



Mónica Isabel Nunes dos Santos

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo
Dr. Frederico Valido e pela Professora Doutora Teresa Dinis e apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Mónica Isabel Nunes dos Santos

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas
apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Estágio Curricular decorrido no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de
Oncologia de Coimbra Francisco Gentil E.P.E., realizado entre dezembro de 2017 e maio de
2018, com uma abordagem clínica às áreas de Hematologia e de Imunologia e Hormonologia

Orientador Externo: Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido

Orientador Interno: Professora Doutora Teresa Dinis Silva

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.*

*Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.*

*Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Odes de Ricardo Reis (Heterónimo de Fernando Pessoa)

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de fazer um agradecimento especial ao Dr. Frederico Valido, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil E.P.E., pela oportunidade que me concedeu em realizar o estágio curricular integrando-me no seu grupo de trabalho, assim como a sua simpatia e toda a ajuda disponibilizada.

Um especial agradecimento a todos os Técnicos Superiores, meus co-orientadores, dos diferentes setores que constituem o Serviço de Patologia Clínica, por todo o conhecimento teórico e prático que me transmitiram.

De realçar o papel fundamental da Dr.^a Ana Paiva, Médica Especialista e do Dr. Jorge Reis, Técnico Superior do setor de Hematologia, e do Dr. Nuno Cunha, Técnico Superior do Setor de Imunologia e Hormonologia, cuja ajuda foi fundamental para a realização deste relatório bem como toda a sua disponibilidade, conhecimentos transmitidos, conselhos profissionais e pessoais.

À Professora Doutora Teresa Dinis, por toda a orientação, apoio e disponibilidade prestados ao longo de todo o estágio.

Aos Meus Pais por todo o apoio incondicional, compreensão, amor, por acreditarem na minha capacidade e me deixarem “correr” atrás dos meus sonhos. Sem eles não seria possível vencer mais uma grande batalha da minha vida.

À minha restante Família por sempre me motivarem e acreditarem em todo o meu potencial.

Ao Meu Namorado, por todo o carinho, que sempre me motivou e nunca me deixou desistir.

Por fim, gostaria de agradecer a todos os Meus Amigos, por todo o apoio, compreensão, ternura e amizade que nunca irei esquecer.

Índice Geral

Índice de Figuras	VII
Índice de Tabelas	XI
Abreviaturas e Convenções	XIII
Resumo	XIX
<i>Abstract</i>	XXI
1. Introdução	I
2. Caracterização do laboratório de Análises Clínicas	2
2.1. Setor de Hematologia	2
2.2. Setor de Microbiologia	3
2.3. Setor de Química Clínica	5
2.4. Setor de Imunologia e Hormonologia	6
3. Controlo de qualidade	7
3.1. Fases analíticas	7
3.2. Controlo de Qualidade Interno	8
3.3. Controlo de Qualidade Externo	9
4. Atividades desenvolvidas	10
4.1. Setor de Hematologia	10
4.1.1. Amostras biológicas	10
4.1.2. Hemograma e parâmetros associados	11
4.1.3. Esfregaço de sangue periférico	20
4.1.4. Velocidade de sedimentação globular	20
4.1.5. Hemostase	21
4.1.5.1. Avaliação laboratorial da hemostase	24
4.1.6. Técnicas de biologia molecular	27
4.1.7. Estudos de fenotipagem celular	28
4.2. Setor de Imunologia e Hormonologia	30
4.2.1. Amostras biológicas	30
4.2.2. Técnicas imunoquímicas	30
4.2.3. Marcadores tumorais	36
4.2.3.1. Antígenos oncofetais	38
4.2.3.2. Enzimas	39
4.2.3.3. Glicoproteínas	40

4.2.4. Proteínas plasmáticas	41
4.2.4.1. Interpretação das principais alterações verificadas no proteínoograma	42
5. Conclusão	53
6. Bibliografia	55
Anexos	XXIII

Índice de Figuras

Figura 1: Princípio de <i>Coulter</i> ou da Impedancia eléctrica utilizado no autoanalisador <i>Coulter</i> [®] LH 750.	12
Figura 2: Gráfico tridimensional obtido pela dispersão da luz para efetuar a contagem diferencial dos glóbulos brancos, no qual o eixo XX' representa a complexidade celular (SS) e o eixo YY' o volume da célula (FS).	13
Figura 3: Algumas alterações da série vermelha com associação a patologias hematopoiéticas.	16
Figura 4: Representação esquemática dos complexos procoagulantes. Após uma lesão vascular existe a ligação do fator VIIa ao fator tecidual (FT), com consequente ativação dos fatores IX e X. O complexo fator IXa/VIIIa ativa o fator X que forma um complexo com o fator Va, convertendo o fator II (protrombina) a fator IIa (trombina).	23
Figura 5: Cálculo da razão internacional normalizada (INR), tendo por base a razão entre o tempo de protrombina (TP) do paciente e o TP controlo, elevado ao expoente do índice de sensibilidade internacional (ISI) da tromboplastina.	25
Figura 6: Esquema do funcionamento global de um citómetro de fluxo. O citómetro de fluxo representado na figura permite a deteção da dispersão da luz, pelos sensores FSC e SSC, e a deteção da emissão de fluorescência pelos sensores PMT. Esta informação é posteriormente transformada num sinal eletrónico e apresentado sob a forma de gráficos.	29
Figura 7: Representação esquemática de um ensaio competitivo. 1- Anticorpo específico presente na matriz sólida; 2- Adição da amostra (antigénio) seguida da adição de um antigénio análogo; 3- Competição entre o antigénio da amostra com o antigénio análogo pela ligação ao anticorpo; 4- Adição de um substrato específico do marcador utilizado na reação; 5- A intensidade da cor é inversamente proporcional à quantidade de antigénio em solução.	31
Figura 8: Representação esquemática de um ensaio não competitivo (indireto). 1- Anticorpo imobilizado na matriz sólida; 2- Adição da amostra (antigénio) liga-se ao anticorpo; 3- Adição do anticorpo secundário; 4- Adição do terceiro anticorpo conjugado com um marcador (enzima); 5- Adição do substrato específico da reação.	32

Figura 9: Representação esquemática de um ensaio eletroquimioluminescente não competitivo (exemplo de detecção da ciclosporina). Na primeira reação é adicionado o antigénio da amostra juntamente com um anticorpo biotilado e um anticorpo marcado com o complexo de ruténio. Na segunda reação ocorre a formação do imunocomplexo que se liga às microesferas revestidas com estreptavidina. Por fim, ocorrem reações de oxidação e redução gerando a emissão de luz pelo complexo de ruténio. 3(

Figura 10: Representação esquemática da tecnologia EMIT utilizada na monitorização de fármacos. É um ensaio que requer a presença do antigénio livre (fármaco da amostra), e de um fármaco ligado à enzima G6PDH e um anticorpo. Após a adição do substrato à reação existe a redução do NAD^+ a NADH, cuja absorvância é convertida na concentração do fármaco livre em solução. 35

Figura 11: Perfil eletroforético normal. **A-** Representação das diferentes frações identificadas no perfil eletroforético normal; **B-** Descrição detalhada das principais proteínas plasmáticas presentes em cada fração do perfil eletroforético. 42

Figura 12: Perfil eletroforético característico da síndrome nefrótica, no qual se observa um aumento da fração α_2 -globulina devido ao aumento da α_2 -macroglobulina. 44

Figura 13: Perfil eletroforético característico de cirrose hepática, com fusão da fração β com a fração γ , devido a uma aumento da produção da IgA. 45

Figura 14: Representação da estrutura de uma imunoglobulina 46

Figura 15: Perfil eletroforético característico de alterações na zona das γ -globulinas. **A-** Perfil típico de uma gamapatia monoclonal devido ao aumento homogéneo da fração γ -globulinas; **B-** Perfil eletroforético típico de uma agamaglobulinemia, isto é, uma redução das γ -globulinas. 47

Figura 16: Fluxograma das diferentes etapas realizadas para a execução da imunofixação, com a utilização de antisoros monoclonais específicos de cada antigénio presente na amostra. 48

Figura 17: **A1:** Perfil eletroforético das proteínas séricas sem alterações. **A2:** Separação eletroforética normal, obtida por imunofixação, revelando a presença de bandas policlonais. 49

- Figura 18: A1:** Perfil eletroforético das proteínas séricas com aumento da fração β_2 -globulinas. **A2:** Separação eletroforética, obtida por imunofixação, evidenciando a presença de uma banda monoclonal do tipo IgA *Kappa*. 49
- Figura 19: A1:** Perfil eletroforético de proteínas séricas com aumento da fração γ -globulinas. **A2:** Separação eletroforética, obtida por imunofixação. Presença de uma banda monoclonal do tipo IgM *Lambda*. 50
- Figura 20: A1:** Perfil eletroforético de proteínas séricas com aumento da fração γ -globulinas. **A2:** Separação eletroforética, obtida por imunofixação. Presença de uma banda monoclonal do tipo IgG *Lambda*. 50
- Figura 21:** Presença de cadeias leves livres *Kappa* com características de monoclonalidade na urina, observadas por imunofixação. Estas características monoclonais foram complementadas com a quantificação das cadeias *Kappa* e razão *Kappa/Lambda*. 51

Índice de Tabelas

<u>Tabela 1:</u> Equipamentos, amostra biológica e respetiva função	4
<u>Tabela 2:</u> Equipamentos, parâmetros analisados e respetivas técnicas de medida	6
<u>Tabela 3:</u> Parâmetros hematológicos e significado, seguido da unidade em que o resultado pode ser expresso	13
<u>Tabela 4:</u> Classificação do tipo de anemia com base nos parâmetros laboratoriais VCM e HCM, bem como as causas associadas	16
<u>Tabela 5:</u> Alterações hematológicas verificadas nas séries granulocítica e agranulocítica, com associação a várias patologias	18
<u>Tabela 6:</u> Patologias hemato-oncológicas associadas ao tipo de célula	19
<u>Tabela 7:</u> Distúrbios hemorrágicos e trombóticos (hereditários e adquiridos) associados a patologias da hemostase	24
<u>Tabela 8:</u> Neoplasias hematológicas mais observadas e expressão do CD que lhe é característico	29
<u>Tabela 9:</u> Parâmetros analíticos determinados pela tecnologia CLIA	33
<u>Tabela 10:</u> Parâmetros analíticos avaliados com base no princípio ECLIA	34

Abreviaturas e Convenções

- ACTH** - Hormona adrenocorticotrófica, do inglês “*Adrenocorticotropic hormone*”;
- ADP** - Adenosina difosfato;
- AFP** - α - fetoproteína;
- AL** - Anticoagulante lúpico;
- ALT**- Alanina aminotransferase;
- AND** - Delta-4-androstenediona;
- AnGap** - Hiato aniônico, do inglês “*Anion Gap*”;
- Anti-EA** - Anticorpos contra os antígenos precoces, do inglês “*Anti-early antigen*”;
- Anti-EBNA** - Anticorpo contra o antígeno nuclear (vírus *Epstein-Barr*), do inglês “*Anti-Epstein-Barr nuclear antigen*”;
- Anti-TG** - Anticorpos anti-tiroglobulina, do inglês “*Anti thyroglobulin antibodies*”;
- Anti-TPO** - Anticorpos anti-tiroperoxidase, do inglês “*Anti-thyroid peroxidase antibodies*”;
- aPTT** - Tempo de tromboplastina parcialmente ativada, do inglês “*Activated partial thromboplastin time*”;
- AST** - Aspartato aminotransferase;
- ATCC** - “*American Type Culture Collection*”;
- BCR** - Recetor célula B, do inglês “*B cell receptor*”;
- BCR-ABL** - Cromossoma de *Philadelphia*;
- BMG** - β 2-microglobulina;
- C3** - Unidade C3 do sistema do complemento;
- C4** - Unidade C4 do sistema do complemento;
- CA** - Antígeno de glicoproteínas, do inglês “*Carbohydrate antigen*”;
- CD** - “*Cluster of differentiation*”;
- CEA** - Antígeno carcinoembrionário, do inglês “*Carcinoembryonic antigen*”;
- Células NK** - “*Natural Killer Cell*”;
- CHCM** - Concentração da hemoglobina corpuscular média;
- CK** - Creatina-cinase, do inglês “*Creatine kinase*”;
- CLED** - “*Cystine lactose electrolyte deficiente*”;
- CLIA** - Ensaio de quimiluminescência, do inglês “*Chemiluminescence immunoassay*”;
- CNA** - “*Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood*”;
- COHb** - Carboxihemoglobina;
- COS** - “*Columbia agar + 5% sheep blood*”;

αCO₂ - Concentração de dióxido de carbono no plasma total;

DHEAS - Dehidroepiandrosterona-sulfato, do inglês “*Dehydroepiandrosterone sulfate*”;

DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês “*Deoxyribonucleic acid*”;

dRVVT - “*Dilute Russell’s viper venom time*”;

E2 - 17-beta-estradiol;

EARS-Net - “*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*”;

EBV - Vírus Epstein-Barr, do inglês “*Epstein-Barr virus*”;

EBV-VCA - Antígeno da capsíde viral (vírus Epstein-Barr), do inglês “*Epstein-Barr virus viral-capsid antigen*”;

ECLIA - Eletroquimioluminescência, do inglês “*Electrochemiluminescent immunoassay*”;

EDTA(K₃) - Ácido etilenodiaminotetracético (tripotássico), do inglês “*Ethylenediaminetetraacetic acid*”;

EMIT - Imunoensaio multiplicado por uma enzima, do inglês “*Enzyme multiplied immunoassay technique*”;

EPO - Eritropoietina;

F(ab')₂ - Fragmento das imunoglobulinas com capacidade de reconhecimento do antígeno;

Fc - Fragmento da região constante das imunoglobulinas;

FER - Ferritina;

FF - Fase folicular;

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra;

FITC - “*Fluorescein isothiocyanate*”;

FL - Fase lútea;

FS - Sensor na direção frontal, do inglês “*Forward Scatter*”;

FSH - Hormona estimulante do folículo, do inglês “*Follicle-stimulating hormone*”;

FvW - Fator de von Willebrand;

G6PDH - Glucose-6-fosfato-desidrogenase;

GAS - Gastrina;

G-CSF - Fator de estimulação das colónias de granulócitos, do inglês “*Granulocyte colony-stimulating factor*”;

GGT - Gama-glutamyltransferase;

GH - Hormona do crescimento, do inglês “*Growth hormone*”;

GM-CSF - Fator de estimulação de colónias de granulócitos e macrófagos, do inglês “*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*”;

Gp - Glicoproteína;

Hb - Hemoglobina;

- HbA1c** - Hemoglobina A1 glicada;
- hCG** - Gonadotrofina coriônica humana, do inglês “*Human chorionic gonadotrophin*”;
- HCM** - Hemoglobina corpuscular média;
- Hct** - Hematócrito;
- hCT** - Tirotropina coriônica humana, do inglês “*Human chorionic thyrotropin*”;
- HDL** - Lipoproteínas de alta densidade, do inglês “*High density lipoproteins*”;
- HE4** - Proteína 4 do epidídimo humano, do inglês “*Human epididymis protein 4*”;
- HHb** - Desoxihemoglobina;
- HMWK** - Quininogénio de alta massa molecular, do inglês “*High-molecular-mass kininogen*”;
- Ig** - Imunoglobulina;
- IGF-I** - Fator de crescimento da insulina tipo I, do inglês “*Insulin-like growth factor-I*”;
- INR** - Razão Internacional Normalizada, do inglês “*International Normalized Ratio*”;
- INSA** - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge;
- IPOCFG** - Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil;
- ISE** - Eléctrodo seletivo de iões, do inglês “*Ion-selective electrodes*”;
- ISI** - “*International Sensitivity Index*”;
- LCR** - Líquido cefalorraquídeo;
- LDH** - Lactato desidrogenase;
- LDL** - Lipoproteínas de baixa densidade, do inglês “*Low Density Lipoprotein*”;
- LH** - Hormona luteinizante, do inglês “*Luteinizing hormone*”;
- LLC** - Leucemia linfóide crónica;
- LMC** - Leucemia mielóide crónica;
- MetHb** - Metahemoglobina;
- MGUS** - Gamapatia monoclonal de significado indeterminado, do inglês “*Monoclonal gammopathy of unknown significance*”;
- MRSA** - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, do inglês “*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*”;
- MUCI** - Mucina-I;
- NAD** - Dinucleótido de adenina nicotinamida, do inglês “*Nicotinamide adenine dinucleotide*”;
- NSE** - Enolase neuro-específica, do inglês “*Neuron specific enolase*”;
- NT-próBNP** - N-terminal do peptídeo natriurético cerebral, do inglês “*N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*”;
- O₂Hb** - Oxihemoglobina;
- PC** - “*Phycoerythrin cyanine*”;
- PCR** - Reações em cadeia da polimerase, do inglês “*Polymerase chain reaction*”;

PE - “*Phycoerythrin*”;

PLT - Contagem total de plaquetas;

PM - Período pós-menopausa;

PNAEQ - Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade;

PO - Período peri-ovulatório;

PRGE - Progesterona;

PRL - Prolactina;

Pró-GRP - Peptídeo libertador da pró-gastrina, do inglês “*Pro-gastrin-releasing peptide*”;

PSA - Antígeno específico da próstata, do inglês “*Prostate specific antigen*”;

PTH - Paratormona intacta, do inglês “*Parathyroid hormone*”;

PVX - “*Chocolate agar PolyViteX*”;

RBC - Células sanguíneas vermelhas, do inglês “*Red blood cells*”;

RBP - Proteína de ligação ao retinol, do inglês “*Retinol binding protein*”;

RDW - Distribuição do tamanho dos eritrócitos, do inglês “*Red cell distribution width*”;

RIA - Radioimunoensaio, do inglês “*Radioimmunoassay*”;

RIQAS EQA - “*Randox International Quality Assessment Scheme, External Quality Assessment*”;

RNA - Ácido ribonucleico, do inglês “*Ribonucleic acid*”;

rpm - Rotações por minuto;

RUB - Vírus da rubéola;

SCC - Antígeno do carcinoma de células escamosas, do inglês “*Squamous cell carcinoma antigen*”;

SCT - “*Silica clotting time*”;

SS - Sensor na direção lateral, do inglês “*Side Scatter*”;

sTfR - Recetores solúveis da transferrina, do inglês “*Soluble transferrin receptor*”;

T3 - Triiodotironina;

T4 - Tiroxina;

TASO - Anti-estreptolisina O, do inglês “*Anti-streptolysin O*”;

TCR - Recetores de células T, do inglês “*T cell receptor*”;

TG - Tiroglobulina;

TIBC - Capacidade total de ligação do ferro, do inglês “*Total iron-binding capacity*”;

TNF - Fator de necrose tumoral, do inglês “*Tumor necrosis factor*”;

TOX - Toxoplasmose;

TP - Tempo de protrombina;

TPO - Trombopoietina;

TRAB´s - Anticorpos anti-recetores da hormona tirotrófica, do inglês “*Thyrotropin receptor antibodies*”;

TRACE - “*Time Resolved Amplified Cryptate Emission*”;

TSH - Hormona tirotrófica, do inglês “*Thyroid stimulating hormone*”;

TSI - Imunoglobulina estimulante da tiróide, do inglês “*Thyroid-stimulating immunoglobulins*”;

TT - Tempo de trombina;

TxA2 - Tromboxano A2;

UK NEQAS - “*United Kingdom National External Quality Assessement Service*”;

VCM - Volume corpuscular médio;

VDRL - “*Venereal Disease Research Laboratory*”;

VHS - Vírus do herpes simplex;

VIH - Vírus da imunodeficiência humana;

VPM - Volume plaquetário médio;

VSG - Velocidade de sedimentação globular;

WBC - Células sanguíneas brancas, do inglês “*White blood cells*”;

WFDC2 - “*WAP four-disulfide core domain 2*”.

Resumo

O presente relatório reporta o estágio curricular realizado no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil E.P.E. (IPOCFG), no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC).

Durante um período de seis meses tive a oportunidade de contactar diretamente com a rotina diária de um laboratório de Análises Clínicas e colocar em prática todos os conhecimentos adquiridos ao longo dos anos académicos.

Mais que uma experiência do foro educacional, este estágio permitiu-me ter uma visão da globalidade de todas as áreas clínicas na avaliação e monitorização dos doentes, bem como uma visão geral de toda a dinâmica laboratorial. Para além das competências profissionais adquiridas, foi também uma enorme aprendizagem pessoal no que respeito ao trabalho em equipa.

Ao longo deste estágio, foi-me possível ter contacto com a rotina laboratorial realizada nos setores de Hematologia, Microbiologia, Química Clínica e Imunologia e Hormonologia, assim como perceber a importante correlação laboratorial entre os demais setores na melhor resposta ao doente.

Devido à extensão e diversidade associada às análises clínicas apenas irei dar ênfase aos setores de Hematologia e de Imunologia e Hormonologia.

Palavras-chave: Serviço de Patologia Clínica; Laboratório de Análises Clínicas; Hematologia; Imunologia e Hormonologia.

Abstract

The present work represents an internship report of Clinical Pathology Department of the Francisco Gentil Portuguese Institute of Oncology at Coimbra E.P.E. (IPOCFG), in the context of the Master's degree Clinical Analysis in the Faculty of Pharmacy, University of Coimbra (FFUC).

During a period of six months I had the opportunity to directly contact with daily routine of a Clinical Analysis laboratory and put into practice all the knowledge acquired during academic years.

More than an educational experience, this internship allowed me to acquire an overview of all clinical areas in patient assessment and monitoring, as well as an overview of all laboratory dynamics. In addition to the acquired professional skills, it was also a great personal learning regarding teamwork.

Throughout this stage, I was able to contact with the laboratory routine performed in the Hematology, Microbiology, Clinical Chemistry and Immunology and Hormonology sectors, as well as to understand the important laboratory correlation among the other sectors in the best response to the patient.

Due to the extension and diversity associated with the clinical analyzes, I will only give emphasis to the Hematology and Immunology and Hormonology sectors.

Keywords: Clinical Pathology Department; Clinical Analysis laboratory; Hematology; Immunology and Hormonology.

I. Introdução

Ao longo da minha infância sempre me questioneei, como era possível com apenas um “tubo de sangue” descobrirem o que se passava dentro do meu organismo. Com base em apenas uma amostra conseguir distinguir o que é patológico ou saudável.

