



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Cristiana Quaresma Dias

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,  
orientado pela Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva  
e pela Dra. Alice Augusta Lopes Mendes e apresentado à Faculdade de  
Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020

Cristiana Quaresma Dias

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular efetuado no Serviço de Patologia Clínica no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva e pela Dra. Alice Augusta Lopes Mendes e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a oportunidade de poder ter realizado o estágio no Serviço de Patologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, privilégio possibilitado pelo diretor Clínico do Serviço, Doutor Fernando Rodrigues a quem agradeço a disponibilidade, cordialidade e simpatia que o caracteriza, agradecendo também à Professora Doutora Ana Miguel Matos, pela coordenação com a instituição que me acolheu nos últimos meses.

Agradeço à Dra. Alice Mendes pela excelente mentoria e orientação, pelo acompanhamento diário. À Dra. Cristiana Canha por me ter ensinado e ajudado quando necessitei. Agradeço a ambas pelas palavras de incentivo a ambicionar ser melhor.

À Professora Doutora Teresa Dinis, a quem estou muito grata, pela disponibilidade e exigência constantes que me motivaram e extraíram o melhor de mim.

Seria impossível agradecer a cada profissional que foi importante na minha formação durante este período. Assim, estendo aqui o meu agradecimento sincero a toda a equipa do Serviço de Patologia Clínica. À minha colega de curso e estágio Catarina pela parceria e amizade demonstradas durante estes meses, bem como à Filipa pelo carinho e apoio.

Agradeço também às minhas colegas, Carina e Débora. A elas estou grata pela bonita amizade que nos une, pela parceria, companheirismo e momentos de cumplicidade. Aos meus queridos amigos: Daniela, Raquel, Diogo, Joana, por estarem sempre presentes durante este percurso e me apoiarem.

Um agradecimento especial à minha família. Sou mais feliz por sentir que somos unidos e que o amor uns pelos outros nos impulsiona a ser pessoas melhores. Assim, aos meus avós, tios e primos: aqui fica o meu reconhecimento. Realço a importância do meu irmão, do meu pai e da minha mãe. Estarei sempre agradecida por acreditarem sempre no meu potencial, por me encorajarem quando os momentos de desânimo e *stress* pareciam levar a melhor de mim. Obrigada por nunca desistirem de mim e por celebrarem comigo as minhas conquistas.

Por fim, agradeço a Deus. Sou grata pela saúde que me tem concedido para poder concluir esta etapa especialmente exigente e sinto-me agradecida pelas pessoas que colocou na minha vida para me alegrarem, motivarem e impulsionarem a ser melhor profissional e melhor pessoa. Se algo de proveitoso existe neste documento, a Ele o devo.



## **RESUMO**

O presente relatório visa descrever os principais acontecimentos e aprendizagens resultantes do estágio curricular do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, decorrido no Serviço de Patologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, durante o período de cerca de cinco meses.

O estágio privilegiou a passagem por quatro setores principais: Bioquímica, Microbiologia, Imunologia e Hematologia. Em cada um foi possível perceber a importância do controlo da fase pré-analítica, analítica e pós-analítica na gestão da qualidade dos resultados obtidos. Assim, é feita a caracterização laboratorial, dos equipamentos e metodologias que o constituem associadas à integração teórica que os fundamenta, evidenciando as tarefas realizadas nas valências da Imunologia e Hematologia.

**Palavras-chave:** Análises Clínicas, CHUC, Patologia Clínica, Imunologia, Hematologia.

## **ABSTRACT**

The present report aims to describe the main events that occurred during the curricular internship featured in the ambit of Clinical Analysis Master's Degree of Coimbra University Pharmacy College, that took place in the Pathology Service belonging to the Coimbra Hospital and University Center.

The internship lasted about five months and privileged a passage over four main sectors: Biochemistry, Microbiology, Immunology and Haematology. In each one it was possible to understand the importance of monitoring each phase implied in a good laboratory result, that covers the pre-analytical, analytical and post-analytical phase. In that way, it is needed a previous full comprehensive review of the laboratory working, its equipments, methodologies associated with theoretical ground basis that justifies the procedures performed.

**Keywords:** Clinical Analysis, CHUC, Clinical Pathology, Immunology, Haematology.



# ÍNDICE

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1.       | INTRODUÇÃO .....   | 1  |
| 2.       | CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO .....                   | 2  |
| 2.1.     | Fase Pré-analítica .....   | 3  |
| 2.2.     | Fase analítica .....   | 4  |
| 2.2.1.   | Setor de Bioquímica .....  | 5  |
| 2.2.2.   | Setor de Microbiologia .....                                     | 5  |
| 2.2.3.   | Setor de Hematologia.....  | 6  |
| 2.2.4.   | Setor de Imunologia .....  | 6  |
| 2.3.     | Gestão da qualidade.....   | 7  |
| 2.4.     | Fase Pós-analítica .....   | 8  |
| 3.       | IMUNOLOGIA.....  | 9  |
| 3.1.     | Reação autoimune.....  | 9  |
| 3.2.     | Autoanticorpos: em que consistem e como se dá a sua síntese..... | 10 |
| 3.3.     | Objetivo do imunodiagnóstico .....                               | 11 |
| 3.4.     | Tipos de doenças autoimunes .....                                | 11 |
| 3.5.     | Metodologias utilizadas na detecção de autoanticorpos.....       | 12 |
| 3.5.1.   | Imunofluorescência indireta - IFI.....                           | 12 |
| 3.5.2.   | Imunoensaios enzimáticos - EIA.....                              | 12 |
| 3.5.2.1. | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay - ELISA.....                   | 13 |
| 3.5.2.2. | Imunoensaio fluoroenzimático - FEIA .....                        | 13 |
| 3.5.3.   | Radioimunoensaio - RIA.....                                      | 13 |
| 3.5.4.   | Quimioluminescência - CLIA .....                                 | 14 |
| 3.5.5.   | Immunoblotting.....  | 14 |
| 3.6.     | Ferramentas auxiliares de diagnóstico.....                       | 15 |
| 3.6.1.   | Anticorpos Antinucleares e Citoplasmáticos.....                  | 15 |
| 3.6.1.2. | Como se deteta a presença de ANA?.....                           | 16 |
| 3.6.2.   | Antígenos Nucleares Extraíveis.....                              | 18 |
| 3.7.     | Algoritmo de identificação .....                                 | 19 |
| 3.8.     | Caso Clínico I .....   | 24 |
| 3.8.1.   | Lupus Eritematoso Sistêmico - Caracterização patológica.....     | 26 |
| 3.8.2.   | Anti-dsDNA.....  | 27 |
| 3.8.3.   | Anti-Histonas, Anti-Nucleossomas e Anti-Sm.....                  | 30 |
| 4.       | HEMATOLOGIA .....  | 30 |
| 4.1.     | Hemograma.....   | 30 |
| 4.1.1.   | Leucograma .....   | 31 |
| 4.1.2.   | Eritrograma .....  | 32 |
| 4.1.3.   | Plaquetograma .....  | 33 |
| 4.2.     | Metodologias associadas à contagem das células do sangue.....    | 34 |
| 4.2.1.   | Impedância Elétrica com Focagem Hidrodinâmica .....              | 34 |
| 4.2.2.   | Dispersão Ótica .....  | 34 |
| 4.2.3.   | Espectrofotometria .....   | 35 |
| 4.3.     | Velocidade de sedimentação.....                                  | 36 |
| 4.4.     | Esfregaço do sangue periférico.....                              | 36 |
| 4.4.1.   | Série Leucocitária .....   | 37 |
| 4.4.2.   | Série Eritrocitária.....   | 40 |
| 4.4.3.   | Série Plaquetar.....   | 43 |
| 4.5.     | Hemostase.....   | 44 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.6.   | Metodologias associadas às provas da coagulação .....                     | 45 |
| 4.6.1. | Método Coagulimétrico .....   | 45 |
| 4.6.2. | Método Cromogénico .....  | 46 |
| 4.6.3. | Método Imunológico.....   | 46 |
| 4.7.   | Testes de <i>screening</i> da coagulação mais requisitados na rotina..... | 46 |
| 4.7.1. | Tempo de Protrombina.....   | 47 |
| 4.7.2. | Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPa).....                  | 47 |
| 4.7.3. | Prova complementar: Inibidores do tipo lupus.....                         | 48 |
| 4.7.4. | Fibrinogénio .....  | 49 |
| 4.7.5. | Testes de fibrinólise: D-Dímeros.....                                     | 50 |
| 4.8.   | Caso Clínico 2.....   | 51 |
| 5.     | BIOQUÍMICA.....   | 54 |
| 6.     | MICROBIOLOGIA.....  | 55 |
| 7.     | CONCLUSÃO.....  | 58 |
| 8.     | BIBLIOGRAFIA.....   | 59 |
|        | ANEXOS.....   | 65 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Modelo hipotético de cascatas de reações que influenciam o desenvolvimento e perpetuação de doenças autoimunes..... | 10 |
| Figura 2 – Exemplos de padrões de fluorescência obtidos por IFI/HEp-.....  | 18 |
| Figura 3 – Algoritmo de identificação de Antígenos Nucleares Extraíveis.....   | 23 |
| Figura 4 – Padrão de fluorescência obtido por IFI/HEp-2. ....  | 24 |
| Figura 5 – Imunofluorescência de anticorpo anti-dsDNA detetado por IFI em substrato de <i>Crithidia luciliae</i> .....         | 25 |
| Figura 6 – Padrão de fluorescência obtido por IFI/HEp-2 .....  | 25 |
| Figura 7 – Leucócitos Polimorfonucleares e Mononucleares .....   | 38 |
| Figura 8 – Alterações morfológicas dos neutrófilos .....   | 39 |
| Figura 9 – Alterações morfológicas dos linfócitos .....  | 40 |
| Figura 10 – Alterações do tamanho e cor dos eritrócitos.....   | 41 |
| Figura 11 – Inclusões e distribuições eritrocitárias.....  | 42 |
| Figura 12 – Alterações na forma dos eritrócitos .....  | 43 |
| Figura 13 – Alterações na distribuição das plaquetas.....  | 44 |
| Figura 14 – Esquema ilustrativo das reações da formação do coágulo <i>in vivo</i> .....  | 45 |
| Figura 15 – Esquema ilustrativo das reações da formação do coágulo no laboratório.....   | 46 |
| Figura 16 – Células encontradas no esfregaço de sangue do doente, pelo software <i>CellaVision</i> .....                       | 52 |
| Figura 17 – Esfregaço do sangue periférico do utente.....  | 52 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Tubos utilizados no CHUC na colheita de sangue.....   | 4  |
| Tabela 2 – Equipamentos automatizados presentes no setor da Bioquímica.....  | 5  |
| Tabela 3 – Equipamentos automatizados presentes no setor da Microbiologia.....   | 6  |
| Tabela 4 – Equipamentos automatizados presentes no setor da Hematologia .....  | 6  |
| Tabela 5 – Equipamentos automatizados presentes no setor da Imunologia .....   | 7  |
| Tabela 6 – Exemplos de doenças autoimunes específicas de órgão associadas ao autoantígeno que as caracteriza.....                                  | 11 |
| Tabela 7 – Exemplos de doenças autoimunes sistêmicas associadas ao autoantígeno que as caracteriza .....   | 12 |
| Tabela 8 – Caracterização dos ENA mais prevalentes e relevantes no diagnóstico de DAIS.....  | 19 |
| Tabela 9 – Algoritmo de detecção de antígenos específicos associados aos padrões de fluorescência nucleares e as patologias prevalentes.....       | 21 |
| Tabela 10 – Algoritmo de detecção de antígenos específicos associados aos padrões citoplasmáticos e correlação com as patologias prevalentes. .... | 22 |
| Tabela 11 – Algoritmo de detecção de antígenos específicos associados aos padrões mitóticos e correlação com as patologias prevalentes .....       | 23 |
| Tabela 12 – Resultado obtido para a pesquisa de ENA.....   | 24 |
| Tabela 13 – Resultados obtidos para a pesquisa de anti-dsDNA.....  | 25 |
| Tabela 14 – Resultados obtidos da determinação de anti-dsDNA (RIA).....  | 25 |
| Tabela 15 – Critérios de classificação de Lúpus Eritematoso Sistêmico .....  | 26 |
| Tabela 16 – Parâmetros avaliados no leucograma, significado e respectiva relevância clínica .....  | 31 |
| Tabela 17 – Parâmetros avaliados no eritrograma, significado e respectiva relevância clínica .....   | 32 |
| Tabela 18 – Parâmetros avaliados no plaquetograma, associados à respectiva relevância clínica.....   | 33 |
| Tabela 19 – Resultados laboratoriais do hemograma com esquema interpretativo .....   | 51 |
| Tabela 20 – Principais determinações bioquímicas efetuadas em amostras de soro associados à respectiva correlação fisiopatológica.....             | 55 |

## **ABREVIATURAS**

AAc – Autoanticorpo

AAg – Autoantígeno

AC – Anti-cell

ANA – Anticorpos Antinucleares e Citoplasmáticos

Anti-DNA – Anticorpos anti-DNA

Anti-dsDNA – Anticorpos anti-DNA de cadeia dupla

Anti-ENA – Anticorpos anti-antígenos Nucleares Extraíveis

Anti-ssDNA – Anticorpos anti-DNA de cadeia simples

AR – Artrite Reumatóide

BCIP/NBT – 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato p-toluidina sal/cloreto de tetrazólio-nitrozul

BIM – *Bulk Input Module*

CBP – Colangite Biliar Primária

CD20 – *Cluster of differentiation 20*

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CLIA – Imunoensaios de Quimiluminescência, do inglês *Chemiluminescent immunoassay*

CLIFT – Imunofluorescência indireta com substrato de *Crithidia lucilae*, do inglês *Crithidia luciliae immunofluorescence test*

CQ – Controlo de qualidade

CQE – Controlo de Qualidade Externo

CQI – Controlo de Qualidade Interno

DAI – Doenças Autoimunes

DAIS – Doenças Autoimunes Sistémicas

DAISR – Doenças Autoimunes Sistémicas Reumáticas

DM – Dermatomiosite

DMTC – Doença Mista do Tecido Conjuntivo

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*

dRVVT – Tempo de coagulação com Veneno de víbora de Russell Diluído, do inglês *Dilute Russell's viper venom time*

EDTA K3 – Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico, do inglês *Ethylenediaminetetraaceticacid tri-potassium*

EIA – Imunoensaios enzimáticos, do inglês *Enzyme immunoassays*

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ENA – Antígenos Nucleares Extraíveis, do inglês *Extractable Nuclear Antigen*

EQAS – *External Quality Assurance Services*

ES – Esclerose Sistêmica

FEIA – Imunoensaio fluoroenzimático, do inglês *Fluorescence Enzyme Immunoassay*

FISH – Hibridização *in situ* fluorescente, do inglês *Fluorescence in situ hybridization*

FITC – Istiocinato de fluoresceína, do inglês *Fluorescein Isothiocyanate*

Hb – Hemoglobina

HbA<sub>1c</sub> – Hemoglobina Glicada

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

HEp-2 – Células do carcinoma da laringe tipo 2, do inglês *Human epithelial type 2 cells*

HG – Hospital Geral (ou Hospital dos Covões)

HP – Hospital Pediátrico

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Precisão, do inglês *High performance liquid chromatography*

HUC – Hospitais da Universidade de Coimbra

ICAP – *International Consensus on Antinuclear antibody Pattern*

IFI – Imunofluorescência Indireta

IFI/HEp2 – Imunofluorescência Indireta com substrato de células do carcinoma da laringe tipo 2

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

INR – *International Normalized Ratio*

INSA – Instituto Nacional Doutor Ricardo Jorge

IOM – *Input Output Module*

ITL – Inibidor do Tipo Lupus

KPC – *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase

LDH – Lactato Desidrogenase

LECS – Lupus Eritematoso Cutâneo Subagudo

LED – Lupus Eritematoso Discoide

LEN – Lupus Eritematoso Neonatal

LES – Lupus Eritematoso Sistêmico

MALDI-TOF – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*

MBPL – Manual de Boas Praticas Laboratoriais

NRBC – *Nuclear Red Blood Cells*

PLT-F – *Fluorescent platelet channel*

PM – Polimiosite

qPCR – *Polymerase Chain Reaction em tempo real*

RDW – Coeficiente de variação de eritrócitos, do inglês *Red Cell Distribution Width*

RET – Reticulócitos

RIA – Radioimunoensaios, do inglês *Radioimmunoassay*

RIQAS – *Randox International Quality Assessment Service*

RLU – *Relative Light Units*

RNA – Ácido Ribonucleico, do inglês *Ribonucleic acid*

RTX – Rituximab

SARS-CoV-2 – Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2, do inglês *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SAF – Síndrome Antifosfolipídico

SCT – Tempo de Coagulação com Sílica, do inglês *Silica clotting time*

SLEDAI – *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*

SLS – Lauril sulfato de sódio, do inglês *Sodium lauryl sulfate*

SPC-CHUC – Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

sRNA – Ácido ribonucleico de baixo peso molecular, do inglês *small regulatory Ribonucleic acid*

ssDNA – Ácido desoxirribonucleico de cadeia simples

SSj – Síndrome de Sjögren

TP – Tempo de Protrombina

TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos

TTPa – Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada

UKNEQAS – *United Kingdom External Quality Assessment Service*

UV – Ultravioleta

VCM – Volume Corpuscular Médio

VS – Velocidade de Sedimentação

WDF – *White cell differential channel*

WNR – *White cell nucleated channel*

WPC – *White cell precursor channel*



## I. INTRODUÇÃO

A avaliação correta e completa de indivíduos que manifestem sinais e sintomas de uma determinada doença passa por diversas considerações até ao diagnóstico definitivo, estando nelas incluída a anamnese, o exame físico e requisição de exames complementares ao diagnóstico. As análises clínicas constituem uma ferramenta auxiliar do diagnóstico de elevado valor uma vez que permitem a confirmação/exclusão de uma suspeita clínica, auxiliam na seleção, otimização e monitorização do tratamento, permitindo também a deteção precoce de doenças, mesmo na ausência de sinais clínicos.

A escolha do Mestrado em Análises Clínicas surge na sequência do interesse manifestado pela vertente clínica aliado à aplicação prática dos conhecimentos adquiridos durante a licenciatura em bioquímica. No segundo ano do presente ciclo de estudos, é realizado um estágio curricular em ambiente laboratorial onde é possível integrar uma equipa multidisciplinar de modo a aplicar os conhecimentos adquiridos durante o primeiro ano do referido curso, possibilitando ainda a aprendizagem técnico-operacional tanto pela integração na rotina laboratorial, como pela validação analítica dos resultados.

As atividades laboratoriais descritas no presente relatório foram desenvolvidas no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, efetuadas no período de cinco meses e orientadas pela Dra. Alice Augusta Lopes Mendes, Farmacêutica especialista em Análises Clínicas, e pela Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva, professora na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Devido à setorização laboratorial do referido serviço, foi possível estagiar por um período de cerca de um mês em cada uma das principais valências do domínio das análises clínicas: Setores de Hematologia, Bioquímica, Microbiologia e Imunologia. Por considerar interessante aprofundar os meus conhecimentos nas áreas da Hematologia e Imunologia, o presente relatório inclui uma abordagem pormenorizada das referidas valências, sendo que as restantes são apresentadas de uma forma mais sucinta. Assim, está dividido em quatro partes principais, iniciando-se com a caracterização do laboratório, seguida da apresentação das três fases analíticas que caracterizam o processo analítico, enfatizando a importância da gestão da qualidade na rotina laboratorial e concluindo com a apresentação das quatro valências. Naquelas sobre as quais incidiu o estudo, é feita a descrição das metodologias utilizadas, informação indispensável a qualquer especialista em Análises Clínicas, apresentando as bases teóricas que sustentam os procedimentos ao nível prático, espelhados em casos clínicos.

## 2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

Tendo em vista a rentabilização de recursos e centralização de serviços, o atual Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (SPC-CHUC) é resultado da fusão, iniciada no ano de 2014, dos Serviços de Patologia Clínica de três hospitais: Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), Hospital dos Covões (HG) e Hospital Pediátrico (HP). O diretor do serviço é o Doutor Fernando Manuel Ribeiro Rodrigues, Patologista Clínico, que conta com a colaboração de uma vasta equipa multidisciplinar constituída por médicos patologistas clínicos, farmacêuticos, técnicos superiores de saúde, técnicos superiores de análises clínicas e saúde pública, assistentes administrativos e auxiliares de ação médica.

O espaço físico do serviço está dividido por diferentes setores, entre os quais uma central de colheitas, salas de serviço administrativo, salas de lavagem e limpeza de material, balcão central de receção de amostras e pelos setores de Microbiologia, Bioquímica (rotina e urgência), Hematologia (rotina e urgência), Imunologia, Serologia, Hormonologia e Genética Humana associados às respetivas salas de validação de resultados analíticos.

Associado à unificação e centralização de serviços, verifica-se um elevado fluxo de amostras rececionadas diariamente no SPC-CHUC, sendo a maioria de enfermarias, central de colheitas, Hospital Pediátrico, Hospital dos Covões, Maternidades Bissaya Barreto e Daniel de Matos. Para além da análise de amostras internas, o serviço recebe amostras vindas de outros hospitais, como do Centro Hospitalar Tondela Viseu, Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, Centro Hospitalar do Baixo Vouga e de outros laboratórios da região Centro, que por serem serviços de menores dimensões, têm um fluxo reduzido de amostras para avaliação de parâmetros muito particulares, não justificando o investimento em autoanalisadores ou reagentes específicos. Da mesma forma, o SPC-CHUC solicita a análise de parâmetros cuja avaliação não seja justificada a nível interno a entidades exteriores, nomeadamente ao Instituto Nacional Doutor Ricardo Jorge (INSA), ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) ou outros laboratórios (Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves, por exemplo).

Sabendo que em média são analisadas diariamente amostras de 1500 doentes, das quais cerca de um terço é colhida ou recebida na central especializada do SPC-CHUC, surgiu a necessidade de implementar um sistema automatizado do tipo *corelab* (de modo a reduzir o tempo de resposta na apresentação de resultados e também no número de amostras colhidas por doente) permitindo uma otimização e simplificação do processo analítico.

Para além dos progressos tecnológicos em termos de equipamentos e *software*, realça-se a existência de um sistema informático de Gestão de Laboratórios de Análises Clínicas, *Clinidata XXI (MaxData)* que permite acompanhar o processamento da amostra, desde a sua requisição pelo clínico até à obtenção do resultado. As vantagens associadas a este sistema em rede são inúmeras salientando a rapidez e a fácil acessibilidade à informação relativa ao estado de processamento das amostras, resultados obtidos nos diferentes setores, a possibilidade de acesso ao histórico do utente e ainda a comunicação direta dos pedidos a muitos dos autoanalisadores dispersos pelos setores do serviço. Esta é uma grande vantagem, no sentido em que, obtido o resultado da determinação, este é lançado diretamente no sistema informático, evitando erros grosseiros por parte da equipa técnica no registo de resultados, associado a uma franca rentabilização de recursos e tempo.

