

Adriana Patrícia Carvalho Moreira de Sousa

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 Armanda Santos e apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Adriana Patrícia Carvalho Moreira de Sousa

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do mestrado em Análises Clínicas,
orientado pelo Dr. Frederico Valido e apresentado à Faculdade Farmácia da
Universidade de Coimbra

Coimbra, 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

A realização do estágio em Análises Clínicas no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil concretizou-se pela congregação de uma série de oportunidades, vontades e intervenientes, sendo que pretendo agradecer a estes os seus contributos para esta etapa. Assim, apresento os meus agradecimentos:

Ao Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, local onde exerço as minhas funções de Técnica Superior de Análises Clínicas, integrada numa equipa multidisciplinar, com elevada qualificação técnica e científica, com acesso a recursos técnicos e tecnológicos inovadores, fundamentais nesta etapa e na construção do meu percurso profissional.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela possibilidade de frequência do Mestrado em Análises Clínicas, que se traduziu numa mais-valia pessoal e profissional.

À Coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, na pessoa da Professora Doutora Maria do Céu Sousa, pelo acompanhamento e organização com vista ao alcance dos objetivos deste estágio.

Ao meu Orientador externo, Dr. Frederico Valido, pela transmissão de conhecimento técnico e científico, exigência, crítica construtiva, disponibilização de recursos, estruturação de um ambiente de aprendizagem autónoma e pelo exemplo de ética profissional.

À minha Orientadora interna, Professora Doutora Armanda Santos, a disponibilidade, o direcionamento do desenrolar do estágio, no sentido da superação de obstáculos, a disponibilização de informação e recursos, e a sua disponibilidade.

Aos Dr. Nuno Cunha, Dr. Jorge Reis, Dra. Maria Alexandra Mendes e Dra. Joana Diamantino, pela disponibilidade, contributos técnicos e científicos, enriquecimento pessoal e profissional, incentivo e compreensão.

Aos meus Amigos e Colegas de Trabalho, pelo apoio, entusiasmo e incentivo.

À minha Família, pois tudo isto foi possível graças ao esforço e dedicação que sempre tiveram.

Índice

Lista de Abreviaturas.....	iii
Índice de Tabelas.....	vii
Índice de Figuras.....	vii
Resumo.....	ix
<i>Abstract</i>	xi
Capítulo I – Introdução.....	1
Capítulo II – Caracterização do Local de Estágio.....	3
2.1 Serviço de Patologia Clínica.....	3
2.1.1. Setor de Hematologia.....	4
2.1.2. Setor de Microbiologia.....	5
2.1.3. Setor de Química Clínica.....	6
2.1.4. Setor de Imunologia/ Hormonologia.....	7
2.2 Controlo de Qualidade.....	10
Capítulo III – Hematologia.....	12
3.1. Sala de Hematologia I.....	12
3.1.1. Hemograma.....	13
3.1.1.1. Parâmetros de avaliação eritrocitária.....	16
3.1.1.1.1. Hemoglobina.....	18
3.1.1.1.2. Hematócrito.....	18
3.1.1.1.3. Volume Corpuscular Médio.....	18
3.1.1.1.4. Hemoglobina Corpuscular Média.....	19
3.1.1.1.5. Concentração média da hemoglobina corpuscular.....	19
3.1.1.1.6. Índice de anisocitose eritrocitária.....	19
3.1.1.1.7. Reticulócitos.....	20
3.1.1.1.8. Eritroblastos.....	20
3.1.1.1.9. Parâmetros de avaliação plaquetária.....	20
3.1.1.1.10. Parâmetros de avaliação leucocitária.....	21
3.1.1.2. Velocidade de Sedimentação.....	22
3.1.1.3. Esfregaço de Sangue Periférico.....	22
3.1.1.4. Aspirados de Medula Óssea.....	24
3.1.1.5. Contagem celular no líquido cefalorraquidiano em Câmara de Fuchs-Rosenthal.....	25
3.1.1.6. Pesquisa da presença e quantificação do gene BCR-ABL.....	25
3.2. Sala de Hematologia 2.....	26
3.2.1. Testes de Coagulação.....	26
3.2.1.1. Tempo de tromboplastina parcial ativada.....	28

3.2.1.2. Tempo de protrombina	28
3.2.1.3. Tempo de Trombina	28
3.2.1.4. D-Dímeros	28
3.2.1.5. Fibrinogénio	29
3.2.1.6. Antitrombina.....	29
3.2.1.7. Proteína C.....	29
3.2.1.8. Proteína S livre.....	30
3.2.1.9. Detecção do Anticoagulante e/ou Inibidor Lúpico	30
3.2.1.10. Pesquisa de mutações do Fator II e do Fator V de Leiden.....	31
3.2.2. Citometria de Fluxo.....	31
3.3. Controlo de Qualidade	32
Capítulo IV – Imunoensaios e Marcadores Tumorais	33
4.1. Imunoensaios	33
4.2. Marcadores Tumorais.....	34
4.2.1. CEA e CA-19-9 no cancro colorretal	36
4.2.1.1. Antígeno Carcinoembrionário	36
4.2.1.2. Antígeno Glucídico 19.9.....	37
4.2.2. CEA e CA-15.3 no Cancro de Mama.....	37
4.2.2.1. Antígeno Glucídico 15.3.....	38
4.2.3. CA-125 e HE-4 no Cancro do Ovário	39
4.2.3.1. Antígeno Glucídico 125	39
4.2.3.2. Human epididymis protein 4.....	40
4.2.3.3. Risk of Ovarian Malignancy Alghoritm.....	41
4.3. Métodos de deteção do complexo Ag-Ac nos MT CEA, CA-15.3, CA-19.9, CA-125 e HE-4.	42
4.3.1. <i>Time Resolved Amplified Cryptate Emission</i>	42
4.3.2. <i>Chemiluminescent Immunoassay</i> ou quimioluminescência	42
4.3.3. <i>Electro-chemiluminescence Immunoassay</i> ou eletroquimioluminescência.....	42
4.4. Controlo de Qualidade	43
Capítulo V – Caso Clínico	45
Capítulo VI – Conclusão	46
Referências Bibliográficas	1
Anexos	3
Anexo 1 – Valores de referência em vigência no setor de Hematologia do SPC do IPOCFG.....	3
Anexo 2 – Painel de controlo de qualidade interno <i>BIO-RAD</i>	5

Lista de Abreviaturas

- 25DT - 25-hidroxivitamina D
ABL - gene Abelson
Ac - Anticorpo
AF - α -fetoproteína
Ag - Antígeno
Ag-Ac - Complexo Antígeno-Anticorpo
ADC - Anemia da Doença Crónica
AL - Anticoagulante e/ou Inibidor Lúpico
AND - Δ 4-androstenediona
APC - Proteína C Ativada
AT - Antitrombina
Anti -TPO – Anticorpo Anti-Peroxidase
Anti-TG – Anticorpo Anti-Tiroglobulina
Baso - Basófilos
BCR - região restrita de quebra, do inglês *breakpoint cluster region*
BCR-ABL - Gene de fusão entre o gene ABL do cromossoma 9 e gene BCR do cromossoma 22
BFU-E - Unidade formadora de crescimento rápido eritróide, do inglês *burst forming unit-erythroid*
BMG - β 2-Microglobulina
BNP - Peptídeo natriurético tipo B
CA-125 - Antígeno Glucídico 125, do inglês *cancer antigen 125*
CA-19.9 - Antígeno Glucídico 19.9, do inglês *cancer antigen 19.9*
CA-72.4 - Antígeno Glucídico 72.4, do inglês *cancer antigen 72.4*
CAL - Calcitonina
CEA - Antígeno carcinomaembrionário, do inglês *Carcinoembryonic antigen*
CF - Citometria de fluxo
CFU-E - Unidade formadora de colónia eritróide, do inglês *colony forming unit-erythroid*
CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CID - Coagulação intravascular disseminada
CYFRA 21.1 - Antígeno formado por um fragmento da citoqueratina 19
CK-MB - Creatina quinase-MB
CLIA - Imunoensaio por Quimioluminescência, do inglês *Chemiluminescent Immunoassay*
COR - Cortisol
CO₂ - Dióxido de Carbono
CPE - Células progenitoras endoteliais
DD - D-Dímeros
ECLIA - Imunoensaio por Eletroquimioluminescência, do inglês *Electrochemiluminescent Immunoassay*
EDTA - ácido etilenodiamino tetra acético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*
Ee2 - 17 α -ethynylestradiol
Eos - Eosinófilos
EPO - Eritropoietina

ESP - esfregaço de sangue periférico
FER - Ferritina
FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
Fib - Fibrinogénio
fPSA - Forma livre do antígeno específico da próstata, do inglês *free prostate-specific antigen*
FSH - Hormona Folículo-Estimulante, do inglês *follicle stimulating hormone*
GAS - Gastrina
GH - Hormona de crescimento
HGB - Hemoglobina
HCG - Gonadotrofina Coriônica Humana, do inglês *Human chorionic gonadotropin*
HCM - Hemoglobina Corpuscular Média
Hct - Hematócrito
HE-4 - “Human epididymis protein 4”
IFD - Imunofluorescência direta
IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina, do inglês *Insulin-like growth factor*
IGF-I - Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I
IL - Interleucina
INF γ - Interferon gama
INR - Rácio Internacional Normalizado, do inglês *International Normalized Ratio*
INS - Insulina
INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
IP - Índice preditivo
IPOCFG - Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E.
KPC - Enzima *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*
LCR - Líquido cefalorraquidiano
LH - Hormona Luteinizante, do inglês *Luteinizing hormone*
LN - Logaritmo Natural
Lymph - Linfócitos
MCHC - concentração de hemoglobina corpuscular média, do inglês *Mean corpuscular hemoglobin concentration*
MCV - volume corpuscular médio, do inglês *mean corpuscular volume* ou *mean cell volume*
MHC - hemoglobina corpuscular média, do inglês *Mean Corpuscular Hemoglobin*
MO - Medula Óssea
Mono - Monócitos
MPV - Volume plaquetário médio
MT - Marcador tumoral
Neut - Neutrófilos
NRBC - Eritroblastos
NSE - Enolase específica do neurónio, do inglês *Neuron-Specific Enolase*
CA-15.3 - Antígeno Glucídico 15.3, do inglês *cancer antigen 15.3*
OST - Osteocalcina
O₂ - Oxigénio
PAF - Polipose Adenomatosa Familiar
PBS - Tampão fosfato salino

PC - Proteína C
PCT - Procalcitonina
Ph I - Cromossoma Filadélfia
PLT - Plaqueta, do inglês *Platelet*
PRGE - Prostaglandina E
PRL - Prolactina
Pro-BNP - Percursor do peptídeo natriurético tipo B
PROG - Progesterona
Pro-GRP - Percursor do péptido libertador de gastrina
PS - Proteína S livre
PSA Livre - Antígeno Específico da Próstata Livre
PSA Total - Antígeno Específico da Próstata Total
PTH - Paratormona
PTI - Púrpura Trombocitopénica Idiopática
PTT - Púrpura Trombocitopénica Trombótica
RBC - Eritrócito, do inglês *Red Blood Cell*
PCR - Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*
RDW - Índice de anisocitose eritrocitária, do inglês *red cell distribution width*
RET - Reticulócito
RIQAS - *Randox International quality assesement scheme*
RNA - Ácido ribonucleico
ROMA - Algoritmo do Risco de Malignidade Ovariana, do inglês *Risk of Ovarian Malignacy Alghoritm*
RT-PCR - PCR em tempo real
SARM - *Staphylococcus aureus* meticilina resistente
SCC - Antígeno do carcinoma de células escamosas, do inglês *squamous cell carcinoma antigen*
SCF - Fator de células estaminais, do inglês *Stem cell factor*
SPC - Serviço de Patologia Clínica
T3 - Triiodotironina
T3L - Triiodotironina, fracção livre
T4 - Tiroxina
T4L - Tiroxina, fracção livre
TES - Testosterona total
TG - Tiroglobulina
TIMP-I- Inibidor tecidual de metaloproteinases I, do inglês *tissue inhibitor of metalloproteinases*
TM - Trombomodulina
TNF α - Fator de necrose tumoral alfa
TP - Tempo de protrombina
TRABs - Autoanticorpos anti recetor da TSH, do inglês *thyrotropin receptor antibodies*
TRACE - *Time-Resolved Amplified Cryptate Emission*
TSDT - Técnica Superior de Diagnóstico e Terapêutica
TSH - Hormona Estimulante da Tiróide, do inglês *thyroid-stimulating hormone*

TSI - Imunoglobulina Estimulante da Tiróide, do inglês *Thyroid stimulating immunoglobulin*

TT - Tempo de Trombina

TTPa - Tempo de tromboplastina parcial ativada

UKNEQAS - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

VCS - volume, conduti

vidade e dispersão de luz, do inglês *volume, conductivity, scatter*

VS - Velocidade de Sedimentação

WBC - Leucócito, do inglês *White Blood Cells*

WFDC - *Whey Acidic Four-Dissulfide Core*

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Equipamentos presentes no setor de hematologia	5
Tabela 2 - Equipamentos presentes no sector de microbiologia.....	6
Tabela 3 - Equipamentos presentes no sector de química clínica	7
Tabela 4 - Equipamentos presentes no sector de imunologia/ hormonologia	8
Tabela 5 - Fases do ciclo analítico laboratorial e erros comuns em cada fase	11
Tabela 6 - Parâmetros avaliados pelo Beckman Coulter® LH750 Analyzer e sua designação	16
Tabela 7 - Classificação fisiopatológica das anemias	17
Tabela 8 - Caso Clínico - Resultados	45

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema representativo do circuito das amostras.....	13
Figura 2 - Esquema representativo do sistema de impedância elétrico que tem como base o princípio de "Coulter	14
Figura 3 - Tecnologia VCS	15
Figura 4 - Formação dos eritrócitos.....	17
Figura 5 - Leucemia Linfocítica Crónica B.....	23
Figura 6 - Esquema do ESP	23
Figura 7 - Esquema representativo da cascata da coagulação.....	27
Figura 8 - Esquema sequencial do circuito das amostras.....	34

Resumo

O diagnóstico do cancro pode ser em muitos casos a chave para a cura. Detetá-lo numa fase precoce aumenta exponencialmente as hipóteses de erradicar de forma definitiva a doença muitas vezes com menor necessidade de se recorrer a tratamentos agressivos.

A vigilância e o rastreio são fatores cruciais para o diagnóstico e cura eficaz. Nesta fase, e também na fase de monitorização terapêutica, as análises clínicas desempenham um papel fundamental, pois constituem um meio complementar de diagnóstico importante na excelência do tratamento do doente oncológico.

É com base neste propósito que diariamente o Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG) trabalha, de modo a diagnosticar e apoiar o doente oncológico. Este Serviço possui um laboratório bem estruturado, que abrange as áreas de Hematologia, Química Clínica, Microbiologia e Imunologia/Hormonologia.

O presente relatório tem por objetivo ser um registo e reflexão crítica da aprendizagem teórica e prática obtida durante o período de estágio realizado no laboratório do SPC do IPOCFG, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas. Este trabalho foca-se em dois setores de extrema importância no diagnóstico, monitorização e prognóstico da patologia oncológica, o setor de Hematologia e o setor de Imunologia/Hormonologia, este último com incidência especial nos marcadores tumorais utilizados na monitorização e prognóstico dos carcinomas do ovário, da mama e colorretal. Além das atividades desenvolvidas, estão também descritas as metodologias analíticas, tecnologias e fundamentos subjacentes à interpretação e validação dos resultados das análises clínicas efectuadas.

Palavras-Chave: Serviço Patologia Clínica, cancro, IPOCFG, diagnóstico, doente oncológico, hematologia, marcadores tumorais.

Abstract

The diagnosis of cancer can in many cases be the key to its cure. Detecting it at an early stage exponentially increases the chances of definitively eradicating the disease, without the need to undertake to aggressive treatments.