Anos mais tarde, e de forma a aprofundar a minha paixão pela área da saúde e de certa forma, também, desmistificar alguns “*pré-conceitos*” que fui criando ao longo do meu crescimento, iniciei os estudos em Bioquímica. Chegada ao fim da Licenciatura, decidi ingressar no Mestrado de Análises Clínicas, de forma a completar os meus estudos e seguir uma área mais direcionada, as Análises Clínicas, que sempre me fascinaram.

Ao longo do referido Mestrado foi-me possível desenvolver conhecimentos novos na temática das Análises Clínicas culminando com a realização do estágio curricular no IPOCFG.

A realização do estágio curricular teve uma duração total de seis meses, no qual me foi proposto colocar em prática todos os conhecimentos adquiridos ao longo dos dois anos passados, a integração numa equipa de profissionais, tomar contacto com a rotina diária de um laboratório e a obtenção de competências técnicas e profissionais.

Atualmente, o Serviço de Patologia Clínica representa um grande pilar complementar no diagnóstico clínico presuntivo de qualquer alteração do estado de saúde bem como na monitorização de terapêuticas e deteção de recidivas.

No IPOCFG, o Serviço de Patologia Clínica engloba quatro setores: a Hematologia, a Microbiologia, a Química Clínica e a Imunologia e Hormonologia. De forma a mostrar a grande importância das áreas laboratoriais irei destacar dois setores que considero fundamentais na monitorização e avaliação do estado do doente oncológico, a Hematologia e a Imunologia e Hormonologia.

2. Caracterização do laboratório de Análises Clínicas

O Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E. foi fundado em 1953 pelo Professor Doutor Luís Raposo. Atualmente, representa uma unidade hospitalar que integra a rede de prestação de cuidados de saúde do doente oncológico no Serviço Nacional de Saúde da Região Centro.

O Serviço de Patologia Clínica, inserido no Departamento Laboratorial do IPOCFG, é dirigido pelo Dr. Frederico Marques Valido, Médico Especialista em Patologia Clínica.

A equipa técnica do Serviço de Patologia Clínica é constituída por cerca de 35 elementos, entre os quais se incluem: Técnicos Superiores de Saúde, Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica, Médicos Internos (Internato de Especialidade em Patologia Clínica), Médicos Especialistas em Patologia Clínica, Assistentes Operacionais e Assistentes Administrativos.

Fisicamente, é constituído por uma área administrativa, onde é realizado o registo de cada utente consoante o tipo de análises a realizar, um espaço de colheitas e receção de amostras, e o laboratório propriamente dito que se encontra dividido em quatro setores: Hematologia, Microbiologia, Química Clínica e Imunologia e Hormonologia. Relativamente ao processo de colheita das amostras, é realizado pelos Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica aos utentes em ambulatório, contudo, também são realizadas colheitas nas Enfermarias do Hospital de Dia e do Serviço de Internamento.

O Serviço de Patologia Clínica recebe diariamente cerca de 350 utentes, sendo cada amostra identificada com um código de barras correspondente.

2.1. Setor de Hematologia

O setor de Hematologia tem como responsável a Dr.^a Isabel Joana Diamantino, Assistente Hospitalar Graduada em Patologia Clínica.

Neste setor recebem-se várias amostras, entre as quais: amostras de sangue total colhidas para tubo com EDTA (K₃), citrato de sódio ou heparina, aspirados de medula óssea, biópsias ganglionares e líquido cefalorraquídeo (LCR).

A nível laboratorial, realiza-se o estudo hematológico de cada amostra. Este compreende essencialmente a realização do hemograma, a determinação da velocidade de sedimentação globular, determinação dos tempos, fatores e inibidores da coagulação, a visualização do esfregaço de sangue periférico e quando solicitados estudos de fenotipagem

celular. Atualmente, com base em técnicas de biologia molecular, é realizada a pesquisa do gene BCR-ABL, do Fator II e do Fator V de *Leiden*.

A caracterização do setor, bem como todos os parâmetros laboratoriais aqui realizados são descritos mais adiante.

2.2. Setor de Microbiologia

O setor de Microbiologia tem como responsável a Dr.^a Maria Alexandre Mendes, Técnica Superior de Saúde, Especialista Ramo de Laboratório.

Neste setor realizam-se diferentes exames no âmbito da microbiologia, entre os quais: exame citobacteriológico, exame micológico, exame parasitológico e exame micobacteriológico.

Para a sua realização, chegam ao setor várias amostras provenientes dos diferentes serviços do IPOCFG, tais como: urina, líquidos biológicos (LCR, líquido pleural, líquido sinovial e líquido das cavidades serosas), secreções respiratórias (expetoração e aspirados brônquicos), exsudado (nasal, ocular, auricular, orofaríngeo e purulento), biópsias, sangue e fezes.

De modo a garantir a fiabilidade dos resultados obtidos no setor, é necessário colocar em prática um conjunto de ações aquando da chegada das amostras ao laboratório. Nestas se incluem a verificação do estado da amostra, nomeadamente o seu acondicionamento, identificação, volume adequado e respetiva informação clínica. Após a verificação e garantia da qualidade da amostra, esta segue um percurso pré-estabelecido.

O estudo citobacteriológico compreende a realização da sementeira da amostra nos diferentes meios de isolamento, tendo em consideração o tipo de flora associada a cada amostra e a pesquisa pretendida. Os meios de isolamento mais utilizados no laboratório são: CLED, CNA, COS e PVX. Paralelamente, realiza-se um esfregaço da amostra com posterior coloração de *Gram* e visualização ao microscópio, permitindo assim a caracterização do microrganismo. Por fim, é realizada, de forma automática, a sua identificação e respetivo antibiograma. No caso de amostras urinárias, o estudo citobacteriológico, descrito anteriormente, inclui a avaliação sumária de urina tipo II.

No estudo micobacteriológico, aplicado à pesquisa de bacilos-ácido-álcool resistentes, inicialmente é realizado o exame direto da amostra (coloração de *Kinyoun*) com posterior técnica de homogeneização, de forma a obter um sedimento. Este é semeado em meio de *Löwenstein-Jensen*, incubado até 6 semanas e efetuado o esfregaço do mesmo.

No estudo micológico são pesquisados fungos leveduriformes, dermatófitos e não dermatófitos. As amostras são semeadas em meio seletivo para fungos (meio *Sabouraud* adicionado de gentamicina e cloranfenicol) e incubadas durante 4 a 6 semanas. Quando se verifica a existência de crescimento fúngico deve proceder-se à sua identificação com base na sua velocidade de crescimento e nas características macroscópicas e microscópicas da colónia. No caso de se observar crescimento leveduriforme é realizada, de forma automática, a sua identificação e respetivo antibiograma. Ao passo que, caso exista crescimento de fungos dermatófitos ou não dermatófitos realiza-se a técnica da fita-cola. Esta técnica consiste em tocar levemente com a fita-cola na periferia da colónia, seguido da adição uma gota de KOH a 10% sobre uma lâmina de vidro. Sobre esta preparação é disposta a tira de fita-cola e uma lamela de vidro para posterior observação microscópica das características estruturais do agente micológico.

Por fim, no estudo parasitológico de fezes é realizado o exame direto do sedimento para a pesquisa de ovos e quistos. A pesquisa de sangue oculto e a pesquisa de *Cryptococcus spp.* e *Giardia lamblia* são realizados por testes imunocromatográficos.

As análises realizadas no setor de Microbiologia requerem bastante trabalho manual, daí ser fundamental a implementação de regras de segurança e boas práticas laboratoriais, pois qualquer erro ou distração pode colocar em causa todo o trabalho diário e a segurança pessoal.

Na Tabela I estão representados os equipamentos utilizados no setor de forma a auxiliar as técnicas manuais utilizadas no setor de Microbiologia.

Tabela I: Equipamentos, amostra biológica e respetiva função.

Equipamento	Amostra biológica	Função
<i>BD Bactec™ 9050 Blood Culture System (Becton Dickinson)</i>	Sangue	Pesquisa de microrganismos.
<i>Vitek® 2 Compact 15 (bioMérieux)</i>	Suspensão do microrganismo em estudo.	Identificação do microrganismo. Detecção da concentração mínima inibitória.
<i>Cobas u 411 (Roche Diagnostics)</i>	Urina	Avaliação sumária tipo II.
<i>Gene Xpert (Werfen)</i>	Sangue; Fezes; Aspirados glânglionares; Biópsias; Colónias isoladas.	Pesquisa de bacilos ácidos-álcool-resistentes e de <i>Clostridium difficile</i> ; Detecção do gene <i>mecA</i> de MRSA.

2.3. Setor de Química Clínica

O setor de Química Clínica tem como responsável o Dr. Luís Espírito Santo Nina, Assistente Hospitalar Graduado Sênior em Patologia Clínica.

O setor de Química Clínica é o que possui maior automatização no Serviço de Patologia Clínica, contudo é uma área de extrema importância no contexto laboratorial. Permite o estudo funcional dos diversos órgãos humanos, entre os quais: o coração, o rim, o sistema digestivo, o fígado e a avaliação do equilíbrio ácido-base. Isto é possível através da quantificação de várias enzimas, proteínas, lípidos, iões e hidratos de carbono.

Ao setor chegam, essencialmente, amostras de sangue venoso colhidas em tubo com esferas ativadoras da coagulação. Após a retração do coágulo, as amostras são centrifugadas a 3000 rpm (*Jouan B4i Multifunction Centrifuge, Thermo scientific*) durante 10 minutos, obtendo-se o produto biológico de interesse, o soro, que é posteriormente analisado de forma automatizada. Chegam também amostras de sangue total colhidas sob EDTA (K₃) e heparina, para a determinação da hemoglobina glicada (HbA1c) e avaliação do cálcio ionizado (Ca²⁺), respetivamente, amostras de urina de 24 horas para a determinação da microalbuminúria e com menor frequência amostras de LCR e outros líquidos biológicos.

São, ainda determinados parâmetros considerados de urgência, em amostras de sangue arterial colhido em anaerobiose sob heparina lítio, de forma a avaliar o equilíbrio ácido-base do paciente. Devido à importância desta análise, esta deve ser realizada o mais rápido possível, isto é, assim que chega ao laboratório e transmitidos de imediato os resultados ao médico.

Tal como nos outros setores é fundamental garantir que todas as amostras recebidas estão em condições de serem processadas de forma correta e assim conseguir resultados fiáveis. Aqui é dada especial atenção às amostras ictéricas e às amostras lipémicas, pois estas condições podem influenciar os resultados das determinações efetuadas. Também as amostras hemolisadas merecem uma análise cuidada. Idealmente devem ser rejeitadas e realizada uma nova colheita, pois a hemólise da amostra irá traduzir-se num aumento dos valores séricos do potássio, lactato desidrogenase (LDH) e outras enzimas intracelulares.

Apesar da grande automatização do setor, ainda se realizam algumas provas serológicas manuais, a maioria das quais consiste em reações de aglutinação. Dentre estas destacam-se: a reação de *Weil-Felix* no diagnóstico de Riquetsioses, o teste de Rosa-Bengala para a deteção de brucelose, o teste de VDRL para o diagnóstico de pacientes com sífilis, a reação de *Waler-Rose* na investigação do fator reumatoide, a pesquisa do *Vírus Epstein-Barr* e a reação de *Widal* para detetar infeções por bactérias do género *Salmonella*.

Na Tabela 2 estão representados os equipamentos utilizados no setor, bem como os parâmetros analisados e a respetiva técnica de medida.

Tabela 2: Equipamentos, parâmetros analisados e respetivas técnicas de medida

Equipamento	Parâmetro analisado	Técnica de medida
<i>Cobas 6000 Analyser Series HITACHI (Roche)</i>	HDL; LDL; Triglicéridos; Ureia; Proteínas totais séricas e urinárias; Fósforo; NH ₃ ; Mg ²⁺ ; K ⁺ ; Lipase; LDH; Glucose; GGT; CK; Cálcio total; Bilirrubina indireta e direta; AST; α-amilase; ALT; Fosfatase alcalina; Albumina; HbA1c.	Espectrofotometria (colorimetria e turbidimetria)
	ISE (Na ⁺ ; K ⁺ ; Cl ⁻)	Potenciometria indireta
<i>Rapidsystem 1265 (Siemens)</i>	pH; pCO ₂ ; pO ₂ ; HCO ₃ ⁻ ; ctCO ₂ ; Hct; tHb; sO ₂ ; O ₂ Hb; COHb; MetHb; HHb; Eletrólitos (Na ⁺ ;K ⁺ ;Ca ²⁺ ;Ca ²⁺ (7.4);Cl ⁻ ;AnGap); Metabolitos (lactato).	Potenciometria
<i>Rapidchem 744 (Siemens)</i>	Confirmação de resultados dos iões Na ⁺ ; Cl ⁻ ;K ⁺ .	Potenciometria
<i>ABL800 (Flex) AQT90 (Flex)</i>	Determinação Ca ²⁺ e confirmação de resultados das gasometrias.	Potenciometria
<i>Reflotron Plus (Roche Diagnostics)</i>	Confirmação dos resultados obtidos no Cobas 6000.	Refractometria (Química seca)

2.4. Setor de Imunologia e Hormonologia

O setor de Imunologia e Hormonologia tem como responsável o Dr. Nuno Ferreira Cunha, Técnico Superior de Saúde, Especialista Ramo de Laboratório.

O setor recebe amostras de sangue total colhido para tubo sem anticoagulante e com gel de separação. Após a retração do coágulo, a amostra é centrifugada a 2000 g (*Jouan B4i Multifunction Centrifuge, Thermo scientific*) durante 10 minutos, obtendo-se assim o soro. Devido à imensa diversidade de parâmetros aqui analisados, são também recebidas amostras de urina de 24 horas, amostras de plasma, saliva e biópsias.

O setor de Imunologia e Hormonologia é o local onde estão centralizadas as determinações de vários parâmetros laboratoriais fundamentais na avaliação e monitorização dos doentes oncológicos, sendo que todos os autoanalisadores utilizam o mesmo princípio base, isto é, reações imunoquímicas com base na ligação antigénio-anticorpo.

De forma mais aprofundada irei dar a conhecer o setor, bem como toda a metodologia utilizada e a sua importância na monitorização do doente oncológico do IPOCFG, mais adiante.

3. Controlo de qualidade

Devido à grande importância dos dados laboratoriais na avaliação e diagnóstico de doentes oncológicos é fundamental que o laboratório de Patologia Clínica possa garantir a viabilidade e fiabilidade dos resultados. Para tal é essencial a existência de programas de controlo de qualidade, internos e externos.

Por outro lado, a qualidade dos resultados não depende apenas das boas práticas aferidas pelos controlos de qualidade interno e externo, depende, também, de todos os procedimentos realizados, desde a preparação do doente para a colheita da amostra até à validação dos resultados, o que engloba as três fases analíticas: a fase pré-analítica, a fase analítica e a fase pós-analítica.

3.1. Fases analíticas

Fase pré-analítica

A fase pré-analítica inicia-se com a receção e registo das requisições de análises laboratoriais, seguindo-se a correta identificação do doente e a sua preparação, o processo da colheita da amostra, a sua conservação e transporte até ao local de processamento.

Esta é a fase que acarreta uma maior percentagem de erro. Os erros são devidos essencialmente a: amostra com identificação incorreta ou ausente, amostra hemolisada ou coagulada, contentor ou tubo de colheita incorreto, incorreto rácio entre amostra/anticoagulante, agitação inadequada da amostra, amostra insuficiente e condições inapropriadas de transporte ou conservação da mesma.

Fase analítica

A fase analítica corresponde ao processamento das análises requisitadas nos diferentes setores, com base numa determinada metodologia e com vista à obtenção de um resultado laboratorial fiável.

Atualmente, as análises laboratoriais são, maioritariamente, realizadas de forma automatizada nos autoanalisadores. É fundamental a realização de um conjunto de ações executadas regularmente a fim de verificar os equipamentos, o estado de conservação dos reagentes e os controlos de qualidade ^[1].

Fase pós-analítica

A fase pós-analítica corresponde ao processo de validação biopatológica dos resultados obtidos na fase anterior, tendo sempre em consideração o tipo de patologia em questão.

Nesta fase, também é incluído o armazenamento e/ou eliminação segura das amostras em estudo, ações que devem ser realizadas de acordo com a legislação nacional ou recomendações para a gestão dos resíduos ^[1].

3.2. Controlo de Qualidade Interno

O Controlo de Qualidade Interno é realizado nos autoanalisadores de todos os setores laboratoriais, diariamente ou segundo uma calendarização definida e antes do processamento das amostras. Este tem como principal objetivo avaliar a precisão dos resultados.

Neste processo são utilizadas amostras controlo, com comportamento e matriz biológica semelhante às amostras dos pacientes. Os resultados são apresentados sob a forma de gráficos de controlo, gráficos de *Levey-Jennings*, os quais incluem indicadores operacionais de qualidade (média e desvio padrão). Considera-se que o método a utilizar pelo autoanalisador está aceitável quando os valores obtidos se encontram dentro dos “*cut-offs*” de decisão clínica definidos com base nas Regras de *Westgard*.

Quando o resultado da amostra controlo não é laboratorialmente seguro, este pode dever-se à existência de erros associados ao equipamento, à instabilidade dos reagentes ou dos calibradores (amostras com composição quantitativa definida).

Este modelo de controlo de qualidade interno é aplicado aos diversos autoanalisadores dos setores de Hematologia e Química Clínica, os quais utilizam 2 ou 3 níveis de controlo (nível alto, baixo e normal). No setor de Imunologia e Hormonologia, devido ao enorme número de parâmetros analíticos avaliados, são utilizados painéis de controlo que permitem a comparação do valor *target* (obtido pelo laboratório) com os restantes laboratórios que utilizam o mesmo equipamento e técnica.

No setor de Microbiologia, devido à grande extensão de técnicas manuais efetuadas o controlo de qualidade interno é realizado semanalmente e consiste no controlo da assepsia dos meios de cultura, da solução salina e dos corantes utilizados. Também, é realizado o controlo da temperatura das estufas existentes e a reprodutibilidade do equipamento *Cobas U411*. Para além disso, mensalmente, são utilizadas estipes ATCC (*American Type Culture Collection*), de forma a controlar todo o procedimento do equipamento automático *Vitek 2 Compact 15 (bioMérieux)*.

3.3. Controlo de Qualidade Externo

O Controlo de Qualidade Externo tem como principal objetivo avaliar a exatidão dos resultados emitidos pelo laboratório, através da comparação entre laboratórios com a mesma metodologia e/ou valor obtido pelo método de referência ^[1].

Atualmente, o setor de Hematologia, Química Clínica e Imunologia e Hormonologia, estão inseridos em programas de avaliação externa da qualidade, onde se incluem, o Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e o *Randox International Quality Assessment Scheme, External Quality Assessment* (RIQAS EQA).

No setor de Hematologia, a citometria de fluxo está inserida no programa *United Kingdom National External Quality Assessement Service* (UK NEQAS).

O setor de Microbiologia realiza dois controlos externos, um dos quais quatro vezes por ano, o programa PNAEQ do INSA, que consiste na avaliação de amostras bacteriológicas (estirpes aeróbias e anaeróbias), amostras para avaliação micológica (leveduras, dermatófitos e não dermatófitos) e avaliação parasitológica. Este setor está ainda inserido no programa anual da *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net).

4. Atividades desenvolvidas

4.1. Setor de Hematologia

A Hematologia é a ciência que compreende o estudo da formação e morfologia de todos os elementos celulares do sangue, avaliação dos diferentes órgãos e patologias hematopoiéticas associadas à sua produção, assim como o estudo da hemostase.

A hematopoiese é um processo biológico que se inicia nas primeiras semanas de vida embrionária e com base na divisão celular da célula estaminal hematopoiética. Esta célula imatura possui a capacidade de se auto-regenerar, proliferar e diferenciar em células progenitoras fortemente especializadas, na medula óssea, que após várias divisões celulares dão origem a células maduras no sangue periférico [2].

4.1.1. Amostras biológicas

O setor de Hematologia avalia, essencialmente, amostras de sangue total colhidas sob EDTA (K₃) e citrato de sódio.

No setor, após a receção das amostras, é necessário proceder a um conjunto de ações realizadas de forma a garantir que todo o procedimento é realizado corretamente. Deve ser efetuada a verificação do número do doente com correspondência ao respetivo tubo e a verificação do estado da amostra, nomeadamente, a existência de coágulos e o volume da mesma.

As amostras de sangue total colhidas sob EDTA (K₃) são utilizadas para a avaliação dos seguintes parâmetros: hemograma, velocidade de sedimentação globular, esfregaço de sangue periférico e fenótipo da população leucocitária.

Para a determinação dos parâmetros da hemostase são utilizadas amostras de sangue total colhido sob citrato de sódio, numa proporção de 9/1 (sangue/anticoagulante). Estas amostras devem ser centrifugadas a 3000 rpm (*Jouan B4i Multifunction Centrifuge, Thermo scientific*) durante 10 minutos de modo a obter um plasma citratado pobre em plaquetas.

No setor de Hematologia, o recurso a amostras colhidas sob anticoagulantes, nomeadamente o EDTA (K₃) e o citrato de sódio, têm um papel de extrema importância. Estes funcionam como agentes quelante de catiões divalentes com consequente inibição da cascata da coagulação. De realçar o papel do anticoagulante EDTA (K₃) que mantém a morfologia dos glóbulos vermelhos e dos glóbulos brancos, inibe a agregação das plaquetas e permite a conservação da amostra durante 24 horas entre 2-8°C [3].

Em doentes que produzam auto-anticorpos que se ligam ao EDTA (K₃), provocando a inibição deste anticoagulante, está preconizada a colheita de sangue total para tubo com heparina. A heparina, é um anticoagulante que ativa a molécula de antitrombina III, sendo esta um inibidor da coagulação [3].

O setor recebe também amostras de aspirados de medula óssea, biópsias e aspirados ganglionares. Estas amostras são avaliadas qualitativa e quantitativamente através da observação microscópica do respetivo esfregaço e fenotipagem celular. Neste tipo de amostra é necessário verificar a existência de alterações nos diferentes estádios maturativos de cada linhagem celular, avaliar os depósitos de ferro nos eritroblastos, bem como a existência de aplasia medular.

