminúria é um dos primeiros sinais de doença renal glomerular e consiste na eliminação de albumina na urina numa quantidade tão pequena que não é detetada pelas tiras reagentes usadas na análise sumária da urina (7). Esta proteína tem um baixo peso molecular e é ligeiramente maior do que o poro dos capilares glomerulares. Qualquer alteração na sua permeabilidade permite que haja filtração de albumina e consequentemente a sua eliminação através da urina (8).

A Determinação da microalbuminúria é geralmente feita numa amostra de urina de 24 horas (12).

Princípio da deteção: São utilizados anticorpos policlonais contra albumina humana num imunoensaio turbidimétrico. Quando uma amostra é misturada com os reagentes, a albumina existente nessa amostra combina-se com o anticorpo anti-albumina humana no reagente, originando um agregado que por ser insolúvel, provoca um aumento da turvação na solução. O grau de turvação da solução é proporcional à concentração de albumina presente na amostra (13).

São usados como referência para adultos, valores inferiores a 30 mg/24h (13).

4.4.3. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO TUBULAR

4.4.3.1. ANÁLISE SUMÁRIA DA URINA

A análise sumária da urina ou urina tipo II permite avaliar a evolução das doenças renais. Esta análise é composta por dois tipos de determinações: 1- Sedimento urinário que consiste numa análise semi-quantitativa do número de elementos existentes na amostra; 2- Análise semi-quantitativa de alguns parâmetros bioquímicos, tais como cor, glicose, cetonas, densidade, PH, proteínas, urobilinogénio, bilirrubina, leucócitos, nitritos e sangue (14).

A amostra a usar deve ser a primeira urina da manhã visto ser mais concentrada, ou, pelo menos a última micção ter sido há mais de 2 horas. Amostras contaminadas com perdas menstruais ou material vaginal devem ser rejeitadas.

No Hemobiolab, a análise destes parâmetros bioquímicos é feita de forma automatizada através do equipamento “Aution Max”.

4.4.3.2. SEDIMENTO URINÁRIO

Na análise do sedimento urinário faz-se a identificação e semi-quantificação de: células epiteliais, eritrócitos, leucócitos, cristais (oxalatos, uratos, fosfatos, cistina entre outros), cilindros (hialinos, granulosos), leveduras, células redondas (evidencia envolvimento do parênquima renal), espermatozoides e muco (15).

Os cálculos urinários ou renais são formados pela combinação de várias substâncias cristalizáveis, tais como: oxalato de cálcio, cistina, ácido úrico, fosfatos, carbonatos e uratos. A análise química dos cálculos é importante para se poder determinar qual a causa do seu aparecimento, que podem ser diversas (Tabela 3).

Tabela 3 - Tipos de Cálculos urinários.

Cálculos urinários	Causa da formação
Ácido úrico	Gota Níveis de ácido úrico elevado na urina e no sangue
Cistina	Cistinúria hereditária
Fosfato de Cálcio	Consumo excessivo de antiácidos Infecção por microrganismos produtores de urease.
Oxalato de cálcio	Hiperparatiroidismo Níveis elevados de cálcio na urina Toxicidade provocada pela Vitamina D Sarcoidose Osteoporose

4.5. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA

O fígado é o maior órgão interno do corpo humano. Desempenha funções bioquímicas fundamentais nomeadamente no metabolismo de proteínas, hidratos de carbono, lípidos e lipoproteínas; síntese da maioria das proteínas plasmáticas exceto imunoglobulinas; destoxicação de xenobióticos; excreção de bilirrubina e sais bilares.

4.5.1. AVALIAÇÃO DA SÍNTESE HEPÁTICA

O fígado é responsável pela síntese da maioria das proteínas plasmáticas exceto das imunoglobulinas. Para tal, os hepatócitos devem encontrar-se funcionais. Havendo uma lesão do tecido hepático que seja superior a 80%, a capacidade de síntese é afetada.

4.5.1.1. ESTUDO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

4.5.1.1.1. PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS

Todas as proteínas realizam funções biológicas e fisiológicas. Muitas vezes o conhecimento das suas propriedades biológicas é a base para o estabelecimento dos métodos para a sua deteção e quantificação. As funções fisiológicas mais importantes são de transporte, de recetores, hormonas e funções enzimáticas (16).

As proteínas séricas podem dividir-se em dois grupos principais: albumina e globulinas (16). Existem centenas de proteínas diferentes no plasma sanguíneo, designadas por proteínas plasmáticas, sendo a maioria sintetizada e catabolizada no fígado. Um fator relevante para o laboratório de análises clínicas é a alteração nas concentrações de proteínas, que resultam de uma reação que funciona como resposta a doenças ou reação de fase aguda, que é uma resposta inespecífica a inflamação ou lesões teciduais. As proteínas afetadas por este tipo de situações são chamadas de Proteínas de Fase Aguda, podendo ser proteínas de fase aguda positiva em que apresentam aumentos nas suas concentrações, tais como α 1-antitripsina, α 1-glicoproteína ácida, haptoglobina, ceruloplasmina, C3, C4 e proteína C reativa; ou proteínas de fase aguda negativas, tais como transtirretina, albumina e transferrina, cujas concentrações diminuem (16).

O fígado possui uma elevada capacidade de reserva, impedindo uma redução da concentração de proteínas no plasma, a não ser que haja uma lesão hepática extensa. A alteração da concentração de proteínas plasmáticas totais depende do tipo, gravidade e duração da lesão hepática. Nas situações de disfunção hepática aguda verifica-se uma pequena alteração no perfil das proteínas plasmáticas, ao contrário do que se verifica na cirrose, em que há diminuição da concentração de todas as proteínas. Nos casos de uma lesão hepática acentuada há um decréscimo da concentração de transtirretina e de protrombina, que possuem um tempo de vida média curto, enquanto nas concentrações de proteínas com tempo de meia vida mais longo não ocorre qualquer alteração (albumina).

O doseamento das proteínas totais séricas pode refletir o estado nutricional, doenças renais, doenças hepáticas, perturbações ósseas e muitos outros estados patológicos. Esta determinação é muito frequente, podendo o seu valor aparecer aumentado, diminuído ou normal, consoante a patologia em causa (16). A hipoproteïnemia pode surgir em situações de perda excessiva por doença renal, inflamação gastrointestinal, hemorragias (de feridas ou internas) ou queimaduras. A hiperproteïnemia pode acontecer em situações de desidratação ou produção excessiva, como acontece no Mieloma Múltiplo (17).

Princípio da deteção: Método colorimétrico baseado na reação do biureto. A absorvência do complexo corado formado resultante da ligação, em meio alcalino, entre as ligações peptídicas das proteínas e o cobre, é proporcional à concentração total de proteína na amostra (Figura 15).

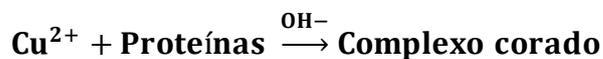


Figura 15 - Reação do biureto usada para determinar proteínas totais.

São usados como referência para adultos, valores entre 6.0-7.8 g/dl (18).

4.5.1.1.2. ALBUMINA

A albumina é a proteína mais abundante encontrada no plasma, sendo sintetizada no fígado. Devido à sua elevada concentração no plasma e ao seu tamanho relativamente pequeno, a albumina é também o maior componente da maioria dos fluidos extravasculares. É responsável por aproximadamente 80% da pressão colóide-osmótica dos fluidos intravasculares. Também tem um papel relevante como tampão do pH e é uma proteína reativa de fase aguda negativa. Outra das funções primárias da albumina é a de transporte de várias substâncias no sangue.

Diminuições da concentração de albumina podem ser causadas por: má nutrição ou mal absorção, doença hepática, perdas enterohepáticas ou gastrointestinais (como diarreia, inflamação), doença renal, hipotiroidismo, diluição por excesso (polidipsia), e redistribuição por hemodiluição. Concentrações séricas elevadas de albumina são encontradas em situações de desidratação ou perfusão excessiva de albumina (17).

Princípio da deteção: Ligação da Albumina a corantes como o Verde de Bromocresol (BCG) ou Púrpura de Bromocresol (PBC), através de uma técnica de leitura bicromática. A absorvência do complexo 596 nm é diretamente proporcional à concentração de albumina (12,17) (Figura 16).

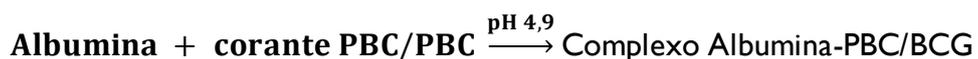


Figura 16 - Reação que ocorre na determinação de albumina com base no complexo albumina-PBC/BCG

São usados como referência para adultos, valores entre 3.5-5.2 g/dl (18).

4.5.2. PROTEÍNOGRAMA/ SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS SÉRICAS POR ELETROFORESE

A eletroforese de proteínas (EFP) séricas é uma técnica de *screening* do soro para anomalias nas proteínas. Dois tipos de métodos de EFP estão hoje em dia em uso: eletroforese de zona e eletroforese capilar (19). Para as determinações de rotina, as proteínas são separadas por eletroforese de zona em cinco ou seis frações de mobilidade diferente: Albumina, Alfa-1, Alfa-2, Beta (ou Beta-1 e Beta-2) e Gama (Figura 17).

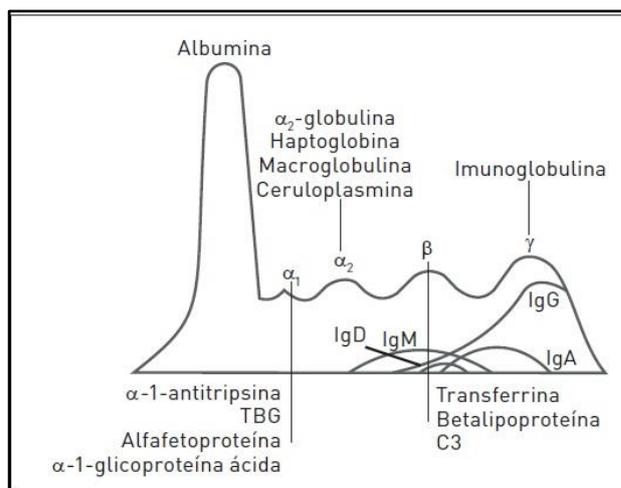


Figura 17 - Perfil eletroforético (de zona) das proteínas séricas com indicação das proteínas encontradas em cada banda eletroforética (19).

A eletroforese das proteínas séricas é útil no contexto do estudo das doenças hepáticas. A Albumina é uma proteína cujo tempo de vida média é longa, cerca de 20 dias. Diminuição na fração de Albumina e aumento na fração das gama-globulinas e beta-globulinas é indicativo de doença hepática crónica ou de lesão aguda grave.

Diminuição na fração de alfa-1-globulina (α_1 globulina), devido a deficiência de alfa-1-antitripsina (α_1 antitripsina), implica doença hepática crónica.

4.5.3. TEMPO DE PROTROMBINA

A determinação do tempo de protrombina é um teste muito usado para avaliar a doença hepática. Nos casos de doença hepática grave encontra-se aumentado e havendo tendência hemorrágica devido à diminuição da síntese dos fatores de coagulação. Este estado patológico implica que haja menor síntese de sais biliares e consequentemente menor absorção intestinal de vitamina K, fundamental para a síntese hepática dos fatores II, VII, IX e X da cascata de coagulação.

A metodologia é apresentada mais adiante no capítulo referente às provas de coagulação realizadas do setor de hematologia.

4.5.4. ESTUDO DOS LÍPIDOS E LIPOPROTEÍNAS DO PLASMA

O fígado é a maior fonte de colesterol circulante no organismo. À exceção dos quilomicrons, é responsável pela síntese de todas as lipoproteínas mas também pela sua remoção da circulação.

Qualquer lesão hepática que impede o bom funcionamento deste órgão implica uma diminuição não só da síntese de colesterol total e de colesterol-HDL, mas também uma diminuição do catabolismo das VLDL, o que leva ao aumento da concentração de colesterol-LDL e de TG.

4.5.5. UREIA E AMÓNIA

Em situações de doença hepática terminal, a concentração de ureia no plasma diminui enquanto a concentração de amónia, molécula precursora de ureia, aumenta devido a uma redução significativa no metabolismo anormal da amónia.

Este aumento na concentração de amónia pode atingir o sistema nervoso central e originar encefalopatia hepática.

4.6. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO EXCRETORA

4.6.1. BILIRRUBINA

A Bilirrubina é formada nas células do Sistema Reticuloendotelial como resultado do catabolismo do grupo *heme*, que faz parte da composição da hemoglobina, mioglobina e citocromos, por ação da hemeoxigenase. Sendo a bilirrubina uma molécula insolúvel em água, é transportada no plasma ligada à albumina para o fígado, onde no interior do hepatócito é sujeita a conjugação com o ácido glucorónico, por ação da enzima Uridinadifosfato-glucoroniltransferase, formando-se a bilirrubina conjugada, hidrossolúvel, que, através de um mecanismo de transporte ativo, passa para os canalículos biliares, sendo eliminada pela bília e chegando ao intestino, onde por ação de bactérias intestinais é reduzida, formando-se o Urobilinogénio. Uma parte deste composto é reabsorvido pela circulação enterohepática, voltando novamente para o fígado, onde uma parte é eliminada na bília e outra parte passa para a circulação geral, sendo depois eliminada na urina. No entanto, a maioria segue para o intestino grosso onde sofre oxidação formando-se a Urobilina que confere a cor castanha às fezes. Todo este fluxo é unidirecional, no entanto este é afetado quando há lesão hepática, obtendo-se diferentes resultados consoante a alteração for de origem pré-hepática, hepática ou pós-hepática.

A determinação dos valores plasmáticos da bilirrubina total, bilirrubina conjugada, bilirrubina não conjugada, assim como a determinação de valores de bilirrubina e de urobilinogénio na urina, permite averiguar qual a origem da lesão.

Verifica-se hiperbilirrubinémia, em que há aumento da concentração de bilirrubina não conjugada no plasma em relação à concentração de bilirrubina conjugada podendo esta estar aumentada dentro dos valores normais ou ligeiramente aumentada, caso a sua

clearance hepática seja inferior à taxa de conjugação. Esta situação ocorre geralmente devido a hemólise, e alteração no transporte ou na conjugação da bilirrubina nos hepatócitos, sendo a alteração de origem pré-hepática e hepática, respetivamente.

A determinação da bilirrubina e do urobilinogénio urinário permite fazer a distinção entre estas duas causas.

Sendo a hiperbilirrubinémia de origem pré-hepática, o urobilinogénio na urina é positivo e a bilirrubina urinária é negativa, uma vez que a maioria da bilirrubina presente na circulação geral é a não conjugada, molécula lipossolúvel que ligada à albumina não é filtrada pelo rim e conseqüentemente não é eliminada pela urina. Na alteração de origem hepática, encontra-se, para além de urobilinogénio, bilirrubina na urina. Isto porque a fração de bilirrubina que existe na circulação geral em maior quantidade é a não conjugada. Sendo esta solúvel, é filtrada a nível renal e eliminada na urina.

A existência de qualquer alteração nos transportadores que permitem o transporte da bilirrubina conjugada para os canalículos biliares, ou de obstrução da sua passagem para o sistema biliar, leva a que haja aumento desta fração de bilirrubina na circulação relativamente à bilirrubina não conjugada. Como consequência, encontra-se bilirrubina na urina mas não urobilinogénio, pois este não é formado, visto que não há passagem de bilirrubina para o intestino delgado.