## **2.1. Fase Pré-analítica**

Tanto na central de colheitas como nas enfermarias hospitalares, existem um conjunto de requisitos técnicos a ter em conta, de modo a garantir a integridade da amostra até ao momento do seu processamento. É nesta fase que ocorrem a grande maioria dos erros grosseiros que afetam os resultados analíticos.

Num contexto de ambulatório, é importante que, após a inscrição do utente pelo administrativo, se identifiquem eventuais condições especiais técnicas para a execução da colheita (condição física do utente, ou outro tipo de condição especial como por exemplo os reclusos). Seguidamente, o individuo é encaminhado para a sala de espera, onde aguarda pela sua vez. A ordem de colheitas é feita mediante um sistema de prioridade com marcação, privilegiando primeiramente doentes em consulta de oncologia, transplantados e diabéticos. Na receção de cada doente na sala de colheitas, o técnico especialista em análises clínicas prepara o material necessário para efetuar a colheita, confirmando a identificação do doente e se fez preparação prévia requerida para algumas análises (jejum, dieta específica, entre outros). Caso o utente se faça acompanhar com amostras colhidas pelo próprio, é importante questionar se a colheita foi executada de acordo com as informações indicadas pela ficha fornecida pelo clínico no momento da consulta. Se o utente cumpriu todos os requisitos, o técnico procede à identificação dos tubos ou porta-amostras, com as respetivas etiquetas cujos códigos de barra conferem informação acerca do nome do doente, o tipo de tubo ou contentor, bem como o setor ou setores nos quais a análise do material biológico vai ser efetuada.

Em ambiente de internamento hospitalar é comum que o doente tenha veias puncionadas para administração de soros ou fármacos. Caso seja necessária a colheita de sangue para análise, o procedimento deve ser interrompido e a colheita deverá ser realizada no membro oposto, de modo a evitar hemodiluições, que falseiam, principalmente, as concentrações dos parâmetros bioquímicos.

No momento da colheita deve ter-se em conta algumas variáveis como a brevidade da aplicação do garrote, o volume de sangue a colher, bem como a ordem dos tubos. Primeiramente a aplicação do garrote não deve exceder 1 minuto, para que não falseie os parâmetros relacionados com a lise celular (nomeadamente potássio e lactato desidrogenase) e provoque a diminuição drástica do fluxo sanguíneo. O volume de sangue a colher é especialmente importante na colheita de amostras que têm de ser acondicionadas em tubo com anticoagulante, uma vez que a relação anticoagulante/amostra deve ser respeitada para que não haja nem diluição excessiva da amostra (caso do anticoagulante em excesso) nem anticoagulante insuficiente que levaria à coagulação ainda que parcial da amostra. Por fim a colheita deve seguir uma ordem para evitar contaminação cruzada dos aditivos. Assim primeiramente efetua-se a colheita para análise microbiológica (hemoculturas), seguindo-se os tubos com citrato de sódio, tubos com gel, e por fim tubos com EDTA K3, mencionados na Tabela 1<sup>1</sup>.

**Tabela 1** – Tubos utilizados no CHUC na colheita de sangue (marca S-MONOVETTE®).

| Cor da tampa | Composição                 | Amostra obtida              | Setores  |
|--------------|----------------------------|-----------------------------|--|
| Verde        | Citrato de sódio a 3,2%    | Plasma (após centrifugação) | Hematologia (Provas da coagulação)                 |
| Castanha     | Gel ativador da coagulação | Soro (após centrifugação)   | Bioquímica, Imunologia, Hormonologia               |
| Vermelha     | EDTA K3                    | Sangue total                | Hematologia (Hemograma, VS),<br>Bioquímica (HbA1c) |

Realizada a colheita é importante a homogeneização dos tubos, principalmente os que contêm anticoagulantes. Por fim, as amostras devem ser encaminhadas para o laboratório com a maior brevidade possível.

## 2.2. Fase analítica

Os assistentes técnicos no balcão de triagem situado no *corelab* conferem as amostras quanto à validade e integridade das mesmas, verificam os pedidos solicitados e identificam as amostras que entram na cadeia de automação e as que são diretamente distribuídas pelos respetivos setores. Assim, as amostras rececionadas podem ser totalmente processadas na

cadeia, ser totalmente processadas fora da cadeia e parcialmente processadas na cadeia com alíquotagem para processamento fora da cadeia.

A grande maioria dos setores, à exceção do setor da microbiologia, recebe pedidos de determinações analíticas que são efetuados em autoanalisadores de química clínica, *Alinity c*, nos sistemas de imunoensaio, *Alinity i* e na cadeia de hematologia, *Sysmex XN-9000*, situados no *corelab*. Por este motivo, após a triagem, as amostras são colocadas no *Bulk Input Module (BIM)* ou no *Input Output Module (IOM)*, módulos de entrada das amostras, associado ao *Accelerator a3600*, equipamento que procede à condução das amostras até à centrifuga (à exceção dos tubos destinados ao hemograma) e, posteriormente, à sua distribuição, mediante a leitura de código de barras, pelos diferentes autoanalisadores consoante os parâmetros a analisar. Depois de realizada a análise, as amostras ou são conduzidas pela cadeia até ao sistema de refrigeração onde ficam armazenadas ou são encaminhadas para o módulo do *Accelerator p540* para proceder à separação de alíquotas do tubo primário, necessárias para os diferentes setores.

### 2.2.1. Setor de Bioquímica

Devido ao elevado número de amostras recebidas para pesquisa de parâmetros bioquímicos, é um setor que se encontra altamente automatizado, de modo a responder com eficácia e rapidez a todos os pedidos. Na Tabela 2 encontram-se os principais equipamentos da química clínica.

**Tabela 2** – Equipamentos automatizados presentes no setor da Bioquímica.

| <b>Equipamento</b>     | <b>Metodologia/Descrição</b>   |
|------------------------|--|
| Alinity c, Abbott      | Espetrofotometria, turbidimetria e potenciometria  |
| Alinity i, Abbott      | Quimioluminescência  |
| Variant II Turbo, Bio- | Cromatografia Líquida de Alta Precisão (HPLC)  |
| AutionMAX Ax-4820      | Espectrofotometria de reflectância – Análise de sumária de urina                               |
| SediMAX Ax-4830        | Microscópio acoplado a câmara que captura imagens de 15 campos – Análise do sedimento urinário |

### 2.2.2. Setor de Microbiologia

O setor da Microbiologia está subdividido em Bacteriologia, Micobactérias, Parasitologia e Micologia. Apesar de ser o setor com maior número de técnicas manuais, e por isso menor automatização, ao longo dos anos houve um investimento contínuo em instrumentação que aumente a fiabilidade e rapidez na identificação de microorganismos. A Tabela 3 apresenta os equipamentos presentes no setor, associados às respetivas funções.

**Tabela 3** – Equipamentos automatizados presentes no setor da Microbiologia.

| <b>Equipamento</b>                         | <b>Princípio</b>   | <b>Função</b>  |
|--|--|--|
| Bact/Alert 3D, BioMérieux                  | Sensor colorimétrico que identifica diminuições do pH  | Deteção de crescimento microbiano  |
| Accelerate Pheno™, Accerelate Diagnostics™ | Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)  | Deteção, identificação, quantificação do agente patogénico e testes de suscetibilidade aos |
| VITEK MS, BioMérieux                       | Espectrometria de Massa: <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i> (MALDI-TOF) | Identificação microbiana   |
| GeneXpert® XVI, Cepheid                    | PCR qualitativo em tempo real (qPCR)   | Identificação KPC, SARS-CoV-2, <i>Clostridium difficile</i> , entre outros                 |
| VITEK 2, BioMérieux                        | Identificação microbiana e testes de suscetibilidade aos antibióticos  |  |

### 2.2.3. Setor de Hematologia

O setor da Hematologia está subdividido em várias áreas consoante a especificidade das análises: hemograma, hemostase, citologia, citometria de fluxo, biologia molecular e citogenética, tendo estagiado em apenas algumas delas, descritas no capítulo 4. Na Tabela 4 encontram-se referidos os equipamentos existentes no setor.

**Tabela 4** – Equipamentos automatizados existentes no setor da Hematologia.

| <b>Equipamento</b>                           | <b>Tecnologia associada</b>                                   |
|--|---|
| Sysmex XN-9000, Sysmex Corporation           | Impedância eletrónica, Citometria de fluxo com fluorescência  |
| ACL TOP 700                                  | Turbidimetria, espectrofotometria, imunoensaio turbidimétrico |
| VES-MATIC CUBE 30, Diesse Diagnostica Senese | Técnica de Westergren modificada                              |
| ROTEM sigma, Werfen                          | Tromboelastometria rotacional                                 |

### 2.2.4. Setor de Imunologia

Já o setor da Imunologia é caracterizado pelos subsectores da Imunologia Geral e Autoimunidade. Tal como nos restantes setores, possui tecnologia que garante a agilização no tempo de resposta necessária em ambiente hospitalar. Assim, encontram-se enunciados na Tabela 5 os principais equipamentos deste setor.

**Tabela 5** – Equipamentos automatizados presentes no setor da Imunologia.

| <b>Equipamento</b>                          | <b>Tecnologia associada</b>   |
|---|---|
| IF Sprinter, Euroimmun                      | Preparação de lâminas por Imunofluorescência Indireta (IFI) – Detecção de autoanticorpos                          |
| EUROPattern, Euroimmun                      | Microscopia de imunofluorescência associada ao computador - Microscópio acoplado a câmara de captação de imagens. |
| Analyzer I, Euroimmun                       | Imunoensaio (ELISA)   |
| Mago 4, DiaMedix                            | Preparação de lâminas por Imunofluorescência Indireta/  |
| EUROBlot One, Euroimmun                     | Immunoblotting  |
| Bio-Flash, Werfen                           | Quimioluminescência   |
| Wallac Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, | Contador de radiação gama   |
| ImmunoCap 250, Phadia                       | Imunoensaio fluoroenzimático (FEIA)   |
| BN ProSpec, Siemens                         | Nefelometria  |
| Optilite                                    | Turbidimetria   |
| Alinity i, Abbott                           | Quimioluminescência   |
| Hidasys 2, Sebia                            | Eletroforese de proteínas urinárias e imunofixação em gel de agarose de proteínas séricas e urinárias             |
| Capillarys 2 Flex Piercing, Sebia           | Eletroforese capilar – proteinograma sérico   |

### **2.3. Gestão da qualidade**

É importante que a prestação de qualquer serviço esteja associada a um sistema de garantia da qualidade, validade e rigor. As análises clínicas não são exceção, uma vez que dos seus resultados dependem ações do corpo clínico decisivos para o bem-estar do doente. Assim, controlo de qualidade entende-se como o conjunto de procedimentos a realizar de forma a detetar erros e monitorizar a reprodutibilidade e exatidão dos resultados ao longo do tempo. Estes erros poderão resultar de diversas situações, das quais condições adversas no ambiente de trabalho, alterações no desempenho do operador ou até mesmo alterações alheias ao manipulador da técnica <sup>2</sup>.

A fiabilidade dos relatórios e resultados apresentados é assegurada pelo responsável do controlo de qualidade (CQ) do laboratório, cuja responsabilidade é a de envidar esforços contínuos no sentido de garantir que todos os procedimentos e atividades sejam regidas por protocolos pré-estabelecidos, baseados no Manual de Boas Práticas Laboratoriais de Patologia Clínica ou Análises Clínicas (MBPL), de forma a garantir a prestação de serviço de excelência com resultados fidedignos e robustos.

O controlo da qualidade interno (CQI) consiste na avaliação dos parâmetros analíticos numa amostra controlo, cuja concentração é conhecida. Cada controlo é usualmente adquirido no comércio e é utilizado de modo a monitorizar a *performance* dos instrumentos laboratoriais, entre os quais os analisadores e reagentes, avaliando a reprodutibilidade dos

resultados. À exceção de metodologias que exijam a execução de mais do que um controlo diário ou mesmo outras que não requeiram análise diária devido ao número reduzido de requisições por dia, o CQI é, por norma, o primeiro ensaio diário a ser realizado.

Após ser conhecido o valor do controlo de CQI, este é analisado mediante a carta de Levey-Jennings, sendo que, se o valor obtido se encontrar fora do intervalo de valores esperados, amostras desconhecidas apresentarão também determinações incorretas. Assim, o procedimento é avaliado de forma a detetar a falha e depois de implementadas as respetivas medidas corretivas, que podem incluir uma nova calibração do método, utilização de novo controlo ou novo reagente, o controlo é novamente analisado até que a concentração do parâmetro coincida com a gama de valores expectáveis. Pode assim concluir-se que o CQI validou o método, o equipamento e os reagentes utilizados, garantindo a fiabilidade dos resultados das amostras seguintes <sup>2</sup>.

Para além da execução do CQI, é importante que cada laboratório se envolva na participação periódica em programas de controlo de qualidade externo (CQE), de modo a avaliar a exatidão dos resultados obtidos, pelo método e equipamento instituídos, respeitante ao parâmetro que está a ser avaliado. Assim, laboratórios de referência enviam uma amostra desconhecida para que seja efetuada a pesquisa quantitativa de um determinado parâmetro. Amostras idênticas são enviadas para outros laboratórios que participam no programa de CQE. Finalmente, é emitido um relatório apresentando o valor obtido pelo laboratório e o valor real determinado pela média de resultados interlaboratoriais, podendo estabelecer comparações com os laboratórios pares, isto é, laboratórios nacionais e internacionais que utilizam o mesmo equipamento e a mesma metodologia <sup>2,3</sup>. A análise do relatório obtido é importante na medida em que garante a segurança e fiabilidade dos resultados obtidos, permitindo também a deteção de falhas técnicas, nomeadamente no equipamento, que poderiam não ser detetadas pelo CQI. O SPC-CHUC participa em diversos programas de controlo externo da qualidade, dos quais EQAS, UKNEQAS, RIQAS e do INSA, tendo uma participação usualmente mensal na avaliação dos parâmetros mais analisados.

#### **2.4. Fase Pós-analítica**

A validação dos resultados é efetuada por uma equipa de médicos Patologistas Clínicos, Técnicos Superiores de Saúde ou Farmacêuticos especialistas em Análises Clínicas, cuja responsabilidade é caracterizada pela integração fisiopatológica dos resultados obtidos nos diversos setores e de acordo com informação clínica fornecida. Destaca-se que, apesar de se

processarem amostras, estas pertencem a um indivíduo com diversos sistemas interrelacionados e que, por isso, deve ser avaliado segundo uma visão holística.

### **3. IMUNOLOGIA**

Como mencionado previamente, o Setor de Imunologia do Serviço de Patologia do CHUC está dividido em 2 subsetores, Autoimunidade e Imunologia Geral. No presente relatório, apresento de uma forma mais aprofundada, os conhecimentos adquiridos no setor da Autoimunidade, uma vez que nunca tinha contactado com a área, suscitando em mim um interesse especial, tanto do ponto de vista prático, relacionado com trabalho laboratorial, como teórico, relativo ao estudo das doenças autoimunes e o que as caracteriza.

#### **Autoimunidade**

##### **3.1. Reação autoimune**

O Sistema imunológico é constituído por um conjunto de moléculas, células, órgãos e sistemas distintos e amplamente distribuídos, cuja função é a de identificar e debelar potenciais ameaças à segurança e integridade do organismo.

Uma resposta autoimune caracteriza-se por um ataque do sistema imunológico ao próprio hospedeiro (*self*), revelando uma perturbação evidente dos mecanismos associados à tolerância. Tolerância ao *self* inicia-se durante o desenvolvimento fetal com a eliminação de células altamente auto-reativas e caracteriza-se pela ausência de resposta do sistema imunológico a autoantígenos (AAg) <sup>2</sup>.

Nas reações autoimunes desencadeiam-se respostas humorais, que compreendem a produção de anticorpos (autoanticorpos, AAC), bem como respostas mediadas por células, resultando na lise de células específicas, mecanismos estes semelhantes aos verificados aquando de um combate a ataques externos (*non-self*). Pode concluir-se que a ocorrência de respostas autoimunes deve-se à perda de tolerância ao *self* associada à incapacidade do sistema imunitário distinguir as partículas *self* das *non-self* <sup>4</sup>.

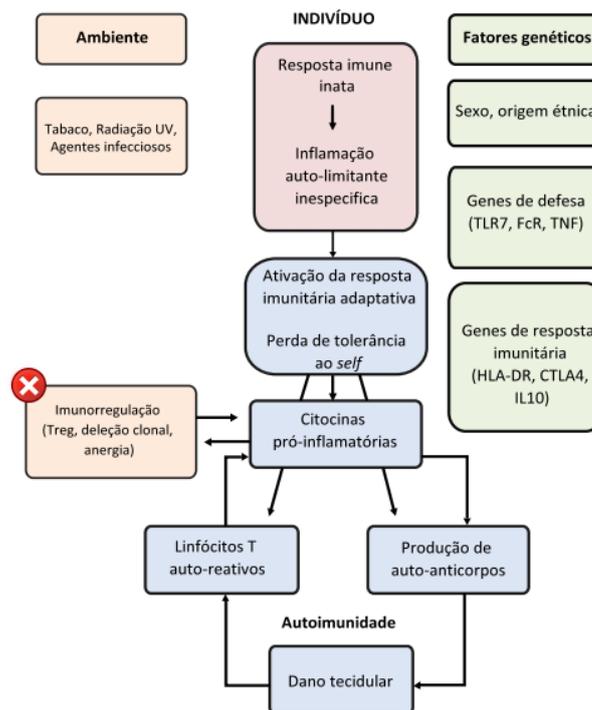
As doenças autoimunes (DAI) incluem mais de 80 doenças crónicas que, apesar de distintas, partilham um mesmo princípio: ativação constante de mecanismos imunológicos que alteram a integridade de células e órgãos do indivíduo.

### 3.2. Autoanticorpos: em que consistem e como se dá a sua síntese

Os autoanticorpos são imunoglobulinas secretadas pelos plasmócitos e são marcadores da ativação dos linfócitos B auto-reativos desencadeada por AAg. Os linfócitos B auto-reativos promovem a apresentação de AAg aos linfócitos T, estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas <sup>5</sup>.

O dano tecidual verificado em indivíduos que apresentam DAI está intimamente relacionado com a produção de AAc. Esses autoanticorpos reagem contra antígenos da superfície celular ou recetores de membrana, formando imunocomplexos que, ao depositarem-se no tecido, levam à ativação do sistema de complemento e a mecanismos pró-inflamatórios e apoptóticos <sup>2</sup>. Quanto maior a especificidade antigénica do autoanticorpo e título presentes na amostra do doente, maior é a sua relevância no imunodiagnóstico <sup>6</sup>.

Na tentativa de explicar a multiplicidade e a complexidade de respostas autoimunes associadas à produção de autoanticorpos, foram elaborados diversos modelos hipotéticos de cascatas de reações. O esquema que se segue, apresentado na Figura 1, compila os conceitos comuns a esses modelos.



**Figura 1** – Modelo hipotético de cascatas de reações que influenciam o desenvolvimento e perpetuação de doenças autoimunes. A suscetibilidade ao desenvolvimento de DAI pode ser herdada, adquirida ou ambas. Mutações ao nível de genes de defesa e genes de resposta imune associados a fatores externos geram uma resposta do sistema imunológico que resulta na perda de tolerância ao *self*, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, autoanticorpos e linfócitos T auto-reativos, resultando em dano celular. A imunorregulação em indivíduos com DAI parece ser ineficaz em deblar as reações autoimunes. Adaptado de <sup>7</sup>.

CTLA4, Proteína 4 associada ao Linfócito T citotóxico; FcR, Região do fragmento cristalizável; HLA-DR, Antígeno leucocitário humano – DR; IL-10, Interleucina 10; TLR7, Toll-like receptor 7; TNF, Fator de necrose tumoral; Treg, Linfócitos T reguladores; UV, Ultra-violeta.

### 3.3. Objetivo do imunodiagnóstico

Indivíduos saudáveis podem produzir autoanticorpos, sendo que com elevada frequência, nunca chegam a ser agente causal de doença uma vez que têm afinidade reduzida para os autoantígenos. Sabe-se, no entanto, que em muitas doenças autoimunes (Lupus Eritematoso Sistêmico, Artrite Reumatóide, Esclerose Sistêmica, Síndrome de Sjogren, entre outras), títulos elevados de autoanticorpos são detetados muito antes do aparecimento de sinais clínicos e que, atualmente, o melhor indicador de doença autoimune continua a ser o anticorpo. Associado à história familiar, a estudos genéticos complementares e a análises hematológicas e bioquímicas, a detecção precoce da presença de autoanticorpos específicos possibilitam uma intervenção atempada e vigilância atenta da evolução do estado clínico do indivíduo <sup>6,8</sup>.

### 3.4. Tipos de doenças autoimunes

As patologias associadas à produção de anticorpos auto-reativos podem ser divididas em dois grupos: doenças autoimunes específicas de órgão e doenças autoimunes sistêmicas (DAIS). Os AAc que reagem com antígenos específicos de um órgão ou tecido estão intimamente ligados a doenças autoimunes órgão-específicas, diferente do que se verifica em indivíduos com DAIS, onde os AAc reagem com antígenos celulares ubíquos <sup>4</sup>. As Tabelas 6 e 7 apresentam alguns exemplos de patologias associadas a cada grupo de DAI.