Surveillance and screening are crucial factors for effective diagnosis and cure. It is at this stage, as well as along therapy monitorization, that clinical analysis plays a fundamental role, since they are an important complementary mean of diagnosis contributing to the excellence of treatment of cancer patients treatment.

The Clinical Pathology Service (CPS) of the Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG) works daily towards that purpose, in order to diagnose, and support cancer patients. This Service has a well-structured laboratory that includes Hematology, Clinical Chemistry, Microbiology and Immunology/Hormonology.

The purpose of this report is to register and critically reflect on the theoretical and practical learning obtained during the internship at the CPS of the IPOCFG, within the Master Degree in Clinical Analyzes. This work focuses on two sectors of extreme importance in the diagnosis, monitoring and prognosis in oncological pathology, the Hematology and the Immunology/Hormonology sector, with emphasis in ovarian, breast and colorectal cancer tumor markers. Besides the activities that were developed, the analytical methodologies, technologies, and fundamentals underlying the interpretation and validation of clinical analysis results are also described.

Keywords: *Clinical Pathology Service, cancer, IPOCFG, diagnosis, cancer patient, hematology, tumor markers.*

Capítulo I – Introdução

"Existe um cancro adormecido em todos nós. ...o nosso organismo produz constantemente células defeituosas. É assim que surgem os tumores. Mas o nosso organismo também está equipado com mecanismos que detetam e controlam essas células." Servan-Schreiber

O cancro caracteriza-se *lato sensu* como uma doença multifatorial que afeta milhões de pessoas por todo o mundo a nível físico e psicológico caracterizada por um crescimento e multiplicação celular desregulada. É considerado uma doença genética devido à transformação de uma célula normal numa célula cancerosa em resultado de uma acumulação de alterações genéticas sucessivas, mas na maioria dos casos não é uma doença hereditária. Assim, a doença oncológica é uma patologia complexa, cujo prognóstico depende intrinsecamente da fase em que a mesma é diagnosticada.

A contribuição da Patologia Clínica é fundamental para o diagnóstico, a monitorização e um correto prognóstico da doença. Tem subjacente um papel auxiliar, com base em tecnologia laboratorial diferenciada que permite identificar e quantificar substâncias que, em excesso, em défice ou ausência, são indicadores de situações patológicas.

Tratando-se o IPOFCG de um hospital especializado no diagnóstico, tratamento e apoio ao doente oncológico, o Serviço de Patologia Clínica (SPC) ganha uma importância basilar e essencial em termos funcionais, sendo que neste serviço se realizam centenas de análises clínicas por dia e nas diversas especialidades de Hematologia, Química Clínica, Microbiologia, Imunologia e Hormonologia.

Partindo da premissa anterior, o presente relatório de estágio visa a descrição e reflexão acerca das atividades desenvolvidas no SPC daquela unidade hospitalar, no período de dezembro de 2017 a maio de 2018, sob orientação externa do seu diretor, Dr. Frederico Valido, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, lecionado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC).

Em termos genéricos, o estágio teve como objetivos gerais integrar e sedimentar os conhecimentos obtidos na fase curricular do mestrado, bem como adquirir e aperfeiçoar competências no contexto da prática laboratorial. O exercício da função de Técnica Superior das áreas de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT) neste serviço caracteriza-se pelo desempenho de um elevado número de tarefas, as quais, pela sua relevância, exigem rigor

técnico e científico na sua execução, no sentido de dar suporte e viabilizar um correto diagnóstico, tratamento e rastreio da doença oncológica.

Para o alcance dos objetivos enunciados no parágrafo anterior, e conforme referido, o plano de estágio consistiu no desenvolvimento de atividades laboratoriais intrínsecas às funções de cada um dos setores que compõem o SPC e por um período de tempo mais alargado nos setores de Hematologia e de Imunologia/Hormonologia.

Cumprindo a sua função descritiva e reflexiva, o presente relatório estrutura-se em 6 capítulos: Capítulo I – Introdução; Capítulo II – Caracterização do Local de Estágio; Capítulo III – Hematologia; Capítulo IV – Imunoensaios e Marcadores Tumoriais; Capítulo V – Caso Clínico; Capítulo VI – Conclusão. São apresentadas de forma sucinta as valências do SPC e com maior destaque os setores de Hematologia e Imunologia/Hormonologia, aqui com ênfase nos marcadores tumorais dos carcinomas da mama, colorretal e do ovário. Este destaque traduz-se numa descrição mais detalhada das metodologias e equipamentos usados, bem como os critérios utilizados na interpretação dos resultados laboratoriais e ao controlo de qualidade do laboratório, reportando, sempre que pertinente, à contextualização teórica.

A Hematologia é o setor onde diariamente exerço as minhas funções como profissional de saúde, sendo que a sua importância se justifica porque esta área estuda o estado dos elementos sanguíneos, dos órgãos hematopoiéticos e das doenças associadas. No contexto de um hospital oncológico, este setor ganha especial relevância pois, a título de exemplo, o estudo do sangue a nível celular e dos intervenientes na coagulação são essenciais para determinar o modo como a doença oncológica e/ou o seu tratamento afetam as células do sangue e a função destas. Por seu lado, no setor de Imunologia/Hormonologia avaliam-se os marcadores tumorais desempenham um papel importante na apreciação da resposta terapêutica, na deteção de recidivas e no prognóstico, para além de auxiliarem no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento.

Capítulo II – Caracterização do Local de Estágio

2.1 Serviço de Patologia Clínica

O IPOCFG é uma unidade hospitalar com uma posição de topo na cadeia de referência hospitalar em Oncologia, sendo que na sua missão se destacam as ações nos domínios da prestação de cuidados de saúde, da prevenção primária e secundária, do rastreio oncológico, da investigação, da formação e ensino oncológicos, do registo oncológico e da colaboração na definição e acompanhamento da execução da política oncológica nacional.

O IPOCFG integra a rede de prestação de cuidados de saúde do Serviço Nacional de Saúde e com responsabilidade de diagnóstico e tratamento da doença oncológica na Região Centro, abrangendo uma população à data dos últimos censos de 2.327.755 habitantes.

A génese do atual IPOCFG aconteceu no ano 1953 em Coimbra, graças ao Professor Doutor Luís Raposo que foi o pioneiro na construção duma pequena infraestrutura sede do Centro de Coimbra do IPO. Passado mais de meio século, esta pequena casa sofreu grandes alterações que originaram a grande instituição que podemos ver nos dias de hoje.

É notória a sua grande evolução, não só pela envergadura da construção, mas pela excelência no atendimento e tratamento do doente oncológico. Constitui atualmente, um hospital de grande qualidade na área da oncologia, afirmação corroborada pela acreditação internacional de qualidade *UKAS – Quality Management 083* desde 2006 pelo *Caspe Healthcare Knowledge Systems*, pela acreditação desde 2010 pela *Organization of European Cancer Institutes*, bem como pelo facto de ser associado do *Health Cluster Portugal - Pólo de Competitividade da Saúde*.

O Serviço de Patologia Clínica está integrado nesta grande unidade hospitalar e é dirigido pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido, especialista em Patologia Clínica pela Ordem dos Médicos, juntamente com uma equipa composta por cerca de 35 elementos formada por médicos, bioquímicos, biólogos, farmacêuticos, técnicos superiores de análises clínicas, administrativos e auxiliares.

O SPC apresenta um fluxo diário médio de 300 utentes e funciona maioritariamente por pré-marcação.

Todos os parâmetros analíticos realizados neste serviço são solicitados pelo(a) médico(a) mediante o preenchimento de uma requisição com a especificação dos testes laboratoriais pretendidos, ou por indicação do protocolo ao qual corresponde uma bateria de análises. Foram definidos vários protocolos pelo SPC em conjunto com os outros serviços da instituição de forma a facilitar o pedido.

É na área administrativa que é feito o atendimento dos utentes onde são registados todos os pedidos das análises em sistema informático. A cada utente é atribuído um número do processo da instituição e os resultados das análises ficarão registados no processo clínico respetivo.

Após o registo, a informação é passada para uma outra área onde se efetua a colheita e a receção das amostras. É composta por duas salas onde os técnicos superiores de análises clínicas são totalmente responsáveis pela realização das colheitas sanguíneas a doentes em regime de ambulatório. Para além de sangue, são também rececionadas amostras de urina, expectoração e fezes. Todas as colheitas efetuadas no internamento são realizadas pelos técnicos do SPC.

O processamento das amostras é feito em quatro setores: Hematologia, Química Clínica, Microbiologia e Imunologia/Hormonologia, em função do tipo de análise a realizar. Os resultados são validados pelo(a) médico(a) ou técnico(a) superior de saúde responsável pelo setor que os pode disponibilizar ao(à) clínico(a) em suporte de papel, informaticamente, ou por telefone, em casos de emergência.

2.1.1. Setor de Hematologia

O setor de Hematologia está sob a coordenação da Dr^a Isabel Joana Diamantino, Assistente Hospitalar Graduada, Especialista em Patologia Clínica pela Ordem dos Médicos.

Neste setor são realizadas diversas análises no campo da hematologia recorrendo ao uso de tecnologias e equipamentos (Tabela I) no processamento de amostras de sangue total, plasma, aspirado de medula óssea e líquidos orgânicos.

Tabela I - Equipamentos presentes no setor de hematologia.

Equipamento	Função
<i>Beckman Coulter® LH750 Analyzer</i>	Hemogramas, contagem diferencial de leucócitos, contagem celular em líquidos orgânicos, contagem de reticulócitos.
<i>Alifax® S.P.A Test I_{BCL}</i>	Velocidade de Sedimentação Globular.
<i>ACL TOP® CTS₅₀₀ Instrumentation Laboratory</i>	Estudos de hemóstase.
<i>GeneXpert® da Cepheid</i>	Estudos genéticos por sistema integrado de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.
<i>Beckman Coulter®Cytomics™ FC 500; Beckman Coulter®TQ. Prep™</i>	Estudos de imunofenotipagem por citometria de fluxo.
<i>WESCORAerospray® 7150 Hematology Slide Stainer-Cytocentrifuge</i>	Coloração e observação de esfregaços.

No Capítulo III – Hematologia serão abordados e aprofundados os conteúdos do relatório relativos a: i) hemograma; ii) parâmetros de avaliação eritrocitária; iii) velocidade de sedimentação globular; iv) esfregaço de sangue periférico; v) aspirados de medula óssea; vi) contagem de Líquido cefalorraquidiano (LCR); vii) pesquisa de presença e quantificação do gene BRC-ABL; viii) testes de coagulação; e ix) processos e procedimentos de controlo de qualidade do setor.

2.1.2. Setor de Microbiologia

O setor de microbiologia está sob a coordenação da Doutora Maria Alexandre Mendes, Assistente de Laboratório, Especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos.

Neste setor são realizadas análises bacteriológicas, micológicas, micobacteriológicas e parasitológicas às amostras recebidas, bem como a pesquisa de sangue oculto nas fezes e o estudo bioquímico de urina (sumária de urina) com observação do sedimento. Existe uma grande diversidade de amostras que chegam ao setor de microbiologia tais como: sangue total, urina, fezes, secreções respiratórias, líquidos orgânicos, exsudados genitais e de feridas auriculares e outros exsudados purulentos, fragmentos de biópsia, cateteres, e raspados de pele e fâneros.

No setor de Microbiologia realizam-se desde sementeiras dos diversos produtos descritos anteriormente, até ao isolamento de estirpes de microrganismos em meios adequados, sua identificação e testes de sensibilidade aos medicamentos antimicrobianos.

Pela sua especificidade, este setor é o que mais depende do trabalho manual dos(as) técnicos(as) especializados(as).

Por de se tratar de um trabalho essencialmente manual (inoculação dos meios, homogeneização de amostras, colorações de Gram e de Ziehl-Neelsen, entre outros) este tem de ser feito de uma forma muito minuciosa, pois a ele estão subjacentes o diagnóstico e respetivo tratamento da doença infecciosa. No entanto, o setor dispõe de equipamentos automatizados essenciais para a realização das análises microbiológicas (Tabela 2).

Tabela 2 - Equipamentos presentes no setor de microbiologia.

Equipamento	Função
<i>BD Bactec™ 9050 Blood Culture System</i>	Incubação e deteção de crescimento de microrganismos em Hemoculturas.
<i>Urisys® 1800 Roche Diagnostics</i>	Sumária de tipo II e observação do sedimento urinário.
<i>Vitek®2 Compact 15 da bioMérieux™</i>	Identificação de microrganismos e estudos de suscetibilidade aos antimicrobianos.
<i>Câmara de fluxo laminar Forma Scientific</i>	Utilizada para a manipulação de amostras.
<i>GeneXpert® da Cepheid</i>	Pesquisa da toxina de <i>Clostridium difficile</i> , de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , enzima <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i> em enterobactérias (KPC) e de <i>Staphylococcus aureus</i> com identificação de <i>Staphylococcus aureus metilina</i> resistente (SARM).
Estufas reguladas a diferentes temperaturas (25°C, 30°C, 37°C e 42°C)	

2.1.3. Setor de Química Clínica

O setor de Química Clínica ou Bioquímica é coordenado pelo Dr. Luís do Espírito Santo Nina, Assistente Hospitalar Graduado, Especialista em Patologia Clínica pela Ordem dos Médicos.

A maioria do trabalho laboratorial realizado na rotina deste setor baseia-se na avaliação automatizada de parâmetros bioquímicos, que auxiliam na avaliação do metabolismo dos diferentes órgãos do organismo, doseados no auto-analisador a partir do soro, fluido biológico obtido por centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos de sangue periférico após coagulação. Para além de amostras de soro, também permite o doseamento de hemoglobina glicada a partir de sangue total com ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) e o processamento de amostras de líquido cefalorraquidiano e diversos líquidos (pleural, ascítico) e urina.

Apesar do trabalho efetuado ser na sua globalidade automatizado (Tabela 3), ainda há espaço para a realização de técnicas manuais, cuja metodologia base se apoia em reações de aglutinação Antígeno-Anticorpo. As provas serológicas realizadas incluem a pesquisa do fator reumatóide, anticorpos contra a *Brucella sp*, *Salmonella sp*. e *Treponema Pallidum*. O ensaio espetofotométrico manual mais comum é o doseamento do cobre.

Tabela 3 - Equipamentos presentes no setor de química clínica.

Equipamento	Função
<i>Cobas® 6000 e Cobas® c311 da Roche Diagnostic™</i>	Avalia a maioria dos parâmetros bioquímicos
<i>Reflotron® Plus da Roche® Diagnostics</i>	Analisador de química seca
<i>Rapidlab® 1265 da Siemens™</i>	Gasometria
<i>ABL 800 FLEX da Radiometer® Copenhagen</i>	Doseamento de cálcio ionizado e gasometria
<i>RapidChem™ 744 da Bayer®</i>	Ionograma (utilizado na confirmação de resultados)
<i>Shimadzu Spectrophotometer UV-120-02</i>	Ensaio espetofotométricos
<i>AQT90 Flex da radiometer®</i>	Marcadores cardíacos (mioglobina, Creatina quinase-MB (CK-MB) e troponina I)

2.1.4. Setor de Imunologia/Hormonologia

O setor de Imunologia e Hormonologia está sob a direção do Dr. Nuno Alexandre Ferreira da Cunha, Técnico Superior de Saúde, Assistente de Laboratório, Bioquímico, Especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Biólogos.

É o único setor do serviço de patologia clínica que apresenta duas áreas juntas no mesmo espaço físico (imunologia e hormonologia), funcionando desta forma como um todo.

O setor Imunologia e Hormonologia é o que mais meios tecnológicos dispõe devido à grande variedade de doseamentos que efetua (Tabela 4). Apresenta uma estreita relação com o setor de Química Clínica no sentido em que ambos os setores utilizam maioritariamente amostras de soro para os parâmetros determinados, apoiando-se mutuamente em casos de colheitas difíceis.