4.1.2. Hemograma e parâmetros associados

O hemograma compreende a avaliação quantitativa e qualitativa das diferentes linhagens celulares existentes no sangue periférico: glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas.

O hemograma é realizado no equipamento *Coulter[®] LH 750 Hematology Analyzer (Beckman Coulter)* que utiliza o princípio de *Coulter* ou da Impedância Elétrica, a tecnologia VCS (volume, condutividade e *scatter*) para a contagem e diferenciação celular (leucócitos) e a espectrofotometria para a quantificação da hemoglobina.

O princípio de *Coulter*, representado na Figura 1, consiste na utilização de uma suspensão de células sanguíneas altamente diluídas numa solução isotónica ou condutora da corrente elétrica. À medida que as partículas individuais são forçadas a passar através de uma constricção, existente ente dois elétrodos, vão sendo gerados impulsos elétricos discretos, cuja amplitude é proporcional ao tamanho e ao número de células existentes na amostra [4].

A tecnologia VCS permite a contagem diferencial dos leucócitos, efetuando assim a fórmula leucocitária. O volume da célula é avaliado pelo princípio da impedância elétrica, o conteúdo celular (núcleo) pela condutividade elétrica e o tamanho/forma celular e granulosidade/complexidade celular são avaliados pela dispersão da luz (*scatter*).

Com base nesta tecnologia é também realizada a contagem de reticulócitos. Esta contagem requer a utilização de um canal diferente e de uma solução de azul-de-metileno que vai corar o RNA dos reticulócitos [4].

Paralelamente, o equipamento efetua a lise dos glóbulos vermelhos com um reagente lítico, contendo cianeto de potássio, que ao reagir com a hemoglobina da amostra vai formar um complexo corado (cianometahemoglobina). Este complexo é quantificado por

espectrofotometria a um comprimento de onda de 525 nm, sendo a sua absorvância diretamente proporcional à concentração de hemoglobina [4].

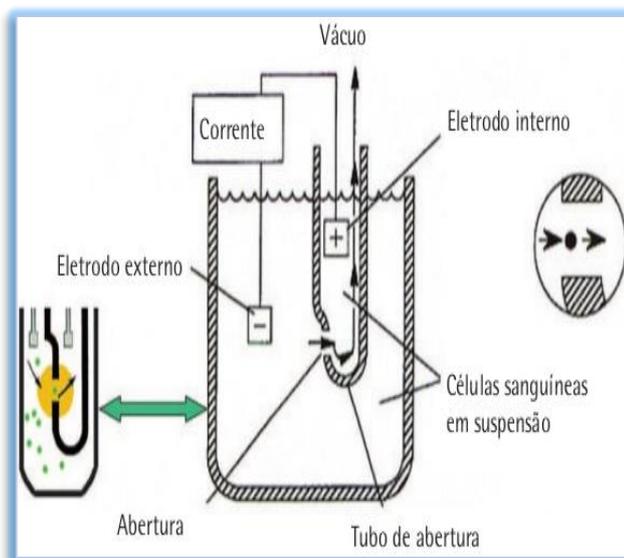


Figura 1: Princípio de Coulter ou da Impedância elétrica utilizado no autoanalisador Coulter® LH 750. (Adaptado de [5]).

Por fim, com base nas diferentes técnicas utilizadas são obtidos gráficos tridimensionais, como o da Figura 2. Com base nos histogramas obtidos, o *software* acoplado consegue inferir diretamente sobre o número total de células sanguíneas vermelhas (RBC), o número total de células sanguíneas brancas (WBC), contagem total de plaquetas (PLT), o volume corpuscular médio (VCM), a distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW) e o volume plaquetário médio (VPM) da amostra. Posteriormente são calculados a hemoglobina corpuscular média (HCM), o hematócrito e a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Na Tabela 3 são apresentados os parâmetros hematológicos avaliados no autoanalisador acima referido, bem como o seu significado laboratorial. No Anexo I, encontram-se os respectivos valores de referência utilizados no laboratório de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG.

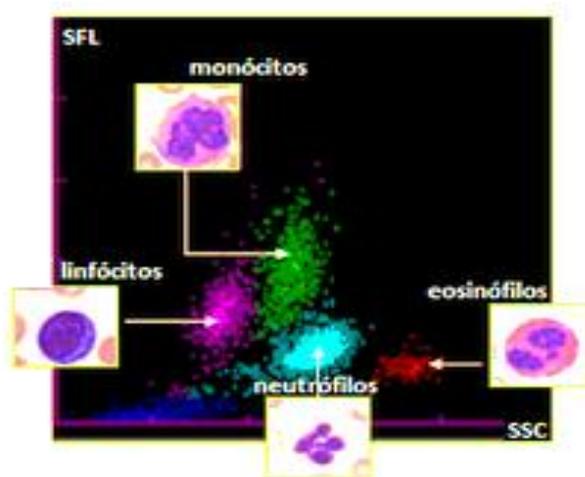


Figura 2: Gráfico tridimensional obtido pela dispersão da luz para efetuar a contagem diferencial dos glóbulos brancos, no qual o eixo XX' representa a complexidade celular (SS) e o eixo YY' o volume da célula (FS). (Adaptado de [5]).

Tabela 3: Parâmetros hematológicos e significado, seguido da unidade em que o resultado pode ser expresso. (Adaptado de [6]).

Parâmetro hematológico	Significado	Unidades
Contagem dos eritrócitos	Número total de eritrócitos na amostra	Nº de células/L
Hemoglobina	Proteína existente no interior do eritrócito	g/dL
Hematócrito	Porcentagem de eritrócitos no volume total de amostra	% (L/L)
Volume corpuscular médio	Tamanho médio dos eritrócitos	fL
Hemoglobina corpuscular média	Hemoglobina média existente em cada eritrócito	pg
Concentração da hemoglobina corpuscular média	Concentração média da hemoglobina globular	g/dL
Distribuição do tamanho dos eritrócitos	Índice de anisocitose eritrocitária (variação do seu tamanho)	%
Contagem de leucócitos	Número total de leucócitos na amostra	Nº de células/L
Polimorfonucleares	Neutrófilos	% (Nº de células/L)
	Eosinófilos	
	Basófilos	
Mononucleares	Linfócitos	
	Monócitos	
Contagem de plaquetas	Número total de plaquetas na amostra	Nº de células/L
Volume plaquetário médio	Tamanho médio das plaquetas	fL
Distribuição do diâmetro das plaquetas	Índice de anisocitose plaquetária (variação do seu tamanho)	%
Contagem de reticulócitos	Número de reticulócitos por cada 100 eritrócitos da amostra	%

Série vermelha

A eritropoiese é um processo regulado pela eritropoietina (EPO), produzida em maior quantidade (cerca de 90%) nas células intersticiais peritubulares do rim, e cerca de 10% no fígado. Este fator de crescimento é produzido no rim em situação de hipóxia, levando à estimulação do processo da eritropoiese, na medula óssea, com consequente, produção de glóbulos vermelhos no sangue periférico [6].

Os glóbulos vermelhos contêm no seu interior uma proteína globular, a hemoglobina (Hb). A Hb é um tetrâmero, com quatro cadeias polipeptídicas ligadas entre si por ligações não covalentes, constituída por duas cadeias α e duas cadeias β , γ e/ou δ , ligadas covalentemente ao grupo heme. Nos adultos, a HbA ($\alpha_2\beta_2$) representa cerca de 96% do total de Hb. Cerca de 2.5 a 3.0 % da Hb total do adulto apresenta-se sob a forma de Hb A2 ($\alpha_2\delta_2$). A Hb fetal (Hb F; $\alpha_2\gamma_2$) predomina durante a vida fetal, diminui rapidamente durante o primeiro ano de vida e representa menos de 1% em adultos normais [7].

O glóbulo vermelho normal tem a forma de um disco bicôncavo, com um diâmetro de cerca de 7-8 μm , palidez central e sem inclusões intra-citoplasmáticas [8]. O tempo médio de vida em circulação é de aproximadamente 120 dias.

No IPOCFG, uma das principais alterações verificadas na série vermelha corresponde à diminuição da concentração de hemoglobina no sangue periférico, isto é, um estado anémico. O doente oncológico desenvolve anemia, essencialmente, por perda aguda ou crónica de sangue. Porém, o seu estado anémico pode também ser devido ao envolvimento da medula óssea em neoplasias hematológicas, processos hemolíticos, efeito da terapêutica (químico e radioterapia), aplasia eritrocitária e défice de fatores hematológicos (ferro, vitamina B₁₂ e ácido fólico) [9].

A anemia é definida como a redução da concentração de Hb no sangue periférico, sendo considerado níveis de Hb <12.0 g/dL para o adulto do sexo feminino e Hb <13.0 g/dL para o adulto do sexo masculino. No entanto, a distribuição normal da Hb varia não apenas com o sexo e a idade, mas também com a etnia e estado fisiológico. Como tal, para a classificação e diagnóstico de anemia, é necessário ter em consideração o mecanismo patológico subjacente e o estado clínico do paciente [10].

A etiologia da anemia pode ser devida aos seguintes processos: diminuição da capacidade de produção de glóbulos vermelhos, aumento da destruição dos mesmos, isto é, hemólise, e, por fim, qualquer tipo de perda de sangue (macroscópica ou microscópica) [10].

A principal causa de anemia adquirida é a deficiência nutricional, incluindo a deficiência de ferro, ácido fólico ou vitamina B₁₂. A anemia ferropénica, definida com uma deficiência de

ferro, pode ser devida a um aporte insuficiente através da dieta, a hemorragias crônicas, necessidades aumentadas e/ou mal absorção deste elemento. Por outro lado, a anemia megaloblástica é caracterizada pela deficiência de nutrientes essenciais como a vitamina B₁₂ e o ácido fólico. Pode ainda acontecer anemia devido a causas autoimunes, situações de inflamação ou de doença crônica, e as anemias hereditárias onde podemos incluir as hemoglobinopatias, como é o caso da anemia das células falciformes e das talassémias (α e β).

Na monitorização e caracterização dos diferentes tipos de anemia é fundamental uma avaliação correta dos parâmetros do hemograma, onde se incluem: a concentração de hemoglobina, o hematócrito, os índices do glóbulo vermelho e a contagem dos reticulócitos [10].

De realçar a contagem dos reticulócitos no estudo desta patologia, pois estes permitem uma avaliação da produção de glóbulos vermelhos na medula óssea. A contagem de reticulócitos permite assim a diferenciação entre anemia hipoproliferativa e anemia regenerativa. No primeiro caso, anemia hipoproliferativa, cuja contagem de reticulócitos é inferior a 2.0-2.5%, existe um defeito na produção dos glóbulos vermelhos, associada a anemias microcíticas, normocíticas e macrocíticas. Por outro lado, na anemia regenerativa, caracterizada por uma contagem de reticulócitos elevada, verifica-se um aumento da destruição dos glóbulos vermelhos, como é o caso da anemia hemolítica [11].

Para além da determinação dos parâmetros do hemograma, devem ser realizadas outras análises, nomeadamente o estudo do perfil do ferro, que inclui a análise do ferro sérico, da ferritina e a capacidade total de ligação do ferro (TIBC). O seu diagnóstico pode ainda ser complementado com a avaliação de outros parâmetros laboratoriais, onde se incluem: vitamina B₁₂, ácido fólico, LDH, bilirrubina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamyltransferase (GGT), haptoglobina, hormonas da tiróide, eletroforese da Hb e teste de *Coombs* direto [10].

Na Tabela 4 encontra-se representada a classificação do tipo de anemia com base nos parâmetros laboratoriais VCM e HCM.

Tabela 4: Classificação do tipo de anemia com base nos parâmetros laboratoriais VCM e HCM, bem como as causas associadas. (Adaptado de [1]).

Tipo de anemia	Anemia Hipocrômica Microcítica	Anemia Normocrômica Normocítica	Anemia Macroscítica
<i>Parâmetro laboratorial</i>	VCM < 80 fL HCM < 27 pg	VCM 80-100 fL HCM ≥ 27 pg	VCM ≥ 100 fL
<i>Causas</i>	Deficiência de ferro; Talassemias; Anemia sideroblástica; Anemia da doença crônica.	Anemia da doença crônica; Insuficiência renal crônica; Falência medular; Anemia hemolítica.	Anemia megaloblástica; Anemia hemolítica associada a fármacos; Anemia associada a síndromes mielodisplásicas.

Após a avaliação dos parâmetros acima referidos é essencial a visualização do esfregaço de sangue periférico. Existem alterações típicas do eritrócito, quer no seu tamanho, forma e/ou presença de inclusões intra-citoplasmáticas, que nos sugerem qual o tipo de anemia em questão. Contudo estas alterações também são sugestivas de outras patologias hematológicas, como demonstrado na Figura 3.

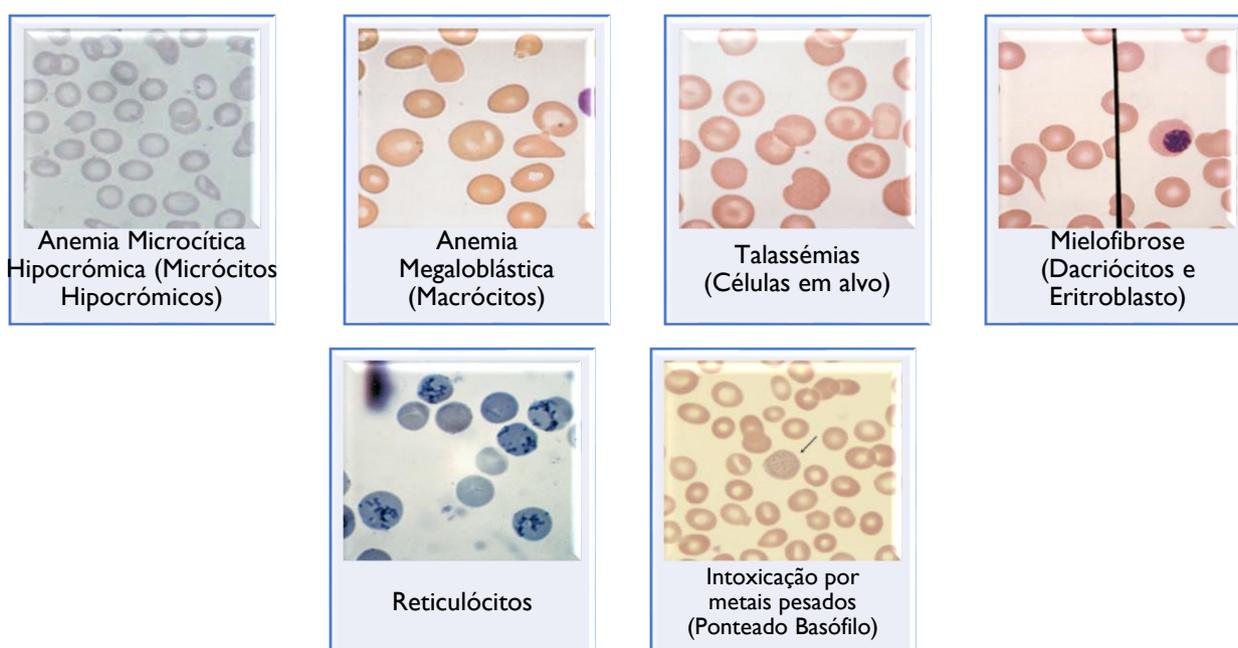


Figura 3: Algumas alterações da série vermelha com associação a patologias hematopoiéticas. (Adaptado de [1]).

Série branca

A célula estaminal hematopoiética, presente na medula óssea, por ação de fatores de crescimento e interleucinas, dá origem ao progenitor da linhagem linfóide e ao progenitor da linhagem mielóide.

Da linhagem mielóide derivam a eritropoiese, referida anteriormente, a megacariopoiese, a referir posteriormente, e a mielopoiese. Esta última, na presença de fatores de crescimento específicos da linhagem, o fator de estimulação das colónias de granulócitos (G-CSF) e o fator de estimulação das colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), após várias divisões celulares dá origem a células maduras do sangue periférico, ditos granulócitos, onde se incluem: os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos. Os granulócitos possuem núcleo lobulado de forma variável, isto é, polimórfico, e grânulos citoplasmáticos proeminentes, cujas características tintoriais diferem consoante a classe a que pertence ^[2].

Ainda incluído na mielopoiese ocorre a diferenciação dos monoblastos em monócitos, já considerados agranulócitos. Os monócitos são a maior célula do sangue periférico, núcleo irregular e citoplasma abundante azurófilo, podendo ser vacuolizado ^[8]. Estes circulam temporariamente no sangue periférico e quando entram nos tecidos maturam para macrófagos ou células dendríticas.

O aumento de qualquer uma destas linhagens é designado por citose/filia e a sua diminuição de citopenia, ambas associadas a várias patologias referidas na Tabela 5.

Para além de alterações quantitativas, podem também existir alterações morfológicas, entre as quais: alteração do número de lóbulos (hipo ou hipersegmentados), alteração nos grânulos citoplasmáticos (grânulos tóxicos devido às terapêuticas administradas), vacuolarização do citoplasma, presença de inclusões citoplasmáticas e existência de células imaturas no sangue periférico ^[8].

Tabela 5: Alterações hematológicas verificadas nas séries granulocítica e agranulocítica, com associação a várias patologias. (Adaptado de ^[12]).

Alteração Hematológica	Patologias associadas
<i>Neutrofilia</i>	Infeções bacterianas; Inflamações; Necrose tecidual; Neoplasias; Leucemias; Síndromes mieloproliferativas; Medicamentos; Doenças metabólicas.
<i>Neutropenia</i>	Aplasia medular; Deficiência de vitamina B ₁₂ ou ácido fólico.
<i>Eosinofilia</i>	Doenças alérgicas (asma, eczema); Doenças cutâneas (psoríase); Intolerância a medicamentos; Leucemia eosinofílica.
<i>Basofilia</i>	Infeção parasitária; Distúrbios leucémicos e mieloproliferativos.
<i>Monocitose</i>	Doenças crônicas; Doenças inflamatórias (tuberculose).

A linhagem linfóide, na presença dos fatores de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β) diferencia-se na série linfocítica, também designada de agranulocítica, que no sangue periférico inclui: os linfócitos B, os linfócitos T e os linfócitos NK (*Natural Killer*).

Os linfócitos B têm origem na medula óssea e possuem na sua membrana plasmática o recetor da célula B (BCR). O BCR apresenta na sua constituição uma proteína com a estrutura de uma imunoglobulina, com capacidade de se ligar a antígenos específicos. Nos centros germinativos dos nódulos linfáticos, as imunoglobulinas são indispensáveis para a ativação dos linfócitos B e a sua diferenciação em plasmócitos e células de memória. Os plasmócitos têm com função produzir anticorpos solúveis de elevada afinidade para os antígenos, de forma a sinalizá-los para serem destruídos por outras células do sistema imunológico. Assim, os linfócitos B constituem a imunidade humoral ^[13].

Os linfócitos T diferenciam-se e sofrem maturação no timo sendo as principais células da imunidade celular. Estes possuem à superfície recetores específicos para um dado antígeno, o TCR, que apenas reconhece antígenos que são apresentados à superfície das células, associados a moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade ^[13].

Os linfócitos NK são gerados na medula óssea e têm a capacidade espontânea de reconhecer e destruir células aberrantes do organismo, nomeadamente células infetadas por vírus e células tumorais, sendo um componente do sistema inato ^[13].

Cerca de 85% dos linfócitos existentes no sangue periférico são linfócitos T. Os linfócitos apresentam-se com um núcleo redondo, cromatina densa e citoplasma azul claro. Uma linfocitose pode estar presente aquando uma infeção viral ou uma neoplasia linfóide.

Situação contrária, linfopenia, pode verificar-se no linfoma de *Hodgkin*, em situações de falência medular grave e administração de terapia imunossupressora e radioterapia ^[14].

No IPOCFG, existe uma grande prevalência de doenças hemato-oncológicas, daí ser fundamental a interpretação do hemograma e a correta identificação de alterações morfológicas das linhagens celulares ao microscópio ótico.

Algumas das patologias associadas às células B e T são apresentadas na Tabela 6. De realçar o papel da técnica da citometria de fluxo, descrita adiante, no diagnóstico e caracterização da patologia em causa através da caracterização do fenótipo celular.

Tabela 6: Patologias hemato-oncológicas associadas ao tipo de célula. (Adaptado de ^[15]).

Célula	Patologia hemato-oncológica
<i>Linfócito B</i>	Leucemia linfoblástica do precursor de célula B; Leucemia linfocítica crónica B; Linfoma linfoplasmocítico; Leucemia das <i>Hairy cells</i> ; Mieloma/plasmocitoma; Linfoma do tipo MALT; Linfoma folicular; Linfoma difuso de grandes células B; Linfoma de Burkitt; Linfoma das células do manto.
<i>Linfócito T</i>	Linfoma linfoblástico do precursor de célula T; Leucemia linfocítica granular de célula T; Linfoma de célula T.

Série plaquetar

A linhagem mielóide, na medula óssea, por ação da trombopoietina (TPO), leva à megacariopoiese, que dá origem às plaquetas. As plaquetas são fragmentos celulares anucleados derivados dos megacariócitos e cerca de um terço destas residem no baço. Têm um papel fundamental no processo da hemostase, com vista a manter a integridade vascular ^[16].

A diminuição do número de plaquetas, trombocitopenia, pode ser devia a três fatores: diminuição da sua produção, acumulação de plaquetas no baço devido ao aumento deste órgão e aumento da sua destruição ^[16]. Em situações de trombocitopenia, é fundamental a avaliação do tubo que contém a amostra, de modo a verificar a existência ou não de coágulo assim como a visualização do esfregaço de sangue periférico, a fim de averiguar a existência ou não de agregados plaquetares. Quando se verifica a presença de alguma destas alterações, é de boa prática repetir a colheita com um anticoagulante diferente do utilizado inicialmente, muitas vezes o escolhido é a heparina ^[8].

O aumento do número de plaquetas, trombocitose, é devido essencialmente a: inflamação, neoplasia, infeção (trombocitose reativa) e a síndrome mieloproliferativa ^[16].