**Tabela 6** – Exemplos de doenças autoimunes específicas de órgão associadas ao autoantígeno que as caracteriza <sup>7</sup>.

| Doenças autoimunes específicas de órgão |                                      |  |
|---|--------------------------------------|--|
| Órgão/Células                           | Patologia(s)                         | Autoantígeno/Localização   |
| Glândulas adrenais                      | Doença de Addison                    | Citocromo P450   |
| Eritrócitos                             | Anemia hemolítica autoimune          | Proteínas de membrana dos eritrócitos                                  |
| Plaquetas                               | Trombocitopenia autoimune idiopática | Proteínas plaquetares (GP IIb/IIIa)                                    |
| Estômago                                | Anemia perniciosa                    | Células parietais gástricas (H <sup>+</sup> /ATPase, fator intrínseco) |
| Intestino delgado                       | Doença celíaca                       | Transglutaminase<br>Gliadinas<br>Endomísio                             |
| Tiroide                                 | Tiroidite de Hashimoto               | Antígenos das células da tiroide (Tiroglobulina)                       |
|   | Doença de Graves                     | Recetor da tirotrófina   |
| Músculo                                 | Miastenia gravis                     | Recetores de acetilcolina  |
| Pâncreas (Ilhéus de Langerhans)         | Diabetes tipo I                      | Células β-pancreáticas (ácido glutâmico descarboxilase, insulina)      |
| Fígado                                  | Hepatite autoimune                   | Antígenos do hepatócito (Citocromo P450 2D6)                           |
| Ductos biliares                         | Colangite biliar primária            | Complexo enzimático do piruvato desidrogenase                          |
| Coração                                 | Doença reumática cardíaca            | Antígenos do miocárdio   |

**Tabela 7** – Exemplos de doenças autoimunes sistêmicas associadas ao autoantígeno que as caracteriza <sup>7</sup>.

| <b>Doenças autoimunes sistêmicas (DAIS)</b> |  |
|---|--|
| <b>Patologia</b>                            | <b>Localização do autoantígeno</b>                             |
| Espondilite anquilosante                    | Vertebras  |
| Esclerose múltipla                          | Cérebro e matéria branca                                       |
| Artrite reumatoide                          | Tecido conjuntivo  |
| Lupus eritematoso sistêmico                 | DNA, proteínas nucleares, eritrócitos e membranas plaquetares  |
| Esclerodermia                               | Núcleo celular, coração, pulmões, trato gastrointestinal, rins |
| Síndrome de Sjögren                         | Glândulas salivares, fígado, rins e tireóide                   |

### **3.5. Metodologias utilizadas na detecção de autoanticorpos**

A detecção de autoanticorpos é feita recorrendo a diversas metodologias que serão explicadas em seguida.

#### **3.5.1. Imunofluorescência indireta - IFI**

Imunofluorescência indireta (IFI) refere-se à metodologia na qual, células de cultura contendo antígenos específicos fixadas numa lâmina, de modo a garantir que o antígeno-alvo não é removido durante o procedimento, são permeabilizadas de forma a permitir a entrada do eventual autoanticorpo presente na amostra de soro. A lâmina é incubada com amostra de soro previamente diluída, e caso contenha autoanticorpos, dar-se-á a formação do complexo antígeno-anticorpo (imunocomplexo). O excedente de autoanticorpo não ligado é removido durante o processo de lavagem da lâmina. Em seguida, a formação do imunocomplexo é revelada pela adição de um segundo anticorpo, anti-imunoglobulina humana conjugado com um fluoróforo (isotiocianato de fluoresceína - FITC). A fluorescência emitida por este composto apresenta coloração verde, quando sobre ele incide radiação ultravioleta, e pode ser observada num microscópio de fluorescência <sup>2;9</sup>, permitindo assim identificar, para além da presença do antígeno a localização celular do mesmo <sup>4</sup>.

#### **3.5.2. Imunoensaios enzimáticos - EIA**

Os imunoensaios enzimáticos (EIA) são metodologias que utilizam as propriedades catalíticas de enzimas para detetar e quantificar reações de ligação antígeno-anticorpo. Nos imunoensaios enzimáticos não competitivos utilizados no setor da autoimunidade, um antígeno específico está covalentemente ligado à superfície de uma fase sólida (poços de microfibras ou esferas de poliestireno), ao qual é adicionada a amostra de soro que poderá conter o anticorpo em estudo. Depois da lavagem para remover os anticorpos inespecíficos que não se ligaram ao antígeno adiciona-se um anticorpo anti-imunoglobulina humana marcado com uma enzima. Ao adicionar o substrato dar-se-á a reação enzimática, na qual o

sinal emitido pelo produto de reação é proporcional à concentração de anticorpo presente no soro do doente. A diversidade de metodologias EIA está relacionada com as características físico-químicas deste produto de reação <sup>2</sup>.

### **3.5.2.1. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay - ELISA**

O ensaio de imunoabsorção enzimática (*enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) é uma metodologia concebida para detetar anticorpos (caso específico das doenças autoimunes) pela mudança de cor originada por uma reação enzimática do tipo indireto, que ocorre em placas com micropoços revestidos com o antígeno e aos quais é adicionada a amostra diluída. Após incubação para promover a formação do imunocomplexo seguem-se várias lavagens para remover anticorpos não complexados. Posteriormente é adicionado um segundo anticorpo (anti-imunoglobulina humana) marcado enzimaticamente (p.ex.: fosfatase alcalina) que reconhece diretamente apenas os anticorpos em análise ligados aos antígenos que revestem a fase sólida. Seguidamente é adicionado o substrato enzimático do conjugado, que gera um sinal colorimétrico (azul). Por fim é adicionada uma solução ácida de forma a parar a reação e que origina uma mudança de cor de azul para amarelo, que absorve a 450 nm. A medição da densidade ótica é realizada através de um leitor de microplacas convencional, sendo que a absorvância é diretamente proporcional à concentração de anticorpo na amostra <sup>2:10</sup>.

### **3.5.2.2. Imunoensaio fluoroenzimático - FEIA**

Este é um método imunoenzimático que quantifica anticorpos presentes na amostra através de uma reação enzimática da qual resulta um produto fluorescente. O autoanalisador ImmunoCap 250<sup>®</sup> utiliza uma fase solida de poliestireno à qual se encontram ligados os antígenos. Ao adicionar a amostra, os anticorpos específicos ligam-se ao antígeno, formando o complexo antígeno-anticorpo. Após lavagem, os anticorpos inespecíficos são removidos e posteriormente é adicionado um anticorpo anti-imunoglobulina humana marcado com a enzima  $\beta$ -galactosidase. Por fim, após a remoção de todas as anti-imunoglobulinas não ligadas ao complexo, é adicionado o substrato enzimático fluorogénico (4- metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosideo) que é convertido em umbeliferona, composto altamente fluorescente. A concentração do anticorpo no soro é proporcional à intensidade de fluorescência lida pelo fluorímetro <sup>11</sup>.

### **3.5.3. Radioimunoensaio - RIA**

Os radioimunoensaios (RIA) são metodologias mundialmente utilizadas nos laboratórios de análises clínicas. Esta preconiza que, as amostras em estudo sejam incubadas

com o antígeno alvo marcado com  $I^{125}$ . Caso a amostra contenha o anticorpo específico de antígeno marcado com o radioisótopo, dar-se-á a formação de um complexo, com a sua posterior precipitação pela adição de uma solução salina de sulfato de amônia <sup>12;13</sup>.

De modo a determinar a quantidade de anticorpos ligados aos antígenos marcados é utilizado um contador de radiação gama. A radiação gama emitida pelos radioisótopos ligados à amostra é detetada e convertida em corrente elétrica. Este sinal elétrico é amplificado e convertido em pulsos voltagem, cujas intensidades estão diretamente relacionadas com a energia de radiação e número de radioisótopos ligados à amostra <sup>14;15</sup>.

#### **3.5.4. Quimioluminescência - CLIA**

Atualmente os imunoenaios de quimioluminescência (CLIA) substituíram muitas das reações por RIA no laboratório de imunologia, uma vez que têm sensibilidade equiparável, e têm a vantagem da facilidade, segurança e menor custo <sup>2</sup>.

A quimioluminescência é o processo em que, de uma reação química resulta um produto que emite luz. Geralmente, as reações de quimioluminescência são de oxidação-redução, sendo com mais frequência de oxidação <sup>11</sup>. Esta metodologia é baseada no princípio do imunoenai indireto onde antígenos recombinantes que revestem uma fase sólida de micropartículas paramagnéticas são incubados com a amostra a ser analisada. Após a magnetização e sucessivas lavagens das microesferas, é adicionado à cubete um anticorpo IgG, anti-imunoglobulina humana conjugada com isoluminol. Caso se tenha formado previamente o complexo antígeno-anticorpo, o conjugado irá ligar-se ao complexo formado produzindo luminescência quando os reagentes “*Trigger*” são adicionados à cubete. Estes reagentes geralmente são constituídos por uma solução alcalina contendo um oxidante (peróxido de hidrogênio, por exemplo) e um catalisador enzimático ou metálico, de forma a promover a oxidação do derivado de isoluminol. Da reação resulta um intermediário excitado que, regressando ao estado fundamental emite luz azul a 425 nm. O sinal luminoso é diretamente proporcional à concentração de analito na amostra e o valor dado em Unidades Relativas de Luz (RLU- *Relative Light Units*) <sup>2;11;16</sup>.

#### **3.5.5. Immunoblotting**

Immunoblotting caracteriza-se por ser uma metodologia utilizada para o *screening* de anticorpos específicos presentes numa dada amostra contra diferentes antígenos, na qual tiras de nitrocelulose contêm antígenos recombinantes altamente purificados.

Em cada tira comercial podem estar presentes mais de dez antigénios diferentes e as amostras a analisar são incubadas com as membranas de nitrocelulose. Se a amostra contiver anticorpo específico para algum dos antigénios fixados, irá formar-se um imunocomplexo no local da tira exclusivo desse mesmo antigénio. Posteriormente, todos os anticorpos que não reagiram com os antigénios fixados são removidos através de sucessivas lavagens. Em seguida as membranas de nitrocelulose são incubadas com a anti-imunoglobulina humana ligada a uma enzima (fosfatase alcalina), que irá reconhecer o imunocomplexo formado previamente. Seguidamente procede-se à lavagem das tiras de modo a remover todo o conjugado não ligado ao imunocomplexo, adicionando-lhe em seguida, o substrato enzimático BCIP/NBT (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato p-toluidina sal/cloreto de tetrazólio-nitrozul). Onde estiver formado o imunocomplexo formar-se-á uma banda azul escura/cinzenta resultante da reação enzimática. A intensidade da cor da banda é proporcional à concentração de anticorpos presentes na amostra <sup>17</sup>.

### **3.6. Ferramentas auxiliares de diagnóstico**

Por norma, quando é colocada a hipótese de um indivíduo possuir uma doença autoimune e não tem histórico de estudo realizado nesse sentido, o SPC-CHUC efetua a pesquisa preliminar de Anticorpos Antinucleares e Citoplasmáticos (ANA) e de Anticorpos anti-Antigénios Nucleares Extraíveis (ENA), associados a outros parâmetros que o clínico, mediante a avaliação do indivíduo, considere relevantes.

Quando as suspeitas recaem sobre doenças autoimunes específicas de um órgão, os parâmetros bioquímicos e hematológicos, associados a outros exames complementares de diagnóstico, poderão orientar a pesquisa de autoanticorpos específicos, uma vez que os antigénios que lhes correspondem, apresentam propriedades fisiológicas e anatómicas características <sup>6</sup>. No Anexo I, encontram-se as orientações do SPC-CHUC na pesquisa de conjuntos de autoanticorpos específicos que caracterizam determinadas patologias.

#### **3.6.1. Anticorpos Antinucleares e Citoplasmáticos**

Quando se trata de DAIS, como os sinais clínicos não se manifestam num local definido contrariamente ao que se verifica com doenças autoimunes específicas de um órgão, a abordagem diagnóstica tem que ser diferente. Os Anticorpos Antinucleares e Citoplasmáticos (ANA) caracterizam-se por ser um grupo de autoanticorpos que se ligam a antigénios presentes no núcleo, aparelho mitótico e citoplasma das células. Conserva-se a sigla ANA uma vez que anteriormente apenas se analisavam os Anticorpos Anti-Nucleares <sup>17</sup>.

A presença de autoanticorpos específicos de antígenos intracelulares é característica de diversas doenças autoimunes sistêmicas e a sua análise é usualmente requerida, como parte integrante da primeira etapa do diagnóstico diferencial. Apesar da elevada frequência de ANA em sujeitos com DAI, sabe-se que também poderão ser identificados em indivíduos com doenças autoimunes órgão-específicas, bem como em algumas infecções, carcinomas, associados ao aumento da idade e até em indivíduos saudáveis <sup>18</sup>. Deste modo, é fundamental aliar os resultados obtidos à história clínica individual e familiar bem como a outros parâmetros analíticos relevantes, de modo a poder ter relevância clínica no âmbito das DAI.

Muitos destes autoanticorpos têm sido caracterizados como biomarcadores de previsão, podendo ser detetados antes das manifestações clínicas da doença, e/ou de prognóstico, isto é, na avaliação do curso e possível desfecho da patologia. Assim, ao detetar-se a presença de AAc, mesmo sabendo que se podem manifestar em indivíduos saudáveis que nunca desenvolverão nenhuma patologia associada, é fundamental informar o corpo clínico do achado de modo a alertar para a possibilidade de desenvolvimento de uma DAI <sup>19</sup>.

### **3.6.1.2. Como se deteta a presença de ANA?**

Foi estipulado pelo *American College of Rheumatology* que a metodologia *gold standard* para pesquisa de ANA é a IFI, uma vez que numa primeira abordagem, alguns imunoenaios (ELISA e EIA) e ensaios em *multiplex* estariam associados a uma elevada percentagem de falsos negativos. Por outro lado, preconizou-se que a linha celular *gold standard* na identificação destes autoanticorpos é a de células do carcinoma da laringe tipo 2 (HEp-2) privilegiadas pelo número elevado de células em todas as fases do ciclo celular, com morfologias celulares ideais, das quais se destaca a presença de muitos nucléolos e de núcleos de grandes dimensões. Apresentam também elevada proliferação celular e expressão de centenas de antígenos relevantes no domínio das DAI <sup>17;20</sup>. A deteção de ANA em células HEp-2 por IFI apresenta um largo espetro uma vez que é capaz de detetar entre 100-150 antígenos celulares em diferentes estadios do ciclo celular <sup>4;21</sup>.

A diluição standard utilizada no *screening* de ANA é, segundo as recomendações, 1:80 <sup>18</sup>. No entanto, sabe-se que títulos correspondente a diluições de 1:80 podem ser considerados como *borderline* uma vez que a maioria das amostras que apresentam estes valores não apresentam, nem de futuro manifestarão, evidências clínicas sugestivas de DAI <sup>2;22</sup>. Assim, preconizou-se que para *screening* de ANA, as amostras seriam diluídas numa razão de 1:160, excetuando-se soros de crianças com idade igual ou inferior a 5 anos de idade, cujo fator de diluição permanece de 1:80.

Na avaliação e detecção de ANA por IFI/HEp-2 é importante ter em conta três aspetos:

1. Presença/ausência de autoanticorpos na amostra
2. Título de anticorpo
3. Padrão de imunofluorescência <sup>17;20</sup>.

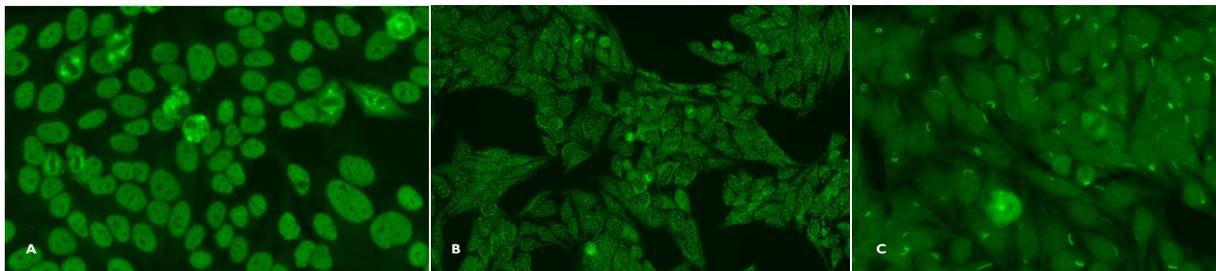
A detecção da presença de autoanticorpos na amostra é revelada pelo sinal de fluorescência verde emitido aquando da irradiação da lâmina com luz UV. Em amostras negativas verifica-se a presença de células não marcadas com fluoróforo, apresentando ausência ou fraco título de fluorescência, sem distinção evidente de estruturas celulares (entre núcleo e organelos citoplasmáticos), com padrões semelhantes ao controlo negativo. Em amostras positivas, para além da avaliação qualitativa revelada pela presença marcada de fluorescência, é importante avaliar o título do anticorpo e o padrão de imunofluorescência.

O título de anticorpo representa a apreciação semi-quantitativa da concentração de anticorpo no soro, avaliada pela intensidade de fluorescência observada. Sabendo que é possível detetar alguns autoanticorpos em indivíduos saudáveis, é importante ter em conta o título de anticorpos uma vez que nestes, é inferior, quando comparado com o de doentes com DAIS. Está definido que amostras com títulos inferiores a 1:160 são consideradas negativas. Por outro lado, são consideradas positivas as amostras cujo título seja igual ou superior a 160, podendo variar entre 320, 640, 1280 e superior a 1280, sendo que quanto maior o título, maior a intensidade de fluorescência e, por conseguinte, maior a concentração de autoanticorpo na amostra.

Por fim, o padrão de imunofluorescência é considerado o fator discriminatório uma vez que indica as características do(s) anticorpo(s) com forte probabilidade de constar(em) na amostra, pois revela a localização dos antígenos intracelulares com os quais complexa, sugerindo ainda o *follow-up* acompanhado de associações serológicas confirmatórias de forma a detalhar e comprovar suspeitas de um diagnóstico específico <sup>17;18;20</sup>. A Figura 2 apresenta alguns exemplos de padrões de fluorescência observados durante o estágio.

A elaboração de algoritmos de decisão baseados na análise dos padrões de fluorescência auxilia na escolha dos testes monoespecíficos confirmatórios de autoanticorpos a realizar através de imunoensaios (ELISA, immunoblotting e CLIA) com especificidade para autoantígenos intracelulares específicos <sup>23</sup>. Como verificado na Figura 2, a cada um dos diferentes padrões corresponde um código anti-cell (AC-X, em que X corresponde um

número). Estes códigos possibilitam um acesso rápido e fácil aos padrões de referência do *International Consensus on Antinuclear antibody Pattern* (ICAP), aliados a uma importante uniformização mundial da nomenclatura.



**Figura 2** – Exemplos de padrões de fluorescência obtidos por IFI/HEp-2. **A:** Fibras do fuso mitótico (AC-25); **B:** Centrômero (AC-3) e Citoplasmático Reticular/AMA tipo mitocondrial (AC-21); **C:** Citoplasmático Anéis e Bastonetes (AC-23). Fonte: SPC-CHUC

### 3.6.2. Antígenos Nucleares Extraíveis

A maioria dos antígenos descritos como fundamentais no diagnóstico de doenças autoimunes estão localizados no núcleo, entre os quais os Antígenos Nucleares Extraíveis (ENA) <sup>24</sup>. Os ENA são um grupo constituído por mais de 100 antígenos de ribonucleohistonas e proteínas nucleares não-histonas isoladas por extração salina <sup>25;26</sup>. Por conseguinte, os Anticorpos anti-antígenos Nucleares Extraíveis (anti-ENA) pertencem ao subgrupo de autoanticorpos ANA que não complexam com a cromatina e que se ligam a proteínas nucleares <sup>27</sup>. Assim, a presença de anti-ENA está intimamente relacionada com diferentes padrões de imunofluorescência de ANA associados a DAI. Alguns ENA apresentam elevada especificidade para determinada patologia (p. ex.: Scl-70 e esclerose sistémica) ou associados a fenótipos característicos de um grupo de doenças, enquanto que outros podem encontrar-se num espectro alargado de doenças <sup>26;27</sup>.

A nomenclatura dos ENA depende do primeiro grupo de autores que o descreveu e poderá estar relacionada com a função do antígeno (*RNP*: Ribonucleoproteína), com o nome do doente que forneceu a amostra de soro de referência (*Sm*: Smith, *La*: Lane, *Ro*: Robert, *Jo*: John) ou da patologia detetada no soro do doente dador (*SSA*: Síndrome de Sjögren A, *SSB*: Síndrome de Sjögren B, *Scl-70*: Escleroderma). A análise detalhada dos ENA é fundamental uma vez que contribui de forma determinante para a distinção entre os diferentes tipos de DAI reumáticas <sup>26</sup>. A deteção de ENA é de especial importância no diagnóstico de doenças caracterizadas por anticorpos específicos, sendo que os mais comuns associados a DAI estão enunciados na Tabela 8.

Na rotina laboratorial, a aplicação de metodologias como ELISA, CLIA, *microarrays* na identificação de anticorpos anti-ENA é cada vez mais frequente, uma vez que são ensaios

sensíveis, que permitem a detecção simultânea de diferentes AAC presentes em volumes reduzidos de amostra, tornando rentável a detecção automatizada de anticorpos.

Os anticorpos anti-ENA podem fornecer informações acerca da natureza dos antígenos pelo tipo de agrupamento (*cluster*) que formam entre si. A grande maioria dos doentes com títulos positivos para o anticorpo anti-Sm também apresentam anticorpos anti-RNP, sendo que o inverso nem sempre acontece, uma vez que este é o anticorpo característico da Doença Mista do Tecido Conjuntivo e o anti-Sm é altamente específico de indivíduos com LES. A associação entre SSA/Ro60, SSA/Ro52 e SSB/La também é frequente, principalmente em quadros patológicos típicos de Síndrome de Sjögren <sup>27</sup>.

**Tabela 8** – Caracterização dos ENA mais prevalentes e relevantes no diagnóstico de DAIS <sup>25;26;28</sup>.

| ANTICORPO          | CARACTERIZAÇÃO DO ANTIGÊNIO   | CARACTERÍSTICAS RELEVANTES DO AAC   | PATOLOGIAS            | PREVALÊNCIA               |
|--------------------|---|---|-----------------------|---------------------------|
| <b>Anti-Sm</b>     | Proteínas do core   | ▸ Associado ao desenvolvimento de nefrite e alterações no SNC, pulmões e miocárdio.   | LES                   | 15-25% (↑ especificidade) |
| <b>Anti-SSA/Ro</b> | Ribonucleoproteínas de 52-kD e 60-kD que contém ácidos nucleicos ricos em uridina | ▸ Dois subtipos diferentes:<br>1) <b>Ro52</b> (nuclear) – associado a Esclerose sistêmica e Miosites.<br>2) <b>Ro60</b> (citoplasmático).<br>▸ Pode não ser detectado por IFI-HEp2.<br>▸ Pode manifestar-se na ausência de anti-SSB/La. | LED                   | 5-20%                     |
|                    |   |   | LECS                  | 40-70%                    |
|                    |   |   | LES                   | 35-70%                    |
|                    |   |   | LEN                   | 80-90%                    |
|                    |   |   | SSj                   | 70-100%                   |
| <b>Anti-SSB/La</b> | Fosfoproteína (48 kD) associada com diversos tipos de sRNA                        | ▸ Menos comum que o anti-SSA/Ro.<br>▸ Raramente encontrado na ausência de anti-SSA/Ro.  | LED                   | 5-10%                     |
|                    |   |   | LECS                  | 40-60%                    |
|                    |   |   | LES                   | 45%                       |
|                    |   |   | SSj                   | 40-90%                    |
| <b>Anti-RNP</b>    | Ribonucleoproteínas   | ▸ Característico de DMTC.   | DMTC                  | 90-100%                   |
|                    |   |   | LES                   | 20-30%                    |
| <b>Anti-Jo-70</b>  | Histidil-tRNA sintetase   | ▸ Associado a respostas desfavoráveis à terapêutica.  | PM                    | 20-30%                    |
|                    |   |   | PM + fibrose pulmonar | 60-70%                    |
|                    |   |   | DM                    | 5-10%                     |
| <b>Anti-Scl-70</b> | DNA topoisomerase I   | ▸ Específico de ES.   | LES                   | 0-5%                      |
|                    |   |   | ES                    | 50-70%                    |
|                    |   |   | ES difusa             | 77%                       |

DM, Dermatomiosite; DMTC, Doença Mista do Tecido Conjuntivo; ES, Esclerose Sistêmica; LECS, Lupus Eritematoso Cutâneo Subagudo; LED, Lupus Eritematoso Discoide; LEN, Lupus Eritematoso Neonatal; LES, Lupus Eritematoso Sistêmico; kD, Quilodalton; PM, Polimiosite; sRNA, Ácido ribonucleico de baixo peso molecular; SSj, Síndrome de Sjögren.