A bilirrubina total é a soma das frações conjugada e não conjugada. As determinações de bilirrubina são utilizadas no diagnóstico e no tratamento de doenças hepáticas, incluindo hepatite e obstrução da vesícula biliar, hematológicas e metabólicas (21).

Para além da bilirrubina total, determinam-se geralmente a bilirrubina direta (conjugada) e por cálculo (figura 18), a bilirrubina indireta, a fração não conjugada.

$$\text{Bilirrubina indireta} = \text{bilirrubina total} - \text{bilirrubina direta}$$

Figura 18 - Reação na determinação de Bilirrubina total pelo diazo método.

As determinações conjuntas são úteis no diagnóstico diferencial e terapêutica de doenças hepatocelulares e colestáticas, doenças hemolíticas e hematológicas.

Princípio da deteção: Diazo-método com metodologia colorimétrica de ponto final. Na determinação da bilirrubina total, a bilirrubina não conjugada na amostra é solubilizada por diluição numa mistura de cafeína/beonzoato/acetato/EDTA. Esta e a fração conjugada reagem diretamente com o ácido sulfanílico diazotado, originando um composto corado. A absorvência deste cromóforo é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina (Figura 19) (14).

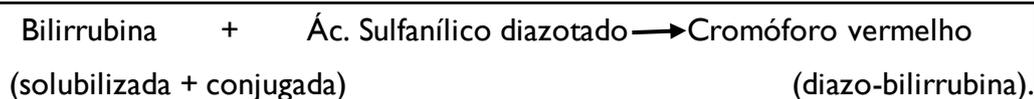


Figura 19 - Fórmula para cálculo da bilirrubina indireta.

São usados como referência para adultos, valores inferiores a 0.70 mg/dl (18).

4.7. LIBERTAÇÃO DE ENZIMAS

Sendo a função hepática na maioria dos casos normal em pacientes com doença hepática, é importante analisar a atividade plasmática de enzimas. Como o aumento da atividade enzimática varia com o tipo de doença hepática, isso permite fazer o diagnóstico diferencial das lesões hepáticas.

4.7.1. LESÃO HEPATOCELULAR

4.7.1.1. ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) E ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)

A Alanina Aminotransferase é encontrada fundamentalmente no fígado e rim e, em menor quantidade, no coração e músculo-esquelético. É uma enzima exclusivamente citoplasmática. A Aspartato Aminotransferase encontra-se em níveis semelhantes no fígado, coração e músculo-esquelético.

A Doença hepática é a causa mais importante do aumento da atividade destas enzimas no soro, vulgarmente designadas por transaminases.

Geralmente a atividade da ALT encontra-se superior à da AST, exceto nos casos de hepatite alcoólica, cirrose hepática e cancro hepático. Nas hepatites virais e em outras formas de necrose hepática, os valores da atividade destas enzimas aumentam antes do aparecimento dos sinais clínicos e dos sintomas. A atividade das Aminotransferases pode atingir valores até 100 vezes o limite de referência superior.

Após um episódio de hepatite aguda, se houver persistência de valores aumentados de ALT durante um período superior a 6 meses, isso pode ser indicador de uma hepatite crónica (14).

As aminotransferases são responsáveis por catalisar a conversão do aspartato e da alanina em oxaloacetato e piruvato, respetivamente.

Princípio da detecção:

ALT

A determinação da atividade enzimática da ALT baseia-se numa reação catalisada pela mesma, na qual o grupo amina da L-Alanina é transferido para o 2-Oxoglutarato, formando piruvato. Este na presença de NADH e lactato desidrogenase é reduzido a L-lactato. Nesta reação, o NADH é oxidado formando-se NAD⁺. A reação é monitorizada medindo o decréscimo da absorvência a 340 nm devido à oxidação do NADH (Figura 20) (22).

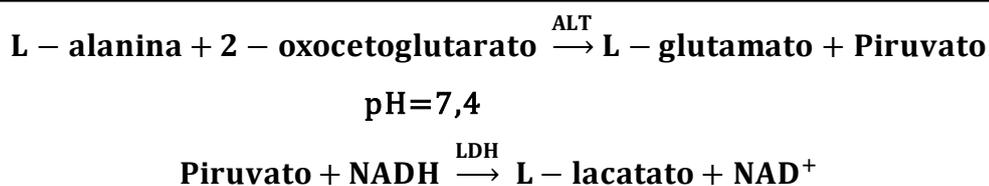


Figura 20 - Reações de determinação de ALT.

São usados como referência para adultos, valores inferiores a 55 U/l (18).

AST

A determinação da atividade desta enzima baseia-se numa reação catalisada pela mesma, na qual o grupo amina da L-Aspartato é transferido para o 2-Oxoglutarato, formando oxaloacetato. Este último na presença de NADH e malato desidrogenase é reduzido a L-malato. Nesta reação, o NADH é oxidado formando-se NAD⁺. A reação é monitorizada medindo o decréscimo da absorvência a 340 nm devido a oxidação do NADH (Figura 21) (22).

São usados como referência para adulto, valores entre 5-34 U/l (18).

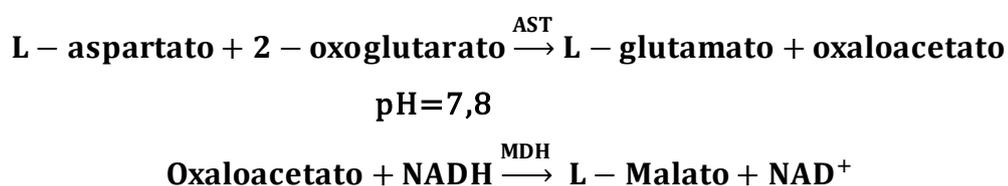


Figura 21 - Reações que ocorrem na determinação de AST.

4.7.2. LESÃO CANALICULAR

Como marcadores enzimáticos de lesão canalicular são usados a Fosfatase Alcalina (ALP) e a Gama-Glutamiltransferase (GGT).

4.7.2.1. FOSFATASE ALCALINA

A fosfatase alcalina está amplamente distribuída por vários tecidos no organismo, nomeadamente na mucosa do intestino delgado, túbulos proximais do rim, placenta, ossos e nas membranas dos canalículos biliares do fígado. Esta enzima permite fazer a distinção entre doenças hepatobiliares e patologias ósseas associadas a aumento da atividade osteoblástica. Verifica-se um aumento da ALP quando há obstrução biliar extra-hepática, devido a cálculo no canal biliar comum ou colestase intra-hepática causada por fármacos ou cirrose biliar primária.

Princípio da deteção: Há hidrólise de *p*-nitrofenil fosfato (composto sem cor) pela ALP formando-se *p*-nitrofenil (composto amarelo a pH alcalino) e fosfato inorgânico. O aumento da absorvência a 404 nm é diretamente proporcional à atividade da fosfatase alcalina presente na amostra (Figura 22) (22).

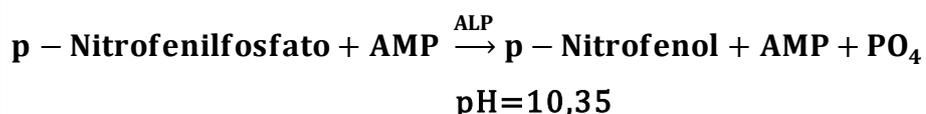


Figura 22 - Reação que ocorre na determinação de ALP.

São usados como referência para adultos, valores entre 40-150 U/l (18).

4.7.2.2. GAMA-GLUTAMIL TRANSFERASE (GGT)

A Gama-Glutamil Transferase é uma enzima presente em maior quantidade nas membranas do túbulo renal proximal, fígado, pâncreas e no intestino. Tal como a ALP, os seus níveis estão aumentados nos casos de obstrução biliar intra- e pós-hepática, mas sendo a GGT uma enzima indutível pela ingestão de fármacos e de álcool, também se encontra aumentada nas situações de hepatite alcoólica aguda.

Princípio da deteção: A variação da absorvência a 642 nm causada pela formação de *p*-nitroanilina, catalisada pela GGT, é proporcional à atividade desta enzima (Figura 23) (22).

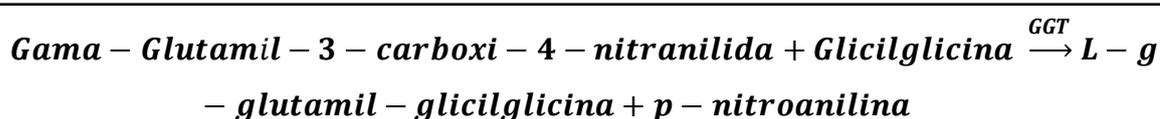


Figura 23 - Reação de determinação de fosfatase alcalina.

São usados como referência, nas mulheres valores entre os 9-36 U/l e nos homens valores entre os 12-64 U/l (18).

Caso Clínico de indivíduo com lesão a nível canalicular.

Indivíduo do sexo masculino que após a determinação de AST e GGT apresenta valores aumentados de ambas as enzimas, principalmente de GGT, o que é sugestivo de lesão hepática a nível canalicular. Não foi solicitado pelo clínico a determinação de bilirrubinas nem de urobilinogénio de modo a poder perceber se esta situação é referente a uma obstrução biliar, devido a indução de fármacos ou ingestão de álcool. Desconhece-se se o indivíduo está sujeito a alguma terapêutica (Figura 24).

TGO - Aspartato Aminotransferase	84	UI/L	< 34	29-04-2014 74
Gama-Glutamiltransferase - GGT	1095	UI/L	< 73	29-04-2014 381
	Resultado confirmado por repetição na mesma amostra			

Figura 24 - Caso clínico de lesão canalicular.

4.8. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO PANCREÁTICA

O Pâncreas é uma glândula com funções endócrina e exócrina, envolvida no processo de digestão. A produção de hormonas como insulina e glucagon, envolvidas no metabolismo dos hidratos de carbono faz parte da função pancreática endócrina enquanto na função exócrina há síntese de enzimas digestivas, constituintes do suco pancreático que auxiliam a digestão.

As doenças pancreáticas podem ser agrupadas em: patologias das células dos ilhéus pancreáticos, como a Diabetes *Mellitus* (deficiência de insulina) e excesso de glucagon; insuficiência exócrina, com mal absorção associada; patologias inflamatórias, como a pancreatite aguda e crónica; patologias neoplásicas como adenocarcinomas e tumores das células dos ilhéus, que podem levar a obstrução biliar se a massa cancerígena ocorrer na cabeça do pâncreas (23).

O doseamento de determinadas enzimas permite avaliar a função pancreática, nomeadamente a exócrina, sendo geralmente feito através do doseamento de α -amilase e de lipase no soro.

4.8.1. AMILASE

A α -amilase é uma enzima que faz parte da classe das hidrolases e catalisa a hidrólise do amido e do glicogénio, sendo assim importante para a digestão dos hidratos de carbono. É produzida não só pelas glândulas salivares como também pelas glândulas acinares do pâncreas.

Devido ao facto da α -amilase não ser específica do pâncreas, só se deve pensar em pancreatite aguda quando o valor sérico desta enzima for 3-5 vezes superior aos valores de referência. O aumento da atividade da α -amilase não está relacionado com a gravidade do envolvimento pancreático, no entanto quanto maior for este aumento, maior é a possibilidade de pancreatite aguda.

Princípio da deteção: A amilase catalisa a hidrólise do derivado de maltotriose, libertando maltotriose e 2-cloro-4-nitrofenol (CNP), composto corado cuja absorvência a 410/694 nm é diretamente proporcional à atividade da amilase (Figura 25) (24).

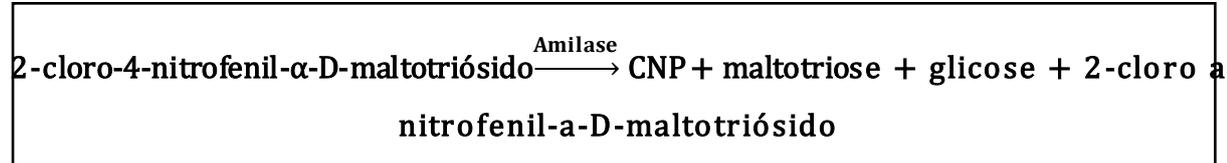


Figura 25 - Reação que ocorre na determinação de amilase.

São usados como referência para adultos valores entre 28-100 U/l (18).

4.8.2. LIPASE

A Lipase pancreática é uma enzima que catalisa a degradação dos TG da dieta a glicerol e ácidos gordos. É considerada um bom biomarcador visto ser mais específico que a α -amilase, e permite confirmar o diagnóstico de pancreatite aguda uma vez que o aumento dos níveis séricos de Lipase permanece durante 5-7 dias enquanto os valores da amilase voltam ao normal após 2-3 dias (25).

Princípio da deteção: O éster do ácido glutárico-(6-metilresorufina) formado pela clivagem do Éster do ácido 1,2-O-dialauril-glicerol-3-ác. glutárico-6-metilresorufina pela lipase, decompõe-se espontaneamente formando metil-resorufina, cuja absorvência a 577 nm é proporcional à atividade de lipase na amostra (Figura 26) (24).

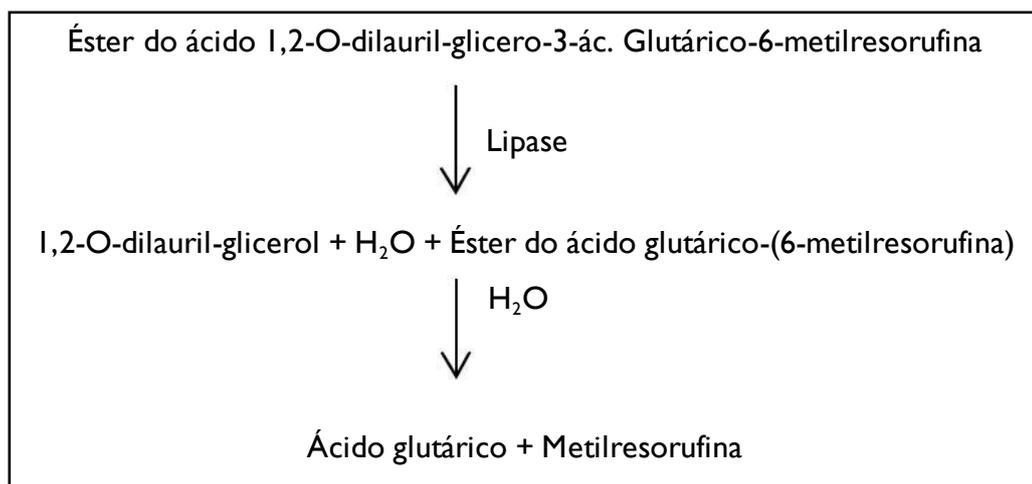


Figura 26 - Reações que ocorrem na determinação da lipase (24).

São usados como referência para adultos, valores inferiores a 38 U7I (24).

4.9. ESTUDO ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO

A Diabetes *Mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas que tem a ver com alterações quer no metabolismo da glicose quer no metabolismo integrado, caracterizada por hiperglicemia crónica devido a ausência de produção de insulina (DM tipo I) ou a resistência periférica de insulina (DM tipo II).