4.1.3. Esfregação de sangue periférico

Para a observação de todas as alterações quantitativas e qualitativas descritas anteriormente é necessário a realização de esfregaços de sangue periférico sobre lâmina de vidro com posterior observação ao microscópio ótico.

Após a realização do esfregaço, este deve ser corado, procedimento que no IPOCFG é realizado no equipamento automático *Aerospray® 7150 Hematology Slide-Cytocentrifuge* (Wescor). O referido equipamento utiliza como técnica a coloração de *Wright Giemsa*. Esta técnica consiste na combinação de um corante ácido, a eosina, com um corante básico, a tiazina. A eosina reage com os componentes básicos da célula e estes adquirem uma cor vermelha/rosa, isto é, o citoplasma e os filamentos citoplasmáticos. A tiazina reage com os componentes ácidos da célula, corando-os de azul, com é o caso do núcleo celular ^[8].

A lâmina corada é depois observada ao microscópio ótico. A observação inicia-se com a objetiva de menor ampliação (objetiva de 10x) de modo a obter um bom campo de observação, seguindo-se a contagem celular de pelo menos 200 células sanguíneas, com a objetiva de maior ampliação (objetiva de 50x ou 100x).

4.1.4. Velocidade de sedimentação globular

A velocidade de sedimentação globular (VSG) é considerada um parâmetro inespecífico, devido à possibilidade de os seus valores sofrerem alterações consoante as condições fisiológicas do indivíduo, como a idade, sexo, possibilidade de gravidez e o tipo de patologia observada. Contudo, o seu aumento tem valor na monitorização de várias patologias, como é o caso da artrite reumatoide, polimialgia reumática, mieloma múltiplo e doenças inflamatórias agudas ou crónicas.

No setor de Hematologia, a VSG é determinada no equipamento *Test I BCL ALI FAX* (Beckman Coulter), que mede a capacidade de agregação e sedimentação de uma suspensão homogénea de glóbulos vermelhos, fotometricamente a um comprimento de onda de 950 nm. Esta medida é compatível com o método de referência de *Westergren* ^[17].

O valor de referência da VSG encontra-se no Anexo I, sendo que este resultado pode ser afetado pela concentração de glóbulo vermelhos da amostra e pela presença de proteínas plasmáticas, como é o caso do fibrinogénio, das imunoglobulinas e da α_2 -macroglobulina ^[17].

4.1.5. Hemostase

No setor de Hematologia realizam-se também os estudos da hemostase. A hemostase é um processo dinâmico que pode ser dividido em duas fases: a hemostase primária, onde ocorre a agregação plaquetária mediada por recetores de superfície e ligantes solúveis e a ativação dos fatores da coagulação com o objetivo de formar uma rede de fibrina.

Posto isto, a hemostase é fundamental na manutenção da fluidez da circulação sanguínea e dos seus principais intervenientes: as plaquetas, a parede dos vasos sanguíneos e os fatores da coagulação ^[18].

Em doentes oncológicos, o estudo da hemostase, é essencial quer na sua monitorização durante o período peri-operatório, quer no desenvolvimento da doença, pois qualquer desequilíbrio neste processo pode desencadear situações de trombose ou hemorragia ^[19].

Seguidamente é apresentado um breve resumo de todo processo fisiológico, bem como as alterações mais frequentes que levam ao desenvolvimento de doença.

Hemostase primária

Durante a lesão do endotélio vascular, as plaquetas são ativadas por ligação às proteínas expostas, como é o caso do colagénio endotelial e o fator de *von Willebrand* (FvW), e pela ligação de agonistas solúveis, como o ADP, a trombina e o tromboxano A2 (TxA2). Este processo desencadeia uma cascata de sinalização, provocando a reorganização do citoesqueleto, mudanças na forma e secreção dos grânulos α e δ das plaquetas. Essas vias de sinalização convergem na ativação dos recetores de superfície das plaquetas a glicoproteína GpIIb e a glicoproteína GpIIIa ^[18].

A ligação das glicoproteínas GpIIb/IIIa ativam proteínas adesivas, como o fibrinogénio, fibronectina e FvW de modo a amplificar ainda mais a ativação das plaquetas, levando à sua agregação e formação do trombo plaquetário. O TxA2 atua como um estímulo para a agregação de mais plaquetas e assim formar o trombo plaquetário de modo a bloquear temporariamente a lesão vascular ^[18].

As principais alterações verificadas na hemostase primária devem-se, essencialmente, a anomalias da parede dos vasos sanguíneos, a septicémias, reações a fármacos ou a defeitos qualitativos/quantitativos das plaquetas.

Os distúrbios hemorrágicos, devido a uma redução da função das plaquetas, mais frequentes são: síndrome de *Bernard-Soulier*, caracterizado pela deficiência da glicoproteína GpIb e a trombastenia de *Glanzmann*, isto é, deficiência das glicoproteínas GpIIb/IIIa ^[19].

Hemostase secundária

A ativação da cascata da coagulação ocorre em paralelo com a agregação plaquetária e envolve a ativação de várias enzimas específicas que iniciam e amplificam a formação da trombina [18].

A maioria dos fatores da coagulação são produzidos no fígado. Alguns destes fatores são dependentes da vitamina K, nomeadamente os fatores II, VII IX, e X. Estas proteínas sofrem uma modificação pós-tradução dependente da vitamina K (carboxilação γ dos resíduos de ácido glutâmico), que lhes permite, posteriormente, ligar o cálcio e tornarem-se funcionalmente ativas. Com base no descrito anteriormente, quando se verifica uma deficiência de vitamina K ou a administração de um antagonista desta vitamina, por exemplo a varfarina, ocorre um processo de inibição da cascata da coagulação [19].

Na década de 60, Macfarlane e Davie & Ratnoff propuseram a hipótese da “cascata da coagulação” de forma a explicar a fisiologia da cascata do sangue. Nesse modelo a cascata da coagulação encontrava-se dividida em três vias, a via intrínseca, a via extrínseca e a via comum, que culminavam na formação de trombina e de um coágulo de fibrina [20].

Atualmente, o modelo proposto é inadequado do ponto de vista da fisiologia da coagulação, tendo em consideração que a divisão da cascata da coagulação em três vias não ocorre *in vivo*.

Em indivíduos normais, estão presentes em circulação níveis mínimos (cerca de 1%) da forma ativada do fator VII da coagulação (fator VIIa). Como podemos observar na Figura 4, quando ocorre uma lesão endotelial, o fator VIIa em circulação, liga-se ao fator tecidual expresso nas membranas celulares, levando à formação do complexo fator tecidual/fator VIIa enzimaticamente ativo. Este complexo tem como substratos o fator IX e o fator X, cuja clivagem resulta na formação do fator IXa e do fator Xa, respetivamente, com formação de trombina e conseqüentemente de um coágulo de fibrina instável [20].

A trombina ativa o fator V em fator Va e o fator VIII em fator VIIIa. A ativação destes cofatores, fator Va e fator VIIIa, é essencial para a formação do complexo fator IXa/fator VIIIa, designado de complexo “tenase” intrínseco, que converte o fator X a fator Xa, e do complexo fator Va/fator Xa, isto é, complexo “protrombinase”, que converte a protrombina em trombina (fator IIa) [20].

Por fim, a trombina converte o fibrinogénio em fibrina, promovendo a ativação plaquetária e ativa o fator XIII da coagulação, que por sua vez, estabiliza o coágulo de fibrina [20].

Qualquer alteração do equilíbrio dinâmico das reações da coagulação culminam no aparecimento de distúrbios hemorrágicos ou trombóticos associados à ausência e/ou aumentos dos fatores da coagulação, listados na Tabela 7.

De realçar que na avaliação da hemostase *in vitro* os termos “via intrínseca” e “via extrínseca” são úteis na interpretação dos exames laboratoriais, pois são criadas condições no tubo de reação para o desencadear da reação de coagulação de formas distintas ^[20].

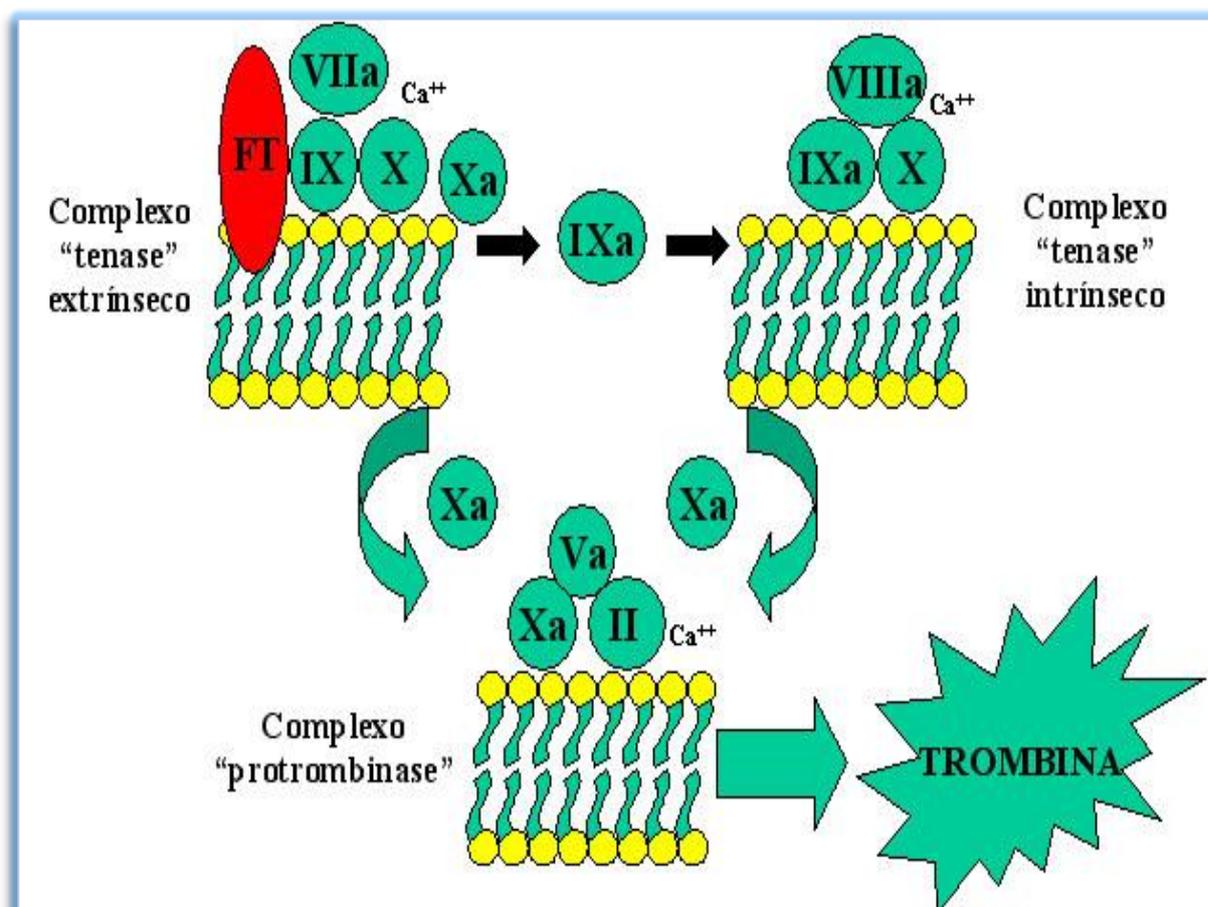


Figura 4: Representação esquemática dos complexos procoagulantes. Após uma lesão vascular existe a ligação do fator VIIa ao fator tecidual (FT), com consequente ativação dos fatores IX e X. O complexo fator IXa/VIIIa ativa o fator X que forma um complexo com o fator Va, convertendo o fator II (protrombina) a fator IIa (trombina). (Adaptado de ^[20]).

Tabela 7: Distúrbios hemorrágicos e trombóticos (hereditários e adquiridos) associados a patologias da hemostase. (Adaptado de ^[19]).

Distúrbios hemorrágicos		Distúrbios trombóticos (trombofilia)	
Hereditários	Adquiridos	Hereditários	Adquiridos
Doença de von Willebrand; Hemofilia A; Hemofilia B; Hemofilia C; Déficit de Fator V, X, VII, XIII; Déficit de protrombina.	Anemia hemolítica; Déficit de vitamina K; Doença hepática.	Déficit de proteína C ou S; Mutações do Fator V de Leiden; Mutações da protrombina.	Síndrome dos anticorpos antifosfolípidos; Aumento dos Fatores VIII, IX, XI, ou fibrinogênio.

Sistema fibrinolítico

A fibrinólise, que ocorre em paralelo com a hemostase secundária é também um processo enzimático no qual a plasmina cliva o coágulo de fibrina, insolúvel e reticulado, em produtos de degradação da fibrina solúveis, entre os quais os D-dímeros ^[19].

Os D-dímeros são indicadores específicos da fibrinólise utilizados no diagnóstico de embolia pulmonar e trombose venosa profunda.

Os distúrbios congênitos do sistema fibrinolítico são raros, contudo podem existir desequilíbrios e provocarem um aumento do risco de trombose ou hemorragias ^[19].

4.1.5.1. Avaliação laboratorial da hemostase

A avaliação laboratorial da hemostase *in vitro* no laboratório de Hematologia é realizada no equipamento ACL TOP 500[®] (Instrumentation Laboratory, Werfen), que utiliza como técnica de medida a turbidimetria.

Tempo de protrombina e Razão Internacional Normalizada

O tempo de protrombina (TP) é um ensaio que reflete a atividade dos fatores da via extrínseca e da via comum da cascata da coagulação.

O teste consiste na adição de um reagente de tromboplastina (fator tecidual), cloreto de cálcio e fosfolípidos à amostra de plasma. Após a sua adição, o fator tecidual do reagente inicia a via extrínseca da cascata da coagulação com consequente formação do coágulo de fibrina, sendo medido o tempo necessário à sua formação ^[16].

Uma das características da determinação do TP é que este não permite ser comparado entre diferentes laboratórios, devido à especificidade do equipamento e do reagente (tromboplastina) na determinação do teste. Logo, e de modo, a permitir uma harmonização

do parâmetro entre os vários laboratórios na monitorização de doentes com terapêutica anticoagulante, é determinada a razão internacional normalizada (INR), que como o nome indica é a razão entre o TP do paciente e o TP de referência, tendo como expoente o índice de sensibilidade internacional (ISI), ilustrado na Figura 5. O ISI é determinado comparando cada reagente com a tromboplastina padrão de referência internacional ^[16].

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

Figura 5: Cálculo da razão internacional normalizada (INR), tendo por base a razão entre o tempo de protrombina (TP) do paciente e o TP controlo, elevado ao expoente do índice de sensibilidade internacional (ISI) da tromboplastina. (Adaptado de ^[16]).

A determinação do TP e INR permitem suspeitar da presença de deficiências ou inibidores dos fatores da via extrínseca (fator VII) e fatores da via comum (fator X, V, II e fibrinogénio), bem como a monitorização da terapêutica com varfarina. Com efeito, a presença de um INR prolongado pode traduzir-se numa deficiência de vitamina K ou de qualquer fator depende desta vitamina, ou de um fator da via extrínseca, bem como a presença de doença hepática ou terapêutica com anticoagulantes ^[16].

Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada

A determinação do tempo de tromboplastina parcialmente ativada (aPTT) reflete a atividade da via intrínseca, incluindo o quinínogénio de alta massa molecular (HMWK), a pré-caliceína, os fatores XII, XI, IX, VIII e da via comum os fatores X, V, II e fibrinogénio. A sua determinação é importante na monitorização da terapêutica com heparina e rastreio de deficiências ou presença de inibidores dos fatores intrínsecos e/ou da via comum ^[19].

O teste para a determinação do aPTT utiliza um reagente que contém um ativador de contacto, a sílica, e fosfolípidos que são adicionados à amostra de plasma. Posteriormente, adiciona-se cloreto de cálcio levando assim à ativação subsequente dos fatores da coagulação, nomeadamente o fator XIIa, com formação de um coágulo de fibrina. O resultado é obtido com base no tempo necessário à formação do coágulo ^[16].

Um valor de aPTT prolongado pode dever-se essencialmente às seguintes causas: deficiência de fatores da coagulação, por exemplo verificado na Hemofilia A e na Hemofilia B, deficiência do fator de contacto, o HMWK, a pré-caliceína e o fator XII, a presença de um

inibidor não específico, como é o caso do anticoagulante lúpico e ainda devido ao efeito de medicação ou contaminação com heparina ^[19].

Quando se verifica esta situação, aPTT prolongado, é necessário proceder à realização de um teste de aPTT da mistura. Este teste consiste na junção em partes iguais de uma *pool* de plasma normal, isto é, cujos valores de aPTT estão dentro dos valores de referência, ao plasma em estudo.

Caso o aPTT da mistura se encontre dentro dos valores considerados normais, então podemos concluir que o plasma do paciente apresenta um défice de fatores, e, deve proceder-se à determinação isolada dos fatores da via intrínseca e da via comum da coagulação, sendo a situação mais comum o défice do fator VIII ou do fator IX. Por outro lado, se o aPTT da mistura se mantiver prolongado, podemos inferir que estamos na presença de um inibidor da cascata da coagulação, como é o caso do anticoagulante lúpico ^{[16][19]}.

Tempo de Trombina

O tempo de trombina (TT) é um ensaio que reflete a conversão do fibrinogénio em monómeros de fibrina pela adição de trombina bovina purificada, sendo medido o tempo necessário para a formação do coágulo.

O TT prolongado pode ser devido a hipofibrinogénemia e disfibrinogénemia, contaminação com heparina, produtos de degradação do fibrinogénio e presença de um inibidor da trombina ^[19].

Quantificação de Fibrinogénio

A determinação do fibrinogénio da amostra é baseada no método de *Clauss*, que consiste na adição de um excesso de trombina ao plasma diluído, isto é, elevadas concentrações de trombina e baixa concentração do substrato (fibrinogénio). O tempo de coagulação é proporcional à concentração de fibrinogénio presente na amostra.

O fibrinogénio é um marcador útil na avaliação de diversas doenças incluindo as disfunções hepáticas, quadros inflamatórios e tumores malignos ^[16].

Quantificação de D-dímeros

A quantificação dos D-dímeros da amostra é realizada por imunoensaio. Este ensaio utiliza uma suspensão de partículas de latex de poliestireno, às quais se junta um fragmento F(ab')₂ de um anticorpo monoclonal altamente específico contra o domínio D-dímero contido nos derivados solúveis da fibrina. Quando se adiciona a mistura à amostra com D-dímeros,

ocorre a aglutinação das partículas, sendo o grau de aglutinação diretamente proporcional à concentração dos D-dímeros da amostra.

Pesquisa do anticoagulante lúpico

O anticoagulante lúpico (AL) é um anticorpo antifosfolípido dirigido contra fosfolípidos com carga negativa ou complexos entre fosfolípidos e proteínas, incluindo a β_2 -glicoproteína I ou a protrombina. Normalmente, a presença de um aPTT prolongado, como referido anteriormente, está relacionado com a presença de um inibidor, neste caso o AL presente em indivíduos com lúpus eritematoso sistémico [16].

Na pesquisa do AL são realizados dois testes: teste de dRVVT (*dilute Russell's viper venom time*) *sreen* e confirmatório e o teste de SCT (*silica clotting time*) *sreen* e confirmatório. Ambos os testes de *screening* possuem uma baixa concentração de fosfolípidos, o que faz com que o reagente seja altamente sensível à presença do AL, alargando o tempo de coagulação na presença deste. Por outro lado, os testes confirmatórios utilizam uma elevada concentração de fosfolípidos neutralizando o AL e encurtando os tempos de coagulação [16].

O teste de dRVVT consiste na adição de veneno de víbora de Russell, cálcio e fosfolípidos, levando à ativação do fator X, com conseqüente formação de um coágulo de fibrina, evitando assim a ativação das vias extrínseca e intrínseca. Neste teste o AL ao ligar aos fosfolípidos impede a ação do veneno de víbora de Russell e prolonga o tempo de coagulação.

O teste de SCT utiliza a sílica que na presença do cálcio, ativa diretamente a via intrínseca da coagulação, levando à formação de um coágulo de fibrina.

Uma amostra é considerada positiva para a pesquisa de AL, sempre que o *ratio screen/confirmatório* for considerado acima da normalidade [16].

Para além da determinação dos parâmetros da hemostase anteriormente descritos, no setor de Hematologia, são ainda determinadas a proteína C, a proteína S, o fator VII, o fator VIII e o fator IX por técnicas imunoquímicas. Os valores de referência dos parâmetros acima enumerados encontram-se no Anexo I.

4.1.6. Técnicas de biologia molecular

No setor de Hematologia, o equipamento *GeneXpert (Werfen)*, utiliza como técnica de referência a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a deteção rápida das mutações pontuais do fator II (20210G>A) e do fator V *Leiden* (1691G>A), utilizados como auxiliares de diagnóstico de trombofilia congénita. Realiza também a deteção do gene de fusão BCR-ABL

auxiliar no diagnóstico de Leucemia Mieloide Crónica (LMC), bem como no direcionamento do seu tratamento e na monitorização da doença residual mínima em pacientes submetidos a transplante de medula óssea ^[21].

A LMC é um distúrbio mieloproliferativo resultante de uma expansão clonal da célula-estaminal hematopoiética multipotente transformada. Em cerca de 90% dos pacientes com LMC, esse evento de transformação corresponde à formação do cromossoma de *Philadelphia* [t (9; 22) (q34; q11)]. A proteína derivada desta fusão é uma tirosina-cinase citoplasmática que ativa várias vias de sinalização, levando ao crescimento descontrolado e inibição da apoptose das células neoplásicas ^[21].

4.1.7. Estudos de fenotipagem celular

A fenotipagem é fundamental no diagnóstico e monitorização de várias patologias oncológicas. Baseia-se na utilização da citometria de fluxo e tem como principal objetivo identificar as diferentes linhagens celulares, caracterizar e quantificar as populações celulares normais, estudar a maturação celular, identificar e quantificar células anómalas e auxiliar o diagnóstico de acordo com o fenótipo observado em cada patologia, sendo os mais comuns os linfomas e as síndromes mieloproliferativas ^[22].

Os estudos de imunofenotipagem são realizados no citómetro de fluxo *Cytomics FC 500 Series (Beckman Coulter)*, cujo princípio de funcionamento está representado na Figura 6. Os estudos de fenotipagem celular são realizados maioritariamente em células de sangue periférico, pelo que a amostra predominante é o sangue colhido para tubo com EDTA (K₃), mas também são utilizados aspirados de medula óssea para a determinação da sua expressão celular.