Tabela 4 - Equipamentos presentes no setor de imunologia/hormonologia.

Equipamento	Princípio do Método	Parâmetros Doseados
IMMULITE 2000 XPI da Siemens	Quimioluminescência	α -fetoproteína (AF)
		Δ 4-androstenediona (AND)
		Anticorpo Anti-Peroxidase (TPO)
		Anticorpo Anti-Tiroglobulina (ATG)
		Calcitonina (CAL)
		Antigénio carcinomaembrionário (CEA)
		Eritropoietina (EPO)
		Forma livre do antigénio específico da próstata (fPSA)
		Gastrina (GAS)
		Hormona Libertadora de Gonodotrofina (GRH)
		Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG)
		Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)
		Imunoglobulina Estimulante da Tiróide (TSI)
ADVIA CENTAUR® XP da Siemens	Quimioluminescência	17 α -ethynylestradiol (Ee2)
		Ferritina (FER)
		Hormona Folículo-Estimulante (FSH)
		Imunoglobulina E (IgE)
		Hormona Luteinizante (LH)
		Prostaglandina E (PRGE)
		Prolactina (PRL)
		Progesterona (PROG)
		Paratormona (PTH)
		Inibidor tecidual de metaloproteinases I (TIMP-I)
		Hormona Estimulante da Tiróide (TSH)
		Vitamina D

KRYPTOR da BRAHMS	TRACE	Procalcitonina (PCT)
		Enolase específica do neurónio (NSE)
		Antigénio Glucídico 15.3 (CA 15.3)
		Antigénio do carcinoma de células escamosas (SCC)
		Cromogranina A
COBAS 6000 da ROCHE	Eletroquimioluminescência	Vitamina B12
		Ácido fólico
		Insulina
		Peptídeo C
		Cortisol
		Testosterona total
		Antigénio Glucídico 19.9 (CA 19.9)
		Antigénio Glucídico 125 (CA 125)
		Antigénio Glucídico 72.4 (CA 72.4)
		Tiroxina, fracção livre (T4L)
		Triiodotironina, fracção livre (T3L)
		Antigénio formado por um fragmento da citoqueratina 19 (CYFRA 21.1)
		Percursor do peptídeo natriurético tipo B (Pro-BNP)
		Tiroglobulina (TG)
“Human epididymis protein 4” (HE-4)		
Autoanticorpos anti -recetor da TSH (TRABs)		
Percursor do péptido libertador de gastrina (Pro-GRP)		
LIAISON da DIASORIN	Quimioluminescência	Serologia Infeciosa
BN PROSPEC	Nefelometria	Proteínas de fase aguda
OPTILITE	Turbidimetria	Cadeias Kappa e Lambda
LBK Wallac 1272	Contador Gama	Técnicas manuais com radioisótopos

No Capítulo IV – Imunoensaios e Marcadores Tumorais será efetuada uma caracterização mais pormenorizada do setor de Imunologia/ Hormonologia, em termos de imunoensaios, dos marcadores tumorais, relativos aos carcinomas da mama, colorretal e do

ovário, dos métodos de deteção do complexo antigénio-anticorpo, e do controlo da qualidade do setor.

2.2 Controlo de Qualidade

Tratando-se de um laboratório inserido numa unidade hospitalar da área oncológica, compete ao SPC a responsabilidade acrescida de assegurar que a qualidade do produto (resultados dos exames) espelhe de forma fidedigna, e consistente o estado clínico dos(as) utentes.

Para tal, são implementadas metodologias de controlo dos procedimentos que medeiam as etapas desde a colheita até à obtenção do resultado, prevendo, identificando e corrigindo falhas, no sentido de minimizar as suas consequências (1).

Esses procedimentos enquadram-se em três fases do ciclo analítico laboratorial: a Fase Pré-Analítica; a Fase Analítica; a fase Pós-Analítica. A fase pré-analítica inclui os processos de atendimento dos(as) utentes, colheita de amostras, triagem e conservação das mesmas no seu transporte. A fase analítica corresponde à fase da realização da análise em si, compreendendo a manutenção dos equipamentos, a calibração, o controlo de qualidade e a preparação das amostras. Por último, a fase pós-analítica consiste na avaliação final de todos os resultados, que pode culminar com a validação biopatológica, e na emissão e entrega do relatório analítico.

No decurso destas fases, devem ser implementadas ações preventivas e de controlo do aparecimento de não conformidades com o protocolo ou erros (2), que podem ocorrer em qualquer fase do ciclo, mas com maior incidência na fase pré-analítica (Tabela 5).

Tabela 5 - Fases do ciclo analítico laboratorial e erros comuns em cada fase.

Fase do Ciclo Analítico	Erros Comuns
Pré-analítica (3)	Colheita e transporte incorretos da amostra Contaminação biológica Erro na rotulagem Identificação incorreta do doente Identificação incorreta do recipiente Recipiente incorreto Requisição de um teste inadequado Volume de amostra insuficiente
Analítica	Falha não detetada no controlo da qualidade Funcionamento incorreto do equipamento Interferências
Pós-Analítica	Demora na disponibilização dos resultados Erro no relatório clínico Introdução incorreta dos resultados Validação incorreta dos resultados

Além do controlo de qualidade interno, o SPC está abrangido por programas de controlo de qualidade externos, como o do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) aplicado às diversas áreas (Hematologia, Imunologia/Hormonologia, Química Clínica e Microbiologia), o programa internacional UKNEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*) relativo à citometria de fluxo, o programa internacional RIQAS (*Randox International quality assesement scheme*) aplicado à Hematologia, Química Clínica e Imunologia.

Capítulo III – Hematologia

A hematologia é definida pelo estudo do sangue e dos seus componentes, dos órgãos hematopoiéticos e da hematopoiese. Pelo seu papel crítico na manutenção da vida, o sangue tem sido referido como “o rio da vida”. O exame de rotina do sangue – o hemograma, é feito através da contagem das células sanguíneas completa e é o teste mais realizado na rotina laboratorial.

O sangue é um dos mais complexos sistemas no corpo humano sendo o sistema hematológico constituído pelo sangue, medula óssea, baço e sistema linfático. No adulto, o sangue é formado por aproximadamente 55% de plasma (componente líquido) e 45% de elementos celulares: eritrócitos (RBC), leucócitos (WBC) e plaquetas (PLT). Os elementos celulares do sangue são formados a partir das células estaminais hematopoiéticas da medula óssea. O sangue exerce funções de transporte de componentes metabólicos, nutrientes, hormonas, trocas gasosas entre o oxigénio pulmonar (O_2) e o dióxido de carbono (CO_2) resultante do metabolismo celular, defesa imunológica pelos glóbulos brancos e por outras moléculas solúveis e hemóstase.

O setor de Hematologia tem como funções a realização de análises de rotina, que contribuem para o diagnóstico de doenças hematológicas através do estudo dos elementos figurados do sangue, bem como a monitorização da terapêutica do(a) doente ao longo do tempo, contribuindo para ajudar o clínico a ajustar a terapêutica sempre que seja pertinente.

Este setor compreende duas salas, sendo que uma delas é responsável pela realização de hemogramas, da determinação da velocidade de sedimentação eritrocitária e esfregaços de sangue periférico (Hematologia 1), e a outra pela realização de testes de coagulação (Hematologia 2).

3.1. Sala de Hematologia I

Assim que as amostras chegam ao setor de Hematologia, vindas da sala de colheitas, são separadas de acordo com a análise a efetuar (Figura 1), sendo que os tubos que contém a tampa roxa, com o anticoagulante EDTA (4), ficam na sala de Hematologia I e após devidamente etiquetados são colocados num agitador mecânico. Posteriormente, com a requisição a acompanhar a amostra são colocados em *racks* e inseridos nos analisadores automáticos da *Beckman Coulter*[®] *LH750 Analyzer* que são responsáveis pela realização do

hemograma. Para além desta análise, o(a) médico(a) poderá pedir na requisição a determinação da velocidade de sedimentação (VS) e o esfregaço de sangue periférico (ESP) ou este poderá também ser efetuado sempre que se achar necessário no ato da validação.

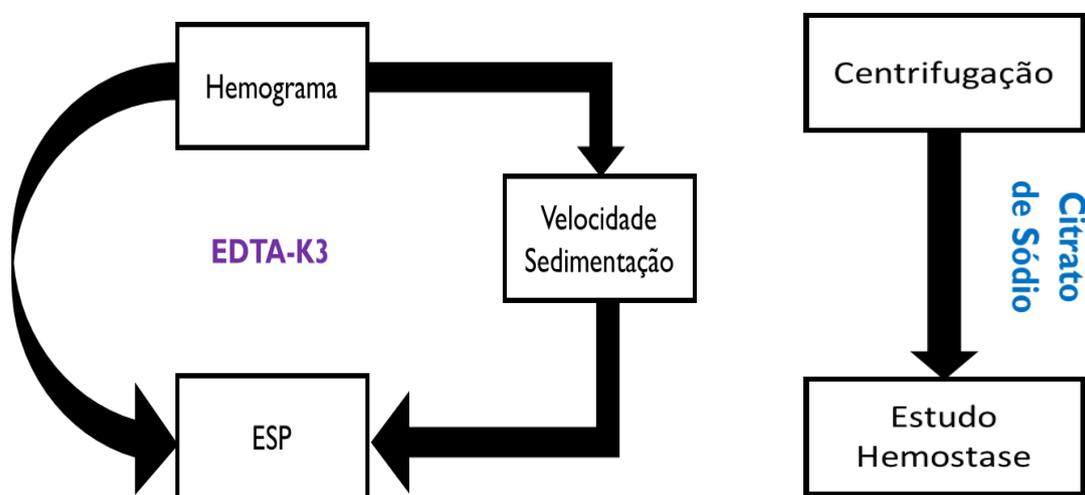


Figura 1 - Esquema representativo do circuito das amostras.

3.1.1. Hemograma

O hemograma é utilizado como auxiliar no rastreio, diagnóstico e monitorização de diferentes patologias, fornecendo informações qualitativas e quantitativas sobre o estado hematológico de um indivíduo. O hemograma inclui a quantificação dos elementos sanguíneos (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) (Anexo I).

Assim, um hemograma engloba a avaliação eritrocitária em que se inclui a contagem de eritrócitos, e a determinação da concentração de hemoglobina (HGB), do hematócrito (Hct) e dos índices eritrocitários – volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MHC), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) e amplitude da distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW), e compreende ainda a avaliação dos leucócitos, fazendo-se a contagem total e a contagem diferencial, ou seja, estabelecendo um valor relativo e absoluto dos vários tipos de leucócitos. Um estudo hematológico básico inclui, ainda, a avaliação plaquetária com contagem do número total de plaquetas (5,6).

O contador automático utilizado neste setor permite ainda a contagem de reticulócitos (RET) e de eritroblastos nucleados (NRBC) importantes no estudo hematológico. O hemograma executado no contador automático é feito com um pequeno volume de sangue total colhido para um tubo com o anticoagulante EDTA, que faz a

quelação de íões metálicos entre eles o Ca^{2+} , inibindo assim o processo de coagulação uma vez que este é um processo que depende de Ca^{2+} . Entre os quelantes de cálcio, o EDTA é o que preserva melhor a morfologia celular sanguínea (4). A amostra devidamente homogeneizada deve ser processada até 2-4 horas após a colheita.

A contagem dos elementos figurados do sangue é realizada no contador hematológico *Beckman Coulter*[®] *LH750 Analyzer* (7). Este equipamento possui um sistema gráfico de distribuição de resultados, alertas de processamento relativos ao aparelho e às amostras (por exemplo, alertas para falha de reagentes, entupimento da agulha, entre outros) e um sistema de alerta para alterações morfológicas, alterações quantitativas e para a presença de células precursoras. Permite ainda, o processamento de amostras em modo manual (usado para análise de amostras isoladas urgentes).

O equipamento *Beckman Coulter*[®] *LH750 Analyzer* apresenta um sistema de impedância elétrica aplicado à contagem celular (princípio de *Coulter*) (Figura 2). Esta metodologia tem como base a medição de alterações numa corrente elétrica durante a passagem de partículas, neste caso células sanguíneas (suspensas numa solução salina, isotónica e boa condutora), através de um pequeno orifício situado entre dois elétrodos. Como as células não são condutoras da corrente elétrica, a sua passagem causa uma interrupção de potencial entre os elétrodos, que gera um pulso elétrico proporcional ao volume da célula que lhe deu origem. É utilizada essencialmente para contagem de leucócitos após a lise dos eritrócitos. As plaquetas e os leucócitos são distinguidos com base no seu volume celular (6).

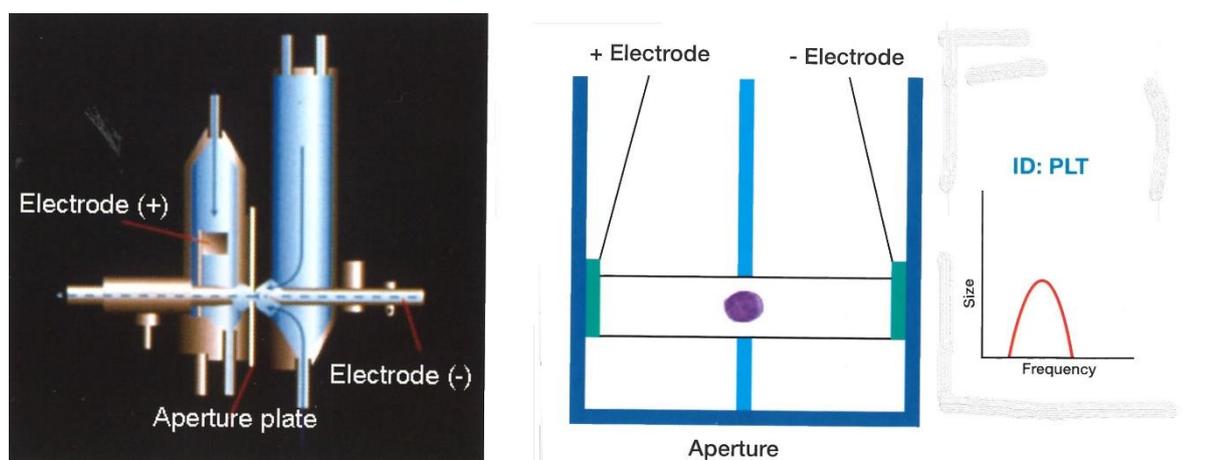


Figura 2 - Esquema representativo do sistema de impedância elétrica que tem como base o princípio de "Coulter". As células são diluídas com um eletrólito, direcionadas para um fluxo em movimento e passam através de um pequeno orifício (abertura) dentro de um transdutor (dispositivo de detecção). A passagem de cada célula através da abertura causa uma diferença de potencial entre os dois elétrodos. Desta alteração da corrente gera-se um pulso elétrico proporcional ao volume da célula que lhe deu origem. Fonte: Learning Guide Hematology, Abbott Diagnosis.

O número de pulsos gerados indica o número de células e o tamanho/amplitude do pulso representa o volume/tamanho da célula. Por seu lado, a soma dos impulsos de todas as células num volume específico é avaliada com recurso a um histograma.

A contagem diferencial das cinco populações de leucócitos em linfócitos, monócitos, eosinófilos, neutrófilos e basófilos faz-se conjugando a medida do tamanho da célula (*volume*), a condutividade (*conductivity*) e a dispersão (*scatter*) da luz laser provocada por cada tipo de leucócito – tecnologia VCS. A amostra é tratada com um sistema de dois reagentes: um procede à lise dos eritrócitos da amostra e o outro atua estabilizando os leucócitos de forma a que mantenham a sua forma quase nativa essencial para a contagem. O tamanho é determinado com base no princípio de *Coulter*, já descrito. A condutividade é determinada através do uso de uma corrente eletromagnética que ao penetrar no leucócito permite obter informação acerca da estrutura interna da célula. Por fim, com o recurso a uma luz laser determinam-se as características superficiais de cada célula de acordo com a dispersão da luz que é gerada pela interação entre a luz laser e o leucócito. Estas determinações são feitas em simultâneos e os resultados representados num gráfico tridimensional.