4.9.1. GLICÉMIA

Segundo a Norma da Direção Geral de Saúde (DGS) nº 002/2011 “diagnóstico e classificação da Diabetes *Mellitus*” (26), o diagnóstico da DM consiste no doseamento sérico da glicose com base nos seguintes parâmetros e valores:

- ❖ Glicémia em Jejum ≥ 126 mg/dl.
- ❖ Sintomas clássicos + glicémia ocasional ≥ 200 mg/dl.
- ❖ Glicémia ≥ 200 mg/dl às 2horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO).
- ❖ Hemoglobina glicada Alc (HbA1c) $\geq 6,5\%$.

Se a glicémia em jejum for ≥ 110 mg/dl mas ≤ 126 mg/dl é recomendado que seja realizada a PTGO a fim de se diagnosticar a DM.

Para além do sangue periférico, também se pode determinar a glicose na urina (glicosúria), para despiste e/ou monitorização da DM e detetar possíveis alterações tubulares renais.

Princípio da deteção: Método da Hexocinase, usando uma técnica de leitura bicromática. O aumento na absorvência a 340 nm devido ao NADH é proporcional à concentração da glicose (Figura 27) (27).

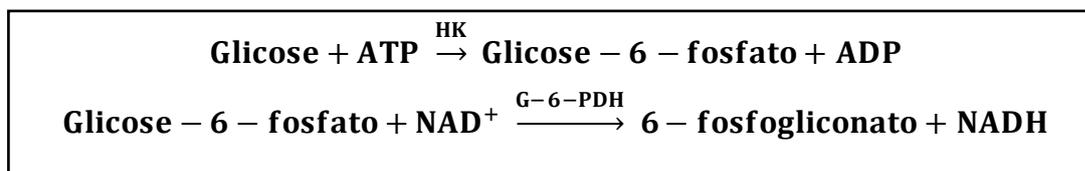


Figura 27 - Reações que ocorrem na determinação de glicose pelo método de hexocinase (27).

4.9.2. PROVA DE TOLERÂNCIA À GLUCOSE ORAL

A Prova de tolerância à glicose oral (PTGO) deve de ser realizada após um jejum de pelo menos 8 horas e não superior a 14 horas (26) e consiste em beber uma solução com 75g de glicose em menos de 5 minutos e colheita de sangue venoso antes (0 horas) e após 2 horas (2h) desta ingestão. Se às 2h a glicémia for ≥ 200 mg/dl o indivíduo é classificado como diabético, mas se o valor obtido estiver entre os 140 mg/dl e os 200 mg/dl é considerado como tendo uma tolerância diminuída à glicose (Tabela 4) (26).

Tabela 4 - Critérios para identificação de categorias de risco aumentado para diabetes (26).

	Glicémia em Jejum (mg/dl)	PTGO 75 g (mg/dl)
Normal	<110	<140
Anomalia da glicémia em Jejum	110 -125	
Tolerância diminuída à glicose		140-199
Diabético	>126	>200

Nas mulheres grávidas a PTGO é obrigatória, porque apesar de não serem diabéticas podem desenvolver uma certa intolerância à glicose durante a gravidez, situação designada por Diabetes Gestacional (DG).

De acordo com a circular normativa da DGS nº002/2011 de 14/01/2011, “diagnóstico da diabetes gestacional” (26) o diagnóstico faz-se com base nos seguintes critérios:

- Glicémia em jejum feita na primeira consulta: ≥ 92 -126 mg/dl.
- Se a glicémia em jejum for < 92 mg/dl realiza-se a PTGO com 75 g de glicose entre as 24-28 semanas de gestação em que são feitas determinações às 0h, 1h e 2h.
- O diagnóstico da DG é estabelecido se houver a confirmação de um ou mais dos seguintes valores:

- 0h: glicémia ≥ 92 mg/dl
- 1h: glicémia ≥ 180 mg/dl
- 2h: glicémia ≥ 153 mg/dl.

4.9.3. HEMOGLOBINA GLICADA

A Hb A_{1c} (hemoglobina glicada) é uma variante estrutural da Hb A formada através de uma reação não enzimática em que a glucose se liga aos resíduos de valina N-terminais das β -globinas (28). A formação da Hb A_{1c} é irreversível, e como tal a sua concentração é correlacionada com a concentração plasmática de glucose no sangue e, devido ao tempo de semi-vida longo dos eritrócitos (cerca de 120 dias), permite a sua avaliação a longo prazo (29,30). Para a interpretação de resultados é importante ter em atenção a existência de patologias associadas com a diminuição do tempo de semi-vida dos eritrócitos, nomeadamente em anemias, visto que os valores da Hb A_{1c} nestes casos serão mais baixos. A determinação da Hb A_{1c} é uma mais-valia tanto no diagnóstico como na monitorização da concentração plasmática da glucose em doentes diabéticos. Isto porque ao contrário da determinação da concentração de glucose no plasma, a quantificação Hb A_{1c} fornece informações acerca do controlo da glicémia e da eficácia do tratamento da diabetes num longo período de tempo antes do ensaio (cerca de 6-8 semanas), e é independente de fatores como a ingestão de alimentos, a prática de exercício físico e das variações dos níveis de glucose que ocorrem durante o dia (30). Visto que a formação de Hb A_{1c} reflete a glicosilação das proteínas, processo associado aos efeitos do excesso de glucose, que são nefastos e que ocorrem a nível vascular, este parâmetro permite avaliar as complicações da diabetes (30).

Este parâmetro permite não só o diagnóstico da DM, como também a sua monitorização. Como não é alterado pela dieta, o utente não necessita de estar em jejum, podendo as amostras ser obtidas a qualquer hora do dia, o que constitui uma vantagem em relação ao diagnóstico da DM feito através do doseamento da glicémia (29).

Valores de HbA_{1c} $\geq 6,5$ % são indicativos de DM.

Princípio da deteção: Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), associado à cromatografia de troca catiónica de fase reversa (Figura 36).

Caso Clínico de indivíduo com glicémia não controlada

Indivíduo do sexo masculino que após determinação de glicémia em jejum apresenta valores acima dos usados de referência (Figura 28). Foi solicitado pelo clínico a determinação da Hb A_{1c}, que dá uma indicação acerca do controlo da glicémia assim como da eficácia do tratamento da diabetes, o que revelou resultados superiores a 6,5%. Estes valores obtidos não só são indicativos de DM como também revelam uma glicémia não controlada. Desconhece-se se o indivíduo está sujeito a alguma terapêutica.

Glicémia	256	mg/dL	< 110	29-04-2014 193
110-125 - Anomalia da Glicémia em Jejum >=126 - Diabetes, se obtida em 2 determinações >=200 - Diabetes, se associada a sintomas clássicos (De acordo com a Norma DGS 002/2011 de 14/01/2011)				
29-04-2014				
Hemoglobina Glicada A1c (HPLC)				
HbA1c (NGSP/DCCT)	9,9	%	>=6,5 -Diabetes, se obtida em 2 determinações	7,3
HbA1c (IFCC)	85	mmol/mol	< 39	56
Glicemia Média Estimada	237	mg/dL		163
(Norma 033/2011 da Direcção-Geral da Saúde)				

Figura 28 - Caso clínico de indivíduo com glicémia não controlada.

4.10. ESTUDO DO METABOLISMO DO FERRO

4.10.1. FERRO

O ferro é um elemento que no organismo participa em variados processos, nomeadamente no transporte de oxigénio e em metabolismo de oxidação celular.

Os valores de ferro são mantidos dentro da normalidade pela absorção intestinal (10% do ferro ingerido diariamente) que ocorre a nível do duodeno e jejuno proximal. Para além da perda diária de ferro pelo suor, esfoliação das células escamosas, eliminação das enzimas digestivas, eliminação pelo trato urinário, e menstruação nas mulheres, o organismo não tem a capacidade de eliminar um possível excesso de ferro através de um aumento da sua excreção ou de o armazenar sem que este exerça efeitos tóxicos (31).

Este elemento é absorvido na forma de ferro ferroso (Fe^{2+}).

A determinação deste parâmetro permite não só o diagnóstico de anemias como também o de outros estados patológicos (Tabela 5).

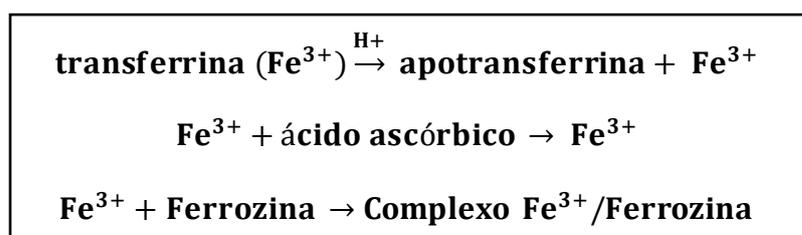
Tabela 5 - Patologias associadas aos valores de ferro, transferrina e ferritina.

Patologia	Ferro	Transferrina	Ferritina
Deficiência em Ferro	Baixo	Alto	Baixo
Hemocromatose	Alto	Baixo	Alto
Anemia hemolítica	Alto	Normal/Baixo	Alto
Anemia Sideroblástica	Normal/Alto	Normal/Baixo	Alto
Envenenamento por ferro	Alto	Normal	Normal

Hiposideridemia é o termo usado para designar situações em que se verifica uma diminuição na quantidade de ferro sérico, nomeadamente nos casos de anemias por deficiência de ferro como consequência de má absorção a nível do trato gastrointestinal, perdas excessivas ou insuficiente ingestão de ferro (31).

Quando se verifica um aumento da quantidade de ferro no soro, esta situação é denominada por hipersideremia, sendo devido a doenças hepáticas (hepatite aguda e cirrose hepática), após múltiplas transfusões e em determinadas anemias (aplásicas, hemolíticas e sideroblásticas) (32).

Princípio da deteção: O ferro sérico é dissociado da sua proteína de transporte (transferrina) num meio ácido, sendo simultaneamente reduzido a uma forma ferrosa. O ferro ferroso é depois complexado com ferrozina, um indicador sensível ao ferro, produzindo um cromóforo colorido que absorve a 571-658 nm (Figura 29) (33).

**Figura 29 - Reações que ocorrem na determinação de Ferro.**

São usados como referência, nas mulheres valores entre 25-156 mg/dl, e nos homens valores entre 31-144 mg/dl (32).

4.10.2. CAPACIDADE TOTAL DE FIXAÇÃO DE FERRO

A capacidade total de fixação de ferro (CTFF) corresponde à quantidade de ferro que pode estar ligada aos locais de ligação de toda a transferrina em circulação (dois por molécula) quando esta está saturada.

Em determinadas situações pode ocorrer diminuição da CTFF, nomeadamente nos casos de anemias devido a infeção ou tumores, onde ocorre também diminuição da siderémia. Em situações como hepatite aguda, anemia perniciosa e hemocromatose ocorre diminuição da CTFF e aumento da siderémia.

Há também aumento da CTFF, nas anemias ferroprivas devido a deficiente ingestão de ferro ou por perdas hemorrágicas, sendo este aumento acompanhado por uma diminuição da siderémia.

Princípio da deteção: São usados dois reagentes num processo sequencial monitorizado por espectrofotometria. Passo 1: é adicionado um primeiro reagente (R1) (tampão ácido que contém um corante com capacidade de ligação ao ferro (cromazurol B) e ao cloreto férrico, à amostra de soro. O pH baixo do R1 liberta o ferro da transferrina. O ferro forma um complexo corado com o corante no final (Fe-cromazurol). Passo 2: É adicionado um segundo reagente (tampão neutro). O pH é alterado e cria um grande aumento da afinidade da transferrina pelo ferro. A transferrina sérica liga-se ao ferro, extraíndo-o do complexo corante/ferro. A diminuição da absorvência a 571-658 nm do complexo corado corante/ferro é diretamente proporcional à CTFF na amostra (Figura 30) (33).

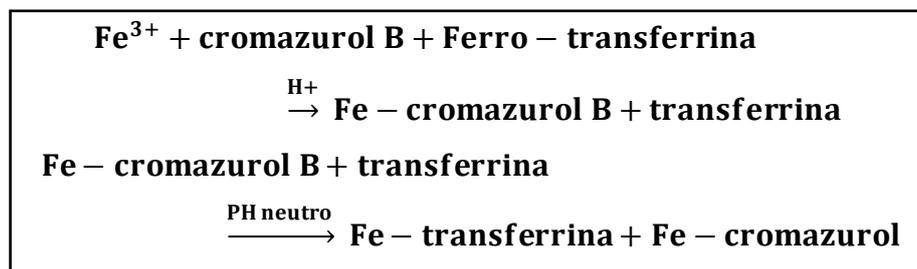


Figura 30 - Reações que ocorrem na determinação de CFFT.

São usados como referência nos adultos, valores entre os 250-450 mg/dl.

4.10.3. FERRITINA

A ferritina encontra-se nas células parenquimatosas do fígado e ainda nas células retículo-endoteliais do baço, medula óssea e do fígado, sendo neste órgão a ferritina responsável pelo armazenamento de ferro. Quando a ferritina se encontra saturada de ferro, este pode ainda ser armazenado nos tecidos em pequenos grânulos de óxido de ferro, denominados por hemossiderina. Estas duas últimas formas de armazenamento de ferro contêm normalmente 25% do ferro total e representam fontes de reserva de rápida mobilização em caso de necessidade (31).

Princípio da deteção: A ferritina determinada por quimioluminescência numa reação a duas fases. Primeiro, combina-se a amostra com micropartículas revestidas com anti-

ferritina. A ferritina na amostra liga-se às micropartículas e é feita uma lavagem. Num segundo passo é adicionado acridinium que se liga à anti-ferritina. Este passo final resulta na emissão de luz que é quantificada e que varia diretamente com a quantidade de ferritina na amostra.

São usados como referência nas mulheres valores entre os 5-200 mg/ml e nos homens valores entre os 20-270 mg/ml (32).

4.10.4. TRANSFERRINA

A transferrina é responsável pelo transporte do ferro no sangue na forma férrica (Fe³⁺) até à medula óssea, onde é incorporado na estrutura da hemoglobina, e ao fígado onde pode ser armazenado pela ferritina. Num indivíduo saudável apenas $\frac{1}{3}$ da transferrina se encontra saturada de ferro (31).

Princípio da deteção: O doseamento da transferrina é feito por imunoturbidimetria, em que um anticorpo específico para a transferrina é adicionado à amostra e a formação do complexo insolúvel entre o anticorpo e a transferrina vão aumentar a turvação da amostra, que é medida a 596-694 nm e é diretamente proporcional à concentração de transferrina na amostra.

São usados como referência para adultos, valores entre os 175-370 mg/dl (33).

Adicionalmente também pode ser calculada a saturação da transferrina através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Sat. Transferrina} = (\text{Ferro} \times 100) / \text{CTFF}$$

Este valor indica que quantidade de ferro circulante no soro está ligado à transferrina (33).