A análise da amostra inicia-se quando as células em suspensão são conduzidas por um fluxo criado por um fluido isotónico, *FACS Flow*, na corrente de fluxo laminar. As células são forçadas a passar, individualmente, através da câmara de fluxo a qual contém dois feixes de luz monocromática, geralmente raios laser, separados fisicamente e com comprimentos de onda pré-definidos ^[22].

O citómetro contém, ainda, dois sensores que avaliam a dispersão da luz em diferentes ângulos, o sensor FS (*Forward Scatter*), que deteta a luz que é dispersa na direção frontal e fornece informação sobre o tamanho da célula, e o sensor SS (*Side Scatter*), que deteta a luz dispersa na direção lateral (90°) e avalia a complexidade celular.

Além dos sensores de dispersão da luz o citómetro de fluxo possui sensores especializados na medida de fluorescência. Neste caso, às amostras são adicionados anticorpos

monoclonais conjugados com fluorocromos (FITC, PE, PC5 e PC7) que se ligam a proteínas específicas presentes na membrana celular ou no interior da célula, e que emitem fluorescência a diferentes comprimentos de onda ^[23].

Os sinais luminosos são detetados por fotomultiplicadores e posteriormente convertidos em histogramas através de *software* adequado ^[22].

Na Tabela 8 encontram-se algumas expressões características dos “*cluster of differentiation*” (CD) mais significativos no diagnóstico de patologias oncológicas.

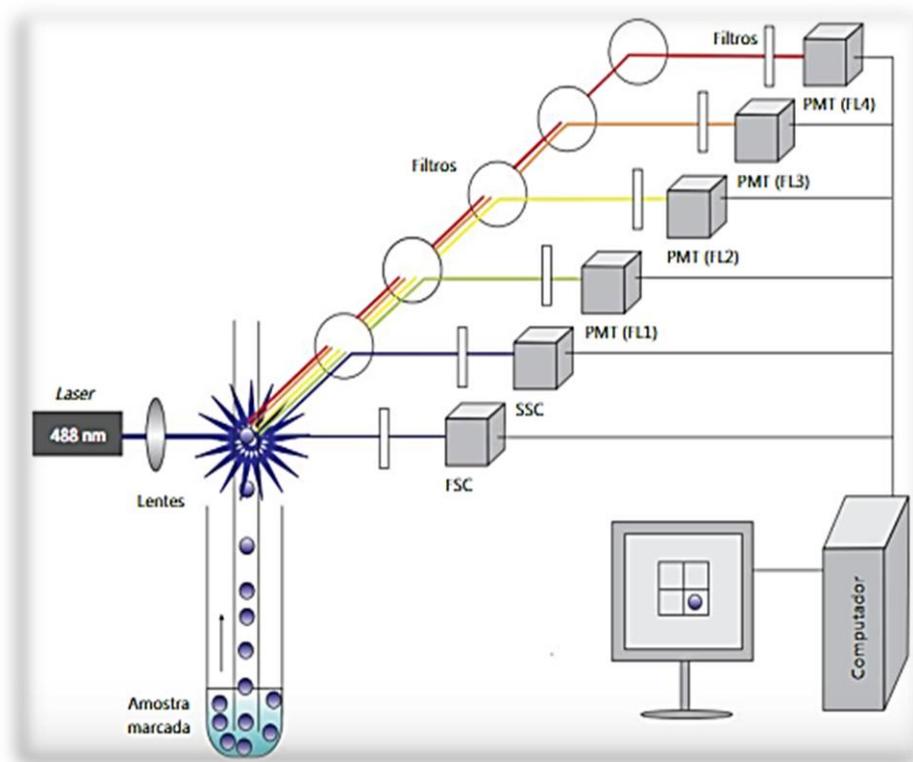


Figura 6: Esquema do funcionamento global de um citômetro de fluxo. O citômetro de fluxo representado na figura permite a detecção da dispersão da luz, pelos sensores FSC e SSC, e a detecção da emissão de fluorescência pelos sensores PMT. Esta informação é posteriormente transformada num sinal eletrônico e apresentada sob a forma de gráficos. (Adaptado de ^[23]).

Tabela 8: Neoplasias hematológicas mais observadas e expressão do CD que lhe é característica. (Adaptado de ^[22]).

Neoplasia	Expressão do CD
LLC	CD5 +; CD10 -; CD 20 +; CD23 +; CD 43 +.
LMC	CD5 +; CD10 -; CD23 -; CD43 +.
Linfoma folicular	CD5 -; CD10 +; CD20 +; CD23 +/-; CD43 -.
Linfoma de MALT	CD5 -; CD10 -; CD20 +; CD23 +/-; CD43 +/-
Linfoma de Burkitt	CD5 -; CD10 +; CD20 +; CD23 -; CD43 -.
Mieloma múltiplo	CD 10 -; CD 20 -; CD38 +; CD 138+; CD 45 +; CD 117+.

Legenda: (+) Expressão positiva; (-) Expressão negativa.

4.2. Setor de Imunologia e Hormonologia

No setor de Imunologia e Hormonologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG efetuam-se análises diversas, desde a avaliação de marcadores de infeção e inflamação (proteínas de fase aguda), hormonas, auto-anticorpos até à monitorização de fármacos e quantificação de marcadores tumorais.

4.2.1. Amostras biológicas

O setor de Imunologia e Hormonologia recebe, maioritariamente, amostras de sangue periférico, sem anticoagulante, que após retração do coágulo e centrifugação permite a obtenção do soro.

Após a receção das amostras, são realizadas ações de modo a verificar a qualidade da mesma em associação com o protocolo a realizar e consoante o tipo de estudo prescrito. Assim, após a centrifugação devemos garantir que o soro não possui fibrina, nem se encontra hemolisado. A hemólise pode gerar resultados falso-positivos de alguns parâmetros tais como a enolase neuro-específica (NSE) e a vitamina B₁₂.

São ainda recebidas amostras de sangue periférico em EDTA (K₃), para a determinação plasmática da concentração de metabolitos como a renina, a hormona adrenocorticotrófica (ACTH), metanefrina, normetanefrina, 3-metoxitiramina e a paratormona intacta (PTH).

Com menor frequência, são avaliadas amostras de urina de 24 horas, saliva e outros fluídos biológicos. Aos contentores de urina fornecidos aos doentes para a colheita de urina de 24 horas é adicionado ácido clorídrico (HCl 6N), como preservante e estabilizador. Na urina de 24 horas com HCl 6N é feita a quantificação do ácido 5-hidroxi-indolacético, ácido vanilmandélico e das metanefrinas fraccionadas. Por outro lado, a urina de 24 horas sem adição de HCl é utilizada na determinação do cortisol e na pesquisa da proteína de *Bence Jones*.

4.2.2. Técnicas imunoquímicas

O setor de Imunologia e Hormonologia possui, atualmente, uma vasta gama de equipamentos dotados de uma tecnologia automática comum a todos, os ensaios imunoquímicos ou imunoensaios, mas com técnicas de deteção distintas como apresentado a seguir.

Os imunoensaios baseiam-se na interação específica que resulta da complementaridade entre um antígeno e um anticorpo. O antígeno, por definição, é uma molécula que se pode ligar específica e irreversivelmente a um anticorpo. Por sua vez, um anticorpo, ou

imunoglobulina solúvel, é uma proteína segregada pelos plasmócitos que se liga a moléculas antigénicas específicas, presentes quer na corrente sanguínea quer nos tecidos, de forma a desencadear uma resposta imunológica com vista à destruição do agente estranho ao organismo ^[23].

A ligação antígeno-anticorpo depende de vários fatores, entre os quais, a afinidade, a avidéz e a concentração das duas moléculas. De forma a minimizar as interferências envolvidas nesta reação são utilizados anticorpos monoclonais que conferem uma maior especificidade e sensibilidade analítica ^[23].

A formação dos imunocomplexos assenta em dois princípios: ensaios competitivos e ensaios não competitivos. A forma como o imunocomplexo é detetado depende do marcador utilizado, podendo ser uma enzima, um isótopo radioativo ou um fluorocromo ^[24].

Um ensaio competitivo, tal como ilustrado na Figura 7, baseia-se na competição entre o antígeno presente na amostra e um antígeno análogo pela ligação ao anticorpo específico presente normalmente numa matriz sólida. Após a lavagem, é adicionado um anticorpo secundário conjugado. Por exemplo, no caso de o ensaio utilizar como marcador uma enzima, a mais utilizada é a fosfatase alcalina, que hidrolisa o substrato levando a uma alteração da cor da reação. A intensidade da cor é inversamente proporcional à quantidade de antígeno em solução ^[25].

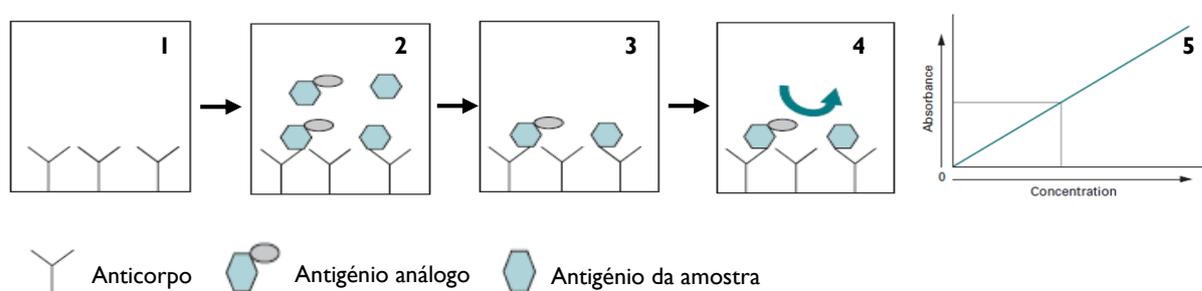


Figura 7: Representação esquemática de um ensaio competitivo. 1- Anticorpo específico presente na matriz sólida; 2- Adição da amostra (antígeno) seguida da adição de um antígeno análogo; 3- Competição entre o antígeno da amostra com o antígeno análogo pela ligação ao anticorpo; 4- Adição de um substrato específico do marcador utilizado na reação; 5- A intensidade da cor é inversamente proporcional à quantidade de antígeno em solução. (Adaptado de ^[24]).

Os ensaios não competitivos, ou em “sandwich”, representado na Figura 8, utilizam um anticorpo monoclonal imobilizado na matriz sólida. Ao ser adicionada a amostra, o antígeno de interesse liga-se ao anticorpo. A amostra não ligada é removida por lavagem e é adicionado um anticorpo secundário específico para o antígeno. Num método direto, o anticorpo secundário está marcado, usualmente com uma enzima. Caso se trate de um método indireto, o anticorpo secundário não é conjugado, e assim, é necessário a adição de um terceiro

anticorpo conjugado com um marcador, geralmente uma enzima, contra a porção Fc do segundo anticorpo. A quantidade de cor é diretamente proporcional à concentração do antígeno da amostra ^[25].

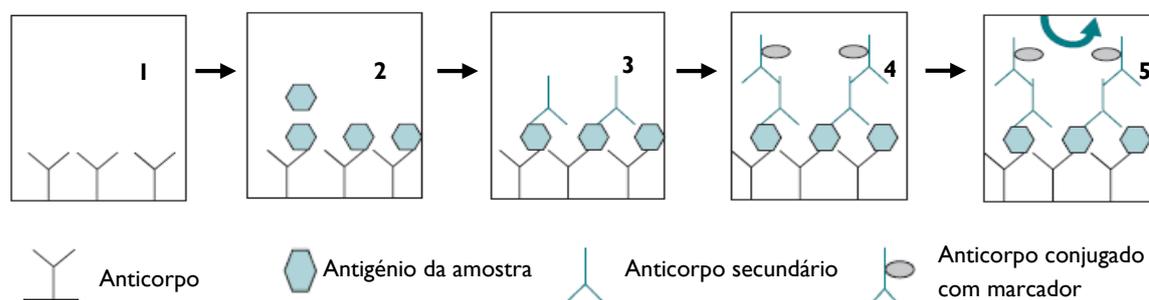


Figura 8: Representação esquemática de um ensaio não competitivo (indireto). 1- Anticorpo imobilizado na matriz sólida; 2- Adição da amostra (antígeno) liga-se ao anticorpo; 3- Adição do anticorpo secundário; 4- Adição do terceiro anticorpo conjugado com um marcador (enzima); 5- Adição do substrato específico da reação. (Adaptado de ^[24]).

De seguida irei apresentar de uma forma resumida os diversos parâmetros analisados, agrupados de acordo com o autoanalisador onde é feita a sua avaliação. No Anexo II encontram-se apresentados os valores de referência dos parâmetros analisados.

Ensaio de quimioluminescência (“Chemiluminescence Immunoassays”)

Os imunoensaios quimioluminescentes (CLIA) são realizados nos equipamentos *Immulite® 2000 XPi (Siemens)*, *ADVIA Centaur® XP (Siemens)* e *Liaison® (DiaSorin)*, diferindo apenas no composto quimioluminescente utilizado. Este ensaio baseia-se na emissão de energia luminosa gerada a partir de uma reação química, na maioria das vezes uma reação de oxidação, entre o substrato quimioluminescente e o peróxido de hidrogénio ^[25].

Neste imunoensaio o anticorpo específico encontra-se ligado à fase sólida utilizada, as esferas de poliestireno. Após a adição da amostra, existe a formação do complexo antígeno-anticorpo ^[25].

Caso se trate de um ensaio não competitivo, é adicionado um anticorpo secundário conjugado com uma enzima, usualmente a fosfatase alcalina, que hidroliza o substrato quimioluminescente, com consequente emissão de luz. Por sua vez, se for um ensaio competitivo a enzima utilizada encontra-se ligada ao antígeno análogo do analito ^[25].

Na Tabela 9, encontram-se representados os parâmetros analíticos avaliados pela tecnologia CLIA.

Tabela 9: Parâmetros analíticos determinados pela tecnologia CLIA.

Equipamento	Parâmetros analíticos		
	Marcadores tumorais	Hormonas	Outros parâmetros
<i>Immulite® 2000 XPi</i> (Siemens)	CEA; AFP; BMG; PSA livre e total.	Calcitonina; ACTH; AND; EPO; GAS; hCG; GH.	Anti-TG; IGF I; TSI; Anti-TPO.
<i>ADVIA Centaur® XP</i> (Siemens)		FSH; PRL; LH; Vitamina D; TSH; PTH; PRGE; E2; DHEAS.	FER; IgE total.
<i>Liaison®</i> (DiaSorin)	VHS 1 e 2 (IgG e IgM); TOX (IgG e IgM); RUB (IgG e IgM); EBV-VCA (IgG); Anti-EBNA (IgG); Anti-EA (IgG); EBV (IgM).		

Eletoquimioluminescência (“Electrochemiluminescence Immunoassays”)

Os ensaios eletroquimioluminescentes (ECLIA) são realizados no equipamento *Cobas e601 Analyser®* (Roche Diagnostics). Este ensaio corresponde a um processo que utiliza espécies altamente reativas, o complexo de rutênio $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ e a tripropilamina (TPA), que reagem entre si, quando são eletricamente estimuladas, com consequente emissão de energia luminosa [26].

Ao ser aplicada uma tensão ao eletrodo de platina é criado um campo elétrico que favorece a reação química entre a TPA e o complexo de rutênio, ocorrendo uma série de reações de oxidação e redução à superfície do eletrodo [26].

Este autoanalisador utiliza o princípio não competitivo, ilustrado na Figura 9, o que requer a utilização de dois anticorpos, um anticorpo biotinilado e um segundo anticorpo específico do antígeno da amostra marcado com o complexo de rutênio.

Numa segunda fase da reação, o anticorpo biotinilado liga-se à superfície das microesferas revestida de estreptavidina, com formação do imunocomplexo. Os imunocomplexos são magneticamente capturados pelo eletrodo de platina. Quando aplicada uma corrente elétrica ocorre a emissão de luz pelo complexo de rutênio. A quantidade de luz produzida é diretamente proporcional à quantidade do analito da amostra [26].

Na Tabela 10 encontram-se os parâmetros avaliados com base neste princípio.

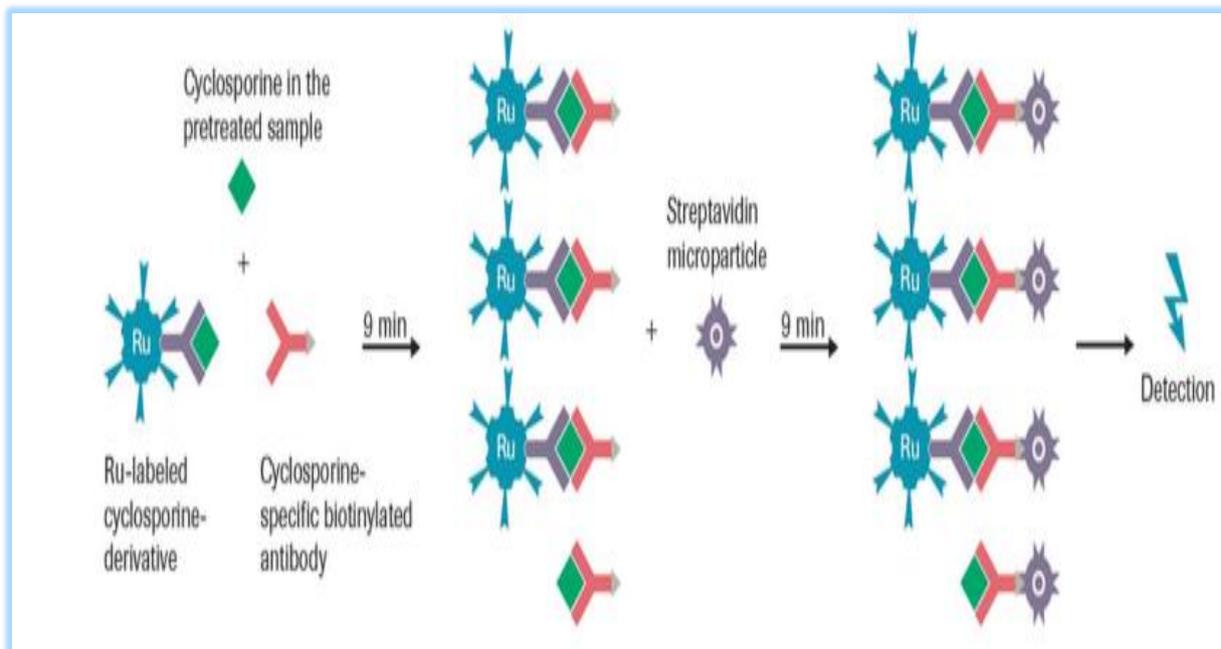


Figura 9: Representação esquemática de um ensaio eletroquimioluminescente não competitivo (exemplo de detecção da ciclosporina). Na primeira reação é adicionado o antigénio da amostra juntamente com um anticorpo biotinizado e um anticorpo marcado com o complexo de rutênio. Na segunda reação ocorre a formação do imunocomplexo que se liga às microesferas revestidas com estreptavidina. Por fim, ocorrem reações de oxidação e redução gerando a emissão de luz pelo complexo de rutênio. (Adaptado de [26]).

Tabela 10: Parâmetros analíticos avaliados com base no princípio ECLIA

Parâmetros analíticos		
Marcadores tumorais	Hormonas	Outros parâmetros
CA 125; CA 19.9; CA 72.4; Cyfra 21.1; NT-PróBNP; HE-4; Pró-GRP.	T3 e T4 (livre e total); Testosterona total; TG; Cortisol; hCT.	TRAB's; Vitamina B ₁₂ ; Ácido fólico;

“Time Resolved Amplified Cryptate Emission”

A tecnologia “Time Resolved Amplified Cryptate Emission” (TRACE) é utilizada no equipamento *Krytor*[®] (*Brahms*). Esta tecnologia tem por base a transferência de energia da molécula dadora (fluorocromo de criptato de európio) para a molécula recetora (fluorocromo XL665) como resultado de uma reação imune [27].

Este é um ensaio homogéneo não competitivo, como tal utiliza dois anticorpos específicos do antigénio da amostra marcados com os fluocromos acima referidos. Quando existe a formação do imunocomplexo, ocorre a transferência de energia da molécula dadora

para a molécula recetora. A intensidade do seu sinal é proporcional à concentração do analito da amostra ^[27].

O equipamento quantifica os seguintes parâmetros analíticos: CA 15.3, a procalcitonina, a enolase neuro-específica (NSE), a prolactina, a cromogranina A e o antigénio do carcinoma de células escamosas (SCC).

Imunoensaio multiplicado por uma enzima (“Enzyme-multiplied Immunoassay Technique”)

O imunoensaio multiplicado por uma enzima (EMIT), representado na Figura 10, é utilizado no autoanalisador *Viva-E Syva Onboard*[®] (Siemens), na monitorização fármacos.

O EMIT é um ensaio competitivo em fase homogénea, o qual utiliza uma enzima, tipicamente a glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH), que é ativada quando se liga ao complexo antigénio-anticorpo ^[28].

Quando a concentração do fármaco da amostra é elevada, existe a formação de um imunocomplexo, entre anticorpo e o antigénio da amostra (fármaco), a enzima G6PDH fica livre e vai hidrolisar o substrato e assim reduzir o cofator NAD^+ a NADH , sendo medida a sua absorvância a 340 nm. A quantidade de analito marcado com a enzima não ligada é diretamente proporcional à concentração do fármaco presente na amostra ^[28].