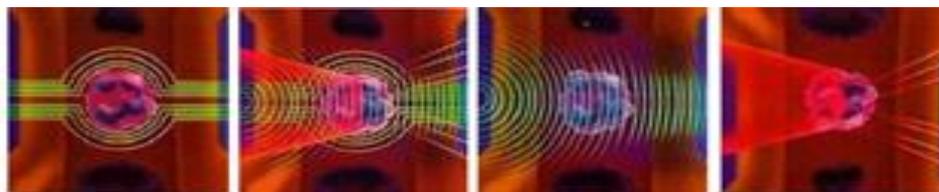


Figura 3 - Tecnologia VCS.

A primeira imagem representa a determinação do volume, a segunda a condutividade e a terceira a dispersão da radiação. A imagem final representa a conjugação das três propriedades anteriores formando a o VCS.

Fonte: <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto216/coulter/ss000125.htm>

A hemoglobina é determinada por um método fotométrico, que tem por base a passagem de um feixe de luz branca, proveniente de uma lâmpada incandescente, através de um filtro de comprimento de onda de 525 nm e através de uma cuvete. A intensidade da luz é medida num detetor e a absorvância do pigmento será proporcional à concentração de hemoglobina presente na amostra. Esta medição é feita antes da contagem dos glóbulos brancos, uma vez que implica a lise dos glóbulos vermelhos com consequente libertação do conteúdo de hemoglobina (6).

Em termos de hemograma, o equipamento *Beckman Coulter® LH750 Analyzer* permite a análise dos parâmetros indicados na tabela 6 e que passarei a descrever.

Tabela 6 - Parâmetros avaliados pelo Beckman Coulter® LH750 Analyzer e sua designação.

Parâmetro	Designação (Unidades)
RBC	Eritrócitos (nº/l)
PLT	Plaquetas (nº/l)
HGB	Hemoglobina (g/dl)
Hct	Hematócrito (%)
MCV	Volume corpuscular médio (fl)
MCHC	Concentração de HGB corpuscular média (g/dl)
MCH	HGB corpuscular média (pg)
WBC	Leucócitos (nº/l)
%Neut e #Neut	Neutrófilos (% e valor absoluto)
%Mono e #Mono	Monócitos (% e valor absoluto)
%Lymph e #Lymph	Linfócitos (% e valor absoluto)
%Eos e #Eos	Eosinófilos (% e valor absoluto)
%Baso e #Baso	Basófilos (% e valor absoluto)
RDW	“Red cell distribution width” (grau anisocitose)
%NRBC e #NRBC	Eritroblastos (% e valor absoluto)
%RET e #RET	Reticulócitos (% e valor absoluto)

3.1.1.1. Parâmetros de avaliação eritrocitária

O processo de formação dos eritrócitos designa-se por eritropoiese. Ao longo do desenvolvimento humano a eritropoiese ocorre em distintas áreas anatómicas: durante o período embrionário ocorre nas ilhas sanguíneas do saco vitelino; no período fetal, predominantemente no fígado; durante a vida adulta, principalmente na medula óssea.

A eritropoiese tem início quando uma célula estaminal hematopoiética multipotente inicia um conjunto de processos que vai culminar com o seu comprometimento à linhagem eritróide. As primeiras células desta linhagem, as unidades formadoras de crescimento rápido eritróide (BFU-E), dependem de muitos fatores de crescimento para a sua diferenciação em unidades formadoras de colónias eritróides (CFU-E), nomeadamente do fator de células estaminais (SCF) e, por sua vez, estas células irão diferenciar-se em pro-eritroblastos. Estes vão-se diferenciar sucessivamente em eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromatófilos e eritroblastos ortocromáticos. A diferenciação prossegue dando origem aos reticulócitos (células anucleadas), que passam por diapedese através da

parede dos sinusoides medulares para o sistema circulatório dando origem aos eritrócitos maduros (Figura 4) (8). O período médio de vida dos eritrócitos é cerca de 120 dias.

MEDULA

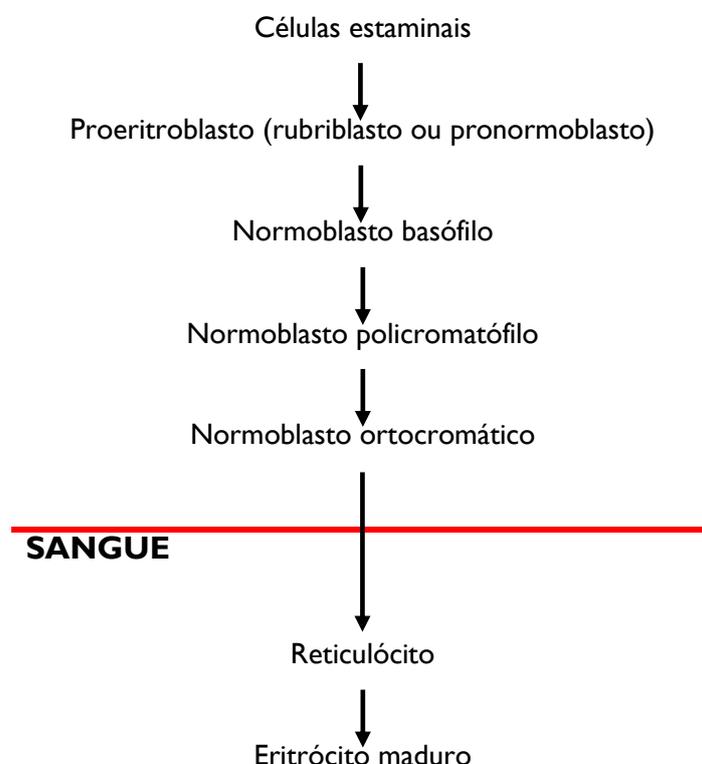


Figura 4 - Formação dos eritrócitos.
Adaptado de Learning Guide Hematology, Abbott Diagnosis

Os diferentes parâmetros analisados no estudo eritrocitário permitem o diagnóstico de patologias tais como, anemias (concentração diminuída de hemoglobina em função do sexo e idade do indivíduo) e policitémia (aumento do valor do hematócrito devido ao aumento do número de eritrócitos, diminuição do volume plasmático ou ambos, com conseqüente aumento da viscosidade sanguínea). As anemias podem ser classificadas em anemia hemorrágica, anemia hemolítica, anemia hipoproliferativa e anemia aplástica (Tabela 7) (9).

Tabela 7 - Classificação fisiopatológica das anemias.

Hemorrágica	<ul style="list-style-type: none">• Aguda• Crónica
Aplástica	<ul style="list-style-type: none">• Insuficiência Medular
Hipoproliferativa	<ul style="list-style-type: none">• Défice nutricional• Défice absorção
Hemolítica	<ul style="list-style-type: none">• Hereditária• Adquirida

Esta patologia é detetada com bastante frequência, uma vez que os(as) doentes oncológicos(as) na generalidade apresentam valores de hemoglobina abaixo dos valores de referência, devido aos tratamentos de quimioterapia agressivos. Estes interferem com o mecanismo de eritropoiese e na absorção a nível intestinal, uma vez que um dos efeitos secundários da quimioterapia são vômitos e diarreia (não há absorção do ferro essencial na constituição de hemoglobina).

Os parâmetros eritrocitários fornecidos pelos contadores automáticos, que são descritos em seguida, ajudam ao diagnóstico das anemias.

3.1.1.1.1. Hemoglobina

A hemoglobina é uma hemoproteína constituída por um grupo prostético, o *heme* e por uma parte proteica, a *globina*. Este grupo confere-lhe uma cor característica, e é constituído por uma parte orgânica e um átomo de ferro, no estado ferroso [Fe(II)]. A sua concentração é determinada espectrofotometricamente no analisador automático. É utilizado um reagente de lise que destrói os eritrócitos libertando a hemoglobina do seu interior que, por sua vez, vai-se ligar ao cianeto de potássio que faz parte da constituição do reagente de lise celular, originando um composto estável, a ciano-metahemoglobina. A sua absorvância é diretamente proporcional à sua concentração expressa em g/dl (6).

A determinação da hemoglobina é muito importante para o diagnóstico de anemias, uma vez que o seu valor se encontra diminuído nesta patologia (8,9).

3.1.1.1.2. Hematócrito

O Hematócrito Hct corresponde ao volume ocupado pelos glóbulos vermelhos num volume total de sangue. É expresso em percentagem (%). É um parâmetro calculado pelo equipamento automático com base no número de eritrócitos e do volume corpuscular médio (MCV) através da fórmula descrita abaixo (6):

$$\text{Hct (\%)} = [\text{RBC (n}^\circ\text{/l)} \times \text{MCV (fl)}] \times 100$$

3.1.1.1.3. Volume Corpuscular Médio

O Volume Corpuscular Médio MCV é o índice hematimétrico que corresponde à média do volume de eritrócitos expresso em fentolitros (fl). É importante no diagnóstico de anemias por ser comumente utilizado na avaliação do grau de anisocitose (variação no

tamanho dos eritrócitos). A anemia classifica-se normocítica quando o MCV se encontra dentro dos valores de referência (80-100 fl), macrocítica quando o MCV é superior a 100 fl (eritrócitos macrócitos) e microcítica quando o MCV é inferior a 80 fl (eritrócitos micrócitos). O MCV na *Beckman Coulter® LH750 Analyzer* é determinado por impedância. O resultado pode ainda ser calculado com base na fórmula seguinte (6,9):

$$\text{MCV (fl)} = \text{Hct (\%)} \times 10 / \text{RBC (n}^\circ\text{/l)}$$

3.1.1.1.4. Hemoglobina Corpuscular Média

A Hemoglobina Corpuscular Média HCM corresponde à hemoglobina presente em cada eritrócito. Este parâmetro pode ser obtido dividindo o valor de hemoglobina pelo número total de eritrócitos. Quando o valor se encontra dentro do intervalo de referência, as anemias são consideradas normocrómicas e quando se encontra diminuído são consideradas hipocrómicas. O resultado é expresso em picogramas (pg) e calculado com base na fórmula seguinte (6):

$$\text{HCM (pg)} = [\text{HGB (g/dl)} / \text{RBC (n}^\circ\text{/l)}] \times 10$$

3.1.1.1.5. Concentração Média da Hemoglobina Corpuscular

A Concentração média da hemoglobina corpuscular (CMHC) é o parâmetro que corresponde à concentração média da hemoglobina por eritrócitos e é expresso em g/dl. O parâmetro é calculado com base na fórmula abaixo (6,9).

$$\text{CHCM (g/dL)} = [\text{HGB (g/dl)} / \text{Hct (\%)}] \times 100$$

3.1.1.1.6. Índice de anisocitose eritrocitária

O Índice de anisocitose eritrocitária ou *red cell distribution with* (RDW) é um parâmetro da variabilidade do tamanho dos eritrócitos, traduzindo o grau de anisocitose dos eritrócitos (6).

Este índice é obtido a partir do histograma dos eritrócitos e é expresso em percentagem (%).

O aumento do RDW tem sido utilizado como indicador precoce de anemia.

A combinação dos dois parâmetros RDW e MCV podem ser utilizados no diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas que apresentam uma população homogénea de eritrócitos, como por exemplo na talassemia *minor* e anemia das doenças crónicas, daquelas que apresentam uma população heterogénea, como é o caso da anemia por falta de ferro (10).

3.1.1.1.7. Reticulócitos

Os reticulócitos correspondem a eritrócitos imaturos no estágio final da diferenciação celular na medula óssea. O tempo médio da maturação dos reticulócitos é de cerca de 4 dias, sendo que a maturação nos três primeiros dias ocorrem na medula óssea e nas últimas 24 horas são libertados para a corrente sanguínea. São células anucleadas, mas que apresentam a capacidade de produção de hemoglobina devido à presença de RNA mensageiro no citoplasma. Têm volume ligeiramente reduzido e adquirem o formato bicôncavo e a coloração citoplasmática própria dos eritrócitos maduros.

A contagem de reticulócitos constitui um fator importante no diagnóstico, classificação e monitorização do tratamento das anemias, bem como na confirmação da regeneração da medula óssea após transplante ou quimioterapia, uma vez que a determinação dos reticulócitos serve como um indicador da produção de eritrócitos pela medula óssea (6).

3.1.1.1.8. Eritroblastos

A presença de eritroblastos no sangue periférico pode levar a uma contagem total errada de leucócitos pelos analisadores hematológicos. Os eritroblastos são células nucleadas e, por isso, não sofrem o processo de lise como os eritrócitos maduros. Os eritroblastos são considerados um reflexo de aumentos extremos da atividade eritropoiética na medula óssea (MO), como sucede em episódios hemolíticos agudos e de *stress* hipóxico severo, ou como resultado de doença maligna hematológica, incluindo muitas leucemias e síndromes mielodisplásicas, bem como alguns tipos de linfomas (9).

3.1.1.1.9. Parâmetros de avaliação plaquetária

As plaquetas são fragmentos anucleados presentes no sangue e produzidos a partir dos megacariócitos na medula óssea. Do total das plaquetas que existem no organismo

humano, cerca de 70% encontram-se na circulação sanguínea, sendo removidas pelas células do sistema reticuloendotelial ao fim de 10 dias.

Um valor baixo de plaquetas ou trombocitopenia é a causa mais comum de sangramento anormal. Os casos de trombocitopenia verdadeira são devidos à produção insuficiente de plaquetas na medula óssea, destruição de plaquetas na corrente sanguínea, ou a um aumento do consumo de plaquetas. Dois exemplos mais frequentes de trombocitopenia são a Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI) e a Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT) (8).

A Púrpura Trombocitopénica Idiopática é uma doença autoimune caracterizada pela produção de anticorpos contra as plaquetas do próprio paciente, que são então destruídas por fagocitose principalmente no baço. O quadro clínico é caracterizado por epistáxis, petéquias, púrpuras na pele e equimoses no corpo. A medula funciona normalmente podendo haver um aumento do número de megacariócitos, assim como megacariócitos imaturos em número variável.

A Púrpura Trombocitopénica Trombótica (síndrome de Moschowitz) é uma doença rara grave que afeta ambos os sexos caracterizada por cinco sinais clássicos: anemia hemolítica microangiopática; trombocitopenia; alterações neurológicas; febre e disfunção renal. É uma doença microvascular que poupa as vénulas e acomete arteríolas e capilares. As lesões vasculares caracterizam-se por pequenos trombos devido à agregação plaquetária que, por sua vez, origina uma redução do fluxo sanguíneo e lise dos eritrócitos (anemia hemolítica). Estas alterações poderão estar na origem de diversos eventos trombóticos e alterações neurológicas que podem variar de uma simples dor de cabeça ao coma, quando ocorre o bloqueio da microcirculação no cérebro.

A trombocitose (aumento do número de plaquetas) está presente em patologias como a Trombocitémia Essencial, a Leucemia Mielóide crónica e a Policitémia Vera (8).

3.1.1.1.10. Parâmetros de avaliação leucocitária

O leucograma compreende a contagem global de leucócitos e a fórmula leucocitária que consiste na contagem diferencial de cada um dos leucócitos presentes no sangue periférico (5). Os eritrócitos podem ser agrupados em duas categorias diferentes: mononucleares e os polimorfonucleares (8). Os primeiros incluem os linfócitos e os monócitos cuja característica é a de apresentar um núcleo único e uniforme. Os leucócitos

polimorfonucleares são também chamados de granulócitos, pela presença de granulação citoplasmática, e incluem os neutrófilos, eosinófilos e basófilos, possuindo um núcleo multifórmico e segmentado.