### 3.7. Algoritmo de identificação

Em situações de forte suspeita de doença autoimune, é realizada a pesquisa de Anticorpos Antinucleares e Citoplasmáticos (ANA) e do conjunto dos sete Anticorpos anti-antígenos Nucleares Extraíveis (ENA) associados a patologias recorrentes, como ferramentas de orientação no diagnóstico. As Tabelas 9, 10 e 11 apresentam a correspondência dos diferentes padrões nucleares, citoplasmáticos e mitóticos, visualizados ao microscópio de

fluorescência, com a respetiva correspondência de AAg que os caracterizam, e cujas imagens características se encontram no Anexo 2. Em seguida é programada a pesquisa dos AAc específicos correspondentes ao padrão de fluorescência identificado pelo SPC-CHUC por diferentes metodologias.

Os padrões nucleares são caracterizados em núcleos de células HEP-2 em interfase fluorescentes, independentemente da positividade/negatividade das restantes células em mitose, e estão representados na Tabela 9. Os padrões citoplasmáticos apresentados na Tabela 10, são caracterizados a partir do conteúdo citoplasmático de células HEP-2 fluorescentes, independentemente da positividade/negatividade das restantes células em mitose. A nomenclatura está associada à reatividade (características da fluorescência) observadas no citoplasma, bem como à estrutura/organelo citoplasmático identificado.

Por fim, são classificadas de padrões mitóticos (Tabela 11), células HEP-2 fluorescentes com características muito particulares de eventos que decorrem durante a mitose. Tomemos como exemplo o padrão esperado observar em AC-24: os centrossomas são identificados como dois pontos fluorescentes localizados em polos opostos de uma célula usualmente em metáfase<sup>29</sup>.

**Tabela 9** – Algoritmo de detecção de antígenos específicos associados aos padrões de fluorescência nucleares e as patologias prevalentes <sup>29</sup>. Fonte: SPC-CHUC.

| PADRÃO DE FLUORESCÊNCIA             | ANTIGÊNIO                              | MÉTODO DE DETECÇÃO DO AUTOANTICORPO                    | PATOLOGIAS ASSOCIADAS  |
|-------------------------------------|--|--|--|
| Nuclear homogéneo (AC-1)            | dsDNA                                  | FEIA, IFI (substrato: <i>Crithidia luciliae</i> ), RIA | LES, Lupus induzido por fármacos, artrite idiopática juvenil |
|                                     | Histonas                               | ELISA  |  |
|                                     | Nucleossomas                           | Immunoblotting   |  |
| Mosqueado (AC-2, 4, 5)              |  |  |  |
| Nuclear mosqueado fino denso (AC-2) | DFS70                                  | CLIA e Immunoblotting                                  | Raro em LES, SSj, ES   |
| Nuclear mosqueado fino (AC-4)       | SS-A/Ro (Ro60), SS-B/La                | CLIA e Immunoblotting                                  | SSj, LES, DM, ES/PM em sobreposição                          |
|                                     | Mi-2, Ku                               | Immunoblotting   |  |
| Nuclear mosqueado grosseiro (AC-5)  | RNP, Sm                                | CLIA e Immunoblotting                                  | DMTC, LES, ES  |
| Nuclear granular (AC-29)            | DNA topoisomerase I (Scl-70)           | IFI e Immunoblotting                                   | ES (cutânea e outras formas mais agressivas da doença)       |
| Centrómero (AC-3)                   | Proteínas do centrómero (CENP-A/B (C)) | IFI / Immunoblotting                                   | ES (cutânea), CBP, Síndrome de CREST                         |
| Pontos nucleares (AC-6, 7)          |  |  |  |
| Múltiplos pontos nucleares (AC-6)   | Sp100                                  | Immunoblotting   | CBP, DAISR, PM/DM  |
| Raros pontos nucleares (AC-7)       | p80-coilina, SMN                       |  | SSj, LES, ES, PM, Indivíduos assintomáticos                  |
| Nucleolar (AC-8, 9, 10)             |  |  |  |
| Nucleolar homogéneo (AC-8)          | PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/To           | Immunoblotting   | ES, ES/PM em sobreposição                                    |
| Nucleolar aglomerado (AC-9)         | Fibrilarina                            |  | ES   |
| Nucleolar pontado (AC-10)           | RNA polimerase III, NOR-90             |  | ES, SSj  |
| Membrana nuclear (AC-11, 12)        |  |  |  |
| Membrana nuclear linear (AC-11)     | Proteínas da lamina                    | IFI  | LES, SSj, artrite seronegativa                               |
| Membrana nuclear pontada (AC-12)    | Proteínas do poro nuclear (gp210)      | Immunoblotting   | CBP  |
| Pleomórficos (AC-13, 14)            |  |  |  |
| Pleomórfico tipo PCNA (AC-13)       | PCNA                                   | IFI e Immunoblotting                                   | LES  |
| Pleomórfico tipo CENP-F (AC-14)     | CENP-F                                 | IFI  | Cancro   |

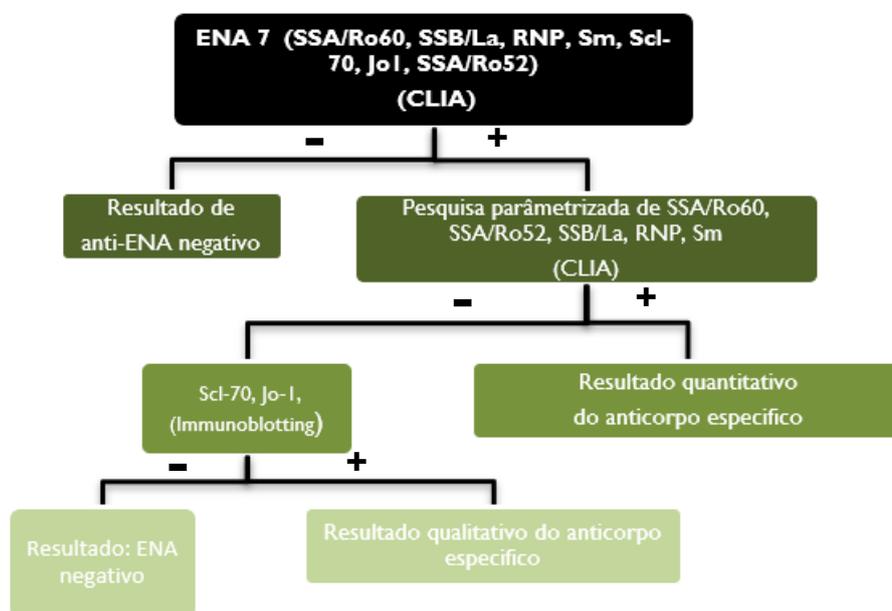
**Tabela 10** – Algoritmo de deteção de antígenos específicos associados aos padrões citoplasmáticos e correlação com as patologias prevalentes <sup>29</sup>. Fonte: SPC-CHUC.

| PADRÃO DE FLUORESCÊNCIA                                | ANTIGÉNIO   | MÉTODO DE DETEÇÃO DO AUTOANTICORPO | PATOLOGIAS ASSOCIADAS  |
|--|---|------------------------------------|--|
| <b>Filamentoso (AC-15, 16, 17)</b>                     |   |                                    |  |
| Citoplasmático filamentoso linear (AC-15)              | Actina  | IFI                                | DMTC, hepatite crónica, cirrose hepática, miastenia gravis, doença de Crohn, CBP, hemodiálise prolongada, rara noutras DAISR além das DMTC |
| Citoplasmático filamentoso fibrillar (AC-16)           | Vimentina   |                                    | Doenças infecciosas ou inflamatórias, hemodiálise prolongada, doença hepática alcoólica, DAISR, psoríase, controlos saudáveis              |
| Citoplasmático filamentoso segmentar (AC-17)           | Tropomiosina  |                                    | Miastenia gravis, doença de Crohn, colite ulcerosa   |
| <b>Mosqueado (AC-18, 19, 20)</b>                       |   |                                    |  |
| Citoplasmático granular (AC-18)                        | Proteínas lisossomais (GW182, Su/Ago2, Ge-1)  | Immunoblotting                     | CBP, DAISR, Doenças Neurológicas Autoimunes  |
| Citoplasmático granular fino denso (AC-19)             | Proteínas ribossomais (PL-7, PL-12, proteínas P ribossomais)  |                                    | PM/DM, LES, LES juvenil, LES neuropsiquiátrico   |
| Citoplasmático granular fino (AC-20)                   | Jo-1 (histidil-tRNA sintetase)  |                                    | Síndrome anti-sintetase, PM/DM, ES, Efusão pleural idiopática  |
| Citoplasmático Reticular/AMA tipo mitocondrial (AC-21) | Proteínas mitocondriais (PDC-E2/M2, BCOADC-E2, OGDC-E2, E1 $\alpha$ da PDC, E3BP/proteína X)              | IFI, ELISA, FEIA, Immunoblotting   | CBP, ES, raro noutras DAIS   |
| Citoplasmático polar tipo Golgi (AC-22)                | Proteínas do complexo de Golgi (Giantina/macrogolgin a, golgina 95, golgina-160, golgina-97, golgina-245) | IFI                                | Raro em SSj, LES, AR, DMTC, ataxia cerebelar idiopática, degeneração paraneoplásica cerebelar, infeções víricas.                           |
| Citoplasmático Anéis e Bastonetes (AC-23)              | IMPDH2 (nematina)   |                                    | Virus da Hepatite C pós terapeutica com ribavirina, LES, doença de Hashimoto.  |

**Tabela 11** – Algoritmo de detecção de antígenos específicos associados aos padrões mitóticos e correlação com as patologias prevalentes <sup>29</sup>. Fonte: SPC-CHUC.

| PADRÃO DE FLUORESCÊNCIA                 | ANTIGÊNIO                                      | MÉTODO DE DETECÇÃO DO AUTOANTICORPO | PATOLOGIAS ASSOCIADAS  |
|---|--|-------------------------------------|--|
| Centrossoma (AC-24)                     | Pericentrina, nineína, Cep250, Cep110, enolase | IFI                                 | Raro em ES, Fenómeno de Raynaud, infecções (viricas e <i>Mycoplasma</i> )                      |
| Fibras do fuso mitótico (AC-25)         | HsEg5  |                                     | Raro em SSj, LES e outras DAIS   |
| NuMA-like (AC-26)                       | Centrofilina                                   |                                     | SSj, LES e outras DAIS   |
| Ponte intercelular tipo midbody (AC-27) | Aurora cinase B, CENP-E, MSA-2, KIF-14, MKLP-1 |                                     | Raro em ES, Fenómeno de Raynaud e carcinomas.  |
| Evelope cromossômico (AC-28)            | Histona H3 modificada, MCA-1                   |                                     | Raro em lupus eritematoso discoide, leucemia linfocítica crônica, SSj e polimialgia reumática. |

Quando a detecção de ANA é positiva, a pesquisa de ENA, esquematizada na Figura 3, segue como forma de confirmação do diagnóstico, sendo que o perfil de ENA é crucial na avaliação das proteínas dentro do núcleo reconhecidas pelas técnicas de IFI <sup>30</sup>.



**Figura 3** – Algoritmo de identificação de Antígenos Nucleares Extraíveis no SPC-CHUC (-, negativo; +, positivo)

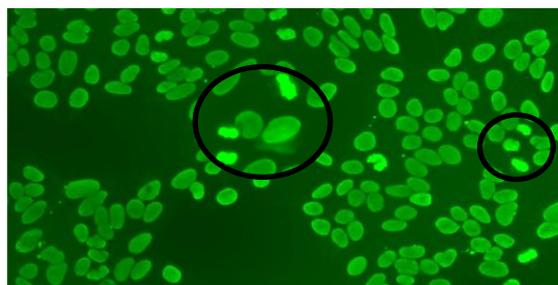
### 3.8. Caso Clínico I

Uma jovem de 24 anos com histórico de poliartralgias (sem qualquer especificidade na história clínica) apresentava sintomatologia febril, e na sequência de uma consulta médica na especialidade de Reumatologia em agosto de 2018, é solicitada a pesquisa de Anticorpos Antinucleares e Citoplasmáticos (ANA).

Sabendo que a doente nunca tinha sido estudada neste contexto, a par do pedido de pesquisa de ANA feito pelo clínico, é efetuada a determinação de anticorpos anti-ENA, obtendo-se os seguintes resultados:

**Tabela 12** – Resultado obtido para a pesquisa de ENA.

| Parâmetros  | Resultado |
|---|-----------|
| <b>ENA-7</b> (SSA/Ro60, SSB/La, RNP, Sm, Scl-70, Jo1, SSA/Ro52) | Negativo  |



**Figura 4** – Padrão de fluorescência obtido por IFI/HEp-2. Realce para a intensidade de fluorescência das células em mitose. Fonte: SPC-CHUC (agosto de 2018).

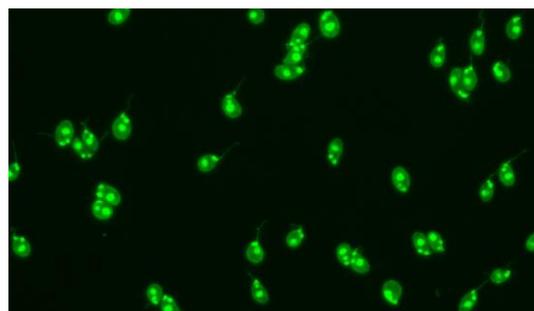
Da análise feita e mediante o padrão obtido pela Figura 4, pode concluir-se que existem autoanticorpos presentes na amostra da doente, manifestados pela presença de fluorescência. Pode referir-se ainda que, os AAC presentes na amostra não fazem parte do conjunto ENA-7 que se revelou negativo (Tabela 12). Para além da deteção de autoanticorpo é importante proceder à sua quantificação revelada pelo título de anticorpo, que se mostrou ser na ordem de 1280.

Por fim, no que diz respeito ao padrão de imunofluorescência, pode verificar-se que as células em interfase apresentam fluorescência homogênea e regular por todo nucleoplasma e que as células em mitose: apresentam cromatina intensamente corada de modo hialino homogêneo, características correspondentes ao padrão de fluorescência AC-I, nuclear homogêneo.

Mediante o algoritmo de identificação de anticorpos antinucleares apresentado na Tabela 9, foi efetuada a pesquisa de anti-dsDNA, anti-histonas e anti-nucleossomas e cujos resultados são apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13** – Resultados obtidos para a pesquisa de anti-dsDNA, anti-histonas e anti-nucleossomas.

| Parâmetro         | Resultado   | Interpretação            |
|-------------------|-------------|--------------------------|
| Anti-dsDNA (FEIA) | 23 IU/mL    | Negativo: <10 IU/mL      |
|                   |             | 10 < Duvidoso < 15 IU/mL |
|                   |             | Positivo: >15 IU/mL      |
| Anti-Histonas     |             | Negativo                 |
| Anti-Nucleossomas |             | Positivo Forte           |
| Anti- dsDNA (RIA) | 61,97 IU/mL | Positivo: >7,0 IU/mL     |



**Figura 5** – Imunofluorescência de anticorpo anti-dsDNA detectado por IFI em substrato de *Crithidia luciliae*. Fonte: SPC-CHUC, agosto de 2018.

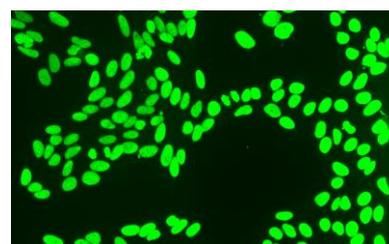
Obtido o resultado de anti-dsDNA pelo método de FEIA, procedeu-se à sua pesquisa recorrendo às metodologias de RIA e IFI, sendo que nesta última, utilizado como substrato o protozoário *Crithidia luciliae* e cujo o resultado está representado na Figura 5. A análise da Figura 5 revela uma intensidade de fluorescência elevada do cinetoplasto do protozoário, com a indicação de título “Positivo Forte (++++)” indicando assim uma positividade marcada para a presença do anticorpo anti-dsDNA na amostra.

Pode observar-se que a pesquisa do autoanticorpo anti-dsDNA se mostrou positiva em todas as metodologias utilizadas para a sua detecção e quantificação. Mediante a análise destes resultados, em conjugação com evidências clínicas manifestadas pela doente (às quais não nos foi possível ter acesso), o corpo clínico chegou a um diagnóstico final.

Informação de diagnóstico clínico: Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

**Tabela 14** – Resultados obtidos da determinação de anti-dsDNA (RIA)

| Data       | Resultado   | Interpretação        |
|------------|-------------|----------------------|
| 02/08/2018 | 61,97 IU/mL | Positivo: >7,0 IU/mL |
| 17/09/2018 | 6,60 IU/mL  |                      |
| 26/10/2018 | 7,76 IU/mL  |                      |
| 04/09/2020 | 5,26 IU/mL  |                      |



**Figura 6** – Padrão de fluorescência obtido por IFI/HEp-2. Fonte: SPC-CHUC, setembro 2020.

A doente continuou a ser seguida em consultas de Reumatologia no CHUC com avaliação periódica dos anticorpos anti-dsDNA durante 3 meses. Passados cerca de 2 anos após o último *follow-up* da doente no setor da Autoimunidade, em setembro de 2020 foram novamente solicitadas, a pesquisa de ANA e determinação de anti-dsDNA. (Figura 6 e Tabela 14).

Verifica-se que os níveis de anti-dsDNA diminuíram de 7,76 IU/mL para 5,26 IU/mL, (possivelmente devido a terapêutica instituída) contrariamente ao observado no padrão de fluorescência apresentado na Figura 5, que apesar de se manter AC-I, em comparação com a Figura 4, pode constatar-se que o título é superior ao manifestado em 2018, sendo superior a 1280. Para compreender os resultados obtidos e o diagnóstico apresentado, é feita uma elucidação geral sobre a patologia associada ao esclarecimento dos diversos parâmetros imunológicos determinados, realçando a sua relevância clínica.

### 3.8.1. Lupus Eritematoso Sistémico – Caracterização patológica

O Lupus Eritematoso Sistémico (LES) é das doenças autoimunes sistémicas com maior incidência na população. Com amplo espectro de sinais e sintomas, alguns deles apresentados na Tabela 15, os doentes afetados por esta patologia poderão experimentar desde dores ligeiras nas articulações e lesões em algumas regiões da pele até ao envolvimento potencialmente fatal de múltiplos órgãos vitais<sup>27</sup>. Afeta maioritariamente jovens entre os 20 e os 40 anos de idade, em que a probabilidade de uma mulher contrair a doença é 9 a 15 vezes superior à de um homem<sup>6</sup>.

**Tabela 15** – Critérios de classificação de Luspus Eritematoso Sistémico<sup>27</sup>.

| CRITÉRIOS *              | DEFINIÇÃO  |
|--------------------------|--|
| ERITEMA MALAR            | Eritema nas eminências malares.  |
| ERITEMA DISCOIDE         | Manchas eritematosas com escama queratótica; cicatriz atrófica pode ocorrer em lesões mais antigas   |
| FOTOSSENSIBILIDADE       | Eritema na pele devido a reação atípica aos raios solares.   |
| ÚLCERAS ORAIS            | Ulceração oral ou nasofaríngea, usualmente indolor.  |
| ARTRITE                  | Artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por sensibilidade, edema ou efusão.  |
| SEROSITE                 | Pleurite: 1) história de dor torácica pleurítica ou 2) atrito ouvido por um clínico ou 3) evidência de efusão pleural ou Pericardite: 1) revelada por eletrocardiograma ou 2) evidência de efusão pericárdica.   |
| DOENÇA RENAL             | Proteinúria persistente ou >0,5 g/dia ou >3+ se a determinação não for realizada ou Cilindros de eritrócitos, de hemoglobina, hialino-granulosos ou mistos.  |
| DOENÇA NEUROLÓGICA       | a) Convulsões: na ausência de fármacos ou distúrbios metabólicos conhecidos ou b) Psicose: na ausência de drogas ou distúrbios metabólicos conhecidos.   |
| DOENÇA HEMATOLÓGICA      | a) Anemia hemolítica com reticulócitos ou b) Leucopenia <4000/mm <sup>3</sup> ou c) Linfopenia <1500/mm <sup>3</sup> ou d) Trombocitopenia <100 000/mm <sup>3</sup> na ausência de fármacos.   |
| DOENÇA IMUNOLÓGICA       | a) <b>Anticorpo Anti-dsDNA</b> : Títulos elevados de anticorpo contra o DNA ou b) <b>Anticorpo Anti-Sm</b> : Presença de anticorpo contra o antigénio Sm nuclear ou c) Presença de anticorpos antifosfolípidicos: 1) elevadas concentrações de anticorpos anti-cardiolipina IgG ou IgM, 2) Pesquisa positiva de anticoagulante lúpico, 3) Falso positivo na pesquisa serológica de <i>Treponema pallidum</i> . |
| PESQUISA DE ANA POSITIVA | <b>Títulos elevados de anticorpos antinucleares e citoplasmáticos</b> detetados por imunofluorescência ou por metodologia equivalente, na ausência de fármacos associados a síndromas lúpicos induzidos por fármacos.  |

\*A presença de quatro ou mais critérios é requerida para a classificação e diagnóstico de LES.

Quando há uma forte suspeita de que o doente apresenta um quadro clínico de LES, o *screening* de ANA é a melhor abordagem preliminar<sup>31</sup>. A maioria dos padrões de fluorescência intimamente ligados à doença são os nucleares e alguns citoplasmáticos e mitóticos, revelados nas tabelas 3, 4 e 5, sendo que o AC-I é o padrão mais característico desta patologia. Deste modo, a detecção dos AAc específicos associados aos padrões de fluorescência auxilia no diagnóstico clínico de LES<sup>27</sup>.