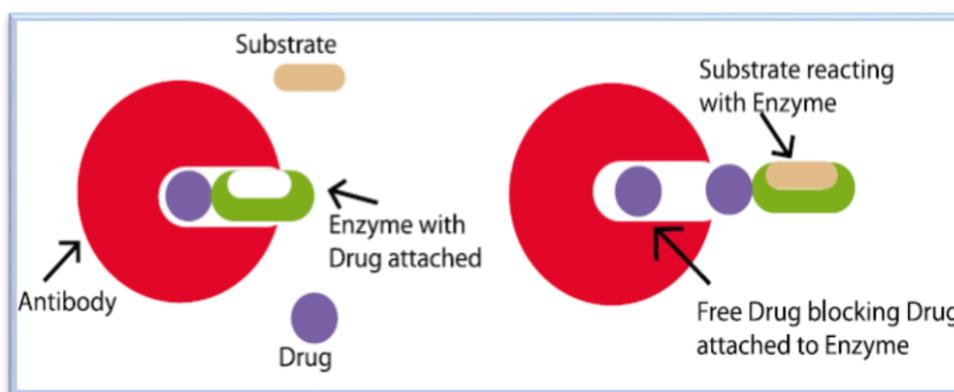


Figura 10: Representação esquemática da tecnologia EMIT utilizada na monitorização de fármacos. É um ensaio que requer a presença do antigénio livre (fármaco da amostra), e de um fármaco ligado à enzima G6PDH e um anticorpo. Após a adição do substrato à reação existe a redução do NAD^+ a NADH , cuja absorvância é convertida na concentração do fármaco livre em solução. (Adaptado de ^[25]).

Nefelometria e Turbidimetria

O equipamento *BN ProSpec*[®] (Siemens) utiliza como técnica de deteção a nefelometria. Com base nesta técnica são quantificados os seguintes parâmetros analíticos: proteína C

reativa, ferritina, recetores solúveis da transferrina (sTfR), IgM, IgG, IgA, haptoglobina, fator reumatoide, transferrina, C3, C4 e α_1 -antitripsina.

Os ensaios nefelométricos assentam no princípio de o complexo antigénio-anticorpo presente na solução dispersar luz em vários ângulos relativamente à direção da luz incidente. O nefelómetro utiliza uma fonte de luz de alta intensidade que atravessa a *cuvette* da reação, que contém o imunocomplexo, e um fotodetector que avalia o sinal de dispersão da luz. A quantidade de luz dispersa é diretamente proporcional à quantidade de analito presente na amostra ^[25].

O equipamento *Optilite*[®] (*Binding Site*) utiliza a turbidimetria e nele são avaliadas as cadeias leves *Kappa* e *Lamba*.

A turbidimetria mede a diminuição da intensidade do feixe de luz incidente ao passar pelas partículas em suspensão, isto é, o complexo antigénio-anticorpo formado, medindo a luz não dispersa ^[25].

Para além da vasta automatização do laboratório, existem determinados metabolitos, presentes quer no soro quer na urina, cuja quantificação é efetuada com recurso a radioimunoensaios (RIA), quer competitivos quer não competitivos.

Um ensaio competitivo permite a deteção e quantificação de pequenas quantidades de metabolitos. Esta reação utiliza um antigénio análogo marcado com um isótopo radioativo, tipicamente o Iodo 125, que compete com o antigénio não marcado pelos locais de ligação do anticorpo fixo na matriz sólida ^[25]. A sua quantificação e deteção são realizadas no contador, *Wallac Wizard 1470 Gamma Counter* (*Meditecno*).

Visto serem técnicas manuais, requerem a realização de uma curva de calibração, obtida com soluções de concentração conhecida e a partir desta é que se determina a concentração do analito presente na amostra.

No soro são avaliados a aldosterona, a metanefrina, normetanefrina e 3-metoxitiramina, a testosterona livre, a dehidroepiandrostenediona e a estrona. Na urina de 24 horas são quantificados manualmente as metanefrinas fraccionadas, o ácido vanilmandélico, o ácido 5-OH-indolacético e o cortisol.

4.2.3. Marcadores tumorais

O laboratório de Imunologia e Hormonologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG tem um papel de extrema importância na determinação sérica dos marcadores

tumorais, visto estes auxiliarem na deteção, monitorização e resposta à terapêutica aplicada a cada doente oncológico.

O marcador tumoral define-se como uma molécula de largo espectro, de características muito variáveis, produzida ou induzida por uma célula neoplásica, ou pelo microambiente do hospedeiro, em resposta a um tumor e que reflete o crescimento e/ou atividade do tumor maligno de modo a diferenciar-se do tecido normal ^[29].

Um marcador tumoral ideal, clinicamente, deve possuir três características: ser altamente específico para um determinado tipo de neoplasia correlacionando-se com o órgão que lhe é específico, como por exemplo o PSA total, que é sintetizado nas células prostáticas; ter elevada sensibilidade, de modo a auxiliar na deteção de pequenos tumores, permitindo o diagnóstico precoce do tumor primitivo ou de recidivas, evitando resultados falso-positivos; fornecer um diagnóstico clínico precoce e auxiliar na monitorização da terapêutica ^[29] ^[30].

A especificidade dos marcadores tumorais não está relacionada com a sua presença nos fluidos biológicos, visto estes poderem ser libertados também por células não neoplásicas, mas pelos valores de concentração detetados em situações consideradas malignas. Em diversas patologias benignas que afetam os tecidos produtores destas substâncias pode ocorrer um aumento sérico, dando lugar a resultados falso-positivos ^[30].

A sensibilidade dos marcadores tumorais é definida com base na presença de maiores quantidades destes no tecido maligno ou em circulação no sangue. Pode ser influenciada por vários fatores desde a localização e a vascularização celular, o número e localização dos nódulos tumorais, pois, quanto maior a invasão celular maior a facilidade de acesso à circulação sanguínea, os mecanismos de secreção e eliminação do organismo que estão condicionados pelo tempo de vida média plasmática do marcador tumoral e a resposta a tratamentos neoplásicos ^[30].

Atualmente sabe-se que um marcador tumoral clinicamente ideal não existe, daí que o diagnóstico clínico de uma neoplasia, nunca deve assentar somente na sua quantificação. Para o seu diagnóstico clínico o médico deve ter sempre em consideração toda a história clínica e familiar do doente, exame físico e a realização de outros exames complementares de diagnóstico, como é o caso de exames imagiológicos e biópsias ^[30].

Bioquimicamente os marcadores tumorais podem ser divididos em vários tipos: antigénios oncofetais, mucinas, citoqueratinas, enzimas, hormonas e genes (supressores de tumores e oncogenes).

Neste setor são frequentemente analisadas na rotina diária do laboratório grande número de marcadores tumorais. Seguidamente, irei dar a conhecer algumas bases teóricas dos marcadores tumorais mais requeridos.

4.2.3.1. Antígenos oncofetais

São proteínas produzidas durante a vida fetal, mas que normalmente deixam de ser expressas durante a vida adulta. Em pacientes com neoplasias, estas proteínas reaparecem em maior concentração, revelando genes que sofreram uma reativação devido a uma transformação maligna das células ^[29].

α - Fetoproteína

A α - fetoproteína (AFP) é uma glicoproteína que existe nas primeiras semanas do desenvolvimento embrionário, sendo sintetizada no saco vitelino em grandes concentrações, passando posteriormente a ser sintetizada no fígado fetal, cujos níveis diminuem gradualmente após o nascimento.

É um marcador tumoral do carcinoma hepatocelular e tumores de células germinativas. Resultados falso-positivos estão associados a hepatopatias benignas, agudas ou crônicas, como cirrose hepática, infecciosas (hepatite), tóxicas devido ao uso de fármaco hepatotóxicos ou na gravidez ^[30].

Antígeno Carcinoembrionário

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína secretada pelo epitélio gastrointestinal durante a vida fetal e detetada em níveis muito baixos após o nascimento.

Encontra-se elevado em vários tipos de neoplasia, como no carcinoma colo-retal, gástrico, pulmonar, mama, pancreático, ovárico e uterino.

É importante mencionar que este pode estar elevado em algumas doenças benignas, como hepatite, cirrose, enfisema pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crônica, colite, artrite reumatóide e pancreatite. O seu aumento também pode estar associado a fumadores.

Trata-se, portanto, de um marcador de baixa especificidade e sensibilidade, pelo que não deve ser usado como diagnóstico, deve ser requerido no acompanhamento da resposta ao tratamento cirúrgico, quimioterapia e/ou no diagnóstico de recidivas ^[29].

Antígeno do Carcinoma de Células Escamosas

O antígeno do carcinoma de células escamosas (SCC) é uma glicoproteína que pode ser detetada imunohistoquimicamente no tecido escamoso da vulva, do exocérvix, do pulmão e do esófago, cuja expressão aumenta quando existe transformação maligna destas células.

Posto isto, o SCC tem concentrações elevadas no cancro do colo do útero, pulmão, pele, cabeça, pescoço, trato digestivo, ovários e trato urogenital ^[29].

4.2.3.2. Enzimas

As enzimas foram dos primeiros grupos de marcadores tumorais identificados. Estas encontram-se maioritariamente presentes no interior das células e são libertadas para a circulação sanguínea aquando uma situação de necrose ou após uma alteração na permeabilidade da membrana celular ^[29].

Enolase neuro-específica

A enolase neuro-específica (NSE) é uma enzima glicolítica que catalisa a reação de conversão do 2-fosfo-D-glicerato a fosfoenolpiruvato, na via glicolítica. Existem várias isoformas da enzima com subunidades imunologicamente diferentes (α , β e γ), sendo as isoformas $\alpha\gamma$ e $\gamma\gamma$ da enolase denominadas de enolase neuro-específica ^[29].

A NSE está presente no tecido neuronal e nas células neuroendócrinas, sendo libertada para a corrente sanguínea numa situação de lise celular. Concentrações séricas elevadas de NSE estão normalmente associadas a tumores com origem neste tipo de células e são sugestivas de mau prognóstico ^[29].

Este marcador tumoral também está associado ao carcinoma brônquico de pequenas células, neuroblastoma, feocromocitoma, carcinoma medular da tiróide, melanoma e tumor endócrino pancreático ^[29].

Antigénio específico da próstata

O antigénio específico da próstata (PSA) é uma serina-protease sintetizado em forma de precursor, o pró-PSA, no retículo endoplasmático rugoso das células epiteliais da próstata.

O PSA total é considerado um marcador tumoral específico da próstata, permitindo detetar e monitorizar o tratamento da neoplasia da próstata. Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade é o único marcador tumoral que pode ser usado como rastreio do cancro da próstata ^[30].

As principais causas do seu aumento na ausência de neoplasia maligna são as prostatites e a hipertrofia benigna da próstata ^[30].

4.2.3.3. Glicoproteínas

CA 15.3

O CA 15.3 é um epítopo presente na mucina-I (MUC1) do sangue periférico. A MUC1 é expressa na zona apical das células epiteliais secretoras e tem como função proteger e lubrificar as células circunjacentes.

No carcinoma da mama, a MUC1, é expressa em excesso e libertada para a corrente sanguínea causando, assim um aumento da concentração do CA 15.3.

Um aumento dos níveis de CA 15.3 pode indicar a evolução da doença devido ao aparecimento de novas metástases ou recidivas. Este encontra-se em concentrações elevadas em outras neoplasias malignas, incluindo a próstata, o estômago, o ovário, o colón e o reto [30].

CA 125

O CA 125 é um epítopo de uma glicoproteína da família das mucinas.

Este marcador tumoral permite a avaliação da evolução e a resposta à terapêutica do carcinoma do ovário, sobretudo no adenocarcinoma seroso, bem como detetar precocemente as recidivas.

Os níveis de CA 125 pode encontrar-se elevados noutros tipo de cancro, como é o caso do cancro do pulmão, do útero, do rim e do estômago. Em condições benignas encontram-se aumentados em processos inflamatórios, cirrose hepática, endometriose e gravidez [30].

CA 19.9

O CA 19.9 está associado a tumores sintetizados pelas células pancreáticas e dos ductos biliares. Os seus níveis podem ser utilizados na monitorização e resposta à terapêutica de doentes com carcinoma do pâncreas [29].

Para além disso, o CA 19.9 encontra-se elevado em pacientes com cirrose, hepatite, pancreatite e patologia gastrointestinal não maligna [30].

Proteína 4 do epidídimo humano

O gene WFDC2 expressa a proteína 4 do epidídimo humano (HE4), uma proteína, secretada no epidídimo que pertence à família dos inibidores de proteases, envolvidas na função imunológica [29].

A HE4 encontra-se elevada em patologias oncológicas como a neoplasia da mama, do endométrio, gastrointestinal e pulmão e na doença ginecológica benigna [29].

Os resultados do HE4 em conjunto com o CA 125, permitem distinguir mulheres com metástases no ovário de mulheres normais ou com processos benignos, podendo-se constatar que a combinação dos dois marcadores tumorais permite uma maior precisão no diagnóstico de neoplasias do que o uso de marcadores individuais [30].

4.2.4. Proteínas plasmáticas

O estudo das proteínas plasmáticas é outro campo de estudo do setor, sendo fundamental no diagnóstico e monitorização de anomalias do perfil proteico, incluindo as gamapatias.

O plasma humano contém um grande número de proteínas identificáveis, sendo mais abundantes as proteínas secretadas diretamente na circulação sanguínea pelo fígado e as imunoglobulinas produzidas pelos linfócitos B. Daí ser fundamental a avaliação da sua concentração total sérica, bem como a avaliação de diferentes frações proteicas. Estas servem como marcadores úteis de fisiologia e de doença [31].

No conjunto das proteínas plasmáticas podemos incluir as proteínas de transporte, os anticorpos, as enzimas, os inibidores e os fatores da coagulação [31].

No setor de Imunologia e Hormonologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG, o estudo das proteínas séricas segue um protocolo pré-definido que inclui para além da quantificação das proteínas totais a realização de um proteinograma e imunofixação.

A quantificação das proteínas totais permite averiguar o estado nutricional do indivíduo e inferir sobre a síntese proteica. Um aumento da concentração das proteínas totais, hiperproteïnemia, deve-se essencialmente ao aumento da síntese proteica e/ou hemoconcentração resultante de desidratação do indivíduo. Contrariamente, uma diminuição da sua concentração, hipoproteïnemia, pode ser provocada por uma hemodiluição resultante do aumento da volémia, por exemplo, devido ao uso de soros parentéricos, à redução do aporte proteico resultante de uma má nutrição, ao aumento da sua eliminação em casos de lesão renal e em estados fisiológicos, como a gravidez.

As proteínas totais urinárias, quantificadas na urina de 24 horas, são um bom indicador da função renal, sendo o seu aumento sugestivo de lesão renal [32].

O proteinograma é uma técnica simples que permite separar as diferentes proteínas séricas. Este é realizado no equipamento *semiautomático HYDRASIS SCAN (Sebia Electrophoresis)*.

Neste procedimento, a amostra de soro, é aplicada sobre um meio de suporte, um gel de agarose, a pH alcalino (pH=8.6), em seguida é aplicada uma corrente elétrica que causa a migração da amostra do pólo negativo (cátodo) para o pólo positivo (ânodo) [33].

A separação proteica ocorre de acordo com a massa molecular e com a carga elétrica das proteínas, permitindo a identificação das frações, descritas adiante e representadas na Figura 11: pré-albumina, albumina, α_1 – globulina, α_2 – globulina, β_1 – globulina, β_2 – globulina e γ -globulinas.

Por fim, as proteínas separadas são coradas com negro de amido, fixadas e avaliadas por densitometria, dando a quantificação relativa de cada fração. Os resultados obtidos são apresentados sob a forma de espectro eletroforético no qual está representado a percentagem (%) do pico que permite a partir do valor da concentração total calcular a concentração de cada fração (g/L).

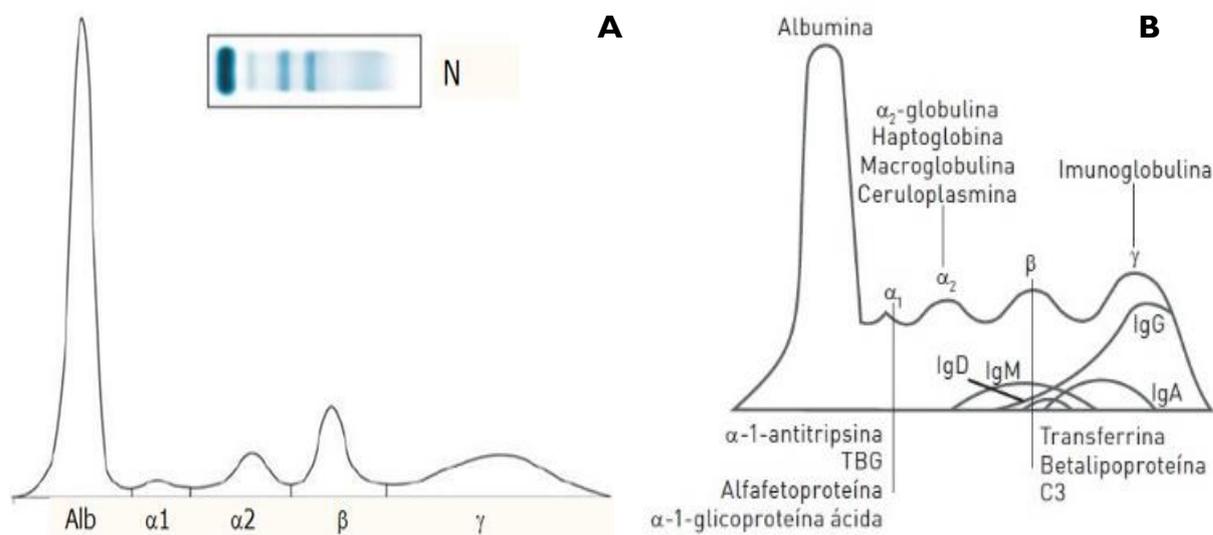


Figura 11: Perfil eletroforético normal. **A-** Representação das diferentes frações identificadas no perfil eletroforético normal; **B-** Descrição detalhada das principais proteínas plasmáticas presentes em cada fração do perfil eletroforético. (Adaptado de [34]).

4.2.4.1. Interpretação das principais alterações verificadas no proteinograma

Pré-albumina (transtirretina) e proteína de ligação ao retinol

A transtirretina, termo comumente usado para a pré-albumina, é uma proteína sintetizada no fígado e tem como funções transportar a hormona tiroxina (T4) e auxiliar no transporte do retinol através da formação de um complexo com a proteína de ligação ao retinol (RBP), dos hepatócitos para os tecidos de todo o organismo [31].

Devido à sua baixa concentração no soro, e pelo facto de apresentar um tempo de semi-vida curto, estas proteínas raramente são observadas no perfil eletroforético. Contudo o seu aparecimento pode ser devido a alterações do estado funcional hepático, do aporte alimentar ou a situações de desnutrição ^[31].

Albumina

É a proteína mais abundante no plasma, corresponde a cerca de 60% da concentração total das proteínas, sendo sintetizada exclusivamente pelos hepatócitos e com um tempo de vida-média plasmática normal de 15 a 19 dias. Possui um papel fundamental no transporte de diferentes substâncias ^[35].

A hipoalbuminémia, isto é, a diminuição da concentração sérica da albumina, pode resultar de diversas situações, nomeadamente da diminuição da sua síntese, aumento do *turnover* metabólico, perdas renais (por exemplo na síndrome nefrótica), perdas gastrointestinais, desnutrição e queimaduras. Os níveis de albumina encontram-se aumentados em pacientes com desidratação ^[35].

α_1 -Globulina

A fração α_1 -globulina compreende, essencialmente, a α_1 -antitripsina, cerca de 90%, a α_1 -glicoproteína ácida e a α -fetoproteína ^[35].

A α_1 -antitripsina é uma proteína de fase aguda e pode ser encontrada em outros fluidos orgânicos, como lágrimas, sémen e líquido amniótico. A sua deficiência está associada a enfisema pulmonar e a cirrose hepática.

No caso da α_1 -glicoproteína ácida, as concentrações plasmáticas aumentam em resposta a inflamação ou necrose tecidual, neoplasias, pós-trauma ou cirurgias.

Por sua vez, a α -fetoproteína encontra-se elevada em situações malignas como nos hepatocarcinomas e em situações fisiológicas consideradas benignas, como na gravidez ^[31].

α_2 -Globulinas

Nesta fração migram a haptoglobina, a α_2 -macroglobina e a ceruloplasmina ^[35].

Os níveis de haptoglobina e de ceruloplasmina podem apresentar-se elevados em numerosas situações que levam a reações de fase aguda. A concentração da ceruloplasmina aumenta na terapêutica com estrogénios e diminui na doença de *Wilson*, desnutrição e

síndrome nefrótica. Por outro lado, a haptoglobina encontra-se diminuída nas hepatopatias graves e na hemólise eritrocitária ^[31].

A α_2 -macroglobulina é sintetizada pelos hepatócitos, sendo o seu principal significado clínico associado à síndrome nefrótica ^[34].

O perfil típico observado na síndrome nefrótica, representado na Figura 12, é caracterizado por hipoalbuminemia, devida a alterações da permeabilidade glomerular com consequente perda de proteínas, e um aumento da α_2 -macroglobulina, à custa da retenção de proteínas de elevada massa molecular, causando assim um aumento da fração ^[31].

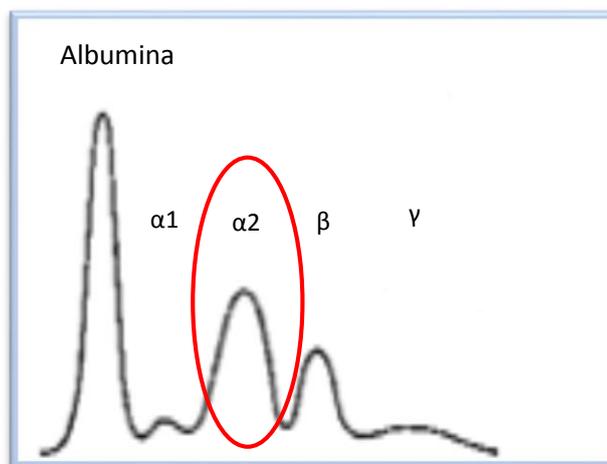


Figura 12: Perfil eletroforético característico da síndrome nefrótica, no qual se observa um aumento da fração α_2 -globulina devido ao aumento da α_2 -macroglobulina. (Adaptado de ^[34]).

β -Globinas

A fração β é composta por um grupo heterogêneo de proteínas, entre as quais: β -lipoproteínas, transferrina, componente C3 do complemento e outros componentes do sistema do complemento, β_2 -microglobulina e antitrombina III ^[31].

Na cirrose hepática ocorre uma alteração típica desta fração, tal como representado na Figura 13. A cirrose hepática é caracterizada anatomicamente por um processo de fibrose e formação de nódulos, frequentemente acompanhado por necrose hepatocelular ^[31].