Os neutrófilos têm um papel fundamental na defesa do organismo, fagocitando e digerindo microrganismos. Os eosinófilos estão presentes predominantemente no sangue periférico e medeiam o processo inflamatório associado a reações alérgicas, e são cruciais na defesa contra parasitas metazoários helmínticos. Os basófilos participam também em reações alérgicas e produzem mediadores inflamatórios como a histamina. Os monócitos migram para os tecidos periféricos onde se diferenciam em vários tipos de macrófagos. A sua principal função é a fagocitose. Os linfócitos B e T são células do sistema imunológico adaptativo.

3.1.1.2. Velocidade de Sedimentação

Para realização deste teste, os tubos primários de EDTA são colocados no equipamento *Alifax® S.P.A Test 1_{BCL}*, que permite a análise da velocidade a que sedimentam os eritrócitos no sangue. A velocidade de sedimentação (VS) depende da maior ou menor capacidade de agregação dos eritrócitos, sendo que esta está sujeita à presença de certas proteínas que neutralizam as cargas negativas dos eritrócitos e o efeito de repulsão entre si. A análise é pois realizada por fotometria cinética (6). Por norma, durante 20 segundos realizam-se 1000 medições (50 medidas por segundo) da densidade ótica da amostra num sistema capilar, sendo expressos os valores em mm/h (milímetros por hora). Os valores normais situam-se entre 1-20 mm/h.

É um teste utilizado na documentação do processo inflamatório, infeccioso ou neoplásico embora seja considerado inespecífico. A VS encontra-se aumentada em situações de hemodiluição, aumento de proteínas de fase aguda, aumento de imunoglobulinas e neoplasias malignas.

3.1.1.3. Esfregaço de Sangue Periférico

Sempre que a contagem globular automática gera resultados duvidosos, deve ser realizada uma visualização microscópica do esfregaço de sangue periférico (ESP) e, se necessário, uma contagem manual das células (Figura 5) (11). Como se observa na figura 5 para além das células de morfologia aparentemente normal, as manchas de gumprecht são restos celulares de pequenos linfócitos caracterizados por uma fragilidade da membrana

celular que leva à rotura da célula linfocitária aquando da execução do esfregaço de sangue periférico.

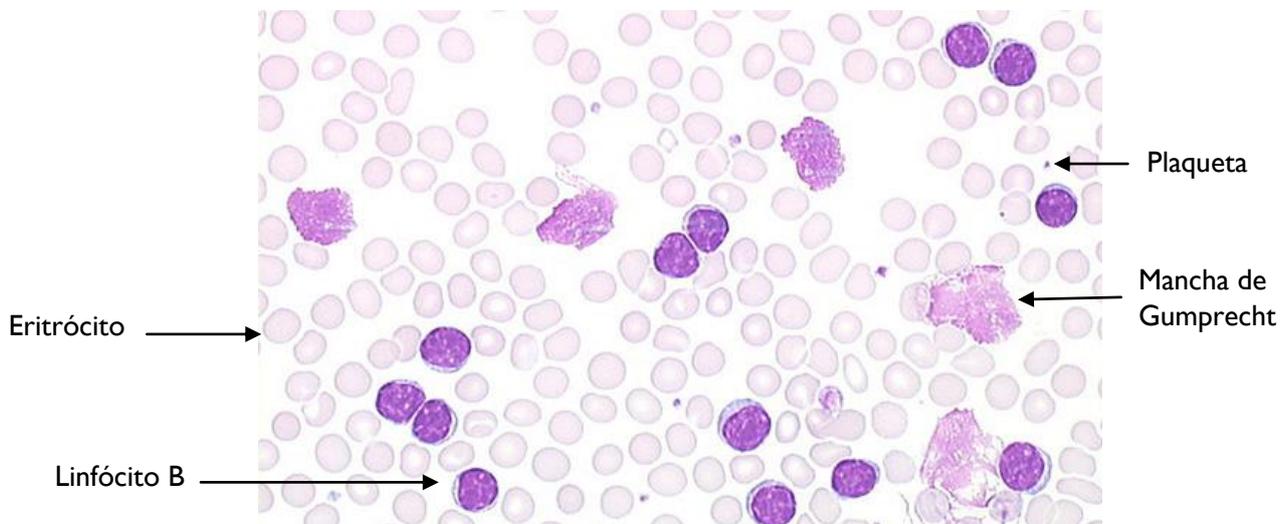


Figura 5 - Leucemia Linfocítica Crónica B.

Fonte: <https://www.germanodesousa.com/page/doencas/article/exame-morfologico-do-sangue-periferico-e-medula-ossea>

A observação cuidada do ESP avalia o número e a morfologia celular através da observação microscópica. Torna-se essencial que este seja bem executado, pois só assim permitirá uma boa contagem e identificação das células sanguíneas. O EPS é feito em lâmina pela técnica de espalhamento (Figura 6). É importante ter atenção ao tamanho da gota que é colocada sobre a lâmina, pois pretende-se obter um esfregaço fino (monocamada celular), com bordos retos, extensão lisa, uniforme e sem "buracos" ou linhas de interrupção, com a ocupação de cerca de dois terços da lâmina e término em franja.

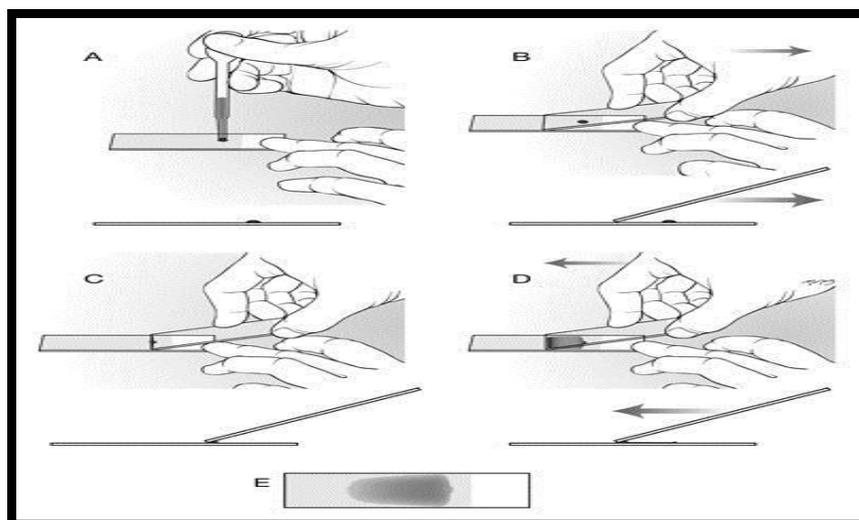


Figura 6 - Esquema do ESP.

Fonte: <https://ahdc.vet.cornell.edu/sects/clinpath/sample/test/hema.cfm>

O melhor local para a avaliação da morfologia das células sanguíneas é a borda fina do esfregaço, onde os eritrócitos se encontram numa única camada, lado a lado, sem sobreposição. Após a realização do esfregaço segue-se a secagem e a coloração pela técnica de *Wright-Giemsa*. Na etapa coloração, primeiramente é usado o metanol como fixador e posteriormente é utilizada uma solução de azul de metileno e eosina. A eosina liga estruturas basófilas das células originando um tom rosa. O azul metileno cora as estruturas acidófilas das células de azul. É utilizado o equipamento *WESCOR Aerospray® 7150 Hematology Slide Stainer-Cytocentrifuge* (12) que permite a coloração total de 12 esfregaços em apenas alguns minutos.

A observação ao microscópio deve ser efetuada primeiramente recorrendo à objetiva de 10x (ampliação de 100x) para se observar o aspeto geral do esfregaço. De seguida recorre-se à objetiva de 50x (ampliação de 500x) na zona menos densa do esfregaço onde as células se encontram mais afastadas facilitando a observação de alterações morfológicas de leucócitos, eritrócitos e plaquetas bem como contagem diferencial de leucócitos. Deve-se relatar sempre a presença de células precursoras das diferentes linhagens.

3.1.1.4 Aspirados de Medula Óssea

Para além da execução de esfregaços de sangue periférico, o setor de hematologia também receciona amostras de medula óssea (MO) (11,13).

O estudo histopatológico da medula óssea permite a avaliação citológica da medula, sendo útil no diagnóstico e monitorização de desordens hematológicas. A amostra é colhida para um tubo de EDTA e é corada da mesma forma que o ESP. A observação do esfregaço é feita com a objetiva de 10x para a avaliação de fragmentos ósseos e de megacariócitos. Com a objetiva de 100x deve ser realizada a contagem propriamente dita.

Adicionalmente a esta coloração é efetuada a coloração de *Perls*. Esta coloração é baseada na reação do azul da Prússia, em que o ião de ferro reage com o ferrocianeto ácido originando um composto de cor azul. Permite identificar depósitos de Fe nos normoblastos, passando estes a designarem-se de sideroblastos.

Os esfregaços de medula óssea fornecem informações relevantes no diagnóstico e monitoramento de Leucemias/Linfomas, de Mieloma Múltiplo, de Síndrome Mielodisplásica,

da aplasia medular, da doença metastática na medula óssea, e na investigação de citopenias (9).

3.1.1.5 Contagem celular no líquido cefalorraquidiano em Câmara de *Fuchs-Rosenthal*

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido semelhante ao plasma, presente nos plexos ventriculares, no canal central da medula óssea e no espaço subaracnóide. À sua alteração estão associadas a patologias que acometem o sistema nervoso central, como infeções (meningites virais ou bacterianas), hemorragias, doenças degenerativas e neoplasias.

A contagem celular é efetuada em câmara de *Fuchs-Rosenthal*. Por forma a eliminar possíveis eritrócitos presentes no LCR, devido à punção, é efetuada uma diluição em partes iguais com ácido acético.

Os eritrócitos apresentam um contorno regular com um halo central e os leucócitos um aspeto granular brilhante.

3.1.1.6 Pesquisa da presença e quantificação do gene BCR-ABL

A leucemia mielóide crónica faz parte de um grupo de doenças designadas por doenças mieloproliferativas. Mais de 95% dos pacientes com leucemia mielóide crónica possuem o característico cromossoma Filadélfia (Ph1), que resulta de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22. A translocação envolve a transferência do gene Abelson (ABL) do cromossoma 9 para o gene BCR (*breakpoint cluster region*) do cromossoma 22, resultando num gene BCR-ABL de fusão. O gene de fusão produz uma proteína, a p210, uma tirosina cinase com atividade desregulada, que desempenha um papel chave no desenvolvimento da leucemia mielóide crónica (14).

A pesquisa do gene de fusão é feita no equipamento *GeneXpert*[®] da *Chepheid* em amostras de sangue periférico ou medula óssea contidas em tubo de EDTA. O sistema *GeneXpert*[®] Dx automatiza e integra a purificação das amostras, a amplificação dos ácidos nucleicos e a deteção das sequências-alvo nas respetivas amostras.

Este sistema requer a utilização de cartuchos apropriados descartáveis, de utilização única onde decorre o processo.

A quantidade de transcrito de BCR-ABL é quantificada como o rácio de BCR-ABL/ABL.

3.2. - Sala de Hematologia 2

3.2.1. Testes de Coagulação

O sistema homeostático protege o sistema vascular e permite que, em caso de lesão, os tecidos sejam reparados e a suas funções restabelecidas. Depende de complexas interações entre a parede dos vasos, as plaquetas e os processos de coagulação e fibrinólise. Este sistema é constituído por várias fases: resposta vascular; hemóstase primária; hemóstase secundária e por último a fibrinólise. Os mecanismos envolvidos neste processo devem ser regulados para contrapor a perda excessiva de sangue, e evitar a formação de trombos intravasculares, garantindo assim, a integridade vascular e tecidular (15).

A resposta vascular é imediata e transitória e permite a redução do fluxo sanguíneo da área afetada e a manutenção das superfícies endoteliais justapostas através do mecanismo de vasoconstrição. A hemóstase primária consiste no processo de formação do trombo plaquetário, nos locais de lesão vascular através da adesão, secreção do conteúdo granular plaquetário, essencialmente ADP e tromboxano A_2 e agregação (ligação plaqueta-plaqueta para formar o trombo plaquetário) que são de extrema importância na limitação da perda sanguínea. A hemóstase secundária consiste na ativação da cascata de coagulação que culmina na formação de trombina para a conversão do fibrinogénio em fibrina. Esta cascata resulta da ativação sequencial de fatores de coagulação. É constituída por três vias: via intrínseca ou de contato, via extrínseca ou do fator tecidular e via comum (Figura 7). A via intrínseca é ativada pelo contato entre as plaquetas presentes no sangue com as superfícies carregadas negativamente do colagénio na região da lesão vascular. A via extrínseca é iniciada pela exposição a fatores tecidulares quando ocorre lesão vascular. Estas duas vias vão convergir na ativação da via comum, que vai conduzir à formação de trombina, que por sua vez vai levar à formação do coágulo de fibrina.

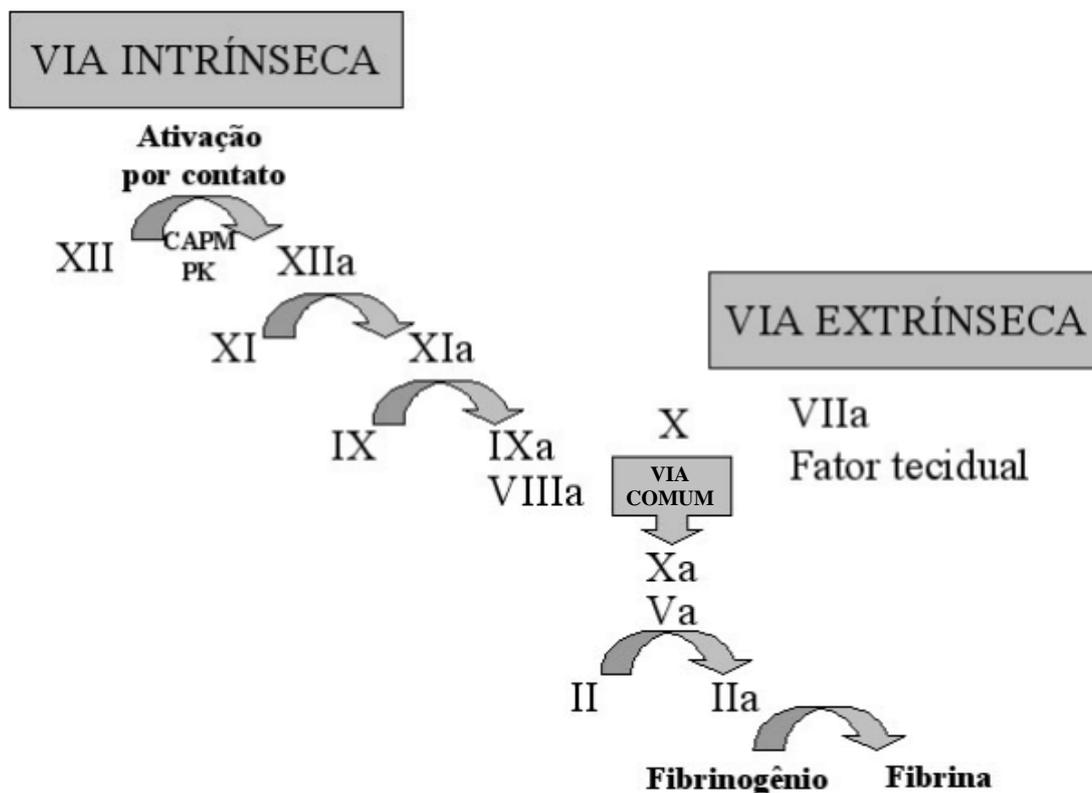


Figura 7 - Esquema representativo da cascata da coagulação.

O esquema representa as duas vias de ativação da cascata da coagulação (via intrínseca e via extrínseca), que convergem no ponto final de ativação do fator X (via final comum) desencadeando a geração de trombina e subsequente formação de fibrina.

Fonte: http://revista.fmrp.usp.br/2001/vol34n3e4/fisiologia_coagulacao.pdf

A fibrinólise que é um processo fisiológico pelo qual a fibrina formada é degradada.

A falência dos mecanismos de coagulação aumenta o risco de hemorragia, mas alterações a nível dos mecanismos reguladores (anticoagulantes naturais) e sistema fibrinolítico podem resultar em trombose.