### 3.8.2. Anti-dsDNA

Os anticorpos que se ligam ao DNA (anti-DNA) são um subgrupo de ANA, e podem-se apresentar como anti-ssDNA, autoanticorpos com maior afinidade na formação de imunocomplexos com DNA de cadeia simples (ssDNA) ou com anti-dsDNA, autoanticorpos que complexam com cadeia dupla de DNA (dsDNA)<sup>4</sup>. Os Anticorpos anti-DNA foram os primeiros autoanticorpos registados em doentes com LES, em 1957. Estudos realizados nos últimos 50 anos, desde a descoberta destes anticorpos em doentes lúpicos, comprovaram a sua relevância na compreensão da fisiopatologia da doença<sup>27</sup>.

Os principais epítomos do dsDNA são constituídos por porções da cadeia de ribose-fosfato do DNA e a formação de complexos com anti-dsDNA pode dar-se em circulação ou *in situ*. Por norma, no local da deposição do imunocomplexo verifica-se a ativação do complemento levando a uma resposta inflamatória associada a sinais de lesão tecidual típicos da doença<sup>6</sup>.

Sabe-se que cerca de 60-83% dos doentes com LES apresentam anti-dsDNA e que 99% dos doentes com LES apresentarão o referido autoanticorpo nalgum estadió da patologia. Por outro lado, é raro encontrar-se anti-dsDNA em doentes com outras DAI ou em indivíduos saudáveis<sup>6,27</sup>. Em alguns casos, a análise dos ANA e a identificação sérica de anti-dsDNA apresentam sinais de positividade vários anos antes da manifestação clínica da doença<sup>27,31</sup>. Assim, pode dizer-se que o anticorpo anti-dsDNA é um marcador fundamental no diagnóstico de doentes com LES, tendo sido incluído pelo *American College of Rheumatology* como critério de classificação da doença<sup>4</sup>.

Em termos práticos é solicitada a pesquisa de anticorpos anti-dsDNA sempre que, da análise dos ANA se verificar padrão de fluorescência do tipo AC-I (vulgarmente denominado de homogéneo) ou quando da observação se confirmar a presença de títulos positivos de células em mitose.

Na identificação e quantificação de anti-dsDNA são comumente utilizadas três metodologias distintas, ELISA, CLIFT (Imunofluorescência indireta em *Crithidia lucilae*) e RIA (ensaio Farr). Das três metodologias mencionadas, a que apresenta maior especificidade e que, com maior segurança, prevê potenciais exacerbações da doença, especialmente glomerulonefrite, são os radioimunoensaios. Estes medem a quantidade de imunocomplexo anti-dsDNA marcado com I<sup>125</sup> que precipita mediante elevadas concentrações salinas, garantindo que os anticorpos com elevada afinidade são detetados.

Por outro lado, a metodologia CLIFT utiliza IFI como meio de detecção anti-dsDNA pela sua capacidade de ligação ao cinetoplasto da *Crithidia lucilae*, protozoário com genoma dsDNA circular. A uma lâmina com *C. lucilae* fixado é adicionada a amostra de soro em análise, à qual posteriormente se adiciona antiglobulina humana marcada com FITC. A detecção de anti-dsDNA é observada ao microscópio de fluorescência e, em casos de positividade, é observado o padrão de fluorescência do cinetoplasto do protozoário. A maior vantagem deste método reside na especificidade, uma vez que deteta exclusivamente anti-dsDNA pois não possui ssDNA nem tão pouco outros antígenos nucleolares<sup>27;32</sup>, no entanto apenas oferece uma avaliação semi-quantitativa, não sendo a metodologia ideal para avaliar a progressão da doença<sup>32</sup>.

Por fim metodologias ELISA são relativamente simples de executar, no entanto são menos seletivas quando comparadas a RIA e CLIFT, uma vez que detetam não só IgG de elevada afinidade, mas também de baixa afinidade. Os diferentes kits de ELISA disponíveis no mercado apresentam diferenças na sensibilidade e especificidade no diagnóstico de LES. Assim, as recomendações internacionais na análise de ANA preconizam a determinação de IgG anti-dsDNA de elevada especificidade na detecção da doença, usando as metodologias de RIA e CLIFT<sup>27</sup>.

No setor da Autoimunidade do Serviço de Patologia Clínica do CHUC está definido que a determinação de anticorpos anti-dsDNA, aquando da suspeita de LES, é feita recorrendo ao método FEIA. Caso a amostra revele valores *borderline*, ou seja, positivo, é repetida a determinação, na mesma amostra, por RIA e CLIFT.

O acompanhamento de doentes com esta patologia é sempre feito recorrendo a esta última metodologia, sendo o CHUC o único hospital em Portugal a utilizar RIA como metodologia na determinação de anti-dsDNA. A metodologia CLIFT é utilizada, geralmente, quando o padrão de fluorescência observado por IFI/HEp2 corresponde a AC-I com elevado título de fluorescência e acompanhado de células em mitose, também estas com elevada

intensidade de fluorescência. Por norma, amostras de doentes com LES submetidos a tratamento farmacológico deixam progressivamente de apresentar pesquisa positiva por CLIFT, não sendo por isso, uma metodologia fiável no *follow-up* da patologia. É usual, associado à pesquisa de anti-dsDNA, se verificar a requisição da determinação de anticorpos anti-histonas, de modo a perceber se o quadro sugestivo de LES poderá dever-se ao efeito de fármacos.

A análise de anti-dsDNA é fundamental não só como parâmetro complementar ao diagnóstico de LES mas também como componente imprescindível no prognóstico da patologia. Assim, o *follow-up* do doente faz-se acompanhar de avaliações das variações, tanto dos níveis, como da avidéz dos anticorpos anti-dsDNA <sup>6</sup>.

A análise periódica (a cada 4-6 semanas) de amostras de doentes com LES pode informar acerca da atividade da doença <sup>6</sup>. O conceito de “atividade da doença” está relacionado com a exacerbação da patologia. Por norma, o aumento dos níveis de anti-dsDNA precede a manifestação clínica da exacerbação, mantendo títulos elevados durante o período de elevada atividade da doença <sup>6;27</sup>. Sabe-se que os anticorpos anti-dsDNA para além de complexarem com o dsDNA, podem estar envolvidos em reações cruzadas com outros antígenos não específicos, como o sulfato de heparano, lamina, colagénio do tipo IV e actina, cuja localização típica é em células renais. Pensa-se que estas reações induzem a lesão do tecido renal, manifestando-se comumente como nefrite lúpica, patologia refrataria responsável por cerca de 75% das mortes por LES <sup>4;27;33</sup>. A atividade da doença pode ser avaliada de acordo com o índice SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) que atualmente preconiza que o título de anti-dsDNA é um elemento parametrizado na escala de atividade da doença <sup>27</sup>.

A realização de ensaios clínicos, que visem a diminuição da produção de anticorpos anti-dsDNA, com terapias anti-linfócitos B têm ganho algum destaque ao longo dos últimos anos. O rituximab (RTX) é um anticorpo monoclonal quimérico, utilizado no tratamento de linfomas e de outras patologias autoimunes, como a artrite reumatoide, que se liga ao antígeno alvo dos linfócitos B CD20, induzindo a morte celular das células B. O RTX demonstrou ter resultados promissores no tratamento de doentes com nefrite lúpica associada a LES, melhorando na função cognitiva, psicose e convulsões associadas a diminuição dos títulos de anti-dsDNA, refletidos na diminuição do score de SLEDAI <sup>27;33</sup>.

### **3.8.3. Anti-Histonas, Anti-Nucleossomas e Anti-Sm**

Tal como verificado na identificação de anti-dsDNA, os anticorpos anti-histonas são comumente identificados em padrões de fluorescência AC-I (nuclear homogêneo) por IFI/HEp2 principalmente nas células em mitose, revelados pela elevada intensidade de imunofluorescência <sup>6</sup>. Os anticorpos anti-histonas são definidos como o grupo de AAC que reagem com histonas, detetados usualmente recorrendo a técnicas de ELISA. Sabe-se que cerca de 50-80% dos doentes com LES manifestam IgG e IgM anti-histonas detetados por immunoblotting ou ELISA <sup>34</sup>, sendo uma característica particularmente importante em doentes com lupus induzido por fármacos (p. ex.: hidralazina e procainamida). Geralmente estes doentes manifestam sintomas ligeiros típicos da patologia, que desaparecem com a suspensão da terapêutica <sup>27</sup>.

No que diz respeito aos AAC anti-nucleossomas sabe-se que têm um valor diagnóstico fundamental em doentes que manifestam diversos sinais de LES e que, no entanto, apresentam autoanticorpos anti-dsDNA negativos. A reatividade dos AAC anti-nucleossomas nestes doentes é, em média, entre 44 e 100% <sup>6</sup>. Por outro lado, os anticorpos ENA anti-Sm são de especial importância no diagnóstico clínico da doença, uma vez que, tal como se verifica com o anticorpo anti-dsDNA, estão associados à gravidade e presença de doença renal, especialmente em descendentes de Afro-Americanos <sup>35</sup>.

## **4. HEMATOLOGIA**

A Hematologia é a ciência que se dedica ao estudo do sangue: o plasma e as células sanguíneas, isto é, os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas. A determinação do número das diferentes populações de células e a avaliação da sua morfologia, são alguns dos parâmetros relevantes na previsão e diagnóstico de doenças hematológicas ou patologias que afetam as células sanguíneas <sup>36</sup>, explorados durante o período de estágio.

### **4.1. Hemograma**

O sangue periférico de indivíduos saudáveis é constituído por células totalmente diferenciadas que são laboratorialmente contadas em hemocítometros automatizados. O hemograma é uma análise de rotina constituída pelo eritrograma, hematócrito, determinação da concentração de hemoglobina plasmática, leucograma e plaquetograma. cujo objetivo é identificar, qualitativa e quantitativamente, as diversas populações de estruturas que circulam no sangue periférico. Para tal são utilizadas amostras de sangue total colhidas em tubos com

anticoagulante, EDTA K<sub>3</sub>, composto que permite manter a integridade das células, impedindo a formação do coágulo sanguíneo <sup>36</sup>.

#### 4.1.1. Leucograma

O leucograma é um exame integrado no hemograma que se dedica à contagem diferencial de leucócitos. Estes constituem uma população de células hematológicas destinadas à proteção do hospedeiro de infeções e dano celular <sup>36</sup>. Assim, valores anormais de leucócitos no sangue periférico podem estar relacionados com eventos patológicos, como infeções, respostas imunológicas, carcinomas ou em sequência de imunossupressão causada por fármacos, mas também associados a fatores fisiológicos, dos quais intensa atividade física e gravidez. As distintas etiologias estão intimamente relacionadas com as populações de leucócitos envolvidas, sendo que a alteração abrupta do número total de leucócitos está comumente associada à variação de um tipo de leucócitos. Por esta razão é importante associar à contagem total a contagem diferencial de leucócitos, também apelidada de fórmula leucocitária, de modo a distinguir de entre a população total, quais são neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos <sup>3</sup>.

**Tabela 16** – Parâmetros avaliados no leucograma, significado e respetiva relevância clínica <sup>3;36;37;38</sup>.

| PARÂMETRO                          |             | CONCEITO ASSOCIADO  | RELEVÂNCIA CLÍNICA   |
|------------------------------------|-------------|---|--|
| Leucócitos                         |             | ▸ Número total de leucócitos por microlitro de sangue.  | Identificar condições associadas a leucocitose (↑ leucócitos) ou leucopenia (↓leucócitos).   |
| Contagem diferencial de leucócitos | Neutrófilos | ▸Contagem do número absoluto de neutrófilos e percentagem relativa do número total de leucócitos. | Fagocitose, Degradação tecidual<br><br>↑ terapia com fatores de crescimento, infeções, doenças mieloproliferativas, stress.                        |
|                                    | Monócitos   | ▸Contagem do número absoluto de monócitos e percentagem relativa do número total de leucócitos.   | Fagocitose e resposta imune adaptativa<br><br>↑ em doenças mieloproliferativas e infeções severas.   |
|                                    | Linfócitos  | ▸Contagem do número absoluto de linfócitos e percentagem relativa do número total de leucócitos.  | Resposta imunitária adaptativa<br><br>↑ na mononucleose infecciosa, infeções virais, leucemias linfocíticas, doenças imunes.                       |
|                                    | Eosinófilos | ▸Contagem do número absoluto de eosinófilos e percentagem relativa do número total de leucócitos. | Reações de hipersensibilidade<br><br>↑ em infeções por protozoários, reações alérgicas, leucemia mieloide crónica, dermatite, linfoma de Hodgkin.  |
|                                    | Basófilos   | ▸Contagem do número absoluto de basófilos e percentagem relativa do número total de leucócitos.   | Reações de hipersensibilidade<br><br>↑ em leucemia basofílica aguda, doenças mieloproliferativas, reações alérgicas, hipotireoidismo e inflamação. |

↑, aumento; ↓, diminuição do número

#### 4.1.2. Eritrograma

O eritrograma, à semelhança do leucograma, é caracterizado pela contagem do número de eritrócitos, células totalmente diferenciadas e as mais abundantes do sangue periférico. No decorrer dos processos maturativos da linha celular hematopoiética eritroide, ocorre a extrusão nuclear e perda de organelos celulares<sup>39</sup>.

Associado à contagem numérica dos eritrócitos está patente no eritrograma a avaliação do seu tamanho, bem como do seu conteúdo em hemoglobina, proteína constituída por quatro grupos heme ligados a quatro cadeias globínicas, capazes de transportar quatro moléculas de oxigénio. A hemoglobina é, portanto, essencial ao cumprimento da principal função do eritrócito: transporte de oxigénio dos pulmões para os tecidos periféricos, acompanhado do transporte reverso de dióxido de carbono para ser eliminado pelo sistema respiratório<sup>39;40</sup>. A Tabela 16 apresenta os parâmetros avaliados no eritrograma.

**Tabela 17** – Parâmetros avaliados no eritrograma, significado e respetiva relevância clínica<sup>37;40;41</sup>.

| PARÂMETRO              |  | CONCEITOS ASSOCIADOS  | RELEVÂNCIA CLÍNICA  |
|------------------------|--|---|---|
| Eritrócitos            |  | › Número total de eritrócitos por microlitro de sangue.                       | Identificar condições patológicas associadas à poliglobulia ou diminuição do número de eritrócitos.   |
| Hemoglobina            |  | › Concentração de hemoglobina, em g/dL.                                       | Identificar a presença de anemia.   |
| Hematócrito            |  | › Volume ocupado pelos eritrócitos no volume de sangue total, em percentagem. |   |
| Índices eritrocitários | Volume Corpuscular Médio (VCM)                       | › Volume médio dos eritrócitos, em fentolitros (fL).                          | Classificação das anemias:<br>› Microcítica (↓VCM) e Hipócromica (↓ HCM e CHCM) – Anemias ferropénicas, talassémias, anemias inflamatórias crónicas, anemia sideroblástica (alguns casos).<br>› Macrocítica (↑VCM) – Anemias megaloblásticas (défice de vitamina B <sub>12</sub> ou folato), hepatopatia, mielodisplasia, anemia aplásica.<br>› Normocítica (≅ VCM) e Normocrómica (≅ HCM e CHCM): Muitas das anemias hemolíticas, anemias hemorrágicas, anemia das doenças crónicas, doença renal, deficiências mistas, falha na medula óssea (pós quimioterapia, infiltração neoplásica, entre outros). |
|                        | Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)                  | › Concentração de hemoglobina, em picogramas (pg).                            |   |
|                        | Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) | › Concentração média de hemoglobina em cada eritrócito, expresso em g/dL.     |   |
|                        | Coeficiente de variação de eritrócitos (RDW)         | › Distribuição do tamanho dos eritrócitos, em fentolitros (fL).               |   |

↑, aumento do número; ↓, diminuição do número; ≅, resultado dentro dos valores de referência.

Apesar de não incluídos na análise de rotina, a contagem de Reticulócitos (RET), Eritroblastos (NRBC) e Eritroblastos/100 leucócitos poderão ser parâmetros relevantes em alguns quadros clínicos. Os reticulócitos são células precursoras dos eritrócitos, possuindo RNA, mitocôndrias e ribossomas e são fortes indicadores de síntese eritrocitária, avaliando a capacidade de resposta da medula óssea perante anemia. São consideradas anemias hiperproliferativas quando o número de reticulócitos aumenta (p. ex.: anemias hemolíticas) e anemias hipoproliferativas, quando a contagem de reticulócitos diminui (p.ex.: supressão da eritropoietina, deficiência de ferro, vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico). A contagem de eritroblastos e a sua presença no sangue periférico poderá indicar patologia ao nível da medula óssea <sup>37</sup>.

É importante realçar que os índices eritrocitários e os reticulócitos são de extrema relevância clínica pois auxiliam na diferenciação das causas de anemia e orientam os pedidos de exames complementares para o estudo do distúrbio <sup>36</sup>.

#### 4.1.3. Plaquetograma

As plaquetas são constituintes do sangue cuja principal função é a de manter a integridade do compartimento vascular aquando da lesão, aderindo à superfície de vasos sanguíneos danificados, formando agregados plaquetares e estimulando mecanismos relacionados com a formação do coágulo <sup>36</sup>. As plaquetas, não são consideradas células uma vez que são constituídas por fragmentos citoplasmáticos resultantes da desintegração dos megacariócitos, libertados na corrente sanguínea <sup>37</sup>. A Tabela 17 apresenta os principais parâmetros avaliados no plaquetograma.

**Tabela 18** – Parâmetros avaliados no plaquetograma, associados à respetiva relevância clínica <sup>42;43;44</sup>.

| PARÂMETRO                             | CONCEITO   | RELEVÂNCIA CLÍNICA  |
|---------------------------------------|--|---|
| Plaquetas                             | ▸ Número total de plaquetas por microlitro de sangue.  | Identificar condições patológicas associadas à trombocitose (↑ plaquetas), trombocitopenia (↓ plaquetas). |
| Volume Plaquetar Médio                | ▸ Volume médio ocupado por cada plaqueta, em fentolitros (fL)<br><br>▸ Plaquetas mais imaturas: geralmente mais volumosas são hemostaticamente mais ativas e funcionais do que as menos volumosas. | Marcador da atividade funcional e da ativação plaquetares.  |
| Plaquetócrito                         | ▸ Volume ocupado pelas plaquetas no volume de sangue total, em percentagem.<br><br>▸ Relaciona os dois parâmetros acima mencionados.   |   |
| Coefficiente de Variação de Plaquetas | ▸ Índice de variação do tamanho das plaquetas, em fentolitros (fL).  | Índice de anisocitose plaquetária.  |

↑, aumento; ↓, diminuição do número

## **4.2. Metodologias associadas à contagem das células do sangue**

Apesar do elevado número de hemocitómetros fabricados por diferentes marcas e com distintos graus de sofisticação e complexidade, a maioria assenta em duas metodologias no que diz respeito à contagem e avaliação do tamanho celular: a impedância elétrica e dispersão ótica. A contagem de eritrócitos e plaquetas é realizada segundo o método de impedância elétrica e a contagem de leucócitos através da metodologia de dispersão ótica.

### **4.2.1. Impedância Elétrica com Focagem Hidrodinâmica**

O princípio da impedância elétrica, inicialmente desenvolvido por Coulter em 1950, baseia-se na medição da alteração da corrente elétrica provocada pela passagem de células por uma abertura sinalizada com dois eléctrodos. As células suspensas numa solução condutora da corrente elétrica, atravessam uma abertura, passando para uma câmara de contagem onde estão posicionados dois eléctrodos, entre os quais é aplicada corrente elétrica de baixa frequência. A impedância elétrica ocorre, quando as células atravessam a abertura e alteram a passagem de corrente entre os eléctrodos, originando pulsos elétricos. O número de pulsos está intimamente relacionado com o número de células contadas e a amplitude do pulso com o volume da célula.

A focagem hidrodinâmica evita erros relacionados com baixas contagens de células e elevadas amplitudes dos pulsos, associados à passagem de várias células em simultâneo, utilizando um fluido que reveste a amostra, que permite a separação e orientação das células na sua passagem pelo eixo central da abertura <sup>36</sup>.

O detetor do hemocitómetro da *Sysmex XN* está programado para identificar como plaquetas, estruturas que meçam entre 2 e 30 fL, e eritrócitos, estruturas cujo diâmetro varie entre 40 e 250 fL. Uma vez que não tem em conta o conteúdo, plaquetas gigantes poderão ser contadas como eritrócitos, assim como micrócitos poderão ser falsamente contados como plaquetas <sup>45</sup>.

### **4.2.2. Dispersão Ótica**

A metodologia associada à dispersão ótica requer a utilização de um laser que, seleccionado um comprimento de onda, origina um feixe de radiação monocromático. Quando a célula atravessa a zona de deteção e interrompe a passagem de radiação, verifica-se a dispersão da luz, que é detetada e convertida em sinal elétrico por fotodetetores. A identificação da radiação ao nível do detetor frontal (*forward scatter*) relaciona-se com a

difração da luz e com o volume da célula, sendo que ao nível do detetor lateral (*side scatter*), a refração e reflexão da radiação indicam o grau da complexidade e granularidade celulares <sup>36</sup>.

As contagens, diferencial e total de leucócitos são realizadas segundo esta metodologia, associada à detecção de ligação de marcadores fluorescentes. A luz emitida pelo laser permite excitar os diversos fluorocromos ligados permitindo a detecção dos diferentes antígenos celulares de interesse <sup>3</sup>. O hemocítmetro possui na sua constituição diferentes canais especializados na contagem de populações específicas dos elementos figurados do sangue. No canal WDF (*White cell differential channel*), um agente lítico é adicionado à amostra, de modo a provocar a lise dos eritrócitos e a permeabilizar a membrana plasmática dos leucócitos permitindo que o fluoróforo se ligue ao DNA e RNA celulares. Assim, para além da informação relativa à complexidade obtida pelo detetor ao nível do *side scatter*, é possível diferenciar e separar as populações de neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos, e granulócitos imaturos, com base no seu conteúdo em ácidos nucleicos, evidenciado pela radiação fluorescente. Já no canal WNR (*White cell nucleated channel*), para além da marcação dos núcleos e organelos leucocitários, é possível a ligação de um fluorocromo aos precursores dos eritrócitos, não destruídos pelo agente lítico de eritrócitos, permitindo a diferenciação e contagem total de leucócitos, basófilos e eritroblastos. O canal WPC (*White cell precursor channel*), é usado, quando na contagem diferencial de leucócitos é emitido um alerta para a possível presença de blastos ou linfócitos anormais. O canal PLT-F (*Fluorescent platelet channel*), é utilizado especificamente quando surgem alertas quanto à identificação das plaquetas e eritrócitos contados por impedância, sendo uma metodologia fidedigna na identificação de plaquetas uma vez que utiliza um fluorocromo que se liga aos ácidos nucleicos presentes nos organelos das plaquetas. Por fim, o canal RET à semelhança dos anteriores, utiliza um fluorocromo que marca o RNA residual presente nos reticulócitos. Concluindo, os sinais emitidos pela intensidade de fluorescência, associados ao *forward* e *side scatter* permitem a identificação das diversas populações contabilizadas nos diferentes canais <sup>3;36</sup>.