4.11. OUTROS

4.11.1. PROTEÍNA C REATIVA

A Proteína C reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda essencialmente de síntese hepática sob influência de citocinas como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), moléculas pró-inflamatórias, sintetizadas no tecido adiposo. Esta proteína tem a propriedade de precipitar com o polissacarídeo C de certos grupos de Pneumococos, encontrando-se deste modo no soro de indivíduos com pneumonia aguda, noutros casos de infeção por bactérias *Gram* negativas ou positivas, ou também em situações de doenças inflamatórias não contagiosas ou tumores malignos. A PCR pode estar associada à doença aterosclerótica, uma vez que esta se caracteriza por ser um processo inflamatório e como tal haverá síntese desta proteína. No entanto, é formada em quantidades inferiores às de um

processo inflamatório, tendo sido necessário desenvolver-se métodos ditos de “alta sensibilidade” para poder proceder ao seu doseamento. Assim sendo, a PCR é chamada de Proteína C Reativa de alta sensibilidade (hsPCR, do inglês “*high sensitivity PCR*”) (34).

A deteção da PCR é indicada em situações de febre reumática aguda e artrite reumatoide e também para diferenciação entre algumas infeções virais e bacterianas (34).

Princípio da deteção: O doseamento da PCR no soro é feito com partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti-PCR. O aparecimento de aglutinação provoca um aumento da absorvência a 572 nm. Este aumento é diretamente proporcionalmente à concentração de PCR na amostra (33).

São usados como referência, valores inferiores a 0,5 mg/dl (18).

4.1.1.2. CREATINA CINASE

A Creatina Cinase (CK) é uma enzima que existe em grandes quantidades nos tecidos com elevadas necessidades energéticas, como o cerebral e o muscular cardíaco e esquelético. É responsável por catalisar a fosforilação da creatina a creatina fosfato, composto muito importante nos períodos de contração muscular. Há aumento da sua atividade na corrente sanguínea, sempre que haja uma destruição celular nos músculos esqueléticos e cardíacos, e no tecido cerebral (22).

A determinação da CK total não permite identificar o local da lesão, para isso é necessário dosear as suas isoformas, tais como a CK-MM específica de lesão muscular esquelética; CK-MB marcador de lesão muscular cardíaca e da CK-BB que permite indicar uma lesão cerebral (22).

Princípio da detecção: a CK catalisa a transferência de um grupo fosfato da creatina fosfato para o ADP, formando-se creatinina e ATP. Este ATP é usado para fosforilar glucose formando glucose-6-fosfato (G-6-P) na presença de hexocinase (HK). A G-6-P é então oxidada pela glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) com a consequente redução de NADP^+ a NADPH. O aumento da formação de NADPH é detetado a 340 nm e é proporcional à atividade de CK na amostra Figura 31) (33).

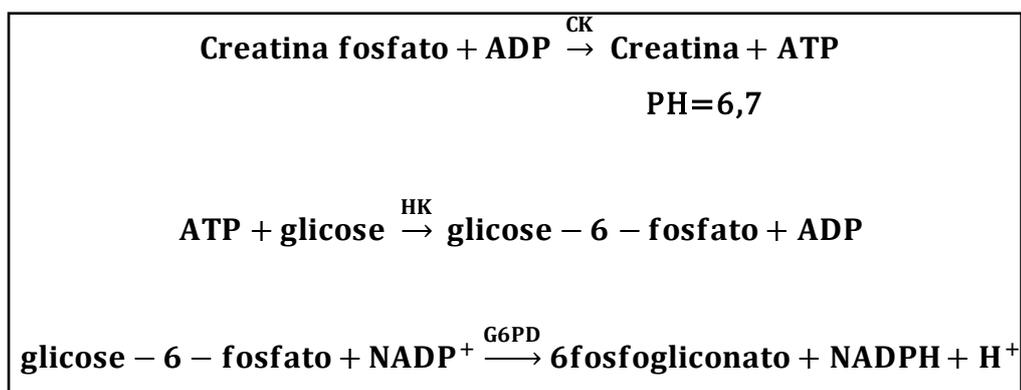


Figura 31 - Reações na determinação de CK.

São usados como referência, nas mulheres valores entre os 29-168 U/l e nos homens entre os 30-200 U/l (18).

No Hemobiolab apenas se doseia a CK total.

4.11.3. LACTATO DESIDROGENASE

A Lactato Desidrogenase (LDH) é uma enzima que catalisa a oxidação do L-lactato a piruvato.

Devido à sua ampla distribuição em todos os tecidos, aumentos séricos de LDH ocorrem em diversas situações clínicas, tais como: enfarte do miocárdio; hemólise; distúrbios a nível hepático, renal, pulmão e músculo (22). Deste modo, o aumento da sua atividade sérica indica que há células a serem lesadas cujas causas podem ser diversas, sendo as mais comuns: hemólise; exercício físico intenso, isquémia cardíaca e hepatite.

Para o seu doseamento, o soro é a amostra de eleição uma vez que as de plasma podem estar contaminadas com plaquetas, as quais têm elevadas concentrações de LDH. Soro hemolisado deve de ser rejeitado, uma vez que os eritrócitos têm 150 vezes mais atividade de LDH do que o soro, interferindo no resultado final (22).

A LDH é um marcador inespecífico de lesão celular mas a determinação das suas 5 isoenzimas podem ajudar a identificar a causa que levou a aumentos da sua concentração sérica (22).

Princípio da detecção: a LDH catalisa a reação na qual o Lactato e o NAD^+ são convertidos a Piruvato e NADH. O aumento da absorvência do NADH a 340nm é diretamente proporcional à quantidade de LDH na amostra (Figura 32) (33).

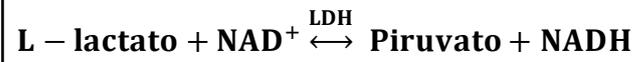


Figura 32 - Reação que ocorre na determinação de LDH.

São usados como referência para adultos, valores entre os 125-243 U/l (18).

V. SECÇÃO DE HEMATOLOGIA

5.1. EQUIPAMENTOS E PRINCÍPIOS

5.1.1. HORIBA MEDICAL ABX PENTRAML

O ABX Pentra[®] (Figura 33) é o equipamento utilizado para a contagem das células sanguíneas, com diferencial leucocitário e contagem de reticulócitos. Para o seu funcionamento este analisador recorre principalmente ao princípio da impedância elétrica, que permite tanto a contagem



Figura 33 - HORIBA MEDICAL ABX PentraML.

das células como a determinação do volume celular. Uma vez aspiradas pelo equipamento, as amostras são diluídas em solução eletrolítica (fluido condutor de corrente elétrica) e distribuídas pelas múltiplas câmaras de contagem. As câmaras apresentam uma micro-abertura calibrada onde é aplicado um campo elétrico entre dois eléctrodos posicionados de cada lado. A passagem das células sanguíneas pela abertura cria uma resistência (impedância) no campo elétrico entre os dois eléctrodos. Quanto maior for o volume da célula que passa pela micro-abertura, maior é a resistência ao campo elétrico e, conseqüentemente, maior é a altura e a duração do pulso elétrico gerado. Estes pulsos são posteriormente amplificados e a informação processada de modo a produzir, através dos coeficientes de calibração, os valores numéricos finais para as células quantificadas. A diferenciação entre os diferentes tipos de células é assegurada pela distribuição das amostras nas diferentes câmaras de contagem, em conjunto com a adição de reagentes específicos. As câmaras de contagem disponíveis neste sistema são a RBC/PLT, para contagem de eritrócitos (RBC do inglês “Red blood cells”) e plaquetas (PLT), a WBC/HGB, para a contagem de leucócitos (WBC do inglês “white blood cells”) e determinação da hemoglobina, a BASO, para a contagem de basófilos (BASO) e a LMNE/RET, para o diferencial leucocitário e determinação de reticulócitos (Ret) (35).

5.1.2. SIEMENS BCS[®] XP

O BCS[®] XP (Figura 34) é o analisador utilizado no Hemobiolab para a realização das provas da coagulação. Este equipamento permite a automatização de todos os passos envolvidos para cada ensaio específico, incluindo a pipetagem das amostras e dos



Figura 34 - Siemens BCS XP.

reagentes para rotores próprios que contêm as cuvets onde se processam as reações, incubação das misturas de reação a 37°C e, de acordo com o ensaio a realizar, a leitura dos resultados por turbidimetria ou fotometria, dependendo do método. O equipamento efetua as determinações através de três princípios diferentes. Nas reações que envolvem a determinação de tempos de coagulação, o aparelho mede o tempo que decorre até à formação do coágulo de fibrina, o qual é detetado através do aumento da turvação, que por sua vez é quantificado pela diminuição da luz emitida através da mistura de reação até um detetor (fotómetro). Este método é aplicado à determinação do tempo de protrombina, do tempo de tromboplastina parcial ativado e do Fibrinogénio de Clauss. Os métodos imunoturbidimétricos recorrem a reagentes com anticorpos monoclonais específicos aos analitos em estudo e ligados a partículas de látex. As ligações específicas antigénio-anticorpo formadas originam agregados que conferem o aumento da turvação da mistura de reação, a qual é quantificada pelo método turbidimétrico semelhante ao descrito anteriormente (36).

5.1.3. VES-MATIC 30 PLUS

No Hemobiolab a determinação da velocidade de sedimentação feita através do autoanalisador VES-MATIC 30 Plus (Figura 35), sendo os resultados expressos em mm/h, que são equivalentes aos calculados usando o método de Westergren.



Figura 35 - VESMATIC 30 PLUS.

O sangue total recolhido para tubos com EDTA é cuidadosamente

misturado pelo dispositivo, ficando as amostras em repouso por um tempo predefinido para que se verifique a sedimentação. Esta última é lida por sensores ótico-eletrônicos (37).

5.1.4. HA-8160- A. MENARINI DIAGNOSTICS

O HA-8160 A. MENARINI (figura 36) é o equipamento usado no Hemobiolab para a separação e quantificação de Hemoglobinas Específicas. A separação das diferentes frações de hemoglobina é feita através de cromatografia de alta eficácia (HPLC do inglês “*high performance liquid chromatography*”) por troca iónica, após a lise dos eritrócitos para libertar o conteúdo de hemoglobina intracelular. Este equipamento é composto por uma coluna cromatográfica



Figura 36 - HA A.MENARINI diagnostics.

revestida internamente por uma resina carregada negativamente que atua como fase estacionária na separação cromatográfica (troca iónica). A carga negativa da coluna permite que ao ser injetada a amostra, previamente diluída pelo equipamento, as amostras carregadas positivamente fiquem retidas, sendo a interação mais forte quanto maior for a carga positiva. Ao aplicar um gradiente crescente de solução salina, criado por duas soluções tampão de diferentes concentrações, as moléculas retidas perdem a sua interação com a coluna e são eluídas em função da sua afinidade para a resina. Com a injeção de eluente de baixa concentração, apenas as moléculas com baixa afinidade para a resina são eluídas, sendo as de alta afinidade eluídas posteriormente com o aumento da concentração da solução salina. A deteção das frações isoladas de hemoglobinas é feita através da leitura da absorvância a 215 nm pelo fotómetro do equipamento (Figura 36). Os resultados são expressos em percentagem relativamente ao total de hemoglobina quantificada (Tabela 6) (38).

Tabela 6 - Valores de referência para hemoglobinas específicas.

Parâmetro	Valores de referência (%)
Hemoglobina A1c	4-6
Hemoglobina A2	1,3-3,7
Hemoglobina F	<1

5.2. AMOSTRAS EM HEMATOLOGIA

Em hematologia as amostras são de sangue total, sendo este colhido para tubos com anticoagulantes; citrato de sódio para a realização das provas de coagulação, e EDTA tripotássico (K₃ EDTA do inglês “Ethylene Diamine Tetraacetic Acid”) para as restantes determinações feitas nesta secção, visto que este último anticoagulante não só inibe o processo de coagulação pela formação de quelatos insolúveis com os iões de cálcio, que estão presentes no sangue, como também permite conservar as amostras durante uma semana, a uma temperatura compreendida entre 2-8°C (4).

5.3. HEMOGRAMA

O hemograma é um teste que permite avaliar as células sanguíneas através do seu número, forma e tamanho. Os parâmetros determinados incluem: contagem de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e reticulócitos; quantificação de hemoglobina; determinação de índice eritrocitário e diferencial leucocitário.

É fundamental ter-se o conhecimento dos valores de referência (Tabela 7) dos parâmetros avaliados num hemograma de modo a poder identificar-se a existência de qualquer alteração a nível celular que possa estar associada a uma possível patologia, sendo que vários fatores podem alterar estes valores, nomeadamente: idade, sexo e altitude do local de residência (31).

No Hemobiolab a análise dos valores dos parâmetros avaliados em cada hemograma é feita com base na idade, sexo e informação clínica disponível, sendo que nos casos em que seja verificada uma alteração nestes valores, é efetuada uma repetição do hemograma e/ou um esfregaço de sangue periférico.

Tabela 7 - Valores de referência num hemograma (31).

Parâmetro/Unidades	Sexo	Valores de Referência
RBC ($\times 10^{12}/L$) Eritrócitos	Homem	4.50-10.00
	Mulher	3.80-4.80
HGB (g/dl) Hemoglobina	Homem	13.0-17.0
	Mulher	12.0-15.0
HTC (%) Hematócrito	Homem	40.0-50.0
	Mulher	36.0-46.0
VCM (fl) Volume corpuscular médio	Homem/Mulher	83.0-103
HCM (pg) Hemoglobina Corpuscular média	Homem/Mulher	27.0-33.0
CHCM (g/dl) Concentração Hemoglobina Corpuscular média	Homem/Mulher	32.0-36.0
RDW (%) Distribuição do volume eritrocitário	Homem/Mulher	11.0-14.0
RET ($\times 10^9/L$) Reticulócitos	Homem/Mulher	50.0-150
PLT ($\times 10^9/L$) Plaquetas	Homem/Mulher	150-410
WBC ($\times 10^9/L$) Leucócitos	Homem/Mulher	4.0-10.0
NEU ($\times 10^9/L$) Neutrófilos	Homem/Mulher	1.5-8.0
LYN ($\times 10^9/L$) Linfócitos	Homem/Mulher	0.8-4.0
MONO ($\times 10^9/L$) Monócitos	Homem/Mulher	0.0-1.2
EOS ($\times 10^9/L$) Eosinófilos	Homem/Mulher	0.0-0.3
BASO ($\times 10^9/L$) Basófilos	Homem/Mulher	0.0-0.3

5.3.1. ERITRÓCITO

É uma célula em forma de disco bicôncavo com 8 µm de diâmetro, flexível e cujo tempo de meia vida é de 120 dias. A sua flexibilidade permite-lhe passar através da microcirculação cujo diâmetro mínimo é de 3,5 µm. A principal função dos eritrócitos consiste no transporte de oxigénio ligado à hemoglobina para os tecidos, e o retorno de dióxido de carbono, dos tecidos para os pulmões (31).

5.3.2. HEMOGLOBINA

A Hemoglobina (Hb) é uma proteína especializada existente nos eritrócitos que permite a estas células realizar as trocas gasosas entre os tecidos e os pulmões (31). É composta por 4 subunidades tendo cada uma um grupo prostético heme, contendo um átomo de ferro que, no estado ferroso (Fe^{2+}), permite a ligação da hemoglobina ao oxigénio e dióxido de carbono. A Hb dominante no sangue depois dos 3-6 meses de idade é a hemoglobina A (HbA), composta por quatro cadeias polipeptídicas $\alpha_2\beta_2$, cada uma com o seu próprio grupo heme. Também se pode encontrar, mas em menor quantidade, hemoglobina F (HbF) e hemoglobina A₂ (HbA₂) (31). Uma diminuição na concentração de Hb no sangue abaixo dos valores de referência para a idade e sexo, é indicador de anemia (31).