Para avaliar a função homeostática são realizados testes de coagulação (15,16). As amostras utilizadas são colhidas para tubos com citrato de sódio e sofrem um processo de centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos de modo a obter um plasma pobre em plaquetas. As amostras devem ser processadas de imediato após centrifugação para evitar a degradação de fatores de coagulação. Amostras hemolisadas ou lipémicas podem provocar alteração dos tempos de coagulação.

As provas de coagulação são efetuadas no equipamento *ACL TOP[®] 500* que apresenta como metodologia a turbidimetria. A formação do coágulo de fibrina gera turvação, sendo medida por absorvância a um comprimento de onda de 870 nm.

3.2.1.1. Tempo de tromboplastina parcial ativada

O teste de Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) avalia a via intrínseca e também a comum. É útil na deteção de anticorpos lúpicos (se estiver presente verifica-se um aumento do TTPa que não corrige com o fornecimento de fatores) e na monitorização laboratorial da heparina. O teste baseia-se na adição ao plasma de fosfolípidos sintéticos, um ativador de contato (sílica) e cálcio que vão ativar a cascata e permitir a formação do coágulo. O valor de referência é de 28 segundos. Um TTPa prolongado pode indicar: deficiência de fatores I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII; doença hepática; coagulação intravascular disseminada; anticoagulantes orais (doses altas); déficit de vitamina K.

3.2.1.2. Tempo de protrombina

O teste de Tempo de protrombina (TP) avalia a via extrínseca e subsequente via comum. É utilizado na monitorização de anticoagulantes orais. O tempo é determinado através da adição de tromboplastina completa (equivalente á tromboplastina tecidual) e cálcio ao plasma citratado. O Rácio Internacional Normalizado (INR) corresponde a uma normalização internacional do tempo de protrombina permite uma correlação interlaboratorial do TP e um melhor controlo da terapêutica anticoagulante. O valor de referência é de 11,3 segundos. Um TP prolongado pode indicar: deficiência dos fatores I, II, V, VII, X; deficiência de vitamina K; coagulação intravascular disseminada; doença hepática; terapêutica com anticoagulantes.

3.2.1.3. Tempo de Trombina

O teste de Tempo de Trombina (TT) avalia a conversão do fibrinogénio em fibrina. Consiste na adição ao plasma de trombina e reflete o tempo de formação do trombo. O valor de referência é de 14 segundos. Um TT prolongado pode indicar: inibição da trombina (heparina, produtos de degradação da fibrina) ou fibrinogénio anormal.

3.2.1.4. D-Dímeros

Os D-Dímeros (DD) são um tipo de peptídeos formados como consequência da ação proteolítica da plasmina sobre a fibrina, o que confirma que houve geração de trombina. O valor de referência é de <278 ng/ml. Níveis elevados indicam fibrinólise e

podem estar associados a: trombozes venosas profundas; tromboembolia pulmonar; coagulação intravascular disseminada; enfarte agudo do miocárdio; cirurgias.

3.2.1.5. Fibrinogénio

O Fibrinogénio (Fib) é glicoproteína plasmática de alta massa molecular e solúvel no plasma sanguíneo, que se converte em fibrina pela ação da trombina. Origina-se no fígado e o seu défice pode estar associado a hemorragias e coagulação intravascular disseminada. O Valor de referência é de 200-400 mg/dl.

Para além destes testes, o setor de hematologia faz outras determinações mais específicas para um estudo de risco trombótico/fatores pró-trombóticos mais pormenorizado que serão descritas abaixo (16,17).

3.2.1.6. Antitrombina

A Antitrombina (AT) é o principal inibidor circulante da coagulação sendo sintetizada no fígado e nas células endoteliais. Inativa diretamente a trombina bem como as outras proteases da serina que intervêm na cascata de coagulação (fatores IXa, Xa, XIa, XIIa), bem como a plasmina e a calicreína (envolvida na ativação da via intrínseca). A atividade da AT é determinada através de um teste cromogénico que mede o nível de AT em duas etapas:

- Incubação do plasma com o reagente do Fator Xa, na presença de excesso de Heparina.
- Quantificação da atividade do Fator Xa residual com um substrato cromogénico sintético. A Paranitroanilina libertada é determinada por método cinético 405 nm, sendo o seu nível, inversamente proporcional à atividade de AT na amostra.

3.2.1.7. Proteína C

A Proteína C (PC) é uma proteína envolvida na regulação da ativação da coagulação, sendo conhecida pela ação proteolítica sobre os fatores Va e VIIIa, reduzindo a produção de trombina. A ativação da PC depende do complexo formado pela trombomodulina (TM) e trombina na superfície da célula endotelial. Está presente no plasma como zimogénio cuja síntese é dependente da vitamina K. Uma diminuição da ação da PC está descrita como um fator de risco trombótico. É utilizado um teste cromogénico para a avaliação da PC.

O nível de Proteína C no plasma dos doentes é medido automaticamente em duas etapas:

- Incubação do plasma do doente com o ativador da Proteína C (fração proteica derivada do veneno de serpente *Agkistrodon contortrix contortrix*).
- Quantificação da Proteína C ativada, utilizando um substrato cromogénico sintético. A Paranitroanilina libertada é determinada cineticamente a 405 nm, sendo o seu nível, diretamente proporcional à atividade de PC na amostra.

3.2.1.8. Proteína S livre

A Proteína S livre (PS) é uma proteína plasmática, dependente de vitamina K, que funciona como inibidor fisiológico da coagulação, ao atuar como co-fator da ativação da proteína C ativada, inibindo os fatores de coagulação Va e VIIIa. Em indivíduos saudáveis, 40% da PS circulante encontra-se na forma livre, enquanto que a restante circula ligada à C4b-BP (proteína ligada à C4b).

É determinada por turbidimetria através de um método imunológico em que ocorre uma reação de aglutinação com um anticorpo monoclonal adsorvido numa partícula de látex. O grau de aglutinação é proporcional à quantidade de PS livre.

3.2.1.9. Detecção do Anticoagulante e/ou Inibidor Lúpico

A presença de auto-anticorpos com afinidade para proteínas que se ligam aos fosfolípidos da membrana das plaquetas com carga negativa e a fatores de coagulação como a protrombina, representam um aumento de risco trombótico. Estes auto-anticorpos estão associados a patologias autoimunes como o Lúpus Eritematoso Sistémico. É característico verifica-se um aumento do tempo de tromboplastina parcial ativada que não corrige após o teste de mistura com plasma normal.

Para a pesquisa de anticoagulante e/ou inibidor Lúpico (AL) é necessário obter plasma sem plaquetas. Para tal, após a centrifugação da amostra de sangue colhida para um tubo de citrato (3000 rpm durante 10min), o plasma pobre em plaquetas é separado e centrifugado novamente (3000 rpm durante 10min).

O método utilizado é o do veneno da víbora de Russel diluído, composto por dois reagentes específicos: um de screen (*HemosIL dRVVT screen*) e outro de confirmação (*HemosIL*

dRVVT confirmatório). O reagente de *screen* apresenta uma baixa concentração de fosfolípidos. O reagente de confirmação apresenta excesso de fosfolípidos. Quando o inibidor lúpico está presente obtemos uma correção do resultado do confirmatório em relação ao *screen*. O resultado é obtido através da razão entre *screen*/confirmatório. Uma razão superior a 1,2 será indicativa de presença de inibidor lúpico.

3.2.1.10. Pesquisa de mutações do Fator II e do Fator V de Leiden

As mutações do Fator II (20210G>A) e Fator V (Leiden, 1691G>A) estão associadas com um aumento do risco de trombose venosa.

Na mutação do Fator II (FII) ocorre a troca de G por A no nucleótido 20210 na região 3' não transcrita do gene e está associada a níveis plasmáticos de protrombina aumentados. O Fator V Leiden (FV) (1691G>A) refere-se a uma troca de G por A no nucleótido 1691 do gene FV, originando a substituição do aminoácido Arginina por Glutamina na proteína, causando resistência à clivagem pela proteína C ativada (APC).

A pesquisa das mutações FII e FV é efetuada com kit de ensaio *Xpert HemosIL FII & FV*, um teste *in vitro* de genotipagem qualitativa para a deteção rápida das mutações pontuais únicas em sangue total anticoagulado com citrato de sódio ou EDTA.

À semelhança da pesquisa de mutações no gene BCR-ABL, é utilizado um cartucho único inserido no equipamento *GeneXpert® da Cepheid* que através de ensaios por RT-PCR, em tempo real, permitem a pesquisa de mutações nos fatores II e V, respetivamente.

3.2.2. Citometria de Fluxo

Para além dos testes de coagulação a sala de Hematologia 2 também recorre à técnica de citometria de fluxo (CF) que permite a medição simultânea de características físico-químicas de células em suspensão, num meio líquido em movimento, orientadas num fluxo laminar e intercetadas uma a uma por um feixe de luz laser, sendo executado no equipamento *Beckman Coulter®CytomicsTM FC 500*.

A CF utiliza um fluxo laminar de partículas em suspensão, que se dispõem umas a seguir às outras, interagindo com um raio luminoso. As partículas geram então sinais (dispersão e/ou emissão de luz por fluorocromos) que são captados por detetores. Os sinais luminosos são de seguida transformados em impulsos elétricos, que se ampliam e são convertidos em sinais digitais para análise posterior (18).

O equipamento *Beckman Coulter®CytomicsTM FC 500* determina simultaneamente: i) a dispersão de luz a 180°, que permite avaliar o tamanho celular (“*forward scatter*”); ii) a dispersão de luz lateral (90°), que permite avaliar a granulação citoplasmática, bem como as características da membrana e a presença de estruturas internas (“*side scatter*”).

Este método é especialmente utilizado no estudo de patologias hemato-oncológicas, através de imunofenotipagem de amostras, que podem incluir: sangue periférico; aspirados de medula óssea; biópsias aspirativas de gânglios e massas (18,19).

O tratamento das amostras: engloba a lavagem das amostras com PBS, a marcação de antigénios da superfície celular com anticorpos monoclonais marcados com um fluoróforo (método de imunofluorescência direta – IFD), e a lise dos eritrócitos utilizando um reagente lisante.

3.3. Controlo de Qualidade

A avaliação da qualidade é uma parte integrante do Setor de Hematologia do SPC. Para esta avaliação recorre-se a controlos internos e externos e a uma avaliação cuidada dos resultados obtidos.

O controlo de qualidade interno é efetuado no início do dia, usando controlos altos, normais e baixos fornecidos pela casa comercial. Este controlo é efetuado para os diferentes parâmetros do setor de hematologia (hemograma, reticulócitos e parâmetros relacionados com a hemóstase).

O Setor de Hematologia do SPC encontra-se inscrito nos programas externos de qualidade RIQAS e INSA.

Este tipo de controlos utiliza amostras com valores desconhecidos para o laboratório, sendo processados como uma amostra normal da rotina.

Os resultados obtidos são tratados estatisticamente pelo programa de controlo externo de qualidade e é emitido um relatório para cada participante com referência à sua performance.

Capítulo IV – Imunoensaios e Marcadores Tumorais

4.1. Imunoensaios

No setor de Imunologia e Hormonologia são realizados imunoensaios para quantificar marcadores tumorais e proteínas de fase aguda, e também para avaliar e monitorizar fármacos, bem como para pesquisar auto-anticorpos. São também realizadas técnicas eletroferéticas para o estudo de proteínas séricas, de hemoglobinas e de isoenzimas da Fosfatase Alcalina e da Lactato Desidrogenase. Para além disso, são também efetuadas imunofixações de proteínas séricas e urinárias.

A determinação dos marcadores tumorais é feita por métodos imunoquímicos, em que o princípio subjacente é a deteção do marcador tumoral por um ou mais anticorpos (Ac), que podem ser monoclonais e/ou policlonais. Os anticorpos monoclonais apresentam maior especificidade que os policlonais, afinidade por um epítopo específico e menor probabilidade de reatividade cruzada entre antigénios (Ag) similares.

As reações Ag-Ac podem ser do tipo Não competitivo ou Competitivo. No ensaio competitivo, o anticorpo é incubado simultaneamente com Ag livre e com um Ag análogo marcado (por exemplo: radioisótopo, fluorocromo), sendo que ambos vão competir pela ligação ao Ac específico presente na fase sólida. Quanto maior for a concentração do antigénio livre, menos antigénio marcado se liga, pelo que o sinal emitido é menor. No ensaio não-competitivo, o Ag é incubado com um Ac específico (primário) geralmente ligado a uma matriz insolúvel sólida (micropartículas, esferas de látex, paredes dos tubos de reação), sendo posteriormente adicionado um Ac marcado (secundário), que se liga a um epítopo diferente do local de ligação do epítopo reconhecido do Ac primário. Quanto mais Ag existir, maior será o sinal emitido. Normalmente, antigénios com maior massa molecular são detetados por métodos não-competitivos.

A deteção do complexo formado pode ser efetuada com recurso a diferentes métodos: quimioluminescência; eletroquimioluminescência; fluorescência; métodos radioativos; imunoturbidimetria e *Time Resolved Amplified Cryptate Emission* (TRACE). No ponto 4.2. deste capítulo são especificadas as técnicas de deteção do complexo Ag-Ac na análise dos marcadores tumorais (MT): Antigénio Carcinoembrionário (CEA); Antigénio Glucídico 15.3 (CA 15.3); Antigénio Glucídico 19.9 (CA 19.9); Antigénio Glucídico 125 (CA 125) e Human epididymis protein 4 (HE-4).

As amostras dão entrada neste setor devidamente registadas e codificadas no sistema informático. O tipo de amostras processadas são na sua maioria soro (refrigerado e à temperatura ambiente), mas também podem ser utilizadas: plasma (refrigerado e à temperatura ambiente); urina de 24 horas e saliva. Pontualmente são processadas amostras de líquido cefalorraquidiano e outros líquidos biológicos.

As amostras chegam ao setor em tubos apropriados para permitir a coagulação do sangue e são centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos. Existem perfis analíticos internos, onde constam conjuntos de parâmetros a dosear. Os tubos são colocados nos auto-analisadores ligados em rede que iniciam os doseamentos até ao resultado final que é posteriormente validado. O circuito segue uma ordem predefinida (Figura 8): IMMULITE 2000XPi, ADVIA CENTAUR® XP, que funcionam agregados a um braço robótico (VERSACELL) que distribui as amostras pelos dois aparelhos, COBAS 6000, KRYPTOR, LIAISON e BN PROSPEC.

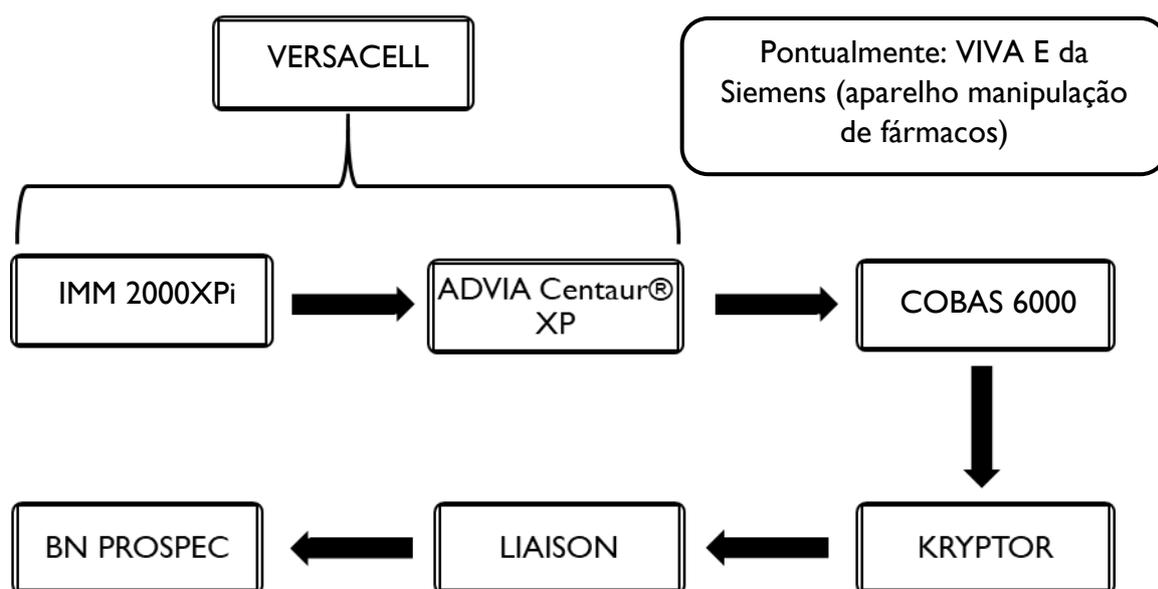


Figura 8 - Esquema sequencial do circuito das amostras.