#### **4.2.3. Espectrofotometria**

De modo a determinar a concentração de hemoglobina (Hb), é adicionado à amostra uma solução contendo lauril sulfato de sódio (SLS) de forma a destruir a integridade da membrana dos eritrócitos e a libertar a Hb. Este composto promove uma alteração da conformação da Hb, com a exposição e posterior oxidação do grupo heme. O SLS liga-se à meta-hemoglobina formada, originando um composto estável, cuja absorvância pode ser medida a 555 nm, e posteriormente convertida em concentração (g/dL) <sup>3</sup>.

### 4.3. Velocidade de sedimentação

Por definição, a velocidade de sedimentação (VS) mede o espaço ocupado, em milímetros, pelos eritrócitos que depositaram, durante uma hora. O aumento da velocidade de sedimentação está relacionado com o aumento da concentração plasmática de proteínas de fase aguda em indivíduos com lesão tecidual, inflamação crónica e neoplasias. No entanto, a VS não pode ser considerado uma prova específica na deteção de doenças inflamatórias, uma vez que poderá estar elevada noutras condições como anemia, gravidez e em indivíduos idosos. Assim, devido à reduzida sensibilidade e especificidade do parâmetro, não é aconselhado a determinação da VS na suspeita de quadros inflamatórios, sendo a proteína C reativa, um parâmetro mais fiável <sup>1:36</sup>.

O pedido de avaliação da VS é comum tendo em vista a monitorização de patologias como artrite reumatoide, e algumas neoplasias <sup>1</sup>. Assim, o SPC-CHUC determina a VS recorrendo no sistema automático VES-MATIC CUBE 30, que deteta, através de um sensor optoeletrico, a alteração na opacidade de uma coluna de sangue à medida que a hemossedimentação ocorre. Durante o procedimento, as amostras são sujeitas a movimentos de rotação, sendo feita a primeira leitura ótica logo após o movimento de rotação e uma segunda leitura após 20 minutos de sedimentação. O valor obtido ao fim dos 20 minutos é comparável com os valores de Westergren (técnica de referência) ao fim de 1 hora, daí os resultados serem apresentados em milímetros por hora (mm/h) <sup>3:36</sup>.

### 4.4. Esfregaço do sangue periférico

Para além da informação obtida pelo hemograma, no que diz respeito à contagem e caracterização das células do sangue, a observação microscópica do esfregaço do sangue periférico é fundamental na obtenção de um quadro hematológico completo do indivíduo em estudo <sup>45</sup>. As razões e vantagens associadas à visualização do esfregaço periférico são múltiplas, destacando a avaliação do número de células, confirmar a contagem diferencial de leucócitos fornecidas pelo hemocítmetro e identificar anomalias morfológicas das células, em particular dos eritrócitos <sup>1</sup>.

Diariamente são realizados cerca de 1500 hemogramas no SPC-CHUC, pelo que seria utópico a realização de todos os esfregaços sanguíneos. Assim, o *software* associado à cadeia de automação Sysmex XN identifica um conjunto de parâmetros a ter em conta pela emissão de alertas, que são sinalizados como *flags*. A deteção de células displásicas, blastos e citopenias marcadas são alguns dos cenários mais frequentes do aparecimento de *flags*. Esta automatização informática não dispensa a avaliação rigorosa e crítica dos parâmetros

preconizados no hemograma, sendo pedido pelo clínico a realização do esfregaço de sangue quando analítica e clinicamente sugestivo.

Terminado o hemograma, o equipamento transfere a amostra para outro módulo para efetuar a preparação e coloração pela técnica de May–Grünwald–Giemsa. Por fim, a lâmina obtida é encaminhada para uma unidade que procede à digitalização automática de imagens do sangue periférico. Associado a este sistema está o *software Cellavision®* que baseado nas imagens provenientes da digitalização automática, procede à identificação, mediante as características morfológicas, das células e estruturas das diversas linhas celulares hematológicas<sup>36;46</sup>. Essa primeira identificação é sem dúvida um grande apoio na validação biopatológica do resultado, no entanto, não é infalível. Algumas das células ou estruturas não são identificadas, e outras por vezes são classificadas incorretamente. Por isso, o olhar crítico do especialista na análise da morfologia e distribuição das estruturas continua a ser indispensável<sup>47</sup>.

Para além do sistema estar sujeito a falhas quanto à classificação, essa identificação é realizada apenas numa zona de monocamada celular do esfregaço, não avaliando o restante da lâmina. É certo que uma boa avaliação passa pela observação das estruturas nessa região, onde não se visualizam sobreposições e, por conseguinte, as características morfológicas são diferenciadas. No entanto, sabe-se que agregados celulares ou estruturas de maiores dimensões usualmente situam-se na periferia do esfregaço sanguíneo e por vezes, não são detetadas<sup>36;37</sup>. Assim, em situações duvidosas, em que a contagem observada no hemograma não é sobreponível com a contagem efetuada pelo software da leitura do esfregaço, a confirmação manual é crucial.

O sangue periférico de indivíduos saudáveis é predominantemente constituído por células totalmente diferenciadas. No entanto, sob condições atípicas, a medula óssea liberta células imaturas na corrente sanguínea, maioritariamente, em doentes com doenças hematológicas proliferativas, fator a considerar aquando da análise do esfregaço de sangue periférico<sup>1</sup>.

#### **4.4.1. Série Leucocitária**

Na observação do esfregaço de sangue periférico, a avaliação dos leucócitos observados deve preconizar a análise de alterações morfológicas indicativas de reatividade (específico dos linfócitos), o grau de segmentação dos neutrófilos e possíveis desvios à esquerda na diferenciação da linha mieloide (neutrófilos em banda), presença de blastos e a

presença de células displásicas <sup>45</sup>. Para tal, saber identificar as características dos leucócitos encontrados tipicamente em indivíduos saudáveis é fundamental. Assim, em seguida, são apresentadas as subcategorias leucocitárias.

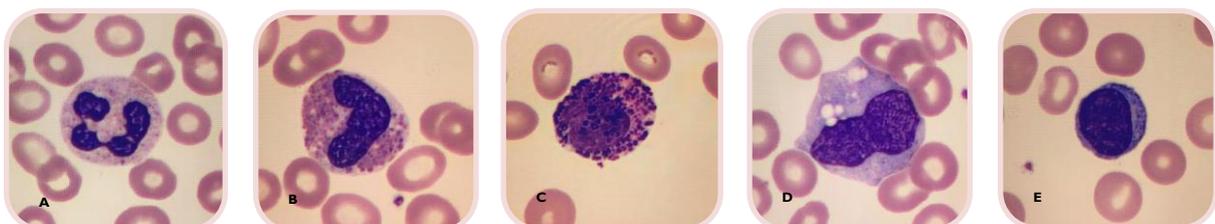
## Polimorfonucleares

Os leucócitos podem ser classificados quanto ao aspeto do núcleo e do citoplasma, características essas evidenciadas na Figura 7. São denominados de polimorfonucleares os leucócitos que apresentem múltiplos lóbulos nucleares. Granulócitos são leucócitos cujo citoplasma é constituído por muitos grânulos sendo que a presença de grânulos e número de lóbulos característicos dos eosinófilos, basófilos e neutrófilos são traços específicos de maturidade celular <sup>3</sup>.

Os neutrófilos são o subtipo de leucócitos mais abundantes no sangue periférico, possuindo um diâmetro característico de 12-16  $\mu\text{m}$ , aproximadamente o dobro do tamanho dos eritrócitos. Uma das características que os define é a segmentação do núcleo, possuindo em média entre 2-5 lóbulos de cromatina condensada separados por filamentos estreitos. Outra particularidade inerente aos neutrófilos reside no elevado número de grânulos citoplasmáticos, os grânulos primários que são azurófilos e raros, e os grânulos secundários, presentes em larga escala e que conferem a coloração cor-de-rosa ao citoplasma. A Figura 8 apresenta algumas alterações morfológicas respeitantes a esta população leucocitária <sup>46,48</sup>.

No que diz respeito aos eosinófilos, o seu tamanho é equiparável ao dos neutrófilos, sendo que o núcleo é tipicamente bilobado. No que diz respeito aos grânulos citoplasmáticos, os eosinófilos apresentam um elevado número de grânulos eosinofílicos (avermelhados) que preenchem quase todo o citoplasma celular.

Contrariamente ao que se verifica com os neutrófilos, os basófilos são os leucócitos menos abundantes no sangue periférico, no entanto possuem uma morfologia que facilita a sua identificação, uma vez que os grânulos basofílicos (roxos) muito densos ocupam grande parte da arquitetura celular <sup>41,48</sup>.

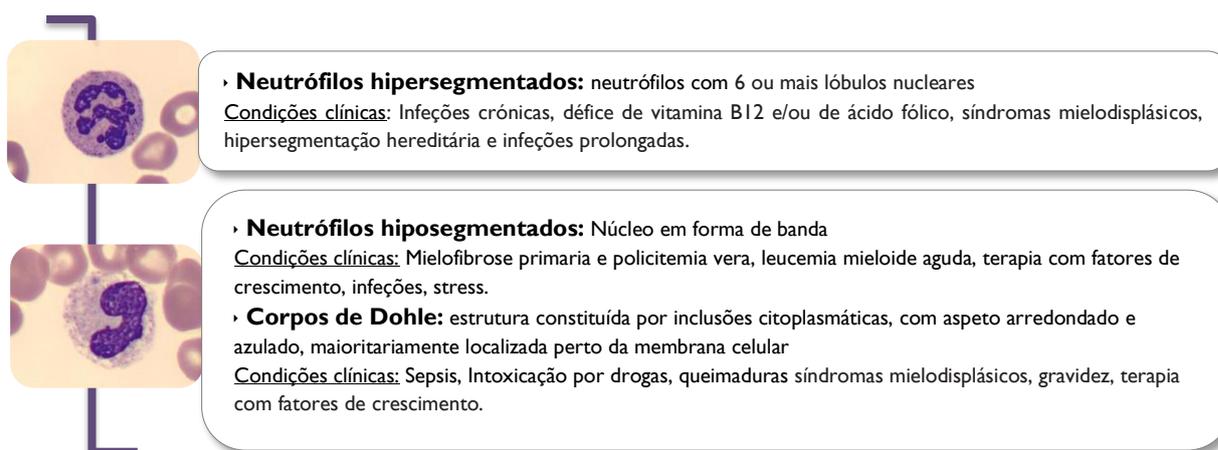


**Figura 7** – Leucócitos Polimorfonucleares e Mononucleares. A: Morfologia característica de neutrófilos; B: Morfologia característica de Eosinófilos; C: Morfologia característica de Basófilos; D: Morfologia característica de Monócitos; E: Morfologia característica de Linfócitos. Fonte: SPC-CHUC.

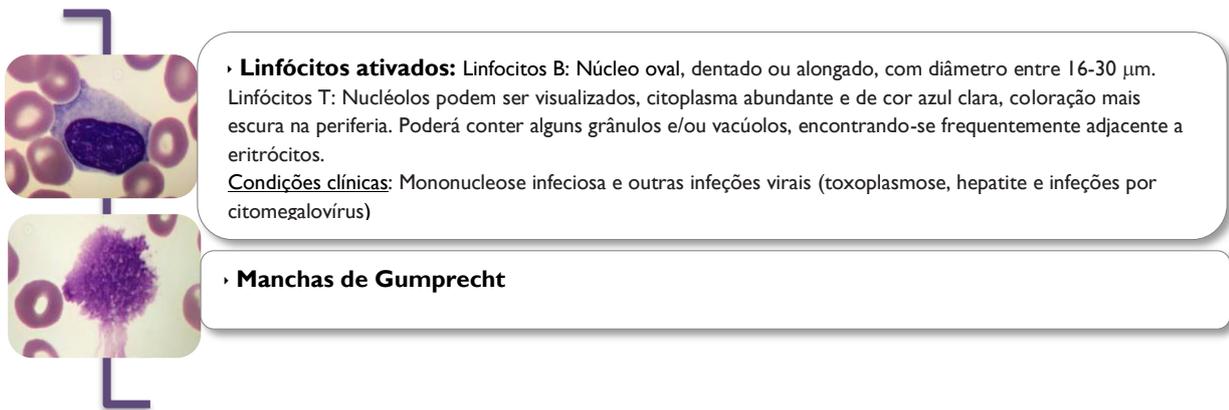
## Mononucleares

Os monócitos e linfócitos são considerados leucócitos mononucleares, constituídos por núcleos mono-lobados, podendo conter também um número reduzido de pequenos grânulos citoplasmáticos <sup>3</sup>. No que diz respeito às dimensões dos monócitos verifica-se que são tendencialmente maiores que os neutrófilos, com bordos citoplasmáticos irregulares observados no esfregaço sanguíneo. A forma do núcleo assemelha-se a uma ferradura, com a cromatina menos condensada que a dos restantes leucócitos maduros. O citoplasma é azul-acinzentado e contém pequenos grânulos da cor violeta. Quando o sangue é colhido para tubos com EDTA, observa-se a formação de múltiplos vacúolos citoplasmáticos que auxiliam na distinção dos restantes leucócitos <sup>3;48</sup>.

No que diz respeito aos linfócitos, sabe-se que o seu diâmetro de linfócitos maduros varia entre 7–20  $\mu\text{m}$ , dependendo da proporção de citoplasma presente. Linfócitos de pequenas dimensões estão em termos funcionais na fase  $G_0$  do ciclo celular, sendo que o núcleo é aproximadamente do tamanho de um eritrócito e ocupa cerca de 90% do volume celular. A cromatina encontra-se condensada e corada de roxo escuro. Já o citoplasma apresenta-se com alguns grânulos azurofilos. Quando, em resposta à ligação de um antígeno, estes linfócitos de pequenas dimensões entram na fase  $G_1$  do ciclo celular, alterando a sua morfologia <sup>3;37</sup>. A Figura 9 apresenta algumas alterações morfológicas respeitantes a esta população leucocitária.



**Figura 8** – Alterações morfológicas dos neutrófilos <sup>38</sup>. Esfregaço de sangue periférico: SPC-CHUC.



› **Linfócitos ativados:** Linfócitos B: Núcleo oval, dentado ou alongado, com diâmetro entre 16-30  $\mu\text{m}$ . Linfócitos T: Nucléolos podem ser visualizados, citoplasma abundante e de cor azul clara, coloração mais escura na periferia. Poderá conter alguns grânulos e/ou vacúolos, encontrando-se frequentemente adjacente a eritrócitos.  
Condições clínicas: Mononucleose infecciosa e outras infecções virais (toxoplasmose, hepatite e infecções por citomegalovírus)

› **Manchas de Gumprecht**

**Figura 9** – Alterações morfológicas dos linfócitos <sup>37;38</sup>. Esfregaço de sangue periférico: SPC-CHUC.

#### 4.4.2. Série Eritrocitária

Os eritrócitos observados no esfregaço de sangue periférico têm aspeto arredondado com uma zona central descorada, que ocupa cerca de um terço do seu diâmetro total <sup>49</sup>, diâmetro este que varia, em média, entre os 6,8 e os 7,5  $\mu\text{m}$  <sup>37</sup>. A avaliação da série vermelha é feita tendo em conta o tamanho, a cor, a forma, homogeneidade na distribuição das hemácias e pesquisa de inclusões eritrocitárias <sup>45</sup>. A maioria das alterações morfológicas dos eritrócitos observadas em esfregaços de sangue periférico estão associadas a variações biopatológicas, algumas das quais, observadas durante o período de estágio e mencionadas em seguida.

##### Tamanho e cor

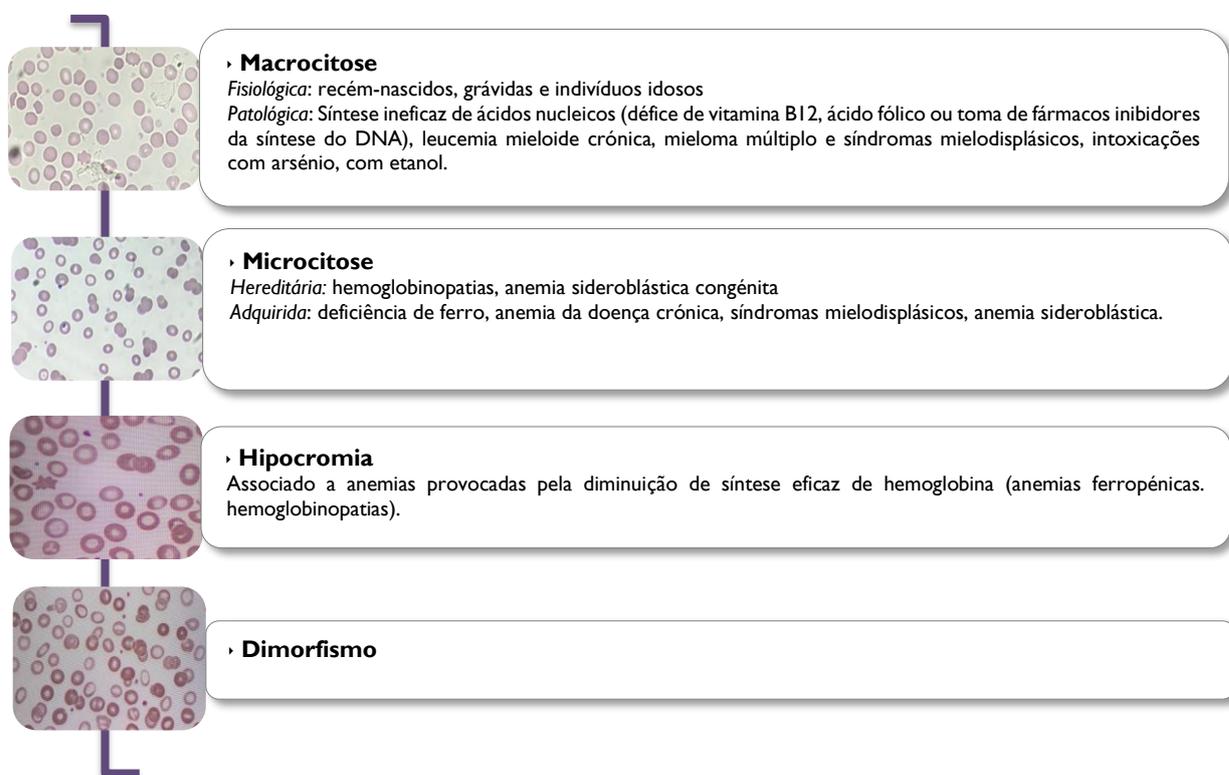
A anisocitose é caracterizada pela variação inespecífica do tamanho dos eritrócitos e pode ser detetada na observação do esfregaço de sangue periférico conjugada com os valores obtidos no eritrograma respeitantes ao RDW <sup>3</sup>. A macrocitose é o termo designado para eritrócitos com volume superior a 8,2  $\mu\text{m}$  e quando o VCM é superior a 100 fL <sup>3;37</sup>. Por outro lado, a microcitose é caracterizada por eritrócitos com volume inferior a 6,2  $\mu\text{m}$  e quando o VCM é inferior a 80 fL <sup>3;37;46</sup>.

Já a anisocromia caracteriza-se pela variação da coloração das hemácias <sup>46</sup>. Dentro desta mesma variabilidade, podem caracterizar-se como hipocrómicos, os eritrócitos que manifestem uma diminuição da sua coloração, revelada pelo aumento da zona central descorada, ocupando uma área superior a um terço do diâmetro total. Está usualmente associada à microcitose e a anomalias na produção de hemoglobina sendo que hipocromia severa é, geralmente refletida, na diminuição nos valores de CHCM <sup>42;49</sup>.

O termo “hipercromia” raramente é utilizado para descrever o aspeto dos eritrócitos observados no esfregaço sanguíneo. A grande maioria dos macrócitos visualizados, por serem

mais espessos que os restantes eritrócitos, apresentam uma maior cromia sem manifestarem, no entanto, alterações relativas ao CHCM. Contrariamente, em condições clínicas de esferocitose hereditária, os esferócitos apresentam uma coloração mais intensa e o CHCM aumentado, o que indica que a hipercromia está relacionada, sobretudo com alteração da forma <sup>46</sup>.

Por outro lado, o dimorfismo é caracterizado pela presença de duas populações distintas de eritrócitos. Pode ocorrer um indivíduo diagnosticado com anemia sideropénica, ao qual foi instituída terapêutica, em doentes com anemia megaloblástica que, em resposta ao tratamento, podem sofrer uma anemia por défice de ferro e após transfusões de sangue a utentes com anemia microcítica e hipocrómica <sup>42</sup>. A Figura 10 apresenta algumas alterações do tamanho e cor dos eritrócitos.



**Figura 10** – Alterações do tamanho e cor dos eritrócitos <sup>3,46</sup>. Esfregaço de sangue periférico: SPC-CHUC. (Imagens correspondentes a Macrocitose e Microcitose foram ambas observadas pela objetiva de 50x e estão apresentadas à escala.)

## Forma

A manutenção da integridade da membrana é fundamental para que o eritrócito possa cumprir a sua função na troca de metabolitos garantindo também, em conjugação com o citoesqueleto, resistência e flexibilidade necessárias à sua sobrevivência na corrente sanguínea<sup>3</sup>. O termo “poiquilocitose” refere-se ao aumento da proporção de eritrócitos com modificações ao nível do seu formato característico em disco bicôncavo. O reconhecimento das distintas formas eritrocitárias auxilia na identificação da possível etiologia associada, sendo que poderá ser de origem intrínseca ou extrínseca. Por um lado, deformações devidas a hemoglobinopatias, malformações enzimáticas ou ao nível da membrana do eritrócito são conotadas como de origem intrínseca. Por outro lado, de origem extrínseca estão incluídos os efeitos de forças mecânicas anómalas, fármacos, químicos ou toxinas<sup>42</sup>.

Na avaliação da poiquilocitose é fundamental localizar e avaliar quais as anomalias predominantes, e garantir a sua distribuição pelo esfregaço sanguíneo de modo a descartar a possibilidade de serem artefactos<sup>49</sup>. As Figuras 11 e 12 apresentam alguns exemplos na alteração da forma dos eritrócitos, da sua distribuição no esfregaço sanguíneo, bem como de algumas inclusões eritrocitárias.