5.3.3. HEMATÓCRITO

O hematócrito (HCT) é a percentagem de eritócitos na massa de sangue após centrifugação. No autoanalisador, é determinado o volume corpuscular médio (VCM) que, juntamente com o número de eritrócitos, permite fazer o cálculo deste parâmetro através da seguinte fórmula:

$$HCT (L/L) = VCM (fL) * RBC (10^{12}/L) / 10^3$$

O resultado pode ser apresentado em Percentagem (%) ou em Litro/Litro (L/L). Um valor de HCT baixo está associado a uma diminuição no número de eritrócitos devido a hemólise, hemorragia assim como uma eritropoiese ineficaz, responsável pela diminuição na produção de eritrócitos e do seu volume celular (31). Um valor de HCT elevado pode ser devido a eritrocitose ou a diminuição do volume de plasma (39,40).

5.3.4. VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO

O VCM corresponde à média dos volumes de uma população de eritrócitos (41). Este parâmetro é expresso em fentolitros (fL) e pode ser determinado diretamente pelo equipamento ou ser calculado através da seguinte fórmula:

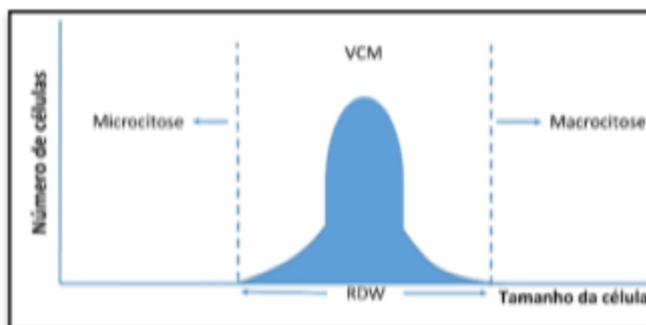


Figura 37 - Histograma de eritrócitos.

$$\text{VCM (fL)} = [\text{HCT (L/L)} / \text{RBC (10}^{12}/\text{L)}] * 10^3$$

As variações acentuadas de VCM assim como a deslocação do histograma dos eritrócitos (Figura 37) são indicativas de uma ineficaz eritropoiese e permitem classificar as anemias (Tabela 8) (31).

Tabela 8 - Classificação genérica das anemias em 3 grupos (31).

Microcítica, Hipocrômica	Normocítica, Normocrômica	Macrocítica
VCM <80 fL	VCM 80-97 fL	VCM > 97 fL
HCM <26 pg	HCM > = 26 pg	
Deficiência de ferro	Hemorragia aguda	Anemia Megaloblástica:
Talassemia	Anemia das doenças crônicas	Défice de vitamina B12 e de folato
Anemia por intoxicação por chumbo	Nefropatia	Anomalias no metabolismo da Vitamina B12 ou folato
	Insuficiência da medula óssea	Defeitos na síntese do ADN
		Anemia não Megaloblástica
		Consumo de álcool
		Hepatopatia
		Mielodisplasia
		Anemia Aplástica

5.3.5. HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA

A Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) indica a quantidade média de hemoglobina presente numa população de eritrócitos. É expressa em picogramas (pg), podendo ser calculada através da fórmula:

$$\text{HCM (pg)} = [\text{HCB (g/dl)} / \text{RBC (10}^{12}/\text{L)}] * 10$$

Este parâmetro permite classificar os eritrócitos segundo a sua coloração em: hipocrómicos (HCM baixo) e normocrómicos (HCM normal). Nas anemias microcíticas e macrocíticas podemos encontrar valores de HCM baixos e altos, respetivamente (42).

5.3.6. CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA

A Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) indica a proporção média de hemoglobina dentro de cada eritrócito. É expressa em g/dl podendo ser calculada pela fórmula:

$$\text{MCHC (g/dl)} = [\text{HCM (g/dl)} / \text{HCT (L/L)}]$$

Tal como a HCM, a MCHM permite classificar os eritrócitos em hipocrómicos (MCHC baixo) e normocíticos (MCHC normal). Valores de MCHC dentro do intervalo de referência são encontrados nas situações de anemia macrocítica, e isto deve-se ao facto da HCM e VCM aumentarem paralelamente (42). Associados a anemia falciforme ou a esferocitose hereditária estão os valores de CHCM elevados.

5.3.7. DISTRIBUIÇÃO DO VOLUME ERITROCITÁRIO

A distribuição do volume eritrocitário (RDW) indica a amplitude de distribuição do volume dos eritrócitos. É expresso em percentagem, sendo o seu cálculo feito através da base da curva de distribuição dos eritrócitos (Figura 37) de modo automático pelo próprio equipamento.

5.3.8. CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

A contagem de reticulócitos é um teste que permite avaliar a taxa de produção de eritrócitos, visto que o seu número no sangue periférico reflete a atividade da eritropoiese pela medula óssea (41). Encontra-se um número aumentado de reticulócitos nos casos de anemia, devido ao aumento da eritropoietina, sendo que um número não aumentado em indivíduos com anemia é sugestivo de uma diminuição da função da medula óssea ou de falta de estímulo eritropoiético (Tabela 9) (31).

Tabela 9 - Fatores que diminuem a resposta normal dos reticulócitos à anemia (31).

Fatores que diminuem a resposta normal dos reticulócitos à anemia
Doenças da medula óssea (hipoplasia, infiltração por carcinoma, linfoma, mieloma, leucemia aguda, tuberculose)
Deficiência de ferro, vitamina B ₁₂ ou folato
Falta de eritropoietina (nefropatias)
Diminuição do consumo de oxigênio pelos tecidos (mixedema, deficiência proteica)
Eritropoiese ineficaz (talassemia major, anemia megaloblástica, mielodisplasia, mielofibrose)
Doença inflamatória crônica

5.3.9. CONTAGEM DE PLAQUETAS

As plaquetas são células pequenas, discoides, sem material nuclear e com um tempo de meia vida de 7-10 dias. São produzidas na medula óssea por fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, que amadurecem por replicação nuclear, havendo aumento do volume do citoplasma e de lóbulos nucleares (31). Quando no estágio de desenvolvimento se atingem 8 glóbulos nucleares, o citoplasma torna-se granular, e como resultado da fragmentação das extremidades deste, são formadas as plaquetas (31). Estas, no seu citoplasma, possuem vários tipos de grânulos (densos, α e lisossomas) onde estão armazenadas diversas proteínas e outros compostos importantes na vasoconstrição, amplificação da agregação plaquetária, estimulação da coagulação e cicatrização das lesões vasculares (31). Dado que a principal função das plaquetas é a formação de um tampão em resposta a lesões nos vasos sanguíneos, a contagem de plaquetas permite avaliar o mecanismo da hemóstase primária.

A contagem das plaquetas é feita pelo próprio equipamento através do princípio da impedância elétrica, sendo os resultados expressos por número de células por litro ($n \times 10^9/L$). A diferenciação é feita com base num valor limite para o volume celular, que varia em função da população de micrócitos presentes na amostra (25 fL como padrão). Quando o número de plaquetas é menor que o valor de referência (Tabela 7) situação denominada por trombocitopenia, existe um maior risco de haver um sangramento não só anormal como também prolongado, sendo a principal causa a diminuição da produção de plaquetas devido a um déficit na medula óssea causado por diversos fatores como: fármacos, infeções virais e leucemias (menos frequentemente) (42,43). A trombocitopenia também pode resultar do aumento do consumo/destruição de plaquetas por processos autoimunes (purpura trombocitopénica idiopática), determinados fármacos ou infeções (síndrome hemolítico-

urémico por *Escherichia coli*), púrpura pós-transfusional, coagulação intravascular disseminada, purpura trombocitopénica trombótica e esplenomegalia (42,43). É importante a preparação de um esfregaço de sangue periférico por forma a poder distinguir esta situação de uma falsa trombocitopenia, pois pode haver agregados plaquetários que pelo equipamento são contabilizados como sendo uma plaqueta isolada. Trombocitose é o termo usado para designar um aumento do número de plaquetas e resulta do aumento da produção de plaquetas pela medula óssea, sendo esta situação associada ao aumento do risco de formação de trombos no interior dos vasos sanguíneos. A trombocitose pode ser de origem primária (disfunção da medula óssea observada na trombocitémia essencial e em outras doenças mieloproliferativas) ou de origem secundária (trombocitose reativa), que pode estar associada a hemorragia, infeção, inflamação, cirurgia, trauma, esplenectomia, diminuição da função do baço, entre outras causas (44).

5.3.10. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS

5.3.10.1. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS

A contagem dos leucócitos totais é realizada na câmara WBC/HCB do equipamento por medição da impedância elétrica e da adição de um reagente responsável pela lise dos eritrócitos, permitindo assim que sejam diferenciados destas células. A aplicação de um valor limite para o volume celular permite a diferenciação dos leucócitos com as plaquetas e com os eritrócitos lisados. Os resultados obtidos para os leucócitos totais e para os seus diferentes tipos são expressos por número de células por litro ($n \times 10^9/L$).

Um número aumentado de leucócitos é encontrado como resposta a processos infecciosos e inflamatórios, sendo este aumento também associado à disfunção da medula óssea (doenças mieloproliferativas), a reações resultantes da administração de determinados fármacos e de desordens de natureza imunológica (alergias e doenças autoimunes) (42,45). Uma anormal estimulação da medula óssea pode levar ao aumento dos precursores mieloides/linfoides nas contagens automáticas de células e na observação de esfregaços de sangue periférico (desvio esquerdo). Nas anemias hemolíticas e pós-hemorragicas, também se encontra um aumento do número de linfócitos totais (31).

A contagem de leucócitos encontra-se diminuída quando há perda da função da medula óssea, que por sua vez pode estar associada a determinadas infeções virais, doenças congénitas (síndromes mielodisplásicas), neoplasias (leucemias), doenças autoimunes e administração de fármacos (radioterapia e quimioterapia) (31,42). A diminuição do número de leucócitos totais também pode ser devido à sua destruição a um ritmo superior a que são

produzidos como nos casos de infecções severas, doenças autoimunes, esplenomegalia e ação de determinados fármacos (42).

5.3.10.2. DIFERENCIAL LEUCOCITÁRIO

O diferencial leucocitário consiste na classificação de uma população de leucócitos nos seus diferentes tipos de células. No equipamento utilizado, esta classificação é feita com base em duas características: o volume e a complexidade celular. O volume celular e o número de células são obtidos através da medição da impedância elétrica. Para a determinação da complexidade celular é adicionado um reagente responsável pela lise dos eritrócitos, estabilização dos leucócitos nas suas formas nativas e pela sua coloração citoquímica diferencial. A intensidade da coloração citoquímica é proporcional à composição em grânulos e de núcleos nas

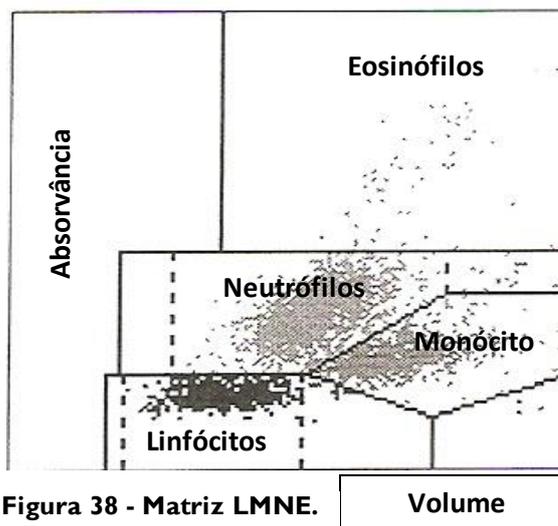


Figura 38 - Matriz LMNE.

células (complexidade celular) e é medida através da leitura da absorvância. Isto permite que as células sejam distribuídas na matriz linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos (LMNE) (Figura 38) em função do seu volume celular (eixo XX) e da sua complexidade (eixo YY). A interpretação é feita segundo as regiões da matriz. As contagens nas câmaras LMNE e basófilos (BASO) são comparadas com as contagens de leucócitos totais de modo a fazer-se a diferenciação em números absolutos e em percentagens.

5.3.10.3. NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos (Figura 39) são os leucócitos que, em conjunto com os eosinófilos e os basófilos, formam o grupo dos granulócitos. São células com núcleo denso característico, com dois a cinco lóbulos, e citoplasma pálido com contorno irregular e grânulos finos azulados (39,40). Tem como principal função a defesa contra infecções bacterianas através do mecanismo de fagocitose e da libertação de substâncias citotóxicas (31). Em doenças infecciosas e inflamatórias, assim como resposta a determinados fármacos, apresentam granulações citoplasmáticas grosseiras (granulações tóxicas) na observação dos esfregaços de sangue periférico (39).

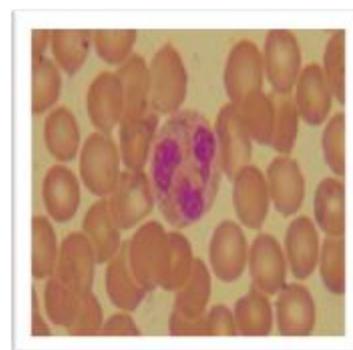


Figura 39 - Neutrófilo.

Uma contagem elevada de neutrófilos é designada por neutrofilia, enquanto neutropenia é o termo usado para denominar uma contagem baixa de neutrófilos.

Nas situações em que ocorre um grande aumento do número de leucócitos em paralelo com o aumento significativo dos neutrófilos imaturos verifica-se a ocorrência de uma reação leucemóide, normalmente associada a infeção (particularmente em crianças) e hemólise severa (31,42). A reação leucoeritroblástica consiste numa reação leucemóide com presença de precursores eritroides e está associada principalmente com invasão medular (fibrose e neoplasias), podendo surgir nas hemorragias e situações de hemólise em casos mais raros (31, 42).

5.3.10.4. LINFÓCITOS

Os linfócitos são divididos em três grupos diferentes, dependendo da sua função: os linfócitos T, mais predominantes (cerca de 70%), que maturam no timo e são importantes na eliminação de antígenos estranhos ao organismo (imunidade celular) (31); os linfócitos B, que sofrem maturação na medula óssea e são importantes na resposta humoral contra agentes estranhos através da sua maturação em plasmócitos e da produção de imunoglobulinas; e os linfócitos *natural killer* (NK), semelhantes aos linfócitos T citotóxicos, tendo um papel importante na destruição celular de vírus e células neoplásicas. A observação ao microscópico não permite distinguir os diferentes tipos de linfócitos, tendo a maioria destas células baixo volume celular, com um rebordo fino de citoplasma, e contêm ocasionalmente na sua composição grânulos azurófilos pequenos e escassos (Figura 40). Os núcleos são de tamanho uniforme e são compostos por cromatina homogénea com alguma aglomeração na periferia celular. Alguns dos linfócitos circulantes apresentam dimensões superiores, com citoplasma azul pálido mais abundante e grânulos azurófilos mais predominantes. Os plasmócitos estão normalmente presentes na médula óssea sendo raros no sangue periférico. A sua presença neste último pode estar associada a infeções severas ou a mieloma múltiplo (39,40).