4.2. Marcadores Tumorais

Os marcadores tumorais (MT) ou biomarcadores são macromoléculas presentes nas células tumorais, no sangue e/ou em fluidos biológicos cujo aparecimento e/ou alteração da sua abundância estão relacionados com a génese e o crescimento de células neoplásicas. Podem ser produzidos diretamente pelo tumor ou pelo próprio organismo em resposta à presença do tumor. São na sua maioria proteínas ou fragmentos proteicos, incluindo antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormonas (20).

Os marcadores tumorais podem ser agrupados de acordo com a sua origem, ou seja, os que são produzidos pelas células tumorais, que são chamados de “derivados do tumor”, e aqueles que são induzidos pela presença do mesmo e produzidos pelo hospedeiro, que são chamados “associados ao tumor”. Estão ainda enquadrados em três grandes grupos: marcadores tumorais celulares; marcadores tumorais séricos; marcadores tumorais genéticos (20).

No setor de Imunologia/Hormonologia do SPC são determinados marcadores tumorais séricos, sendo as amostras obtidas através de um método pouco invasivo, constituindo uma ferramenta na avaliação e da progressão da doença oncológica, na avaliação da eficácia do tratamento e como indicador de prognóstico. Os marcadores tumorais séricos constituem o recurso ideal para a deteção de células tumorais disseminadas, devido à facilidade de acesso ao material a ser analisado – o sangue periférico.

O uso correto dos marcadores tumorais e a sua aplicação clínica encontra-se estritamente relacionada com os termos “sensibilidade” e “especificidade”. A sensibilidade de um dado marcador tumoral é definida como a percentagem de pacientes portadores de um determinado tumor, com valores patológicos, acima do normal. Por sua vez, a especificidade é considerada a percentagem de pacientes sem tumor maligno, com valores normais para um determinado marcador tumoral (20).

Com base na sua utilidade clínica, considera-se o “marcador tumoral ideal” como sendo produzido por todos os tumores da mesma linhagem, sendo possível a sua deteção em quantidades mínimas de células. Aquele marcador teria de apresentar uma sensibilidade e uma especificidade de 100%. Deveria também apresentar características proporcionais ao tamanho tumoral, bem como contribuir para a seleção do tratamento e ser útil no momento do prognóstico. Os seus níveis deveriam refletir, ainda, com precisão a evolução clínica e a reincidência da doença; já a sua taxa normalizada indicaria a regressão e cura da doença.

Num mundo de constantes avanços tecnológicos, as investigações continuam no sentido da descoberta do marcador tumoral ideal que atualmente ainda não existe. Por este motivo, os marcadores tumorais não são utilizados com valor de diagnóstico.

Conforme referido, os marcadores que seleccionei para abordar em maior detalhe neste relatório estão relacionados com os carcinomas da mama, colorretal e do ovário e são o Antígeno Carcinoembrionário (CEA), o Antígeno Glucídico 15.3 (CA 15.3), o Antígeno

Glucídico 19.9 (CA 19.9), o Antígeno Glucídico 125 (CA 125) e o “Human epididymis protein 4” (HE-4).

4.2.1. CEA e CA 19.9 no cancro colorretal

O cancro colorretal é uma das neoplasias mais comuns nos países desenvolvidos. A maioria dos cancros colorretais estão associados a fatores ambientais, dietéticos e à idade avançada e apenas uma pequena percentagem está associada a fatores hereditários, como a polipose adenomatosa familiar e o cancro colorretal hereditário não polipóide. O diagnóstico precoce constitui um dos aspetos mais importantes para a diminuição da mortalidade associada a este tipo de cancro (20).

A associação dos biomarcadores CEA e CA 19.9 é aplicada no cancro colorretal e em tumores com metastização hepática e da vesícula biliar (20).

4.2.1.1. Antígeno Carcinoembrionário

O Antígeno Carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína com alto peso molecular (180 KDa) que foi identificada em metástases do cancro colorretal. O nome é derivado de uma convicção prévia de que o CEA estava presente apenas em carcinomas gastrointestinais e no trato digestivo fetal. Esta glicoproteína é muito pouco expressa no adulto, sendo que a sua expressão normalmente é nula ou residual e aumenta em situações neoplásicas.

Foi verificada uma relação entre valores elevados de CEA e a presença de metástases do cancro colorretal. Têm-se observado concentrações elevadas deste marcador tumoral em condições malignas e não malignas, sendo que estas incluem várias doenças hepáticas, lesões inflamatórias, especialmente do trato gastrointestinal, enfarte, quistos ováricos, hipertiroidismo, infeções, insuficiência renal, doença vascular do colagénio e situações associadas ao consumo de tabaco. Devido a este facto a quantificação do CEA não deve ser usada no diagnóstico ou como indicador de malignidade, mas sim no prognóstico, avaliação de estadio e monitorização.

Este marcador tumoral pode ser utilizado na monitorização durante o tratamento, na deteção de possíveis recidivas após cirurgia e na existência de metástases. Uma descida dos valores do marcador CEA, ou a regularização normal dos mesmos, indicam que o organismo está a responder ao tratamento e existe uma possível remissão. Por outro lado, um aumento

dos valores pode corresponder a uma recidiva, a um aumento de tamanho do tumor ou até o aparecimento de metástases, sendo que esse aumento no marcador tumoral pode ser observado de 3 a 18 meses antes da deteção clínica da recidiva.

É também utilizado com frequência como marcador complementar associado a outros mais específicos, sendo encontrados níveis séricos elevados, por exemplo no cancro da mama.

4.2.1.2. Antigénio Glucídico 19.9

O Antigénio Glucídico 19.9 (CA 19.9) é uma glicoproteína do tipo mucina, de alto peso molecular (>400 KDa). É formada principalmente por hidratos de carbono que constituem cerca de 85% da molécula. É sintetizada normalmente pelas células dos ductos pancreáticos e da vesícula biliar humana e pelos epitélios gástrico, do cólon, endometrial e salivar. É indicado como marcador tumoral de neoplasias gastrointestinais, como o cancro colorretal, e os carcinomas esofágico, gástrico, pancreático e das vias biliares.

O valor de referência é até 37 U/ml, sendo que a sua sensibilidade é variável em função da localização do tumor. As principais limitações do CA 19.9 incluem o seu aumento frequente em condições não malignas, como na doença hepática maioritariamente com icterícia e pancreatite, doença inflamatória intestinal e doenças autoimunes que podem elevar o CA 19.9, sem ultrapassar 120 U/ml.

O CA 19.9 possui uma estrutura siálica originária do antigénio do grupo sanguíneo Lewis. Consequentemente, não se expressa nos indivíduos com genótipo Lewis negativo (5-10% da população Caucasiana), pelo que os níveis séricos de CA 19.9 nestes são normais mesmo na presença de cancro colorretal.

O CA 19.9 é útil no diagnóstico diferencial entre doença benigna e maligna, e na avaliação prognóstica.

4.2.2. CEA e CA 15.3 no Cancro de Mama

O cancro da mama é o segundo cancro mais comum a nível mundial, e o mais comum em mulheres, nos países desenvolvidos. A incidência deste cancro em Portugal é inferior à média europeia, contudo continua a ser a neoplasia mais frequente nas mulheres.

O antigénio carcinoma embrionário (CEA) e o Antigénio Glucídico 15.3 (CA 15.3) são marcadores tumorais frequentemente usados no controlo e monitorização da doença

numa fase avançada sendo que a sua avaliação em simultâneo fornece resultados mais fiáveis do que isolados, uma vez que não apresentam valor de diagnóstico (20). O doseamento destes marcadores tumorais é atualmente usado como um teste de diagnóstico complementar de metástases assintomáticas.

Especificamente em relação ao marcador CEA, já desenvolvido no ponto relativo aos marcadores tumorais doseados na monitorização do cancro colorretal, no caso do cancro da mama os níveis elevados correlacionam-se também com estadio avançado e também com um prognóstico desfavorável, enquanto que níveis pós-operatórios crescentes geralmente indicam recidiva.

4.2.2.1. Antígeno Glucídico 15.3

O Antígeno Glucídico 15.3 (CA 15.3) é uma glicoproteína sendo que a parte proteica é o produto do gene MUC1, que codifica uma proteína da família das mucinas, com um papel importante na formação de barreiras mucosas com função protetora nas superfícies epiteliais glandulares.

É o marcador tumoral mais sensível e específico da mama, variando de acordo com o estágio clínico e a massa tumoral, existindo uma correlação direta entre o aumento ou diminuição do CA 15.3 com a progressão ou regressão do carcinoma da mama, respetivamente.

O valor de referência é de <35.0 U/ml, sendo o CA 15.3 avaliado em tipos de cancro mais agressivos e avançados com evidências de metástases, uma vez que detetados precocemente estão relacionados com níveis de CA 15.3 normalmente baixos. Níveis elevados pré-operatórios de CA 15.3 estão associados a um prognóstico desfavorável e correlacionam-se com o volume do tumor.

Podem-se encontrar também níveis elevados de CA 15.3 noutras neoplasias, como no cancro do ovário, do pulmão, do colo do útero, no hepatocarcinoma e em linfomas. Porém, os níveis séricos deste marcador encontram-se elevados também noutras doenças benignas, como hepatite crónica, tuberculose, sarcoidose e lúpus eritematoso sistémico, logo não sendo útil na fase de rastreio. O seu uso deve ficar restrito a monitorização do tratamento e deteção de recidivas. Por exemplo, durante um período de remissão, a realização de ensaios repetidos de CA 15.3 permitem o diagnóstico precoce de recidivas e de aparecimento de metástases.

A expressão em conjunto de CEA e CA 15.3 auxilia na deteção de metástases. Embora este marcador tumoral seja o mais eficiente, é importante o uso do valor da expressão dos dois marcadores, permitindo o diagnóstico precoce de metástases em cerca de 60-80% dos doentes com cancro da mama.

4.2.3. CA 125 e HE-4 no Cancro do Ovário

O cancro do ovário é a quarta causa mais comum de morte relacionada com cancro entre as mulheres, a nível mundial. É a forma mais letal de cancro ginecológico e é potencialmente curável, caso seja diagnosticado precocemente. No entanto, os sintomas do cancro do ovário estão relacionados com a presença de massas anexiais e muitas vezes são vagos e inespecíficos. Consequentemente, 70-75% dos cancros do ovário são detetados em fase avançada.

De acordo com a Agência Internacional de Investigação do Cancro, a taxa de sobrevivência ao fim de 5 anos nas doentes com cancro do ovário é de 46%. No entanto, se a doença for diagnosticada precocemente, essa taxa pode aumentar até aos 94%.

O Antígeno Glucídico 125 (CA 125) e o “Human epididymis protein 4” (HE-4) são marcadores tumorais frequentemente usados no controlo e monitorização do cancro do ovário.

4.2.3.1. Antígeno Glucídico 125

O Antígeno Glucídico 125 (CA 125) é uma glicoproteína de elevado peso molecular presente em estruturas derivadas de ductos paramesonéfricos (trompas de Falópio, endocérnix e vagina superior) e em células mesoteliais (pleura, pericárdio, peritoneu).

O CA-125 é o marcador tumoral utilizado principalmente na monitorização da resposta terapêutica e deteção precoce de recidivas em caso de carcinomas epiteliais do ovário e outros tecidos de origem Mülleriana, variando o seu valor de acordo com o tamanho e o estadió dos tumores.

O valor de referência é, em termos gerais, <35 U/ml, mas os níveis de CA 125 estão relacionados com o estado funcional dos ovários, pelo que sofre oscilações em função de condições fisiológicas tais como:

- Ciclo menstrual - os níveis de CA 125 flutuam durante o ciclo menstrual, sendo maiores na fase da menstruação e no pico da ovulação;

- Pré-menopausa - as mulheres sãs em idade fértil apresentam níveis superiores deste marcador do que as mulheres pós-menopáusicas;
- Gravidez - aumento dos níveis do marcador tumoral devido à retenção de fluídos;
- Raça - o marcador tumoral apresenta níveis inferiores nas mulheres de raça asiática e africana quando comparadas com as caucasianas.

Embora esteja elevado na maioria dos casos de cancro do ovário, apresenta baixa sensibilidade nos estadios iniciais da doença, o que faz com que o uso isolado deste MT não seja adequado como método de rastreio.

É, ainda, um marcador tumoral que não é específico para o cancro do ovário, uma vez que pode estar aumentado noutras condições malignas de diferentes origens epiteliais (carcinoma endometrial, carcinoma do endocérvix e cancro do pulmão) e não epiteliais (linfomas) e condições benignas ginecológicas (miomas, endometriose, quistos no ovário).

Por outro lado, o CA 125 é um marcador tumoral com elevado número de falsos positivos, sendo que condições como falência renal e doença hepática são os principais responsáveis por falsos positivos.

Em relação à monitorização do tratamento, o CA 125 é utilizado para avaliar a resposta à quimioterapia, já que os níveis séricos estão correlacionados com o estadio da doença, exibindo variações de acordo com progressão ou regressão tumoral (20).

4.2.3.2. *Human epididymis protein 4*

A proteína 4 do epidídimo humano (HE-4, também denominada WFDC2) faz parte da família de proteínas de soro de leite ácido contendo um núcleo com quatro ligações dissulfureto (*Whey Acidic Four-Dissulfide Core – WFDC*) que se suspeita terem propriedades de inibição da tripsina. Na sua forma madura glicosilada, a proteína tem um peso molecular de aproximadamente 20-25 KDa e é constituída por uma só cadeia peptídica que contém dois domínios de WFDC.

A HE-4 foi determinada pela primeira vez no epitélio do epidídimo distal. Tal como o marcador tumoral CA 125, o HE-4 está presente em tumores epiteliais do ovário, e são usados em conjunto para monitorização das pacientes. O marcador HE-4 comparado com outros apresenta uma sensibilidade aumentada na deteção do carcinoma do ovário,

principalmente no estadio I da doença, estando presente em algumas neoplasias do ovário com o marcador CA 125 negativo.

Em relação ao CA 125, tem ainda a vantagem do seu valor ser menos influenciado pelas doenças benignas ginecológicas pelas doenças hepáticas. Mas um dos principais motivos para falsos positivos prende-se com a insuficiência renal. As neoplasias do endométrio e do colo do útero também apresentam níveis elevados de HE-4, bem como os adenocarcinomas do pulmão e da mama, entre outros (20).

O HE-4 tem sido usado principalmente no diagnóstico diferencial entre massas pélvicas benignas e malignas. Em combinação, estes marcadores determinam com maior precisão a benignidade ou malignidade da massa pélvica em mulheres pré e pós-menopáusicas. A estratificação de alto ou baixo risco para cancro epitelial do ovário, pela combinação dos marcadores HE-4 e CA 125 é realizada pelo Algoritmo do Risco de Malignidade Ovárica (ROMA) a seguir descrito.