**Figura 11** – Inclusões e distribuições eritrocitárias<sup>38</sup>. Esfregaço de sangue periférico: SPC-CHUC.

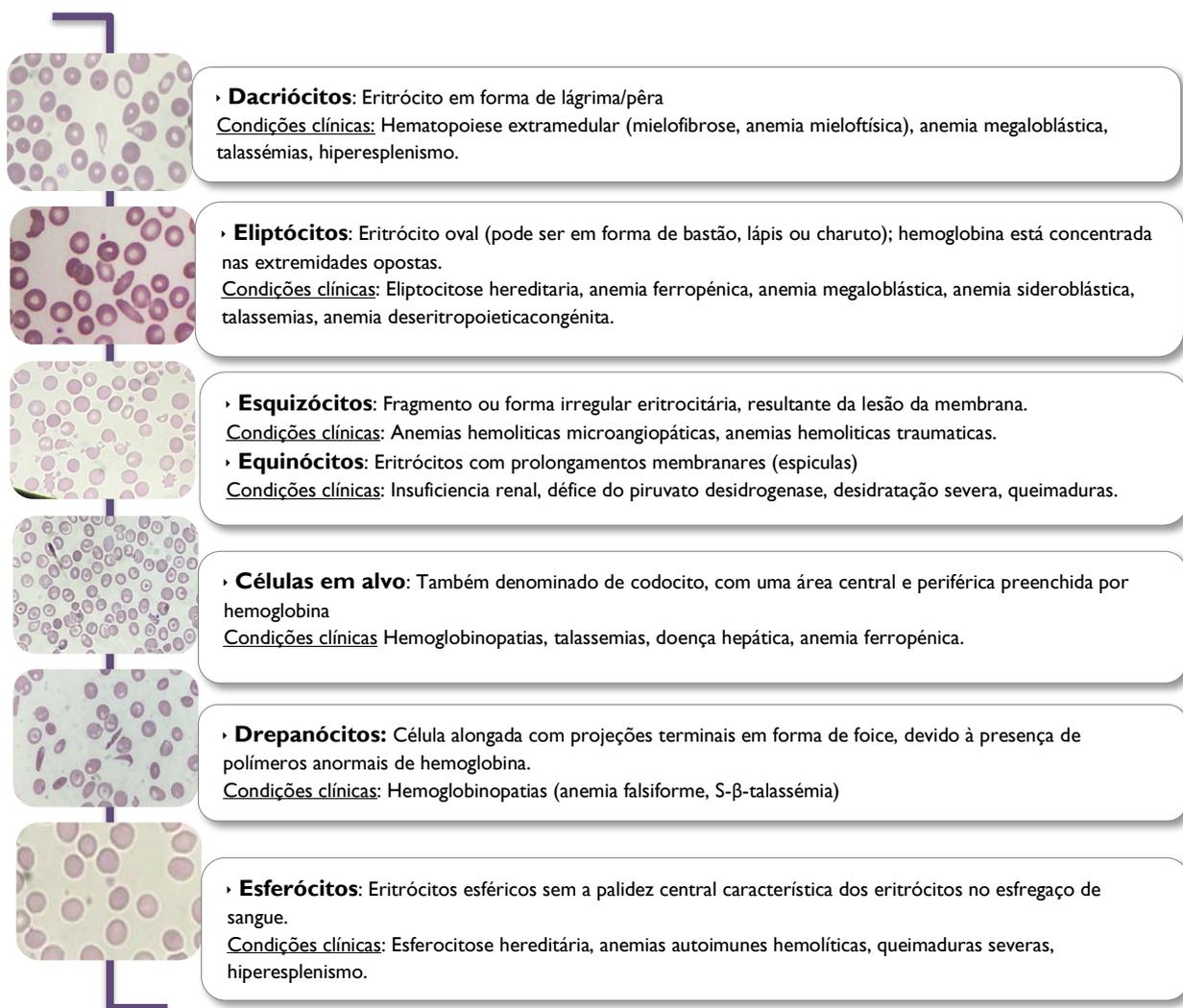
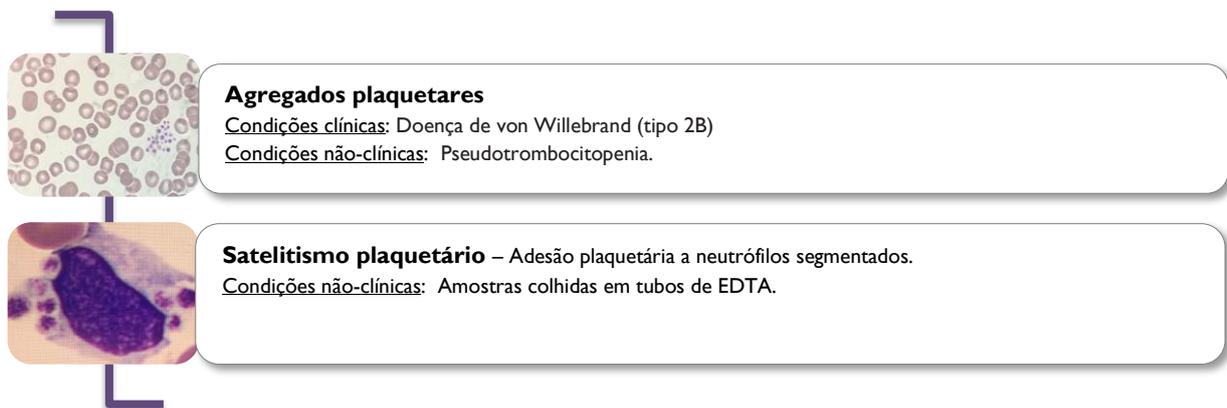


Figura 12 – Alterações na forma dos eritrócitos <sup>38</sup>. Esfregaço de sangue periférico: SPC-CHUC.

#### 4.4.3. Série Plaquetar

As plaquetas observadas no esfregaço sanguíneo apresentam contornos irregulares, com grânulos finos azurofilos. O diâmetro médio destas estruturas varia entre 1 e 3  $\mu\text{m}$ , podendo chegar até aos 5  $\mu\text{m}$  <sup>42</sup>. No que diz respeito à avaliação das plaquetas no esfregaço de sangue periférico, é importante avaliar o seu número e tamanho, a formação de agregados e a distribuição dos grânulos <sup>45</sup>. É fundamental realçar que a contagem de plaquetas obtida pelo hemocítmetro poderá ser errónea em alguns quadros de trombocitopenia, devido à pseudotrombocitopenia <sup>42</sup>. Na Figura 13 encontram-se alterações na distribuição das plaquetas no esfregaço sanguíneo.

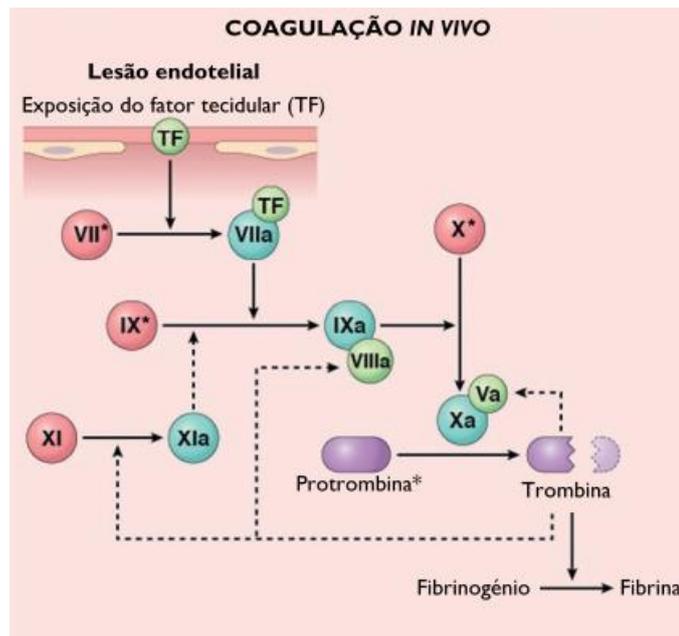


**Figura 13** – Alterações na distribuição das plaquetas <sup>1:46</sup>. Esfregaço de sangue periférico: SPC-CHUC.

#### 4.5. Hemostase

A hemostase é um processo homeostático pelo qual o organismo mantém a fluidez do sangue que circula no sistema vascular, prevenindo perdas quando de lesões nos vasos sanguíneos, pela formação do coágulo. Os processos hemostáticos incluem, para além da formação do coágulo, a sua dissolução e reparação da porção do endotélio lesada, mantendo um equilíbrio entre dois fenómenos antagónicos: hemorrágicos e trombóticos <sup>3</sup>.

Os eventos altamente regulados envolvidos na hemostase promovem a ação integrada de plaquetas, células endoteliais vasculares e fatores de coagulação no local do dano vascular, culminando na formação do coágulo. A sequência de reações de reparação é iniciada pela vasoconstrição na zona do dano, de modo a reduzir o aporte sanguíneo na área. De seguida dá-se a adesão e agregação das plaquetas, pela exposição do fator de von Willebrand subendotelial e de colagénio na área lesada. Posteriormente dá-se a formação da fibrina, uma vez que a lesão endotelial ativa nesse local o fator tecidual, proteína que promove uma cascata de reações, esquematizadas na Figura 14, que resultam na formação de uma rede de fibrina, composto altamente ativador e agregador plaquetar. Por fim, os agregados plaquetares e a fibrina polimerizada formam uma estrutura sólida permanente, cuja finalidade é a prevenção de futuras hemorragias. Em seguida, são ativados mecanismos contrarreguladores de modo controlar a formação do coágulo e a reparar o endotélio destruído, desencadeando processos fibrinolíticos associados à destruição do coágulo <sup>50</sup>.



**Figura 14** – Esquema ilustrativo das reações da formação do coágulo *in vivo*. As Linhas pontilhadas estão associadas a mecanismos de *feedback* positivo. Fatores marcados com um asterisco (\*) são dependentes de vitamina K. Adaptado de <sup>50</sup>.

#### 4.6. Metodologias associadas às provas da coagulação

Os métodos através dos quais se executam os testes associados aos fenômenos da coagulação são diversos. O SPC-CHUC possui ao seu dispor o autoanalisador *ACL TOP 700*, equipamento totalmente automatizado concebido para a análise de múltiplos parâmetros, tendo por base três metodologias principais: o método coagulimétrico, o método cromogénico e o método imunológico, explanados em seguida <sup>51</sup>.

##### 4.6.1. Método Coagulimétrico

Ensaio baseado no método coagulimétrico são frequentemente utilizados na avaliação de indivíduos cuja suspeita recaia sobre patologias associadas à hemostase e para monitorizar as terapêuticas com anticoagulantes. O princípio coagulimétrico baseia-se na medição do tempo de coagulação, isto é, o tempo necessário para detetar a formação de fibrina, determinado pela turbidez da amostra a 671 nm. A radiação dispersa é convertida em sinais elétricos, que se traduzem no tempo de coagulação. A maioria dos parâmetros analisados no subsetor da coagulação são determinados mediante esta metodologia, incluindo provas de rotina do *screening* da coagulação, pesquisa de fatores das diferentes vias da cascata de coagulação e controlo da terapêutica com os novos anticoagulantes <sup>51;52</sup>.

#### 4.6.2. Método Cromogénico

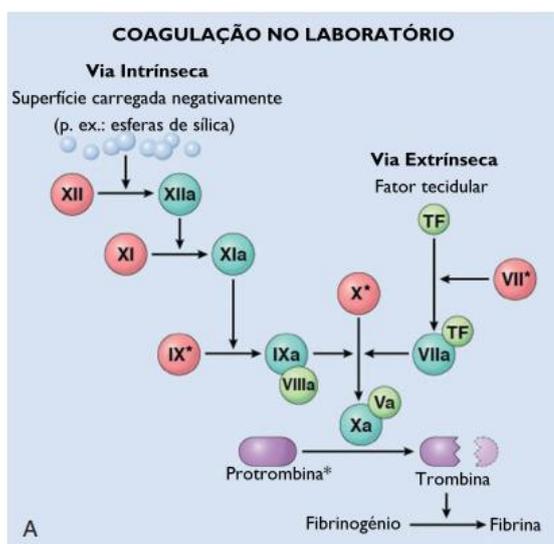
A metodologia associada às reações cromogénicas baseia-se no princípio de deteção do analito pela sua reação com um cromogénio. O produto da reação é um composto corado (cromóforo) e é detetado espectrofotometricamente a 405 nm, sendo a densidade ótica proporcional à concentração do analito na amostra. Os parâmetros avaliados segundo esta metodologia no SPC-CHUC são o fator Xa, a proteína C, a antitrombina e o plasminogénio<sup>51;52</sup>.

#### 4.6.3. Método Imunológico

O ensaio imunoturbidimétrico é utilizado no laboratório do SPC-HUC para pesquisar D-dímeros, fator plaquetar 4, fator de von Willebrand e a atividade do fator de von Willebrand. As partículas de latex revestidas com um anticorpo monoclonal específico do analito a pesquisar são incubadas com o plasma do doente. Na presença do analito, as partículas de latex aglutinam, traduzindo-se na diminuição da radiação transmitida causada pelos agregados, a 405 nm ou a 671 nm. A diminuição da turbidez, ou seja, da radiação que alcança o detetor, é registada pelo instrumento, sendo que a diferença entre o sinal inicial, anterior à aglutinação, e o final, após a aglutinação, é proporcional à concentração do analito<sup>53;54</sup>.

#### 4.7. Testes de screening da coagulação mais requisitados na rotina

É comum dividir as doenças relacionadas com a hemostase em patologias associadas a eventos hemorrágicos ou a eventos trombóticos. Desta forma é inicialmente requerida a realização de provas de screening da coagulação, que se baseiam nas vias clássicas (intrínseca e extrínseca) da coagulação apresentadas na Figura 15<sup>56</sup>.



**Figura 15** – Esquema ilustrativo das reações da formação do coágulo no laboratório. As Linhas pontilhadas estão associadas a mecanismos de *feedback* positivo. Fatores marcados com um asterisco (\*) são dependentes de vitamina K. Adaptado de<sup>50</sup>.

#### 4.7.1. Tempo de Protrombina

O Tempo de Protrombina (TP) mede o tempo (em segundos) de formação do coágulo de fibrina numa amostra à qual, primeiramente é adicionada tromboplastina e, seguidamente, cloreto de cálcio. O início da contagem do tempo dá-se no momento da adição do cloreto de cálcio e termina com a deteção da formação das moléculas de fibrina insolúveis <sup>55</sup>.

O TP é uma das provas de hemostase mais requisitadas, a par com o TTPa, e avalia a ação dos fatores da coagulação das Vias Extrínseca e Comum. Tempos alongados do TP podem refletir diversas alterações, sendo que as mais comuns são défice ou inibidores de fatores da coagulação e alterações da função hepática. É também sensível a fatores dependentes da Vitamina K (Fator II (Protrombina), Fator VII, Fator IX e Fator X) e por isso, também é utilizada na monitorização das terapêuticas com fármacos antagonistas da Vitamina K, pelo cálculo e análise do INR (*International Normalized Ratio*) <sup>54</sup>.

Uma vez que a tromboplastina fornecida pelas casas comerciais apresenta variações entre marcas e lotes que se reflete no tempo de coagulação, foi preconizado que cada tromboplastina fosse aferida relativamente a uma tromboplastina padrão, de modo a evitar a variabilidade associada à medição do TP e que se utilizasse uma razão em vez de um número absoluto para a obtenção de resultados reprodutíveis, comparáveis entre laboratórios. Assim, cada lote de tromboplastina tem associado um valor numérico ISI (*International Sensitivity Index*) e a razão foi denominada de INR <sup>55:56</sup>:

$$INR = \left( TP_{doente} / TP_{controlo} \right)^{ISI}$$

#### 4.7.2. Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPa)

A uma amostra de plasma citratado são adicionados ativadores da via intrínseca, sílica e fosfolipídios, de modo a iniciar a fase de contacto. Em seguida, após a ativação, adiciona-se cloreto de cálcio de modo a despoletar uma sequência de reações que levam à formação de trombina, culminando na formação final do coágulo. À semelhança da medição do TP, o TTPa regista o intervalo de tempo (em segundos) que dista desde o momento da adição do cloreto de cálcio até à deteção da formação do coágulo <sup>56</sup>.

O TTPa avalia a ação dos fatores da coagulação das vias intrínseca e comum sendo sensível às carências de fatores destas vias, nomeadamente os Fatores II, V, VIII, IX, X, XI, XII e Fibrinogénio <sup>55</sup>. Existem quatro etiologias principais a considerar quando o TTPa está elevado: défice de um destes fatores, inibidores de fatores, presença de inibidor do tipo lupus

e a toma de fármacos anticoagulantes (p.ex.: heparina). A predominância do défice de fatores ocorre ao nível dos fatores FVIII e FIX, que originam os quadros patológicos correspondentes a hemofilia A ou B, respetivamente. Já os inibidores de fatores são anticorpos com elevada afinidade para fatores da coagulação, frequentemente encontrados em indivíduos hemofílicos, idosos ou em pós-parto, estando altamente associados a hemorragias severas e equimoses extensas <sup>57</sup>.

#### **4.7.3. Prova complementar: Inibidores do tipo lupus**

Os inibidores do tipo lupus (ITL) são um conjunto de imunoglobulinas que se ligam a fosfolípidos. Também denominado de anticoagulante lúpico, uma vez que designava o anticorpo inibidor da coagulação sanguínea no plasma de doentes com LES, por aumentar os tempos de coagulação revelados pelo TTPa, uma vez que se liga aos fosfolípidos adicionados no início desta mesma prova. No entanto, contrariamente ao observado, verifica-se que a presença de inibidores do tipo lupus *in vivo* está associada a eventos trombóticos e risco aumentado de trombose arterial e tromboembolismo venoso.

Estes anticorpos podem surgir como resultado de doenças inflamatórias ou como fruto de doenças autoimunes (LES ou Síndrome Antifosfolipídico) ou da toma de alguns fármacos, estando frequentemente associados a abortos de repetição. O painel de provas usadas para a identificação de inibidores do tipo lupus no SPC-CHUC incluem o TTPa, Tempo de coagulação com Veneno de víbora de Russell Diluído (dRVVT), e o Tempo de Coagulação com Sílica (SCT) <sup>54;57</sup>. Segundo as *guidelines* para a deteção dos ITL, preconiza-se que a análise seja feita em sangue venoso colhido para tubo com citrato de sódio na proporção 1:9, sujeito a dupla centrifugação e que, sejam realizadas duas provas baseadas em diferentes metodologias (dRVVT e SCT). Cada prova deve contemplar um teste de *screening* e um teste confirmatório <sup>58</sup>. O teste de *screening* utiliza reagentes cuja constituição é caracterizada por uma baixa concentração de fosfolípidos e mede o tempo (em segundos) que uma amostra de plasma demora a coagular e que, devido à presença de ITL, prolonga o tempo acima dos limites de referência. Por outro lado, o teste confirmatório envolve a adição de excesso de fosfolípidos, de modo a reduzir ou corrigir o efeito do inibidor, resultando na diminuição/correção do tempo de coagulação prolongado. Se a razão entre o resultado obtido no teste de *screening* e o resultado obtido no teste confirmatório, se revelar superior a 1,2, então pode dizer-se que a amostra contém ITL, bastando o rácio de uma das metodologias para conferir positividade. No entanto o resultado só é clinicamente sugestivo se a positividade se mantiver 12 semanas após o primeiro resultado positivo <sup>1;59</sup>.

A detecção do inibidor do tipo lupus é especialmente importante em condições pré-operatórias. Geralmente um TTPa aumentado, por estar altamente associado a elevado risco hemorrágico, leva ao cancelamento da intervenção cirúrgica. A presença de ITL é o único motivo pelo qual, se pode prosseguir com o procedimento uma vez que, apesar de originar TTPa prolongado, está associado a condições fisiológicas trombóticas, e, por conseguinte, não representa risco hemorrágico durante a cirurgia.

### **Testes de mistura**

Os estudos de mistura são efetuados na avaliação da hemostase de modo a determinar se o prolongamento do TP ou do TTPa é devido a deficiência de fatores ou devido à presença de inibidores de fatores. Mistura, na proporção 1:1, de plasma do doente com plasma normal seguido da medição do tempo de coagulação. Se, após os testes de mistura, o TP ou TTPa se mantiverem elevados e não tiver havido correção, conclui-se que a amostra do doente contém inibidores dos fatores presentes no plasma normal, mantendo o prolongamento dos tempos de coagulação. Por outro lado, se for observada a correção dos tempos de coagulações, pode concluir-se que se trata de déficit de fatores da coagulação que foram corrigidos pelo plasma normal, exceto quando se trata de inibidores tardios, como é o caso do inibidor do fator VIII<sup>1</sup>. A detecção do inibidor tardio do fator VIII, no SPC-CHUC é feita pela determinação do tempo de coagulação após incubação a 37°C durante 2 horas, de uma mistura de plasma do doente com plasma normal (mistura 1), na proporção 1:1. Sob as mesmas condições de temperatura, são incubadas isoladamente as amostras de plasma do doente e plasma normal, sendo combinadas (mistura 2) no término das 2 horas e feita a leitura do tempo de coagulação. Se o TTPa continuar prolongado em ambas as misturas 1 e 2 é devido à presença de um inibidor de fator de ação imediata. Se por outro lado, apenas a mistura 1 revelar TTPa prolongado, indica a presença do inibidor tardio da coagulação.

#### **4.7.4. Fibrinogénio**

O Fibrinogénio, ou Fator I da cascata de coagulação, é uma glicoproteína fibrosa presente no plasma sanguíneo, essencial para a formação da fibrina<sup>60</sup>. Como evidenciado na Figura 13, a conversão de fibrinogénio em fibrina requer a presença de trombina. Deste modo, o método de *Clauss* é a metodologia utilizada na determinação quantitativa e qualitativa do fibrinogénio plasmático, medindo o tempo (em segundos) desde a adição de trombina em excesso até à de formação da fibrina. Assim, o fibrinogénio é um importante marcador na avaliação do risco trombótico e da gravidade das patologias relacionadas, uma vez que tempos

reduzidos refletem elevada atividade de fibrinogénio associado a um maior risco de formação de coágulo <sup>1</sup>.

Baixas concentrações de fibrinogénio funcional são detetadas em doentes com coagulação intravascular disseminada, doença hepática, hemorragias pós-operatórias ou pós-traumáticas e em condições de afibrinogenemia (ausência de fibrinogénio), hipofibrinogenémia (concentrações reduzidas de fibrinogénio funcional) ou disfibrinogenémia (fibrinogénio disfuncional) <sup>1;54;56</sup>. Por outro lado, como proteína de fase aguda, elevadas concentrações plasmáticas de fibrinogénio podem ser observadas em condições inflamatórias agudas ou crónicas.