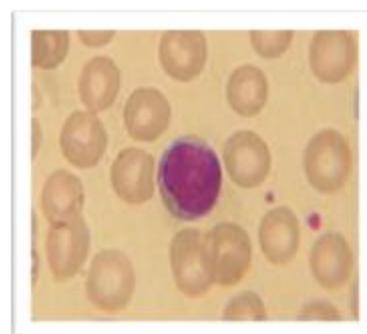


Figura 40 - Linfócito.

Um aumento do número de linfócitos (linfocitose) é mais frequente em lactentes e em crianças jovens e está associada a infeções que produzem reação neutrófila em adultos. As infeções virais são as mais comuns, particularmente as infeções pelo vírus Epstein Barr (EBV) (mononucleose infecciosa) e pelo citomegalovírus (CMV) (39,45). Nestas infeções verifica-se a presença de numerosos linfócitos atípicos (Figura 41), caracterizados por núcleos

ligeiramente maiores e irregulares, com cromatina menos uniforme, e citoplasma muito abundante e basófilo na periferia, que tende a espalhar-se em torno dos eritrócitos nos esfregaços de sangue periférico (39). A ocorrência dos linfócitos atípicos pode também estar associada à administração de determinados fármacos. Para além das situações de infeções, também são encontrados níveis aumentados de linfócitos em leucemias linfoides crónicas, leucemias linfoblásticas agudas e em alguns linfomas (45). A deficiência em linfócitos (linfopenia) pode ocorrer em insuficiências graves da medula óssea, no tratamento com glucocorticoides ou outros imunossupressores, em linfomas (linfoma de Hodgkin avançado), em síndromes de imunodeficiência (infeção vírus da imunodeficiência humana do inglês “*human immunodeficiency virus*” (HIV) e após irradiação sistémica (31).

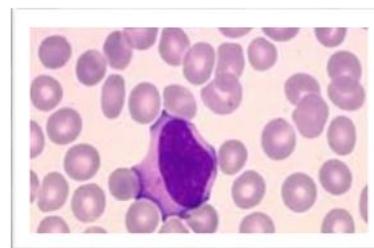


Figura 41 - Linfócito atípico.

5.3.10.5. MONÓCITOS

Os monócitos (Figura 42) são, em média, os leucócitos com maior volume celular presentes no sangue periférico. Possuem núcleos grandes, centrais, ovais ou endentados, e com cromatina aglomerada. O citoplasma é abundante, com cor azulada, e contém pequenos vacúolos. Os grânulos citoplasmáticos estão também normalmente presentes (39,40). A principal função destas células é a defesa contra microrganismos e outras partículas estranhas, através do mecanismo da fagocitose (31). Nos tecidos estas células transformam-se em macrófagos, um dos principais fagócitos do organismo.

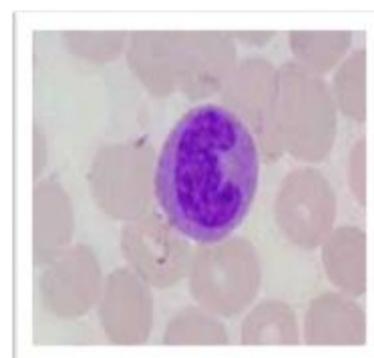


Figura 42 – Monócito.

O aumento do número de monócitos (monocitose) está associado a determinadas doenças infecciosas e inflamatórias crónicas, incluindo doenças autoimunes do tecido conjuntivo, e a neutropenia crónica (31). A monocitose pode também estar associada a leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocítica crónica e a outras neoplasias malignas (39,45). Uma diminuição do número de monócitos (monopenia) podem resultar da ação imunossupressora dos glucocorticoides, de agentes quimioterápicos, certos tipos de leucemia e síndromes mielodisplásicas (42).

5.3.10.6. EOSINÓFILOS

Os eosinófilos (Figura 43) apresentam uma morfologia semelhantes à dos neutrófilos mas possuem grânulos citoplasmáticos maiores (maior intensidade na coloração citoquímica), apresentando coloração vermelho-alaranjada intensa devido à sua afinidade para corantes ácidos como a eosina, e têm normalmente três ou menos lóbulos nucleares. Têm como principal função a regulação das respostas alérgicas e ação citotóxica contra parasitas (31,40).

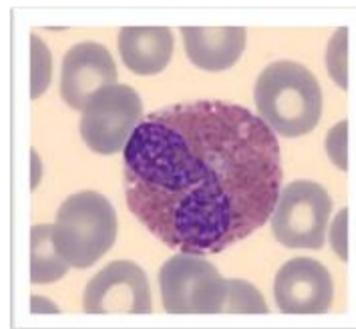


Figura 43 – Eosinófilo.

Um aumento significativo na contagem de eosinófilos (eosinofilia) está principalmente associado à ocorrência de infecções parasitárias e de reações alérgicas (incluindo hipersensibilidade a fármacos), mas pode também resultar de determinadas doenças autoimunes, leucemia mieloide aguda/crónica e síndrome hipereosinofílica (eosinofilia crónica idiopática) (40,45). A diminuição do número de eosinófilos (eosinopenia) ocorre por ação imunossupressora prolongada dos glucocorticoides (39,42).

5.3.10.7. BASÓFILOS

Os basófilos (Figura 44) são os leucócitos presentes em menor quantidade no sangue periférico. Possuem no seu citoplasma vários grânulos grosseiros, de cor azulada, devido à sua afinidade pelos corantes básicos, que cobrem o núcleo multissegmentado da célula (31,40). A principal função destas células consiste em regular reações, não só alérgicas como também inflamatórias, através da sua desgranulação, que leva à libertação de histamina e de heparina (31).

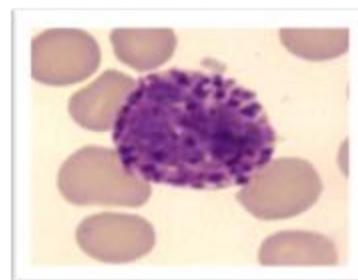


Figura 44 – Basófilo.

5.4. ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO

Através da observação ao microscópio ótico de um esfregaço de sangue periférico (ESP) é possível fazer-se uma avaliação qualitativa e quantitativa dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A análise dos eritrócitos permite fazer uma classificação com base nas variações de volume (macrocitose, microcitose e anisocitose), cor (hipocromia, policromasia), inclusões eritrocitárias e presença de células com morfologia anormal (Figura 45), em que estas últimas podem sugerir determinadas patologias (31).

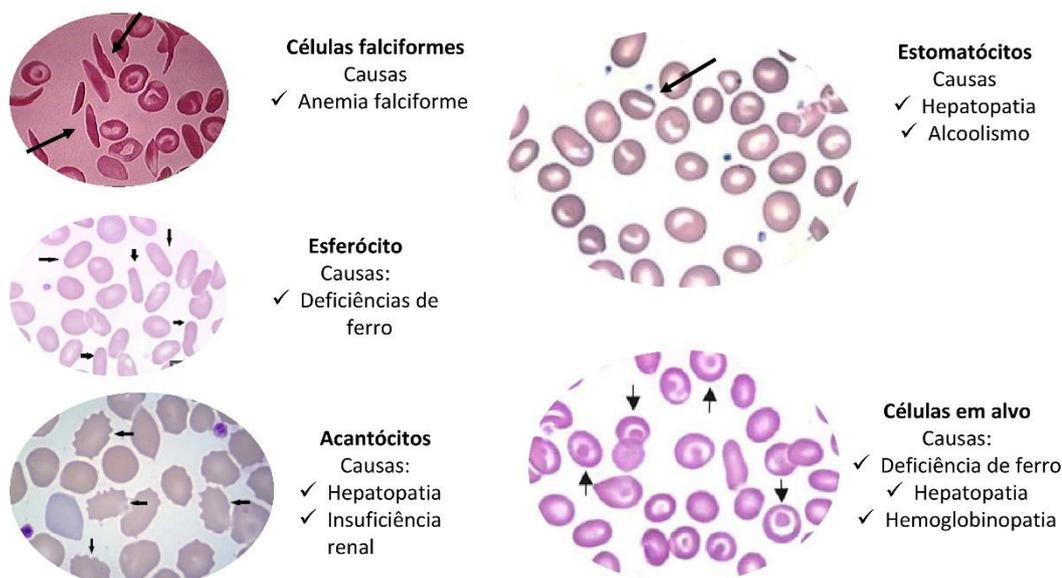


Figura 45 - Células com morfologia anormal associadas a determinadas patologias (31).

O estudo das plaquetas não só permite identificar alterações morfológicas e numéricas, como também permite fazer a distinção entre uma verdadeira trombocitopenia de uma trombocitopenia devido à presença de agregados plaquetários (Figura 46).



Figura 46 - Agregados plaquetários.

Para além do estudo morfológico, a observação dos leucócitos incide na sua avaliação quantitativa, sendo esta realizada nas situações em que os contadores de células são incapazes de determinar corretamente o diferencial leucocitário. Nestes casos é feita a contagem manual de 100 leucócitos presentes no esfregaço, é calculada a percentagem de cada tipo de célula e é obtida a sua contagem absoluta a partir do valor de leucócitos totais fornecido pelo auto-analisador e das percentagens calculadas através da contagem manual. O equipamento pode acusar a presença de leucócitos imaturos, devendo então ser confirmada a presença destes e ser referida nas observações aos resultados, em conjunto com a sua identificação possível (31).

O ESP é feito manualmente, usando-se uma amostra de sangue total. De modo a permitir a boa observação tanto das células assim como de hemoparasitas, é importante que a técnica usada na sua preparação seja correta (Figura 47) (Anexo I) (31).

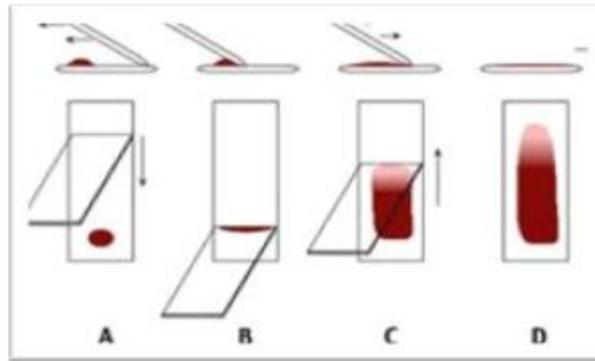


Figura 47 - Técnica correta para realizar um esfregaço de sangue periférico.

No Hemobiolab, a coloração dos esfregaços é feita pela técnica Hemacolor (reagentes Hemacolor Applichem Pancreac ITW companies), que se baseia na coloração de Pappenheim (combinação do método de coloração de May-Gruenwald-Giemsa). Os núcleos das células ficam corados com as cores básicas (da tiazina) e os elementos citoplasmáticos com as cores ácidas (da eosina) (46).

5.5. ALGUMAS PATOLOGIAS ASSOCIADAS À LINHAGEM ERITROIDE

A patologia mais frequente relacionada com os eritrócitos é a anemia, sendo esta definida como a redução da concentração de hemoglobina no sangue, tendo em conta a idade, sexo, etnia e altitude. A classificação das anemias é feita com base em dois critérios:

- Origem e mecanismo fisiopatológico da anemia;
- Tamanho e quantidade de hemoglobina nos eritrócitos (31,41).

As anemias são assim, a partir do valor de VCM e de HCM, classificadas em microcíticas, normocíticas ou macrocíticas, hipocrômicas e normocrômicas (Tabela 8).

Caso Clínico de indivíduo com macrocitose e trombocitopenia

Homem de 59 anos cujo hemograma apresenta um valor de MCV indicativo de Macrocitose, e uma contagem de plaquetas abaixo do valor de referência (figura 48). Foi solicitado pelo clínico que fossem analisados outros parâmetros (apresentados na Tabela 10). Numa observação aos resultados obtidos, destaca-se um aumento de GGT, o que justifica a macrocitose, devido a um possível caso de alcoolismo, visto que esta enzima é induzida pela ingestão de álcool. Foi observado o esfregaço de sangue periférico, o qual não revelou a presença de agregados plaquetários, o que confirma a trombocitopenia detetada através do hemograma.

CBC			Limites
WBC	5.8		4.0-10.0
RBC	2.82	B	4.50-5.50
HGB	10.0	B	13.0-17.0
HCT	30.6	B	40.0-50.0
MCV	108	A	83-101
MCH	35.4	A	27.0-33.0
MCHC	32.7		32.0-36.0
RDW	10.7	b	11.0-16.0
PLT	54	B	150-410
MPV	10.5		6.0-11.0
PCT	0.057	b	0.150-0.500
PDW	22.0	A	11.0-18.0

Figura 48 - Hemograma com macrocitose e trombocitopenia.

Tabela 10 - Determinação de parâmetros para confirmação de macrocitose.

Parâmetro	Valor obtido	Valor de referência
Fosfatase Alcalina	95	45-129
GGT	201	73
ALT	50	<34

Caso Clínico de Anemia Microcítica Hipocrômica

Mulher de 46 anos em que no Hemograma os valores de MCV e MCH são indicativos de Anemia Microcítica Hipocrômica (Figura 49). Também foram analisados outros parâmetros cujos resultados estão apresentados na tabela II. Numa análise aos resultados obtidos verifica-se que à exceção da CFFT, todos os outros parâmetros estão diminuídos o que é sugestivo de anemia ferropénica. A observação do esfregaço de sangue periférico revelou a presença de células em charuto, o que confirma que esta anemia é devido a deficiência de ferro.

CBC			Limites	Unidades
WBC	7.0	!	4.0-10.0	10 ³ /mm ³
RBC	4.40		3.80-4.80	10 ⁶ /mm ³
HGB	8.7	B	12.0-15.0	g/dL
HCT	28.4	B	36.0-46.0	%
MCV	65	B	83-101	µm ³
MCH	19.8	B	27.0-33.0	pg
MCHC	30.6	B	32.0-36.0	g/dL
RDW	22.8	A	11.0-14.0	%
PLT	326		150-410	10 ³ /mm ³
MPV	9.9		6.0-11.0	µm ³
PCT	0.322		0.150-0.500	%
PDW	--		11.0-18.0	%

Figura 49 - Determinação de Parâmetros para confirmação de anemia ferropénica.

Tabela II - Determinação de parâmetros para confirmação de anemia ferropénica.

Parâmetro	Valor obtido	Valor de referência
Ferro sérico	16	50-170
CFFT	448	250-450
Ferritina	3	10-281
Acido Fólico	4,78	>5,38

Caso Clínico de indivíduo com Anemia Normocítica e Normocrômica

Homem de 83 anos. Os valores de MCV e de MCH indicam anemia Normocítica e Normocrômica (figura 50). Foram determinados outros parâmetros cujos resultados estão apresentados na tabela 12. O valor de ferro baixo acompanhado de ferritina dentro dos valores de referência, o que em conjunto com o aumento de

CBC			Limites	Unidades
WBC	4.3		4.0-10.0	10 ³ /mm ³
RBC	3.02	B	4.50-5.50	10 ⁶ /mm ³
HGB	9.6	B	13.0-17.0	g/dL
HCT	27.9	B	40.0-50.0	%
MCV	92		83-101	µm ³
MCH	31.8		27.0-33.0	pg
MCHC	34.5		32.0-36.0	g/dL
RDW	16.4	a	11.0-16.0	%
PLT	187		150-410	10 ³ /mm ³
MPV	6.7		6.0-11.0	µm ³
PCT	0.125	b	0.150-0.500	%
PDW	11.0		11.0-18.0	%

Figura 50 - Hemograma com anemia normocítica e normocrômica.

imunoglobulina A é sugestivos de doença inflamatória crónica ou de tumor maligno.