4.2.9. Risk of Ovarian Malignancy Algorithm

Com o intuito de melhorar os resultados e obter a máxima eficácia dos MT envolvidos no cancro do ovário foi desenvolvido um algoritmo do Risco de Malignidade Ovariana designado ROMA para calcular o risco de cancro epitelial do ovário. O algoritmo tem em consideração os valores de HE-4 e de CA 125, além do estado fértil das doentes (pré e pós-menopausa). O algoritmo calcula a probabilidade preditiva de encontrar cancro do ovário durante a cirurgia. Para calcular o valor de ROMA, é necessário efetuar primeiro o cálculo do índice preditivo (IP) tendo em conta o estado fértil.

- Cálculo do Índice Preditivo (IP)

a) Pré-menopausa:

$$IP = -12.0 + 2.38 * LN(HE4) + 0.0626 * LN(CA125)$$

b) Pós-menopausa:

$$IP = -8.09 + 1.04 * LN(HE4) + 0.732 * LN(CA125)$$

Em que, LN = Logaritmo Natural

- Cálculo do valor do ROMA

$$\text{Valor do ROMA (\%)} = e^{IP}$$

4.3. Métodos de deteção do complexo Ag-Ac nos marcadores tumorais CEA, CA 15.3, CA 19.9, CA 125 e HE-4

Conforme foi já referido, a determinação quantitativa de marcadores tumorais séricos é efetuada por métodos imunoquímicos, que se baseiam na utilização de anticorpos específicos dirigidos contra esses marcadores. Uma vez que os marcadores que anteriormente caracterizei são os que se aplicam no estudo dos cancro colorretal, cancro a mama e cancro do ovário, nos pontos seguintes refiro os métodos usados para a deteção do complexo Ag-Ac nos marcadores tumorais CEA, CA 15.3, CA 19.9, CA 125 e HE-4.

4.3.1. *Time Resolved Amplified Cryptate Emission*

O método *Time Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE)* baseia-se na transferência de energia não radioativa entre um dador (criptato) e um aceitador (XL655) que são dois marcadores fluorescentes. A proximidade entre o dador e o aceitador é promovida pela formação do complexo imunológico composto pelo antigénio que se pretende pesquisar. O fluorocromo aceitador é excitado levando à emissão de um sinal de fluorescência, cuja intensidade é proporcional à concentração de antigénio presente na amostra (20).

Parâmetro doseado caracterizado no relatório: CA 15.3

Equipamento: *KRYPTOR* da *BRAHMS*

4.3.2. *Chemiluminescent Immunoassay* ou quimioluminescência

No imunoensaio quimioluminescência (CLIA) a deteção da formação do complexo Ag-Ac é efetuada por determinação da quimioluminescência que é emitida no decorrer da reação enzimática mediada pela enzima que se encontra conjugada com o antigénio (método competitivo) ou o anticorpo (método não competitivo) e um substrato adequado (20).

Parâmetro doseado caracterizado no relatório: CEA

Equipamento: *IMMULITE 2000 XPI* da *Siemens*

4.3.3. *Electro-chemiluminescence Immunoassay* ou eletroquimioluminescência

A eletroquimioluminescência (ECLIA) baseia-se na produção de luz através de uma reação quimioluminescente, mediante a aplicação de uma corrente elétrica. Neste ensaio são

utilizados dois anticorpos monoclonais (um anticorpo biotinizado e o outro marcado com complexo de ruténio) que ao reagir com o antígeno presente na amostra levam à formação de imunocomplexo. A adição de micropartículas revestidas por estreptavidina promove a ligação do imunocomplexo à fase sólida (superfície do eléctrodo) pela interação da biotina e da estreptavidina. A aplicação de uma corrente eléctrica ao eléctrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador (20).

Parâmetros doseados caracterizados no relatório: CA 19.9, CA 125 e HE-4

Equipamento: *COBAS 6000* da *ROCHE*

4.4. Controlo de Qualidade

Como em todos os Setores do SPC, o Setor de Imunologia/Hormonologia realiza diariamente um controlo de qualidade interno aos equipamentos. São utilizados os controlos multiparamétricos da *BIO-RAD*, como (Anexo 2): *Immunoassay Plus*; *Speciality Immunoassay*; *Tumor Markers Plus*; *Cardiac Markers Plus*.

Para além do controlo interno, o Setor de Imunologia/Hormonologia também realiza uma vez por mês o controlo de qualidade externo internacional *RIQAS (Immunoassay)* e três vezes por ano o programa do *INSA – Endocrinologia*. Estes controlos têm como vantagem o facto de serem externos à própria empresa e por possuírem um programa associado ao equipamento e ao lote, permitindo comparar os resultados entre laboratórios que utilizem o mesmo lote e equipamento.

Capítulo V – Caso Clínico

A Anemia da Doença Crónica (ADC) é uma síndrome clínica que se caracteriza pelo desenvolvimento de anemia em pacientes que apresentem doenças infecciosas crónicas, inflamatórias ou neoplásicas sendo esta última a condição presente no caso clínico exposto. Os três principais mecanismos envolvidos na etiopatogenia da ADC são:

- Diminuição da sobrevivência dos eritrócitos (devido à presença de um estado de hiperatividade do sistema mononuclear fagocitário desencadeado pelo processo neoplásico. Tal estado hiperreativo leva à remoção precoce dos eritrócitos circulantes e, portanto, à diminuição da sobrevivência dos eritrócitos.
- Resposta medular inadequada (está diretamente relacionada com a ativação dos macrófagos e a libertação de citocinas inflamatórias [IL-1, IL-6], do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e do interferon gama (INF γ) que atuam inibindo a proliferação dos precursores eritrocitários e, portanto, inibindo a eritropoiese.
- Distúrbio do metabolismo do ferro (distúrbio da reutilização do ferro armazenado devido ao aumento da síntese de lactoferrina, promovido pela IL-1, que é uma proteína semelhante à transferrina secretada pelos neutrófilos, que compete com esta, logo, dificulta a mobilização do ferro depositado e, conseqüentemente, a eritropoiese.

O caso clínico a seguir descrito (Tabela 8), poderá ser indicativo de uma Anemia da Doença Crónica, uma vez que se trata de uma doente com um carcinoma maligno de mama.

Mulher de 57 anos com carcinoma da mama.

Tabela 8 - Caso Clínico – Resultados.

Parâmetros	Resultados
RBC	4.04 $10^6/\mu\text{l}$
HGB	9.8 g/dl
Hct	30.8 %
MCV	76.1 fl
MCH	24.3 pg
MCHC	31.9 g/dl
RDW	19.0 %

Perante os resultados da série vermelha do hemograma verifica-se a presença de uma Anemia (HGB < 12 g/l). Os valores de MCV < 80 fl e MCH < 27 pg são indicativos de microcitose e hipocromia, respetivamente. Tais valores sugerem a presença de uma possível Anemia da Doença Crónica, uma vez que esta anemia é caracterizada pela presença de microcitose e hipocromia associado a uma doença maligna.

Capítulo VI – Conclusão

No último capítulo deste relatório pretendo fazer uma reflexão crítica em relação ao alcance dos objetivos, dos aspetos facilitadores do estágio e da sua relevância em termos profissionais.

Deste modo, acho pertinente referir a finalidade que considero ser a deste estágio, ou seja, ele é uma estratégia de profissionalização complementar às competências adquiridas em contexto de sala de aula, preparando os(as) alunos(as) para integrarem o mercado de trabalho ao interrelacionar e integrar a formação teórico-prática e a formação prático-profissional. No meu caso, uma vez que desempenho a função de Técnica Superior Diagnóstico e Terapêutica no SPC, a finalidade deste estágio traduziu-se na aquisição de competências técnicas e científicas que permitirão em termos profissionais, por um lado, o aumento qualitativo no desempenho das minhas funções, e por outro, a médio e longo prazo, a progressão profissional. O estágio adquire uma relevância significativa para mim também porque a área das Análises Clínicas implica uma atualização constante inerente à inovação e evolução científicas, principalmente no contexto de rotina laboratorial e tão abrangente como é o desta área.

Em relação à autoavaliação que faço tendo em conta os objetivos propostos, considero que adquiri, consolidei e atualizei aptidões para a prática diária laboratorial em termos de técnicas aplicadas ao rastreio, diagnóstico e monitorização de doenças, especificamente, as de foro oncológico, sendo que o setor onde exerço a minha atividade profissional é o da Hematologia. Demonstrei motivação, interesse e empenho na realização das atividades que me foram propostas, sempre com responsabilidade. Adquiri e consolidei também competências de trabalho em equipa multidisciplinar, bem como competências de resolução de problemas perante novas situações, tornando-me mais autónoma.

Durante o período de 6 meses tive oportunidade de realizar atividades em cada um dos setores que compõem o SPC, tendo neste relatório aprofundado as atividades e técnicas, mencionado equipamentos e feito o enquadramento teórico relativos aos setores de Hematologia e de Imunologia/Hormonologia. Relativamente ao setor de Imunologia/Hormonologia abordei os marcadores tumorais séricos referentes aos carcinomas colorretal, da mama e do ovário. As atividades do setor de Hematologia incluíram estudos de hemocitometria, estudos citogénicos, de citometria de fluxo e provas de coagulação. Por outro lado, as atividades no setor de Imunologia/Hormonologia

permitiram a consolidação de conhecimentos e competências em termos de determinação de marcadores tumorais, em específico para os carcinomas já referidos, os marcadores tumorais séricos, métodos de determinação, e da sua importância no acompanhamento do tratamento do tumor, tendo também indicação prognóstica.

Como aspetos facilitadores deste estágio saliento a sua estrutura que confere autonomia aos(as) alunos(as), a experiência e disponibilidade das equipas técnicas e dos orientadores, o espírito de investigação e rotina laboratorial, procurando sempre um desempenho de padrão ótimo, corroborando o estatuto do IPOCFG como referência na área da oncologia. Outro aspeto facilitador deste estágio e com importância acrescida quando lidamos com doentes oncológicos é o ênfase colocado na componente humana, não se restringindo o trabalho desenvolvido ao espaço laboratorial.

Referências Bibliográficas

1. MARTELLI, A. - **Gestão da Qualidade em Laboratórios de Análises Clínicas.** UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde (2011), 13(Esp):363-8.
2. PLEBANI, M. - **Errors in Clinical Laboratories or errors in laboratory medicine?** Clin. Chem. Lab Med (2006), 44 (6): 750-9.
3. GUIMARÃES, A. C. et al. - **O laboratório clínico e os erros pré-analíticos.** Rev. HCPA (2011), 3(1): 66-71.
4. Lewis, S. M., Tatsumi, N., **Collection and handling of blood,** In Lewis, S.M., et al. (Eds.), -*Dacie and Lewis Practical Haematology.* Churchill Livingstone/Elsevier. 10th Ed. (2006), pp 1-9
5. Lewis, S. M., **Reference ranges and normal values,** In Lewis, S.M., et al. (Eds.), -*Dacie and Lewis Practical Haematology.* Churchill Livingstone/Elsevier. 10th Ed. (2006), pp 11-24
6. Bain, B., Lewis, S. M., Bates, I., **Basic haematological techniques,** In Lewis, S.M., et al., -*Dacie and Lewis Practical Haematology.* Churchill Livingstone/Elsevier. 10th Ed. (2006), pp 26-53
7. **COULTER LH 750 System Reference.** Beckman Coulter Inc. (2013)
8. Bain, B., **Blood Cell morphology in health and disease,** In Lewis, S.M., et al., -*Dacie and Lewis Practical Haematology.* Churchill Livingstone/Elsevier. 10th Ed. (2006), pp 80-113
9. Bates, I., Bain, B.J., **Approach on the diagnosis and classification of blood diseases,** In Lewis, S.M., et al., - *Dacie and Lewis Practical Haematology.* Churchill Livingstone/Elsevier. 10th Ed. (2006), pp 609-624
10. Worwood, M., **Iron deficiency anaemia and iron overload,** In Lewis, S.M., et al., -*Dacie and Lewis Practical Haematology.* Churchill Livingstone/Elsevier. 10th Ed. (2006), pp 132-160
11. Bain, B., Lewis, S. M., **Preparation and staining methods for blood and bone marrow films,** In Lewis, S.M., et al., - *Dacie and Lewis Practical Haematology.* Churchill Livingstone/Elsevier. 10th Ed. (2006), pp 60-77
12. **Essential Information for the Aerospray® Hematology Slide Stainer-Cytocentrifuge (Model 7150) its Accessories and Supplies,** WESCOR, Revision A (2009)

13. Bates, I., **Bone marrow biopsy**, In Lewis, S.M., et al., - *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Churchill Livingstone/Elsevier. 10th Ed. (2006), pp 118-130
14. Kaeda, J. with contributions from Bain, B., **Molecular and Cytogenetic Analysis**, In Lewis, S.M., et al., - *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Churchill Livingstone/Elsevier. 10th Ed. (2006), pp 555-594
15. Laffan, M., Manning, R., **Investigation of haemostasis**, In Lewis, S.M., et al., - *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Churchill Livingstone/Elsevier. 10th Ed. (2006), pp 380-440
16. Laffan, M., Manning, R., **Laboratory control of anticoagulant, thrombolytic and antiplatelet therapy**, In Lewis, S.M., et al., - *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Churchill Livingstone/Elsevier. 10th Ed. (2006), pp 466-479
17. Laffan, M., Manning, R., **Investigation of thrombotic tendency**, In Lewis, S.M., et al., - *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Churchill Livingstone/Elsevier. 10th Ed. (2006), pp 441-463
18. Martins, D., Gagliani, L., - **Importância da Citometria de Fluxo no Diagnóstico Diferencial das Leucemias**, Revista UNILUS, Centro Universitário Lusíada, São Paulo/ Brasil (2008) 5(8): 5-23
19. Matutes, E., Morilla, R., Catovsky, D., **Imunophenotyping**, In Lewis, S.M., et al., - *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Churchill Livingstone/Elsevier. 10th Ed. (2006), pp 335-355
20. Molina, R., Filella, X., Augé, J. M., Escudero, J. M., - **Clinical value of tumor markers, Current status and future prospects III**, Cobas, Roche (2013), pp 5-106

Anexos

Anexo I – Valores de referência em vigência no setor de Hematologia do SPC do IPOCFG.

DESCRIÇÃO	UNIDADE	VALOR DE REFERÊNCIA
HEMOGRAMA		
LEUCÓCITOS	g/l	4,0 - 11,0
Neutrófilos	%	45 - 70
Linfócitos	%	20 - 40
Monócitos	%	3 - 10
Eosinófilos	%	1 - 5
Basófilos	%	0 - 2
RETICULÓCITOS	%	0,5 - 2,5
ERITRÓCITOS	t/l	Mulher: 4,0 - 5,5 Homem: 4,5 - 6,5
HEMOGLOBINA	g/dl	Mulher: 12 - 16 Homem: 13 - 18
HEMATÓCRITO	%	35 - 47
VCM	fl	85 - 95
HCM	pg	27 - 32
CHCM	g/dl	32 - 36
RDW	%	11,5 - 14,5
PLAQUETAS	g/l	150 - 450
VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO		
VS (1 hora)	mm/h	0 - 20

Anexo 2 – Painel de controlo de qualidade interno *BIO-RAD*.

Parâmetro	<i>Immunoassay Plus</i>		Parâmetro	<i>Speciality Immunassay</i>		Parâmetro	<i>Tumor Markers Plus</i>	
	LIQ1	LIQ2		LIQ1	LIQ2		LYPI	LYP2
CEA			EPN			ACTH		
AF			IPT			BMG		
PSA Livre			IGFI			CA19.9		
PSA Total			CPE			CA72.4		
HCG			ATG			CA125		
FER			ATA			CYFRA 21.1		
COR			25DT			CAL		
TSH			OST			TGII		
T3 Total								
T4 Total								
INS								
FSH								
LH			Parâmetro	<i>Cardiac Markers Plus</i>				
E2				CARI	CAR2			
PROG			BNP					
PRL								
TES								
DHS								
VIT.B12								
FOL								
GH								
IGE								
T3 Livre								
T4 Livre								
AND								