Nesta patologia, existe uma diminuição da razão albumina/globulinas, devido à diminuição da síntese hepática da albumina associada a um aumento das imunoglobulinas, geralmente da IgA, gerando a fusão da fração β com a fração γ , denominada como ponte cirrótica. Este perfil eletroforético típico deve-se ao aumento da sua produção uma vez que existe uma hiperatividade do sistema reticuloendotelial, especificamente dos plasmócitos ^{[31][34]}.

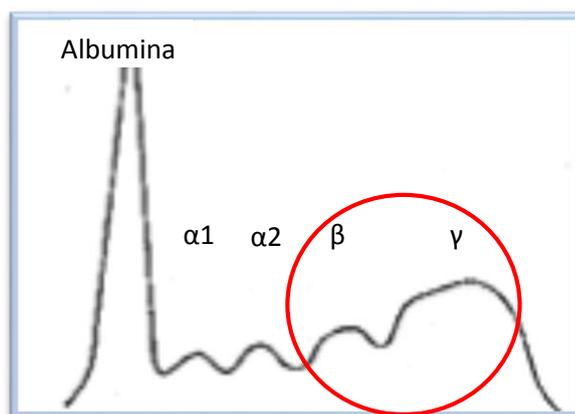


Figura 13: Perfil eletroforético característico de cirrose hepática, com fusão da fração β com a fração γ , devido a um aumento da produção da IgA. (Adaptado de ^[34]).

γ -Globulinas

Na zona eletroforética das γ -Globulinas migram as imunoglobulinas, predominantemente a IgG.

Os linfócitos B maduros localizados nos gânglios linfáticos e na corrente sanguínea, desenvolvem receptores de superfície, as imunoglobulinas, que ao contactarem com o antígeno alvo em circulação, proliferam e dão origem a um clone de células plasmáticas produtoras de anticorpos ^[31].

As imunoglobulinas, cuja estrutura está representada na Figura 14, são proteínas glicosiladas constituídas por duas cadeias polipeptídicas leves (“*light chains*”) e duas cadeias polipeptídicas pesadas (“*heavy chains*”), interligadas entre si por ligações dissulfureto (S-S). Estas cadeias possuem uma sequência constante nos terminais C, que garantem a sua estrutura tridimensional, e uma região variável nos seus terminais N, responsável pela especificidade de ligação aos antígenos ^[36].

As imunoglobulinas sofrem digestão proteolítica específica na presença da papaína, da qual resultam o fragmento $F(ab')_2$, que retém a capacidade de reconhecimento do antígeno, e o fragmento da região constante (F_c), estruturalmente mais homogêneo, contudo não pode ligar-se ao antígeno.

Devido às variações existentes nos domínios constantes das cadeias pesadas (região Fc), estas podem ser divididas em 5 classes de anticorpos: a cadeia α dá origem a anticorpos da classe IgA, a cadeia γ às IgG, a cadeia δ às IgD, a cadeia ϵ às IgE e a cadeia μ às IgM.

A molécula de IgM associa-se em pentâmeros e é uma das principais imunoglobulinas presentes no soro sendo predominante na resposta primária. A IgG é um monómero presente em maiores quantidades e de maior durabilidade no soro. Tem um papel fundamental no segundo contacto com o antigénio, isto é, na resposta secundária. A IgA apresenta-se na forma

dimérica ou trimérica e é a principal imunoglobulina presente nas secreções (saliva, leite e fluidos intestinais). A IgE, forma monomérica, liga-se aos recetores dos mastócitos e basófilos, estimulando a sua desgranulação em situações de reações alérgicas. Por fim, a IgD apresenta forma membranar (BCR) [36].

As cadeias leves são de dois tipo *Kappa* (κ) e *Lambda* (λ). As cadeias leves são sintetizadas em excesso e secretadas como cadeias leves livres, mas permanecem na corrente sanguínea em níveis baixos devido à sua rápida filtração glomerular [31] [36].

As alterações na fração das γ -Globulinas são as mais frequentes do perfil eletroforético, sendo a ausência ou diminuição desta banda sugestiva de imunodeficiências congénitas ou adquiridas. Um aumento policlonal das γ -globulinas, correlaciona-se com a existência de doenças autoimunes, infeções hepáticas, tuberculose, sarcoidose, sífilis e VIH [36].

Na Figura 15-A, encontra-se representado um perfil eletroforético característico de uma banda monoclonal nesta zona, sugestivo de uma gamapatia monoclonal.

O aparecimento de um pico monoclonal, devido ao aumento homogéneo da fração das γ -globulinas, representa um aumento da produção de uma paraproteína (ou M-proteína), a partir da proliferação maligna de um único clone de plasmócitos na medula óssea. A proteína monoclonal gera um pico na fração γ , sendo as mais comuns as IgG κ ou IgG λ [35].

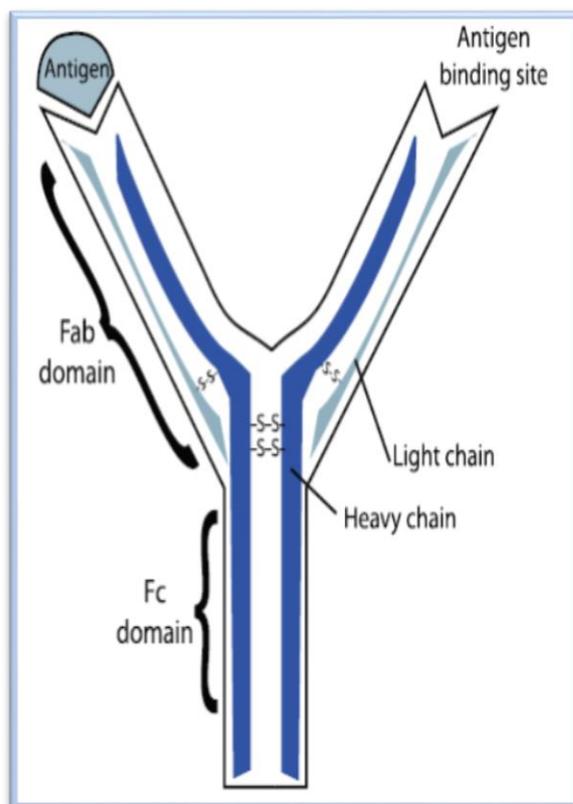


Figura 14: Representação da estrutura de uma imunoglobulina. (Adaptado de [25]).

Contrariamente à situação anteriormente descrita, pode ocorrer uma redução das γ -Globulinas, Figura 15-B, caracterizado por hipogamablogulinemia ou agamaglobulinemia. Este perfil pode ser observado em situações onde existe a ausência de um ou mais anticorpos específicos, resultando em infecções frequentes ^[34].

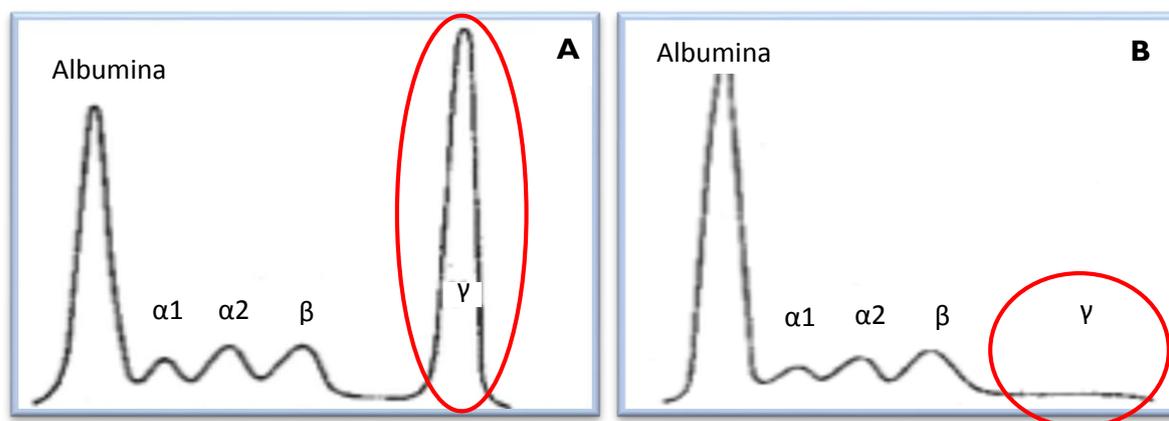


Figura 15: Perfil eletroforético característico de alterações na zona das γ -globulinas. **A-** Perfil típico de uma gamapatia monoclonal devido ao aumento homogêneo da fração γ -globulinas; **B-** Perfil eletroforético típico de uma agamaglobulinemia, isto é, uma redução das γ -globulinas. (Adaptado de ^[34]).

Sempre que se verificarem alterações na zona das γ -globulinas é necessário proceder à realização de uma imunofixação de modo a determinar qual o tipo de gamapatia associado a esse aumento, permitindo assim a deteção e identificação de proteínas monoclonais de cadeias pesadas (IgG, IgM, IgA) e de cadeias leves (*Kappa* ou *Lambda*).

A realização da imunofixação, cujo fluxograma está representado na Figura 16, começa com a separação eletroforética, isto é, as imunoglobulinas são separadas com base na massa molecular e carga elétrica quando é aplicada uma corrente elétrica.

Esta técnica requer a utilização de antisoros (anticorpos) monoclonais constituídos por imunoglobulinas totais de mamífero anti-humanas que precipitam as proteínas no interior da matriz do gel durante a fase da imunofixação ^[33].

Os antisoros monoclonais utilizados são os seguintes: G (Antisoro anti-cadeias pesadas γ), A (Antisoro anti-cadeias pesadas α), M (Antisoro anti-cadeias pesadas μ), K (Antisoro anti-cadeias leves *Kappa*) e L (Antisoro anti-cadeias leves *Lambda*). É ainda utilizada uma amostra padrão (controlo) serve como referência do perfil eletroforético das proteínas da amostra.

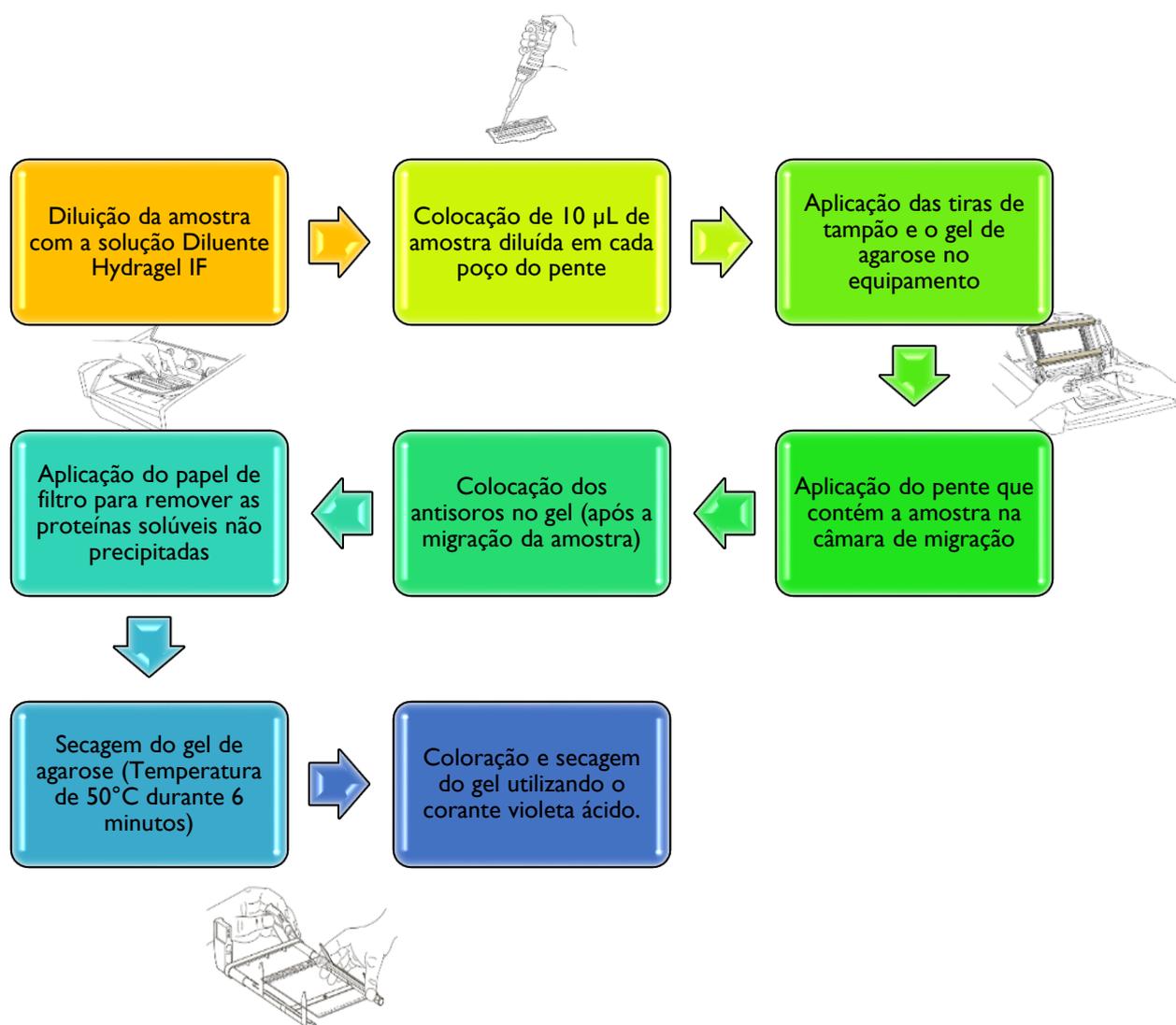


Figura 16: Fluxograma das diferentes etapas realizadas para a execução da imunofixação, com a utilização de anticorpos monoclonais específicos de cada antígeno presente na amostra.

Imunofixações de amostras normais, apresentam uma zona corada difusa de imunoglobulinas em todas as pistas de migração, isto é, um perfil policlonal. Quando existe a presença de uma imunoglobulina monoclonal (gamapatia) esta é caracterizada por uma banda estreita localizada ao mesmo nível de migração que a banda presente na pista de amostra controle. A identificação desta banda é útil no diagnóstico de uma gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), mieloma múltiplo, macroglobulinemia de *Waldenstrom* e amiloidose [35].

Principais alterações das proteínas séricas verificadas no setor de Imunologia e Hormonologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG

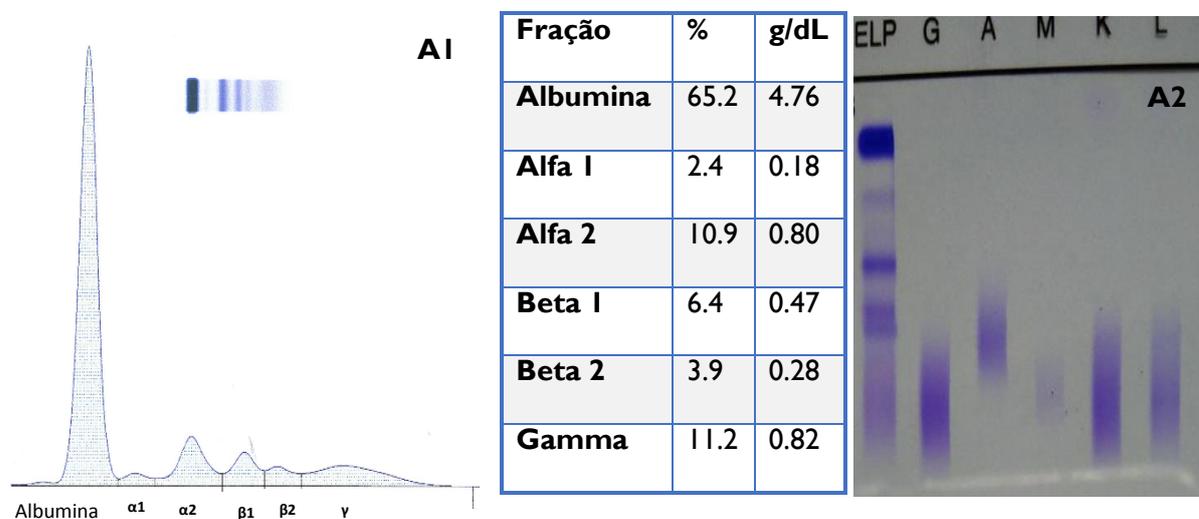


Figura 17: A1: Perfil eletroforético das proteínas séricas sem alterações. **A2:** Separação eletroforética normal, obtida por imunofixação, revelando a presença de bandas policlonais. (Imagens disponibilizadas pelo IPOCFG).

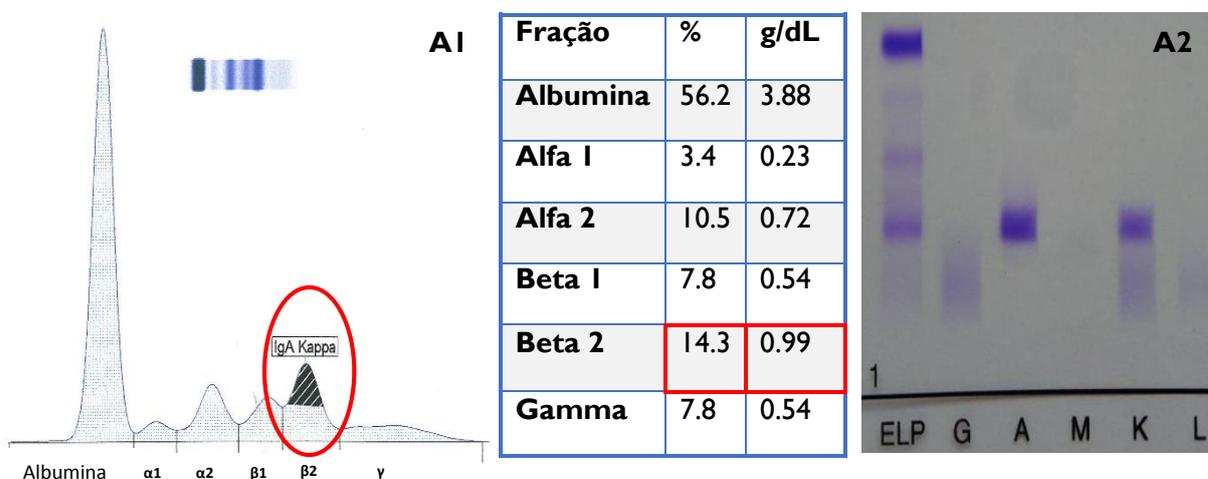


Figura 18: A1: Perfil eletroforético das proteínas séricas com aumento da fração β_2 -globulinas. **A2:** Separação eletroforética, obtida por imunofixação, evidenciando a presença de uma banda monoclonal do tipo IgA Kappa. (Imagens disponibilizadas pelo IPOCFG).

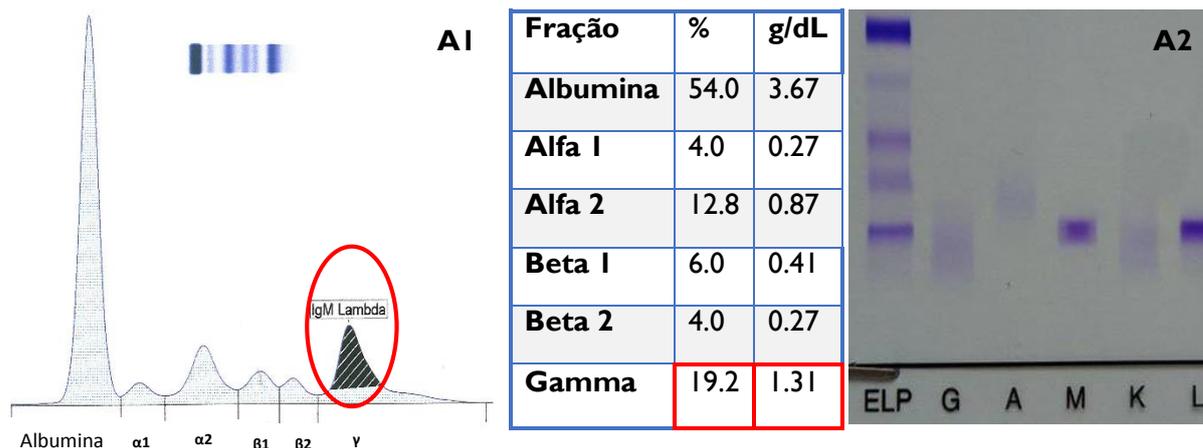


Figura 19: **A1:** Perfil eletroforético de proteínas séricas com aumento da fração γ -globulinas. **A2:** Separação eletroforética, obtida por imunofixação. Presença de uma banda monoclonal do tipo IgM Lambda. (Imagens disponibilizadas pelo IPOCFG).

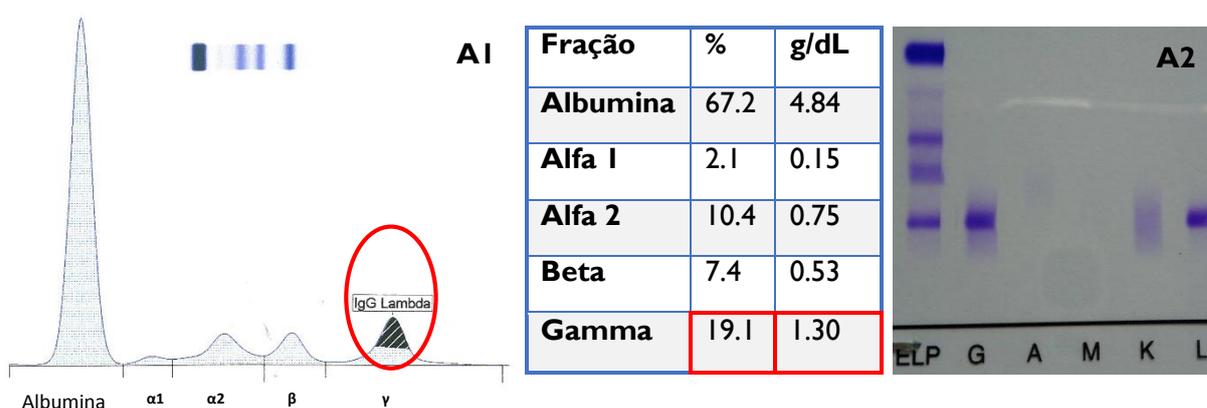
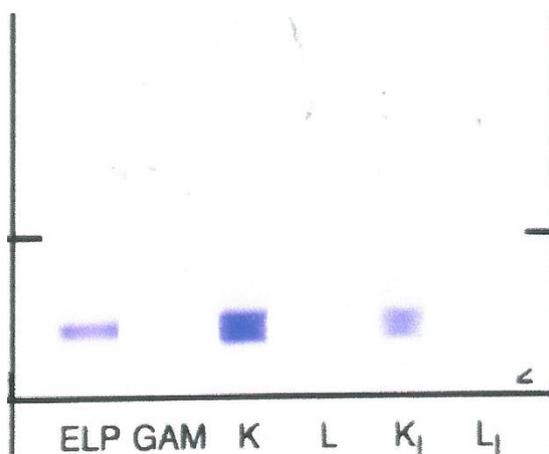


Figura 20: **A1:** Perfil eletroforético de proteínas séricas com aumento da fração γ -globulinas. **A2:** Separação eletroforética, obtida por imunofixação. Presença de uma banda monoclonal do tipo IgG Lambda. (Imagens disponibilizadas pelo IPOCFG).