A observação do esfregaço de sangue periférico revelou a presença de fenómeno de *rouleaux* (agrupamento dos eritrócitos em forma de pilhas de moedas), que está associado a

processos inflamatórios. Desconhece-se se o indivíduo está sujeito a algum tipo de terapêutica e não foi solicitado pelo clínico outros parâmetros tais como transaminases que possam esclarecer o aumento de Imunoglobulina A, devido a uma possível cirrose, PCR e VS que surgem aumentados em situações inflamatórias, podendo confirmar a existência de roulaux eritrocitário e conseqüentemente a anemia por doença inflamatória crônica.

Tabela 12 - Determinação de parâmetros para confirmação de anemia por doença inflamatória crônica.

Parâmetro	Valor obtido	Valor de referência
Ferro	48	22-322
Ácido Fólico	3.16	> 5,38
Ferritina	88	22-322
Imunoglobulina A	3999	70-400

5.6 ALGUMAS PATOLOGIAS ASSOCIADAS A ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE LEUCÓCITOS

O estudo da série branca permite evidenciar estados infecciosos e leucêmicos que, com os dados do exame clínico, auxiliam o médico tanto no diagnóstico como na orientação terapêutica. Para interpretar as alterações que ocorrem nos valores e nas proporções entre os diferentes tipos de leucócitos, deve relacionar-se a função específica de cada tipo de célula com as possíveis causas do seu aumento ou diminuição (Tabela 13) (31).

Tabela 13 - Patologias associadas a alterações no número de leucócitos.

Células	Alteração	Causas associadas
Neutrófilos	Neutrocitose	Infeção bacteriana, dano tecidual, doenças metabólicas, neoplasia hemorragia ou hemólise aguda, fármacos, doenças mieloproliferativas, tratamento com fatores de crescimento mieloide.
	Neutropenia	Congénita: Ex.: Síndrome de Kostman, neutropenia cíclica. Adquirida: drogas, infeção viral e bacteriana.
Eosinófilos	Eosinofilia	Alergia, parasitas, reações a fármacos, recuperação de doença aguda, infeção da pele, linfoma de Hodgkin e outros tumores malignos, poliartrite nodosa, tumores metastáticos com necrose tumoral.
	Eosinopenia	Infeções agudas com neutrofilias acentuadas.
Basófilos	Basofilia	Infeções (varicela, varíola, sinusite crónica), doença endócrina, estados alérgicos, LMC, carcinoma pulmonar.
	Basopenia	Infeções agudas com neutrofilias acentuadas, uso de corticoides, tratamento com hormonas da tiroide.
Linfócitos	Linfocitose	Infeções virais, hipersensibilidade a fármacos, doenças endócrinas, leucemia linfoblástica crónica, leucemia linfoblástica aguda.
	Linfocitopénia	Falência medular grave, doença de Hodgkin, imunossuppressores, radioterapia, HIV.
Monócitos	Monócitose	Infeção bacteriana crónica, infeção por protozoários, neutropenia crónica, doença de Hdgkin, e outros tumores malignos.
	Monócitopénia	Anemia aplástica, Lucemia linfoide crónica, leucemia das células cabeludas, HIV, terapia com corticoides.

Os fatores de coagulação são denominados em numeração romana, e, quando ativados, esta numeração é acompanhada da letra “a”. Alguns necessitam de vitamina K para a sua produção.

Tabela 14 - Fatores de coagulação (31).

Fator	Nome descritivo	Vida média	Sistema de Atuação	Local de Produção
I	Fibrinogénio	36-90 Horas	Intrínseco e Extrínseco	Fígado
II	Protrombina	60-70 Horas	Intrínseco e Extrínseco	Fígado Dependente de Vitamina K
III	Factor tecidual		Extrínseco	Vários tecidos
IV	Cálcio		Intrínseco e Extrínseco	
V	Proacelerina	12-36 Horas	Intrínseco e Extrínseco	Fígado
VII	Proconvertina	7 Horas	Extrínseco	Fígado Dependente de Vitamina K
VIII	Factor anti-hemofílico A	10-12 Horas	Intrínseco	Vários tecidos
IX	Factor anti-hemofílico B	24 Horas	Intrínseco	Fígado Dependente de Vitamina K
X	Factor Stuart-Prower	48 Horas	Intrínseco e Extrínseco	Fígado Dependente de Vitamina K
XI	Factor anti-hemofílico C	60 Horas	Intrínseco	
XII	Factor Hageman ou contacto		Intrínseco	
XIII	Fator estabilizante de Fibrina	3-4 Dias	Intrínseco e extrínseco	Fígado

Uma coagulação descontrolada de sangue leva a que ocorra a oclusão dos vasos sanguíneos (trombose), sendo importante a existência de mecanismos de proteção, como a inibição dos fatores coagulantes, através de fatores anticoagulantes (Tabela 15).

Tabela 15 - Fatores anticoagulantes (31).

Anticoagulantes	Ação	Local de síntese
Ínibidor do Fator Tecidual (TFPI)	Inibe os fatores Xa, VIIa e o TF	Fígado e endotélio
Antitrombina	Inativa as serina proteases	Fígado
α_2 -macroglobulina	Inibem as serinas	
α_2 -antiplasmina		
α_1 -antitripsina		
Proteína C	Inibem os cofatores da coagulação Va e VIIa	Fígado e endotélio
Proteína S		

Em torno da região lesada, o fluxo sanguíneo é responsável pela diminuição e dispersão dos fatores de coagulação ativados, sendo estes destruídos pelas células do parênquima hepático, e removidos pelas células de *Kupffer* (31).

A fibrinólise consiste na remoção do excesso de fibrina de modo a não comprometer o normal fluxo de sanguíneo. O plasminogénio (pró-enzima β -globulina) no sangue e fluido tecidual é convertido a plasmina (serina protéase), por ativação da parede vascular (ativação intrínseca) ou dos tecidos (ativação extrínseca) (31).

O Ativador Tecidual de plasminogénio (TPA) é uma serina protéase que se liga à fibrina, aumentando a capacidade de conversão do plasminogénio ligado ao trombo em plasmina. Esta conversão também é facilitada pela uroquinase ou Ativador Plasminogénio Urinário (UPA). A formação de plasmina nos locais de lesão limita a extensão do trombo em formação e tem a capacidade de degradar a fibrina (31). A plasmina circulante é inativada pela α_2 -antiplasmina e α_2 -macroglobulina, enquanto a formação de plasmina pode ser inibida por ação do Inibidor de Plasminogénio (PAI -I), que inativa o TPA (31).

A avaliação laboratorial da hemostase consiste em testes que não só permitem avaliar a eficácia da via extrínseca e intrínseca da coagulação, e da conversão de fibrinogénio em fibrina, como também permitem a monitorização da terapêutica com anticoagulantes.

No Hemobiolab os testes realizados são: tempo de protrombina (TP), tempo de trombolastina parcial ativado (PTTa) e a quantificação de fibrinogénio.

5.7.1. TEMPO DE PROTROMBINA

O TP mede o tempo de coagulação (formação do coágulo de fibrina) após a adição de concentrações ótimas de cálcio (CaCl_2) e de tromboplastina (fator tecidual e fosfolípidos). Este teste avalia a eficácia global da via extrínseca da coagulação e está dependente dos fatores II (protrombina), V, VII e X e da concentração de fibrinogénio no plasma (39). O TP depende da tromboplastina usada em laboratório, e como tal foi desenvolvido o índice internacional normalizado (I.N.R. do inglês “international normalized ratio”) por forma a internacionalizar-se este teste, através da seguinte fórmula:

$$\text{INR} = (\text{TP doente} / \text{TP controlo})^{\text{ISI}},$$

onde ISI representa o índice de sensibilidade internacional.

O INR foi introduzido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para padronizar o controlo do tratamento com anticoagulantes orais, sendo o ISI determinado comparando cada reagente com a tromboplastina padrão (OMS).

Pode encontrar-se este parâmetro aumentado em certas situações tais como: deficiência de vitamina K, doenças hepáticas, deficiências específicas na coagulação e em determinadas terapias anticoagulantes com varfarina (39).

5.7.2. TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADO

O TTPa ativado consiste na medição do tempo de formação do coágulo de fibrina após a cascata da coagulação ser ativada através da adição de um ativador de superfície (ácido elágico), fosfolípidos (tromboplastina parcial) e cálcio (CaCl_2). Este teste permite avaliar a eficácia global da via intrínseca da coagulação, uma vez que esta é ativada na ausência do fator tecidual e por uma superfície de contacto, e está dependente dos fatores II, V, VIII, IX e X e da concentração de fibrinogénio no plasma (39). A determinação do TTPa possibilita a monitorização de doentes sujeitos à terapia com heparina clássica (não fracionada), visto que se verifica o aumento dos valores com a sua administração (39). Os valores aumentados para o TTPa estão também associados a coagulação intravascular disseminada, doença hepática, presença de anticoagulantes circundantes (imunoglobulinas) e deficiência em fatores da coagulação para além do fator VII (39,47). Também se podem encontrar valores moderadamente elevados em doentes sujeitos a terapêutica com anticoagulantes orais e na deficiência em vitamina K. A determinação do TTPa é também útil na pesquisa do anticoagulante lúpico, um autoanticorpo com ação pro-trombótica no organismo que é responsável pela inibição da coagulação *in vitro* (39,47).

5.7.3. FIBRINIGÉNIO

A quantificação do fibrinogénio pode ser efetuada por dois métodos diferentes. O fibrinogénio derivado corresponde a uma estimativa fornecida pelo equipamento relativamente à concentração de fibrinogénio calculada a partir do TP. Este método tem menor exatidão na presença de determinadas condições patológicas e em doentes com tempos de coagulação prolongados, sendo utilizado o método de Clauss modificado para estes casos. Este método permite determinar o fibrinogénio, medindo-se o tempo de coagulação corrigido por adição de trombina em excesso, por forma a garantir que o tempo de coagulação seja independente da sua presença na amostra, e da diluição do plasma, de modo a evitar a interferência de inibidores da coagulação que possam estar presentes (produtos de degradação da fibrina e heparina) (31).

Baixas concentrações de fibrinogénio podem ser associadas a: deficiências congénitas e adquiridas, terapia com fibrinolíticos e à presença de produtos de degradação do fibrinogénio.

5.8. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

A velocidade de sedimentação (VS) é um parâmetro que permite caracterizar a velocidade a que os eritrócitos sedimentam no plasma sanguíneo, através da medição da altura do sedimento eritrocitário. Os valores obtidos são principalmente dependentes da concentração plasmática de proteínas de fase aguda, nomeadamente de fibrinogénio e de imunoglobulinas (42). Um aumento de VS está principalmente associado com a formação de *rouleaux* eritrocitário, fenómeno caracterizado pela agregação de eritrócitos e aumento da concentração plasmática de proteínas de fase aguda (31). O aumento destas proteínas é responsável pela diminuição das forças de repulsão entre os eritrócitos, conferidas pelas cargas negativas das membranas eritrocitárias (31). A determinação da VS é um teste inespecífico, uma vez que o seu aumento pode estar associado a diversas doenças inflamatórias sistémicas, incluindo doenças autoimunes como a artrite reumatoide e o lúpus eritematoso sistémico, nas quais se verifica um aumento das proteínas de fase aguda (31). Para além das doenças inflamatórias, a VS encontra-se aumentada na tuberculose, assim como em outras doenças infecciosas, no linfoma de Hodgkin, no mieloma múltiplo e em diversas neoplasias (31).

Fisiologicamente, as elevações da VS podem ser observadas na gravidez e com o aumento da idade.

A determinação da VS Permite, para além da monitorização da progressão de doenças inflamatórias, a do seu tratamento.

No Hemobiolab a determinação da VS é feita através do autoanalisador VES-MATIC 30 Plus (Figura 35), sendo os resultados expressos em mm/h, que são equivalentes aos calculados usando o método de Westergren.

Nos casos em que o equipamento é incapaz de efetuar uma leitura adequada devido a interferência das etiquetas dos tubos na leitura ótica ou de volume de amostra reduzido, a determinação da VS é feita manualmente, através do uso de um suporte com uma graduação específica para os tubos utilizados, e, de tubos graduados de *Westergren*, que requerem menor quantidade de amostra, respetivamente.

5.9. DETERMINAÇÃO DE HEMOGLOBINAS ESPECÍFICAS

A hemoglobina humana é formada por dois pares de cadeias proteicas, cada uma delas ligada a um grupo heme. No início da fase embrionária, as principais cadeias de globina da fase adulta não são expressas, sendo produzidas as hemoglobinas transitórias Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Portland ($\zeta_2\gamma_2$) e, posteriormente, a Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$), após a ativação da expressão da α -globina. No feto, a forma predominante é a Hb F ($\alpha_2\gamma_2$), mantendo-se até cerca de 3-6 meses após o nascimento, em que a expressão da γ -globina é substituída pela δ -globina e depois pela β -globina para a síntese da Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e da Hb A ($\alpha_2\beta_2$), respetivamente (31).

A determinação de hemoglobinas específicas é útil nos casos em que se suspeita de uma hemoglobinopatia, que pode estar associada à síntese das cadeias de globina numa extensão inferior às que são necessárias (talassemias) ou à expressão de variantes estruturais de Hb A devido a mutações nos genes das globinas.

5.9.1. HEMOGLOBINA A1c

Parâmetro discutido em 4.9.3.

5.9.2. HEMOGLOBINA A2 E HEMOGLOBINA F

Em condições normais, a Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e a Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) são expressas em quantidades muito reduzidas nos adultos e em crianças após os 6-12 meses. O aumento da produção destas hemoglobinas é normalmente detetado nas β -talassemias e está associado a um mecanismo destinado a evitar a acumulação de cadeias α resultante do défice na síntese das β -globinas necessárias à produção da Hb A (31). Nas α -talassemias o défice na síntese das α -globinas afeta também a produção da Hb A₂ e da Hb F, o que leva a uma diminuição destas hemoglobinas. Assim sendo, a determinação da Hb A₂ e da Hb F é importante para avaliar as β -talassemias, que são classificadas em menor (traço β -talassémico), intermédia e maior, de acordo com a severidade da doença e os defeitos genéticos primários envolvidos. As

manifestações clínicas são variáveis, e podendo verificar-se uma anemia ligeira assintomática a anemia hemolítica severa dependente das transfusões, e surgem como consequência da inadequada produção de hemoglobina (anemia microcítica hipocrômica) e da acumulação desequilibrada das α -globinas (eritropoiese ineficaz com hemólise e aumento do número de reticulócitos e eritroblastos) (31). O aumento mais significativo da Hb F é normalmente observado nas formas mais graves de β -talassémia, visto que a síntese das cadeias γ favorece a eliminação do excesso de α -globinas, embora esteja dependente da capacidade do organismo em sintetizar estas cadeias (31). Nas formas mais ligeiras de β -talassémia, os níveis de Hb F estão normalmente dentro dos limites de referência ou ligeiramente aumentados (31).

5.9.3. HEMOGLOBINA S

A Hb S é a variante estrutural resultante de mutações nos genes das globinas mais comum. A sua produção está associada a mutações que provocam a substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 das β -globinas (31). A Hb S tem baixa solubilidade na presença de baixas pressões de oxigénio, podendo polimerizar no interior dos eritrócitos e originar alterações morfológicas em que as células assumem a forma de foice (drepanócitos). A formação de polímeros resulta ainda em alterações da membrana celular, na produção de substâncias oxidantes e adesão anormal dos eritrócitos ao endotélio vascular (39).

A Hb S está associada às síndromes falciformes, que ocorrem em dois genótipos diferentes. A doença homocigótica (genótipo Hb SS) é designada por anemia falciforme e origina anemia moderada resultante tanto da hemólise como da afinidade diminuída da Hb S para o oxigénio. O principal aspeto clínico da anemia falciforme surge através da oclusão vascular pelas células em foice e resulta em crises agudas com eventual lesão dos órgãos afetados. Na anemia falciforme a Hb A não é detetável e a Hb F é variável (5-15%) de acordo com a severidade da doença (quantidades maiores são detetadas em doença menos severa) (31).

A doença heterocigótica (genótipo Hb AS), designada por traço falciforme, é benigna e não demonstra anormalidades hematológicas, embora em condições de baixa pressão de oxigénio (altitudes elevadas) haja a deformação dos eritrócitos que assumem a forma de drepanócitos, com o desenvolvimento das complicações associadas (31,39). No traço de células falciformes a Hb S varia entre 25 a 45% da hemoglobina total (31).

5.10. GRUPO SANGUÍNEO - SISTEMA ABO E RHESUS

Na superfície dos eritrócitos encontram-se proteínas que funcionam como antígenos (Ags), usados para classificar os grupos sanguíneos através dos sistemas ABO e Rhesus (Rh) considerados como sendo os mais comuns. A sua determinação tem interesse no estudo de histocompatibilidade aplicado às transfusões, transplantes e gravidez (49).

O sistema ABO consiste em três genes alelos: A, B e O, sendo a sua classificação feita com base na determinação dos antígenos A e B nos eritrócitos, que correspondem a anticorpos naturais (aglutininas naturais). Os Ags A e B podem aparecer isolados ou juntos e definem os tipos de sangue: tipo A (antígeno A), tipo B (antígeno B), tipo AB (antígeno A+B) e tipo O (ausência de antígeno A e B) (49).

O grupo sanguíneo Rh é composto por dois genes, RhD e RhCE, que codificam proteínas de membrana que têm os Ags D, C e e. O Ag D é o que possui maior importância na patologia clínica. O gene RhD pode estar presente ou ausente, o que origina os fenótipos Rh D+ e Rh D-, respetivamente (31).

A técnica utilizada para a determinação do grupo ABO/D combina os princípios de aglutinação e filtração em microtubos de gel impregnados com o reagente específico do Ag eritrocitário a determinar. Para cada amostra são utilizados quatro microtubos: A, B, D (Rh) e Ctl (controlo). No poço de cada microtubo é colocada uma suspensão de glóbulos vermelhos, sendo esta imediatamente centrifugada. Os glóbulos vermelhos não aglutinados concentram-se no fundo do microtubo, enquanto os aglutinados são retidos na coluna de gel (tabela 16 e 17). A sua posição no gel determina a intensidade da reação (Figura 52) (30).

Tabela 16 - Interpretação do grupo AB0.

Microtubo A	Microtubo B		Grupo AB0
Sem aglutinação	Sem aglutinação		0
Com aglutinação	Sem aglutinação	Sem aglutinação	A
Sem aglutinação	Com aglutinação	Sem aglutinação	B
Com aglutinação	Com aglutinação	Sem aglutinação	AB

Tabela 17 - Interpretação do grupo Rh.

Microtubo D	Microtubo Ctl	Grupo Rh
Com aglutinação	Sem aglutinação	Positivo
Sem aglutinação	Sem aglutinação	Negativo

Caso de indivíduos com grupo sanguíneo A/Rh+

Analisando os microtubos, verifica-se que houve aglutinação dos glóbulos vermelhos no microtubo A ao contrário do que aconteceu no microtubo B, o que permite identificar no grupo AB0, ambas as situações como sendo do grupo A. Nos microtubos D ocorreu aglutinação o que não aconteceu no microtubo Ctl, o que permite no grupo Rh, identificar as situações como sendo positivas (Figura 52).

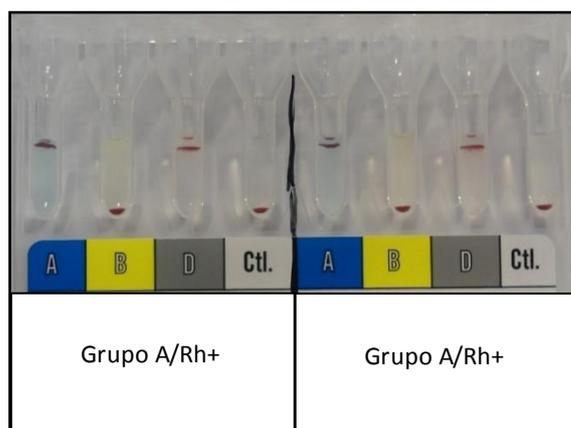


Figura 52 - Indivíduos com grupo sanguíneo A/Rh+.

5.1.1. CONTROLO DE QUALIDADE EM HEMATOLOGIA.

Antes de qualquer processo analítico ser iniciado, é realizado diariamente o CQI. Nos contadores de células são usados três níveis de controlo (patológico baixo, normal e patológico alto), sendo usado apenas um nível de controlo para os reticulócitos, o que é feito em apenas um dos equipamentos. Para a determinação de hemoglobinas (Hb A_{1c}, Hb A₂, Hb F) em ambos os equipamentos, e para avaliar a velocidade de sedimentação, também nos dois aparelhos, são usados dois níveis de controlo (normal e patológico), assim como nos analisadores usados para as provas de coagulação.

A análise da qualidade das amostras também tem um papel importante, devendo-se verificar se há presença de coágulos visto que estes podem alterar vários parâmetros, nomeadamente as contagens celulares, assim como o nível do volume de amostra, particularmente para as provas de coagulação, dado que a quantidade de amostra e de anticoagulante devem estar numa determinada proporção.

CONCLUSÃO

Considero que a realização do meu estágio descrito neste relatório, em conjunto com o restante plano de estudos do Mestrado, ser uma mais-valia para a aquisição de competências tanto teóricas como práticas dentro da área das análises clínicas. O contato com a rotina laboratorial e com os profissionais de saúde responsáveis pelos serviços contribuiu para um melhor entendimento da realidade associada ao laboratório clínico, assim como a aquisição de conhecimentos a nível dos princípios dos métodos analíticos, dos equipamentos utilizados nos ensaios, da interpretação de dados laboratoriais e dos procedimentos empregados para garantir a qualidade dos serviços prestados.

Como Farmacêutica, este estágio permitiu-me ter um contato com um mundo completamente diferente daquele que eu já tinha experienciado dentro das áreas de atividade farmacêutica, o que foi para mim uma experiência muito enriquecedora e que deu ainda mais valor ao facto de eu ter realizado este mestrado.

BIBLIOGRAFIA

1. Guia das Boas Práticas Laboratoriais. In Despacho n.º 8835/2001 (2.ª série).
2. Cooper G., Choosing a Quality Control Product. In Basic Lessons in Laboratory Quality Control, Bio-Rad Laboratories, Inc. Quality Systems Division (2011), pp 42-44.
3. Cooper G., Levey-Jennings and Westgard Rules. In Basic Lessons in Laboratory Quality Control, Bio-Rad Laboratories, Inc. Quality Systems Division (2011), pp 20-28.
4. Euromedic- Manual de Boas Práticas Laboratoriais.
5. Rifai N., Warnick G.R., Remaley A. T., Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Others Cardiovascular Risk Factors. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 402-430.
6. Apple F. S., Jaffe A. S.; Doença Cardiovascular Tietz fundamentos de Bioquímica Clínica, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 413-441.
7. Kaplan J. M., First M.R., Renal Function in Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds) Clinical chemistry: theory Analysis correlation, Mosby Elsevier, 5th edition (2010), Vitalbook file, p 567-585.
8. Delaney, M. P.; Price, C. P.; Lamb, E. J. Kidney Function and Disease. In: Burtis, C.A.; Ashwood, E. R.; Bruns, D. E. (Ed.) Tietz. Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th. Ed (2008), pp 631-654.
9. Lamb E.J., Price C.P., Creatinine, Urea and Uric Acid. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (eds) Tietz fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Edition (2008), pp 363-372.
10. Frank E.L., Nonprotein Nitrogen Compounds. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) Clinical chemistry: Techniques, Principles, correlation, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6th edition (2010), pp266-280.
11. Almeida L. M. Avaliação da função renal, Coimbra 2015.
12. Freeman V.S., Carbohydrates, in Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) Clinical Chemistry: Techniques, principles, Correlations, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6th edition (2010), pp 309-327.
13. Saks D.B., Carbohydrates. In Burtis, Ca., Ashwood, E.R., Bruns, D.E (Eds) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed (2008), pp 373-401.

14. Chiasera J. M., Xu, X., Liver function in Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) Clinical Chemistry: Tecniques, principles, Correlations, Lippincott Wiliam & Wilkins, Philadelphia, 6th edition (2010), pp 516-540.
15. Lynch K.L., Wu A.H., Renal function. In Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) Clinical Chemistry: Tecniques, principles, Correlations, Lippincott Wiliam & Wilkins, Philadelphia, 6th edition (2010), pp 557-577.
16. Kaplan L., Pesce A., Classifications and Descriptions of Proteins, Lipids, and Carbohydrates. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation, Mosby Elsevier, 5th edition (2010), VitalBook file, pp 507-526.
17. Tymchak L., Amino Acids and Proteins. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6th edition (2010), pp 223-264.
18. Roberts, W.L., McMillin G.A., Burtis C.A., Bruns, D.E. (Eds.) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 858-893.
19. Klinberg S., Serum Protein Electrophoresis. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., Clinical References - Methods of Analysis, 5th edition, Elsevier Evolve.
20. Silva R., Lopes A. Seric proteins electrophoresis: clinical interpretation and correlation, Revista Médica de Minas Gerais 18 (2008) pp 116-122.
21. Dufour R., The Liver: Fuction and Chemical Pathology. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation, Mosby Elsevier, 5th edition (2010), VitalBook file, pp 586-600.
22. Panteghini, M., Bais, R., Enzymes. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 317-336.
23. Dufour R., The Pancreas: Function and Chemical Pathology. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds.) Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation, Mosby Elsevier, 5th edition (2010), VitalBook file, pp 651-662.
24. Ming J., Lipase. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., Clinical References - Methods of Analysis, 5th edition, Elsevier Evolve ano (2010).
25. Johnson-Davis K., McMillin G.A., Enzymes. In Bishop, M. L., Fody, E.P., Schoeff, L. E., (Eds) Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 6th edition (2010), pp 281-308.
26. Diagnóstico e classificação da Diabetes Mellitus, in Norma da Direção Geral de Saúde nº 002/2011.

27. Sacks D. B., Path F.R.C, Tietz, Carbohidratos, Fundamentos de Química Clínica, Saunders, Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed (2008) pp 383-399.
28. Dods R.F., Diabetes Mellitus. In Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Eds) Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation, Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri, 5th edition (2010), pp 729-754.
29. Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c, in Norma da Direção Geral de Saúde N° 033/2011.
30. Nathan, D. M.; Turgeon, H, Regan, S. - Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. Diabetologia. 50:11 (2007) 2239– 2244. doi: 10.1007/s00125-007-0803-0.
31. Hoffbrand A. V.; Moss P. A.H., Fundamentos em Hematologia. 6° Ed., Porto Alegre, Artmed, (2016). ISBN 978-85-65852-30-2.
32. Higging T., Beutler E., Doumas B., Hemoglobim, Iron in Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds) Tietz Fundamentals os clinical Chemistry, Saunders, Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008) pp 516-520.
33. Siemens, Advia 1800 sistema de Bioquímica Clínica., Guia do operador, métodos.
34. Moura, J. M S P. Oxidação das lipoproteínas humanas de baixa densidade, inflamação e aterosclerose. Coimbra, 2010.
35. Horiba, Medical ABX Pentra PmL., Guia do utilizador, métodos.
36. Siemens, BCS., Guia do utilizador, métodos.
37. Diese, Ves-Matic-30 Plus., Guia do utilizador.
38. A. Menarini diagnostics, HA-8160., Guia do utilizador, métodos.
39. BAIN, B. J. ET AL – Dacie and Lewis Practical Haematology. 11^a Ed., London, Churchill Livingstone, 2011. ISBN: 978-0-7020-3408-4.
40. Thelml, H; Diem, H; Haferlach, T– Color Atlas of Hematology, Practical Microscopic and Clinical Diagnosis. 2^a Ed., New York, Thieme, 2004. ISBN 1-58890-193-9.
41. Oliveira, R- Hemograma, como fazer e interpretar. 1^a Ed. LPM Editora, 2007. ISBN 978-85-99305-14-0.
42. Greer, J. P. ET AL. - Wintrobe's Clinical Hematology, Volume I. 13^a Ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2014. ISBN 978-1-4511-7268-3.
43. Stasi, R. – How to approach thrombocytopenia. Hematology ASH Education Program (2012) 191-197.
44. Bleeker, J. S.; J. Hogan, W. J. - Thrombocytosis: Diagnostic Evaluation, Thrombotic Risk Stratification, and Risk-Based Management Strategies. Thrombosis 2011 (2011) 1-16.
45. George, T. I. – Malignant or benign leukocytosis. Hematology ASH Education Program

(2012) 475-484.

46. www.infopedia.pt/dicionarios/termos-medicos/Pappenheim

47. Kamal, A. H.; Tefferi, A.; Pruthi, R. K. – How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. *Mayo Clin Proc* 82 (2007) 864-873.

48. Gallagher, E. J.; Le Roith, D.; Bloomgarden, Z. - Review of hemoglobin A_{1c} in the management of diabetes. *Journal of Diabetes I* (2009) 9-17.

49. Lorenzi, T., - *Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica*. 4ª Ed. Guanabara Koogan, 2006. ISBN 078-85-277-1791-5.

ANEXOS

ANEXO I. TÉCNICA PARA REALIZAÇÃO DE ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO

- 1 – Recorre-se a uma lâmina devidamente limpa e uma lamela ou lâmina com os cantos arredondados, para permitir uma melhor distribuição da amostra pela lâmina.
- 2 – Coloca-se, cuidadosamente, uma pequena gota de sangue (cerca de 10 µl) no eixo central da lâmina a cerca de 1 cm de uma das suas extremidades.
- 3 – Coloca-se a extremidade da lamela ou da segunda lâmina em contacto com a primeira lâmina, que deve estar apoiada numa superfície horizontal, um pouco à frente da gota de sangue, criando um ângulo de 45° entre as duas.
- 4 – Faz-se retroceder a lâmina ou lamela até que entre em contacto com a gota de sangue e este flua rapidamente por todo o comprimento da zona de contacto entre as duas lâminas (ou lâmina e lamela).
- 5 – Apoiando a lamela ou segunda lâmina sobre a lâmina horizontal com um ângulo de cerca de 45°, faz-se avançar esta rapidamente ao longo de todo o comprimento da lâmina horizontal.
- 6 – O esfregaço seca rapidamente ao ar, procedendo-se seguidamente à coloração do mesmo.