A imunofixação de proteínas presentes na urina realiza-se em amostra urina de 24 horas concentrada. Neste caso é efetuada a pesquisa da proteína de Bence-Jones, isto é, a pesquisa de cadeias leves *Kappa* e *Lambda* e/ou de cadeias leves livres *Kappa* e *Lambda*. Quando presente, esta proteína indica a existência de uma gamapatia monoclonal, ver Figura 21 ^[32].

Neste procedimento são utilizados os seguintes antisoros: GAM (Antisoros anti-cadeias pesadas γ , α ou μ), K (Antisoro anti-cadeias leves livres *Kappa*) e L (Antisoro anti-cadeias leves livres *Lambda*).



Cadeia	Resultado (mg/dL)
Kappa livre	16654.4
Lambda livre	2.57
Razão Kappa/Lambda	6480.3

Figura 21: Presença de cadeias leves livres *Kappa* com características de monoclonalidade na urina, observadas por imunofixação. Estas características monoclonais foram complementadas com a quantificação das cadeias *Kappa* e razão *Kappa/Lambda*. (Imagens disponibilizadas pelo IPOCFG).

5. Conclusão

Terminado o estágio curricular no IPOCFG, posso concluir que esta experiência representou para mim um grande desafio, quer a nível profissional e académico quer a nível pessoal.

Foram seis meses de muito trabalho, ao longo dos quais coloquei em prática todos os conhecimentos adquiridos durante a minha formação académica. Foi-me possível a integração numa equipa de profissionais, tomar consciência da responsabilidade que é garantir que o resultado laboratorial é o mais fiável e “rápido” possível. Para além disso desenvolvi a capacidade de resolução de problemas, não só do foro técnico como também de conflitos internos que por vezes influenciam o espírito de equipa. Por fim, tomei consciência do papel fundamental que um laboratório de Análises Clínicas desempenha no auxílio e monitorização dos doentes.

Outro aspeto a realçar, prende-se com o facto de, atualmente, todo o laboratório clínico ser demasiado automatizado, e assim, desta forma, o trabalho dos profissionais de laboratório estar verdadeiramente simplificado. A evolução tecnológica e informática contribui, de alguma forma para a melhoria na qualidade da execução dos testes laboratoriais, associada a uma diminuição do número de erros associados e diminuição no tempo de resposta, levando assim a um aumento significativo na prescrição de exames laboratoriais. Porém, e num futuro não tão distante, temo pela nossa profissão.

Todavia, é notória a necessidade da existência de técnicas especializadas no laboratório, pois é o corpo técnico, que assegura a viabilidade e fiabilidade laboratorial, isto é, assegura que a amostra seja colhida de forma adequada, providencia o transporte e conservação apropriados, assim como o seu rápido processamento e garante a qualidade de todos os equipamentos, fundamental para a qualidade do resultado. Temos também a capacidade de deteção de um valor crítico tendo em conta o tipo de patologia em questão.

Por fim, considero esta experiência fundamental, muito o devo às pessoas maravilhosas com quem tive o prazer de trabalhar. De reforçar a ideia que todos “nós” trabalhamos para garantir que cada amostra é tratada com todo o profissionalismo e responsabilidade possível. Cada amostra representa uma história de um doente e uma família receosa à espera de uma resposta cujo resultado pode mudar toda uma vida.

6. Bibliografia

1. Norma Portuguesa EN ISO 15189 (2014).
2. Mayani H., The regulation of hematopoietic stem cell populations. *F1000Research* 5 (2016) 1524.
3. Haverstick D. M., Groszbach A. R., Specimen Collection and Processing. In Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E. (Eds) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 5th Ed. (2006), pp 145-162.
4. Rhyner M. N., The Coulter Principle for Analysis of Subvisible Particles in Protein Formulations. *AAPS Journal*. 13 (2011) 54-58.
5. Oliveira R. A. G., Automação em Hematologia: Contadores multiparamétricos. In Oliveira, R. A. G., *Hemograma como fazer e interpretar*, LMP Editora, 1ª Ed. (2007), pp 117-156.
6. Scadden D. T., Longo D. L., Hematopoietic stem cells. In Longo D. L., *Harrison's Hematology and Oncology*, The McGraw-Hill Companies, New York, 17th Ed. (2010), pp 2-7.
7. Higgins T., Eckfeldt J. H., Barton J. C., Doumas B. T., Hemoglobin, Iron and Bilirubin. In Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E. (Eds) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 5th Ed. (2006), pp 985-1030.
8. Adewoyin A. S., Nwogoh B., Peripheral blood film - a review. *Ann. Ibd. Pg. Med.* 12 (2014) 71-9.
9. Feliciano A., Costa A., Melo M. J., Anemia associated with malignancy. *Rev. Port. Pneumol.* IX (2003) 117-128.
10. Freeman A. M., Morando D. W., Anemia, Screening. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing (2018) Jan.
11. Adamson J. W., Iron deficiency and other hypoproliferative anemias. In Longo D. L., *Harrison's Hematology and Oncology*, The McGraw-Hill Companies, New York, 17th Ed. (2010), pp 70-80.
12. Holland S. M., Gallin J. I., Disorders of granulocytes and monocytes. In Longo D. L., *Harrison's Hematology and Oncology*, The McGraw-Hill Companies, New York, 17th Ed. (2010), pp 42-56.
13. Cardoso E. M., Visão Global do Sistema Imunológico. In Arosa F. A., Cardoso E. M., Pacheco F. C. (Eds) *Fundamentos de Imunologia*, Lidel, Lisboa, 2ª Ed. (2012), pp 31-40.

14. Elenitoba-Johnson K. S. J., Hematopoietic Malignancies. In Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E. (Eds) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 5th Ed. (2006), pp 1371-1396.
15. Longo D.L., Malignancies of Lymphoid Cells. In Longo D. L., *Harrison's Hematology and Oncology*, The McGraw-Hill Companies, New York, 17th Ed. (2010), pp 182-204.
16. Higgins R. A., Kitchen S., Olson J. D., Hemostasis. In Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E. (Eds) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 5th Ed. (2006), pp 2083-2128.
17. Sonmez, C., Dogan O. C., Kaymak A. O., Akkaya N., Akin K. O., Guntas G., Test-I analyzer and conventional Westergren method for erythrocyte sedimentation rate: A comparative study between two laboratories. *J. Clin. Lab. Anal.* (2018) 2-7.
18. Tran, R., Myers D. R., Cicilliano J., Hardy E. L. T., Sakurai Y., Ahn B., Qiu Y., Mannino R. G., Fay M. E., Lam W. A., Biomechanics of haemostasis and thrombosis in health and disease: From the macro- to molecular scale. *J. Cell. Mol. Med.* 17 (2013) 579-596.
19. Palta S., Saroa R., Palta A., Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* 58 (2014) 515-523.
20. Franco, R. F., Overview of coagulation, anticoagulation and fibrinolysis. *Med Ribeirão Preto.* 34 (2001) 229-237.
21. Hu, L. H., Pu L.F., Yang D.D., Zhang C., Wang H.P., Ding Y.Y., Li M.M., Zhai Z.M., Xiong S., How to detect the rare BCR-ABL (e14a3) transcript: A case report and literature review. *Oncol. Lett.* 14 (2017) 5619-5623.
22. Brown M., Wittwer C., Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clin. Chem.* 46 (2000) 1221-1229.
23. Arosa F. A., Cardoso E. M., Técnicas de Imunologia. In Arosa F. A., Cardoso E. M., Pacheco F. C. (Eds) *Fundamentos de Imunologia*, Lidel, Lisboa, 2ª Ed. (2012), pp 565-589.
24. Burns R., Immunochemical techniques. In Wilson K., Walker J. (Eds) *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*, 7th Ed. (2010), pp.263-299.
25. Koivunen M. E., Krogsrud R. L., Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Lab. Med.* 37 (2006) 490-497.
26. Vogeser, M., Shipkova M., Bonnin R. R., Wallemacq P., Orth M., Widmann M., Vestraete A. G., Multicenter analytical evaluation of the automated electrochemiluminescence immunoassay for cyclosporine. *Ther. Drug Monit.* 36 (2014) 640-650.
27. Bazin H., Trinquet E., Mathis G., Time resolved amplification of crytate emission: a versatile technology to trace biomolecular interactions. *Molecular Biotechnology.* 82 (2002) 233-250.

28. Dasgupta A., Handbook of Drug Monitoring Methods: Therapeutics and Drugs of Abuse. *Humana Press*, Totowa, New Jersey (2008).
29. Sokoll L. J., Rai A. J., Chan D. W., Tumor Markers. In Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E. (Eds) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 5th Ed. (2006), pp 617-667.
30. Coppolino G., Bolignano D., Rivoli L., Mazza G., Presta P., Fuiano G., Tumour markers and kidney function: A systematic review. *Biomed Res. Int.* (2014).
31. Hortin G., Amino Acids, Peptides and Proteins. In Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E. (Eds) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 5th Ed. (2006), pp 509-563.
32. Whicher J. T., Hawkins L., Higginson J., Clinical applications of immunofixation: A more sensitive technique for the detection of Bence Jones protein. *J. Clin. Pathol.* 33 (1980) 779-780.
33. Bossuyt X., Bogaerts A., Schiettekatte G., Blanckaert N., Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system. *Clin. Chem.* 44 (1998) 944-949.
34. Silva R. O. P., Lopes A. F., Faria R. M. D., Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Rev Med M. Gerais.* 28 (2008) 116-122.
35. O'Connell T. X., Horita T. J., Kasravi B., Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *Am. Fam. Physician* 71 (2005) 105-112.
36. Schroeder H. W. J., Cavacini L., Structure and Function of Immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) 41-52.

Anexos

Anexo I- Valores de referência utilizados no setor de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG

Parâmetro analítico	Valor de referência	Unidades
<u>Hemograma</u>		
<i>Leucócitos</i>	4.0 – 11.0	g/L
<i>Neutrófilos</i>	45 – 70	%
<i>Linfócitos</i>	20 – 40	%
<i>Monócitos</i>	3 – 10	%
<i>Eosinófilos</i>	1 – 5	%
<i>Basófilos</i>	0 – 2	%
<i>Eritrócitos</i>	♀: 4.0 – 5.5 ♂: 4.5 – 6.5	t/L
<i>Hemoglobina</i>	♀: 12 - 16 ♂: 13 – 18	g/dL
<i>Hematócrito</i>	♀: 35 - 47 ♂: 40 – 54	%
<i>VCM</i>	85 – 95	fL
<i>HCM</i>	27 – 32	pg
<i>CHCM</i>	32 – 36	g/dL
<i>RDW</i>	11.5 – 14.5	%
<i>Plaquetas</i>	150 – 450	g/L
<u>Hemostase</u>		
<i>TP</i>	11.3	seg
<i>INR</i>	< 1.20	%
<i>aPTT</i>	28.0	seg
<i>TT</i>	11.0	seg
<i>Fibrinogênio</i>	200 – 400	mg/dL
<i>D-Dímeros</i>	< 278	ng/mL
<u>Pesquisa de AL</u>		
<i>Ratio dRVT screening/ dRVT confirmatório</i>	0.90 – 1.20	
<i>Ratio SCT screening/ SCT confirmatório</i>	< 1.20	
<i>Fator de Von Willebrand</i>	Grupo sanguíneo O: 40.3 – 125.9 A, B, AB: 48.8 – 163.4	%
<i>Proteína C</i>	70 – 130	%
<i>Proteína S</i>	55 – 123	%
<i>Fator V</i>	70 – 120	%
<i>Fator VII</i>	55 – 170	%
<i>Fator VIII</i>	50 – 150	%
<i>VS</i>	0 – 20	mm/h

Anexo II- Valores de referência utilizados no setor de Imunologia e Hormonologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG

Parâmetro analítico	Valor de referência	Unidades
CEA	Não fumadores <3.4 Fumadores ≤5.2	ng/mL
CA 15.3	<35.0	U/mL
CA 125	<35.0	U/mL
HE4	<125	pmol/L
α-fetoproteína	<5.0	UI/mL
CA 19.9	<37.0	U/mL
CA 72.4	<6.90	U/mL
NSE	<20	ug/L
CYFRA 21.1	<3.30	ng/mL
SCC	<1.5	ng/mL
β -HCG	<5.0	mUI/mL
β 2- microglobulina	<2.40	mg/L
Cromogranina A	<102	ng/mL
S100	<0.15	ug/L
Ferritina	♀: 10 – 291.0 ♂: 22.0 – 322.0	ug/L
Vitamina B12	191 – 663	pg/mL
Ácido fólico	3.9 – 26.8	ng/mL
Eritropoietina	4.3 – 29	mUI/mL
Haptoglobina	30 – 200	mg/dL
Recetores solúveis da transferrina	0.76 – 1.76	mg/L
Transferrina	212.0 – 360.0	mg/dL
Ceruloplasmina	0.2 – 0.6	g/L
Proteína C reativa	<0.3	mg/dL
TASO	<214	UI/mL
Fator reumatoide	<15.9	UI/mL
Procalcitonina	<0.5	ng/mL
C3	90 – 180	mg/dL
C4	10 – 40	mg/dL
α 1- antitripsina	0.9 – 2.0	g/L
Homocisteína	5.0 – 15.0	umol/L
IgG	700 – 1600	mg/dL
IgA	70 – 400	mg/dL
IgM	40 – 230	mg/dL
Cadeias Kappa livres	3.30 – 19.4	mg/dL
Cadeias Lambda livres	5.71 – 26.30	mg/dL
Razão kappallambda livre	0.26 – 1.65	
Cadeias Kappa livres urina	1.35 – 24.19	mg/dL
Cadeias Lambda livres urina	0.24 – 6.66	mg/dL
Razão kappallambda urina	2.04 – 10.37	
PSA	<4.0	ng/mL
PSA livre		ng/mL
Razão FPSA/PSA	Risco elevado:<10.0 Risco reduzido:≥25.0	%

<i>TSH</i>	0.45 – 4.5	mUI/L
<i>T3 livre</i>	2.0 – 4.4	pg/mL
<i>T4 livre</i>	0.90 – 1.8	ng/dL
<i>T3 total</i>	80 – 200	ng/dL
<i>T4 total</i>	4.6 – 12.0	ug/dL
<i>Anticorpos anti-tiroglobulina</i>	<40.0	U/mL
<i>Anticorpos anti-peroxidase</i>	<35.0	U/mL
<i>TRAB'S</i>	Negativo: <1.0 Duvidoso: 1.0-1.5 Positivo: >1.5	UI/L
<i>Tiroglobulina</i>	<77.0	ng/mL
<i>Calcitonina</i>	♀: <11.5 ♂: <18.2	pg/mL
<i>PHT</i>	18.0 – 80.0	pg/mL
<i>Vitamina D</i>	Deficiência: <20 Insuficiência: 20 – 30 Suficiência: 30 – 100 Toxicidade: >100	ng/mL
<i>FSH</i>	♀- FF: 2.5 – 10.2 PO: 3.4 – 33.4 FL: 1.5 – 9.1 PM: 23.0 – 116.3 ♂: 1.4 – 18.1	UI/L
<i>LH</i>	♀- FF: 1.9 – 12.5 PO: 8.7 – 76.3 FL: 0.5 – 16.9 PM: 15.9 – 54.0 Con. Orais: 0.7 – 5.6 ♂: 1.5 – 9.3	UI/L
<i>Estradiol</i>	♀- FF: 19.5 – 144.2 PO: 63.9 – 356.7 FL: 55.8 – 214.2 PM: <32.2 Con. Orais: <102.0 ♂: <39.8	pg/mL
<i>Progesterona</i>	♀- FF: 0.20 – 1.40 PO: 0.80 – 3.00 FL: 3.34 – 25.6 PM: 0.21- 0.73 ♂: 0.28 – 1.22	ng/mL
<i>Prolactina</i>	♀: 1.9 – 25.0 ♂: 2.5 – 17.0	ng/mL
<i>Testosterona total</i>	♀: 0.029 – 0.41 ♂: 1.93 – 7.40	ng/mL
<i>Testosterona livre</i>	♀- Con. Orais: 0.55-2.01 FF: 0.45 – 3.17 FL: 0.46 – 2.48 PM: 0.29 – 1.73 ♂: 7.20 – 23.0	pg/mL

<i>DHEAS</i>	1.16 – 5.29	ng/mL
<i>17-OH-Progesterona</i>	♀- FF: 0.32 – 1.47 FL: 0.25 – 2.91 PM: 0.19 – 0.71 ♂: 0.63 – 2.15	ng/mL
<i>Estrona</i>	♀- FF: 37.2 – 137.7 FL: 49.8 – 114.1 Peri-ovulatório: 59.9- 229.6 Menopausa c/terap: 40.0- 346.0 Menopausa s/terap: 14.1- 102.6	pg/mL
<i>Cortisol</i>	7-10h: 6.0 – 18.4 16-20h: 2.7 – 10.5	ug/dL
<i>ACTH</i>	<46	pg/mL
<i>Aldosterona decúbito</i>	2.94 – 17.5	ng/dL
<i>Aldosterona ortostática</i>	4 – 28	ng/dL
<i>Renina decúbito</i>	2.80 – 39.90	mUI/L
<i>Renina ortostática</i>	4.40 – 46.10	mUI/L
<i>Gastrina</i>	13.0 – 115.0	pg/mL
<i>Glucagon</i>	0 – 30	pmol/L
<i>Insulina</i>	2.6 – 24.90	uUI/mL
<i>Peptídeo C</i>	1.1 – 4.4	ng/mL
<i>Serotonina</i>	70.0 – 270.0	ng/mL
<i>Ácido vanilmandélico</i>	<13.6	mg/24h
<i>Metanefrinas urinária</i>	<350.0	ug/24h
<i>Metanefrinas plasmáticas</i>	<65.0	pg/mL
<i>Normetanefrinas urinárias</i>	<600	ug/24h
<i>Normetanefrinas plasmáticas</i>	<196	pg/mL
<i>Ácido 5-OH indolacético</i>	<15.0	mg/24h
<i>Cortisol urinário</i>	36.0 – 137.0	ug/24h
<i>Cortisol livre salivar</i>	8-10h: 0.07 – 0.69 23-24h: <0.40	ug/dL
<i>Fosfatase alcalina óssea</i>	♀: pré-menopausa: 3-19 Pós-menopausa: 6-26	ug/L
<i>Osteocalcina</i>	14 – 42	ng/mL
<i>Pró-BNP</i>	Insf. Cardíaca aguda: <300.0 Provável ins. Cardíaca aguda:>900	pg/mL
<i>TOXO- IgG</i>	Negativo: <7.2 Duvidoso: 7.2-8.8 Positivo: ≥8.8	UI/mL
<i>TOXO-IgM</i>	Negativo: <6.0 Duvidoso: 6.0-8.0 Positivo: ≥8.0	UA/mL
<i>EA-IgG</i>	Negativo: <10 Duvidoso: 10-40	U/mL

	Positivo: ≥ 40	
<i>EBNA-IgG</i>	Negativo: < 5 Duvidoso: 5-20 Positivo: ≥ 20	U/mL
<i>VCA-IgG</i>	Negativo: < 20 Positivo: ≥ 20	U/mL
<i>VCA-IgM</i>	Negativo: < 20 Duvidoso: 20-40 Positivo: ≥ 40	U/mL
<i>HSV1-IgG</i>	Negativo: < 0.9 Duvidoso: 0.9-1.1 Positivo: ≥ 1.1	Índice
<i>HSV2-IgG</i>	Negativo: < 0.9 Duvidoso: 0.9-1.1 Positivo: ≥ 1.1	Índice
<i>HSV1/2-IgM</i>	Negativo: < 0.9 Duvidoso: 0.9-1.1 Positivo: ≥ 1.1	Índice
<i>Rubéola-IgG</i>	Negativo: < 10.0 Positivo: ≥ 10.0	UI/mL
<i>Rubéola-IgM</i>	Negativo: < 20 Duvidoso: 20-25 Positivo: ≥ 25	UA/mL
<i>Hidantoína</i>	10 – 20	ug/mL
<i>Fenobarbital</i>	15 – 40	ug/mL
<i>Carbamazepina</i>	4 – 12	ug/mL
<i>Ácido valpróico</i>	50 – 100	ug/mL
<i>Metotrexato</i>	48h: < 1	umol/L
<i>Digoxina</i>	0.8 – 2.0	ng/mL
<i>Gentamicina</i>	Pico: 4 – 10 Vale: 0.5 - 2	ug/mL
<i>Vancomicina</i>	Pico 60' após infusão: 26.5– 40 Vale: 5.0 – 10	ug/mL
<i>Albumina</i>	59.8 - 72.4 4.40 – 5.50	% g/dL
<i>Alfa 1</i>	– 3.2 0.10 – 0.20	% g/dL
<i>Alfa 2</i>	7.4 – 12.6 0.50 – 0.80	% g/dL
<i>Beta</i>	7.5 – 12.9 0.60 – 0.90	% g/dL
<i>Gamma</i>	8.0 – 15.8 0.70 – 1.20	% g/dL

Legenda: ♀- Sexo feminino; ♂- Sexo masculino.