#### **4.7.5. Testes de fibrinólise: D-Dímeros**

Os D-Dímeros caracterizam-se por serem o produto final da degradação da fibrina mediada pela plasmina <sup>54</sup> e, por conseguinte, todos os episódios trombóticos são acompanhados pela libertação de D-dímeros. Elevados níveis de D-dímeros indicam que houve formação de fibrina que, posteriormente, foi lisada pela plasmina <sup>57</sup>. No entanto, a determinação dos D-dímeros é clinicamente relevante quando utilizado como parâmetro de valor preditivo negativo, isto é, na exclusão da ocorrência de eventos trombóticos. Deste modo, uma prova de D-dímeros negativa é altamente sugestiva de ausência de quadros tromboembólicos emergentes associados nomeadamente, a tromboembolias pulmonares <sup>56</sup>.

## 4.8. Caso Clínico 2

Um utente de 62 anos, em seguimento clínico em consultas de hemato-oncologia, a 8 de setembro de 2020 dirigiu-se ao SPC-CHUC para a realização de análises e cujos resultados foram os seguintes:

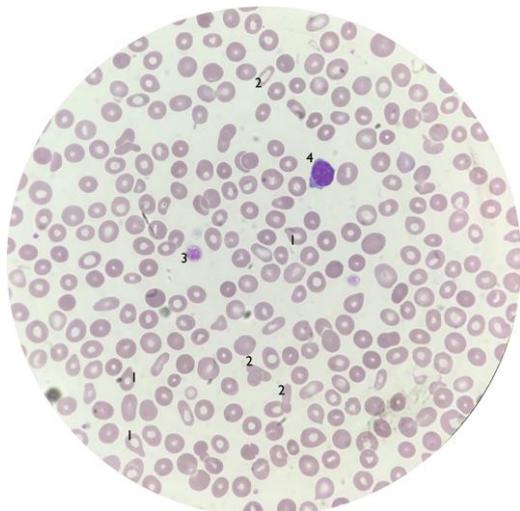
### ▶ Hemograma:

**Tabela 19** – Resultados laboratoriais do hemograma com esquema interpretativo.

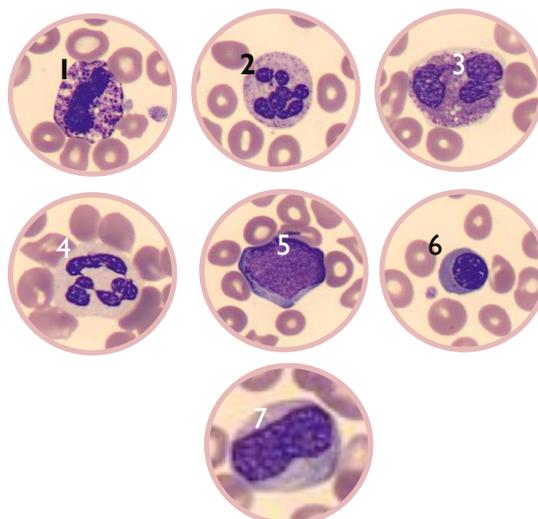
| Parâmetro       | Resultado                       | Intervalo de Referência   | Interpretação |
|-----------------|---------------------------------|---|---------------|
| Leucócitos      | $14,89 \times 10^3/\mu\text{L}$ | $4,0 - 10,0 \times 10^3/\mu\text{L}$  | ↑             |
| Neutrófilos     | $9,54 \times 10^3/\mu\text{L}$  | $2,0 - 7,0 \times 10^3/\mu\text{L}$   | ↑             |
| Linfócitos      | $1,98 \times 10^3/\mu\text{L}$  | $1,0 - 3,0 \times 10^3/\mu\text{L}$   | ≡             |
| Monócitos       | $0,93 \times 10^3/\mu\text{L}$  | $0,2 - 1,0 \times 10^3/\mu\text{L}$   | ≡             |
| Eosinófilos     | $1,20 \times 10^3/\mu\text{L}$  | $0,0 - 0,5 \times 10^3/\mu\text{L}$   | ↑             |
| Basófilos       | $1,24 \times 10^3/\mu\text{L}$  | $0,0 - 0,1 \times 10^3/\mu\text{L}$   | ↑             |
| Eritrócitos     | $3,79 \times 10^6/\mu\text{L}$  | Homem: $4,5 - 5,5 \times 10^6/\mu\text{L}$<br>Mulher: $3,8 - 4,8 \times 10^6/\mu\text{L}$     | ↓             |
| Hb              | $10,8 \times 10^6/\mu\text{L}$  | Homem: $13,0 - 17,5 \times 10^6/\mu\text{L}$<br>Mulher: $12,0 - 16,0 \times 10^6/\mu\text{L}$ | ↓             |
| Hematócrit<br>o | 34,0 %                          | Homem: 40,0 – 50,0 %<br>Mulher: 36,0 – 46,0 %   | ↓             |
| VCM             | 89,7 fL                         | 80,0-100,0 fL   | ≡             |
| HCM             | 28,5 pg                         | 27,0 – 32,0 pg  | ≡             |
| CHCM            | 31,8 g/dL                       | 32,0 – 35,0 g/dL  | ≡             |
| RDW             | 21,7 fL                         | 11,6 – 14,0 fL  | ↑             |
| Plaquetas       | $107 \times 10^3/\mu\text{L}$   | $160 - 370 \times 10^3/\mu\text{L}$   | ↓             |

↑, acima dos valores de referência; ↓, abaixo dos valores de referência; ≡, dentro dos valores de referência.

▸ Esfregaço de sangue periférico:



**Figura 16** – Esfregaço do sangue periférico do utente. 1- Dacriócito, 2-Eliptócito, 3-Plaqueta, 4-Linfócito (Observação da lâmina ao microscópio ótico na objetiva de x50, SPC-CHUC).



**Figura 17** – Células encontradas no esfregaço de sangue do doente, pelo software *CellaVision*. 1-Basófilo, 2 e 4 – Neutrófilo displásico (hipersegmentado), 3-Eosinófilo, 5 – Blasto, 6- Eritroblasto ortocromático, 7- Metamielócito. (Fonte: SPC-CHUC).

*Relatório do esfregaço de sangue periférico:* Basofilia, eosinofilia e presença de raros precursores mieloides. Presença de 4,6% (9 em 195) de células compatíveis com imaturidade. Anisopoiquilocitose com presença de dacriócitos e eliptócitos.

*Informação adicional:* Provas bioquímicas com alterações apenas na enzima Lactato desidrogenase com valores na ordem dos 688 U/L (valores de referência < 248 U/L); instituída terapêutica adicional com eritropoietina.

Informação de diagnóstico clínico: Mielofibrose secundária a Trombocitémia Essencial (em seguimento e fazer terapêutica com *Ruxolitinib*).

A Mielofibrose é uma doença neoplásica mieloproliferativa caracterizada pela proliferação desregulada de megacariócitos, precursores mieloides e eritroides, acompanhada pela transformação fibroblástica da matriz da medula óssea, como resultado da proliferação de fibroblastos. Devido ao comprometimento da arquitetura medular, a hematopoiese é maioritariamente extramedular esplénica<sup>49;61</sup>. Neste caso, o quadro mielofibrótico resultou de uma outra doença, Trombocitémia essencial. Esta é caracterizada por ser uma patologia clonal hematopoiética na qual se verifica um aumento persistente no número de plaquetas plasmáticas, podendo progredir, de facto, para quadros mielofibróticos uma vez que os megacariócitos sintetizam fatores de crescimento que estimulam a proliferação de

fibroblastos. Devido à proliferação desregulada de megacariócitos, precursores eritroides e mieloides, é comumente instituída terapêutica que regule a hiperprodução celular. O *ruxolitinib* pode causar anemia e trombocitopenia, condições que poderão ser atenuadas pela alteração na dose prescrita e pela prescrição de eritropoietina e androgénios <sup>40;49</sup>.

No que diz respeito à série branca, verifica-se pelo hemograma, apresentado na Tabela 18, a presença marcada de leucocitose com preponderância neutrofílica, eosinofílica e basofílica, comprovadas pela observação do esfregaço de sangue periférico. Inclusivamente, um estudo publicado em setembro de 2019 apresenta uma relação estatisticamente significativa entre doentes com mielofibrose e basofilia persistente, com risco subsequente agravado de desenvolver leucemia mieloide aguda <sup>62</sup>. Observou-se ainda, como evidenciado na Figura 16, múltiplos neutrófilos displásicos e alguns precursores mieloides (Imagem 7 da Figura 16) característicos da patologia.

No que diz respeito à série vermelha, pelos dados do hemograma, verifica-se que devido aos níveis baixos de hemoglobina, eritrócitos, e hematócrito, o doente encontra-se com uma anemia. Pelos valores de VCM, HCM e CHCM constata-se que a anemia é normocítica normocrômica. Já os valores de RDW aumentados revelam a presença de anisocitose, comprovada pela observação do esfregaço sanguíneo, revelado na Figura 17. Pôde visualizar-se ainda poiquilocitose marcada com presença de dacriócitos (quanto mais grave a fibrose, mais dacriócitos podem aparecer no esfregaço de sangue) e eliptócitos, deformações características da hematopoiese na medula óssea fibrótica e/ou no baço <sup>49</sup>. Por fim, a existência de células imaturas da linha eritroide (Imagem 6 da Figura 16) comprova a dificuldade da medula óssea produzir estruturas maduras devido ao elevado estado fibrótico.

À semelhança do observado na linha eritroide, verifica-se que, no que concerne à série plaquetar o doente se encontra com uma trombocitopenia (plaquetas  $<160 \times 10^3/\mu\text{L}$ ). Esta condição é típica em estadios avançados da patologia devido à hiperproliferação de fibroblastos que dificultam a maturação celular. De realçar que as alterações ao nível da LDH, marcador sérico de turnover celular, comprovam mieloproliferação clonal <sup>61</sup>.

## 5. BIOQUÍMICA

A química clínica está intimamente relacionada com a avaliação de parâmetros bioquímicos para o estudo da fisiologia e fisiopatologia humana. Estima-se que um terço das análises hospitalares sejam para determinações de parâmetros bioquímicos. Assim, devido ao elevado número de amostras torna-se crucial a aquisição de equipamento cada vez mais automatizado de forma a padronizar os resultados e a responder de forma rápida e eficiente. *Alinity c* é um sistema compacto para química clínica que maximiza a produtividade de ensaios fotométricos e potenciométricos. O tipo de reação pelo qual o analito é detetado poderá ser através de reações enzimáticas ou químicas, dependendo do parâmetro a ser determinado. As amostras analisadas com maior frequência são o soro e a urina, pela relativa facilidade de colheita, aliada à elevada panóplia de analitos associados a diversas funções ou reações fisiológicas. Em meio hospitalar poderão surgir outros fluidos biológicos dos quais líquidos cefalorraquídeo, sinovial, pleural, ascítico e líquido de diálise, usualmente para determinações de glucose e proteína.

A análise sumária da urina é uma avaliação importante no diagnóstico e *follow-up* de patologias renais e infeções do trato urinário. É caracterizada pelo exame físico-químico da urina e pela análise do seu sedimento. Na avaliação físico-química da urina, como o nome indica, são analisados parâmetros físicos (cor, densidade e turvação) e químicos (pH, urobilinogénio, hemoglobina, nitritos, glucose, proteínas, bilirrubina, corpos cetónicos e esterase de leucócitos). Por sua vez, a análise microscópica do sedimento urinário permite a visualização e deteção de células ou estruturas glicoproteicas como eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, cilindros hialinos, cilindros hialino-granulosos, bactérias, leveduras, muco e cristais (oxalato de cálcio, fosfato, urato, trifosfato). Por sua vez, como mencionado, nas amostras é possível avaliar diversos analitos, sendo que os principais estão evidenciados na Tabela 20.

**Tabela 20** – Principais determinações bioquímicas efetuadas em amostras de soro associados à respetiva correlação fisiopatológica.

| Parâmetro             | Reação   | Método                  | Função biopatológica associada                                 |                 |
|-----------------------|--|-------------------------|--|-----------------|
| Azoto ureico          | Enzimática (urease/glutamato   | Fotometria              | Função Renal   |                 |
| Creatinina            | Enzimática (Creatinase, Sarcosina oxidase e Peroxidase)                                    |                         |  |                 |
| Acido úrico           | Enzimática (Uricase/peroxidase)  |                         |  |                 |
| Sódio                 | Química  | Potenciometria indireta | Equilíbrio Hidro-eletrolítico<br>Equilíbrio Hidro-eletrolítico |                 |
| Potássio              | Química  |                         |  |                 |
| Cloro                 | Química  |                         |  |                 |
| ALT                   | Enzimática (Substratos: $\alpha$ -cetogluturato, L-alanina; enzima: lactato desidrogenase) | Fotometria              | Citólise   |                 |
| AST                   | Enzimática   |                         |  |                 |
| $\gamma$ -GT          | Enzimática (Substrato: L-gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida)                           |                         | Colestase  | Função Hepática |
| ALP                   | Enzimático (Substrato: Para-nitrofenil fosfato)  |                         |  |                 |
| Bilirrubina           | Química (Sal de diazónio)  |                         |  |                 |
| Proteínas totais      | Química (Método do biureto)  |                         | Síntese  |                 |
| Albumina              | Química (Verde de bromocresol)   |                         | Metabolismo ósseo  |                 |
| Cálcio                | Química (Arsenazo III)   |                         |  |                 |
| Magnésio              | Enzimática (Isocitrato desidrogenase)  |                         |  |                 |
| Fosforo               | Química (Fosfomolibdato)   |                         | Metabolismo dos Hidratos de Carbono                            |                 |
| Glucose               | Enzimática (hexocinase/G-6-fosfato deseidrogenase)   |                         |  |                 |
| Hemoglobina glicada   | -  | HPLC                    |  |                 |
| Colesterol total      | Enzimática   | Fotometria              | Perfil lipídico em associação com risco cardiovascular         |                 |
| Colesterol HDL        | Enzimática   |                         |  |                 |
| Colesterol LDL        | Enzimática   |                         |  |                 |
| Triacilgliceróis      | Enzimática (Glicerol fosfato oxidase)  |                         | Destrução celular  |                 |
| Creatina cinase       | Enzimática (Substrato: N-acetil-L-cisteína)  |                         |  |                 |
| Lactato desidrogenase | Enzimática (Substrato: Lactato)  |                         |  |                 |
| Proteína C Reativa    | -  | Imunoturbidimetria      | Inflamação e/ou infeção  |                 |

## 6. MICROBIOLOGIA

Os produtos biológicos analisados com maior frequência no setor da microbiologia são: urina, fezes, sangue, expetoração, aspirado e lavado brônquico, zaragatoa da orofaringe, exsudato e aspirado de ferida, pus de abscesso, biopsia, exsudato vaginal, líquidos cefalorraquidiano, sinovial, peritoneal e pleural. Também é comum a análise microbiológica de objetos que estejam em contacto com fluidos e tecidos corporais, analisando-se próteses, lentes de contacto e pontas de cateter. No presente relatório apenas se encontram resumidas as áreas da bacteriologia, micobactérias e parasitologia.

Em bacteriologia, a primeira etapa aquando da receção da amostra passa pela sua sementeira em meios de crescimento referenciados e realização de esfregaço para coloração de Gram. Os meios de cultura escolhidos, o tipo de inoculação da amostra, bem como as condições associadas à atmosfera e temperatura estão intimamente relacionadas com a amostra e os microrganismos potencialmente patogénicos que se pretende identificar. Passado o período de incubação, 18-24h para a maioria das amostras, procede-se à observação das primoculturas. É importante lembrar que, durante esta avaliação se deve ter em mente que algumas amostras biológicas têm uma microbiota associada ou que poderá ter ocorrido contaminação da amostra durante a colheita. Observadas as culturas, em associação com a análise do esfregaço corado pela coloração de Gram, é possível obter uma orientação para a identificação do microrganismo.

A identificação final do microrganismo, possível após crescimento de colónias puras e isoladas, é feita por espetrometria de massa MALDI-TOF. Esta metodologia permite a identificação do microrganismo que compõe a cultura pura pois as proteínas que o constituem são ionizadas e aceleradas por meio de uma carga elétrica, onde o tempo de voo das moléculas é detetado e reproduzido num espetro. Este é comparado com múltiplos espetros de uma base de dados de referência, resultando na sua identificação. Por fim, para a identificação da terapêutica a instituir é realizado o teste de suscetibilidade aos antibióticos (TSA) e a sua interpretação segundo as normas do EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). O resultado deste ensaio indica a que antimicrobianos é resistente e aos quais é suscetível, sendo que neste último é associado o valor da menor concentração de fármaco necessária para inibir o seu crescimento (concentração mínima inibitória).

Na área das micobactérias, as amostras preferencialmente estudadas são as do trato respiratório. Sabendo que estas amostras têm microbiota associada, recorre-se a processos de descontaminação e concentração, de modo a identificar os bacilos ácido-álcool resistentes. A sua identificação é feita pela observação ao microscópio ótico de lâminas coradas pela coloração de *Kinyoun* e pela observação, em meio de cultura, do crescimento de colónias com morfologia muito típica. Por fim, as micobactérias poderão ser identificadas por técnicas de análise molecular.

No que concerne à pesquisa de parasitas, as amostras mais analisadas são fezes, sangue e urina. O exame parasitológico das fezes inclui os exames macroscópico e microscópico da amostra. No primeiro, observa-se o aspeto das fezes: consistência, presença de sangue, muco ou até de vermes parasitários. O exame microscópico é realizado após

tratamento prévio da amostra, de modo a filtrar e extrair artefactos e recuperar elementos parasitários que estejam presentes. Do sedimento obtido, é feita a sua observação a fresco entre lâmina e lamela, utilizando as objetivas de 10x na pesquisa de larvas e ovos, e a objetiva de 40x, na identificação de quistos ou trofozoítos. A análise de amostras de sangue privilegia a análise de lâminas coradas do esfregaço de sangue e da gota espessa. A observação da lâmina com as objetivas de 50x e 100x é feita de modo a detetar e avaliar a morfologia dos parasitas encontrados.

## 7. CONCLUSÃO

O estágio realizado ao longo de cinco meses no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra foi fundamental no meu processo de formação profissional e pessoal. No que diz respeito à primeira vertente, o estágio foi importantíssimo no sentido de conferir uma excelente oportunidade diária de aplicação de conhecimentos obtidos ao longo da minha formação académica, especialmente, da componente teórica apreendida durante o primeiro ano do presente ciclo de estudos. O desafio de integrar uma equipa hospitalar de profissionais de saúde altamente competentes e exímios no seu trabalho foi excelente, uma vez que me permitiu absorver o conhecimento, teórico e prático transmitido, sentindo também o incentivo à autonomia e investigação, pela procura das bases científicas que fundamentam os procedimentos e metodologias aplicadas. Posso dizer que a exigência e o rigor são uma máxima neste laboratório, valores que contribuíram para uma evolução no sentido de responsabilidade, destreza prática, mas acima de tudo, uma vontade enorme de aprender de forma a poder ser útil à entidade que me acolhe.

Em condições adversas como as verificadas neste ano letivo com o aparecimento da pandemia, após o regresso ao estágio, foi requerida uma capacidade de adaptação a condições diversas, aplicando as normas estipuladas pela Direção Geral de Saúde, tendo contribuído para o meu crescimento pessoal. Por outro lado, a elaboração do presente relatório, aliada a todas as restantes condições atípicas exigiram da minha parte uma elevada capacidade de organização e disciplina, valências que anteriormente não possuía. Assim, o estágio permitiu adquirir, para além da importante experiência prática laboratorial, *soft skills* que me serão muito uteis na integração do mercado de trabalho.

Por fim, aquilo que considero que captou instantaneamente a minha atenção foi a extensa automatização laboratorial, inerente principalmente, a ambientes hospitalares onde se verifica um elevadíssimo fluxo de amostras e a exigência de tempos de resposta reduzidos. No entanto, fruto de diversas conversas com profissionais de diversos setores, pude perceber que todos partilham da mesma opinião: o aumento da automatização, apenas aliviou a carga de trabalho que anteriormente era mais manual, agudizando a necessidade de uma constante supervisão do controlo da qualidade e produção. Percebi que, apesar de ser tecnologia de topo, lhe estão inerentes falhas e que será sempre necessária a avaliação rigorosa e crítica por parte do analista clínico.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. KOTTKE-MARCHANT, Kandice; DAVIS, Bruce H. – **Laboratory Hematology Practice**. 1<sup>st</sup> Ed. Wiley-Blackwell, 2012. ISBN: 978-1-405-16218-0
2. TURGEON, Mary Louise - **Immunology and Serology in Laboratory Medicine**. 5<sup>th</sup> Ed. St Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2014. ISBN: 978-0-323-08518-2.
3. MCKENZIE, Shirlyn B.; WILLIAMS, J. Lynne - **Clinical Laboratory Hematology**. 3<sup>rd</sup> Ed. Pearson Education, 2016. ISBN: 978-1-292-08184-7.
4. POLLARD, K. Michael - **Autoantibodies and Autoimmunity: Molecular Mechanisms in Health and Disease**. 1<sup>st</sup> Ed. Weinheim: WILEY-VCH, 2006. ISBN: 978-3-527-31141-5.
5. MAJKA, Darcy S.; CHANG, Rowland W. - **Is Preclinical Autoimmunity Benign? The Case of Cardiovascular Disease**. Rheumatic Disease Clinics of North America. 40, 4 (2014), pp. 659-668.
6. SHOENFELD, Yehuda; MERONI, Pier Luigi; GERSHWIN, M. Eric – **Autoantibodies**. 3<sup>rd</sup> Ed. Kidlington, Oxford: Elsevier, 2014. ISBN: 978-0-444-56378-.
7. RAY Sayantan et al. - **Autoimmune Disorders: An Overview of Molecular and Cellular Basis in Today's Perspective**. Journal of Clinical and Cellular Immunology. (2012).
8. ROSE, Noel R.; MACKAY, Ian R. - **The Autoimmune Diseases**. 6<sup>th</sup> Ed. Academic Press Elsevier, 2020. ISBN: 978-0-12-812102-3
9. KOIVUNEN, Marja E.; KROGSRUD, Richard L. - **Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories**. Laboratory Medicine. 37, 8 (2006), pp. 490-497.
10. YU, Hye-Weon; HALONEN, Marilyn J.; PEPPER, Ian L. - **Immunological Methods**. In: PEPPER, Ian L.; GERBA, Charles P.; GENTRY, Terry J. Environmental Microbiology. Elsevier, 2015. ISBN: 978-0-12-394626-3, pp. 245-269.
11. MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R. - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 23<sup>rd</sup> Ed. St Louis, Missouri: Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-323-29568-0.

12. SHARMA A. et al. - **Immunological Techniques for Detection and Analysis**. In: BATT, Carl A.; TORTORELLO, Mary Lou. Encyclopedia of Food Microbiology, Academic Press Elsevier, 2014. ISBN: 978-0-12-384733-1, pp. 869-879.
13. BIANCHI-BOSISIO, A. - **PROTEINS | Physiological Samples**. In: WORSFOLD, Paul; TOWNSHEND, Alan; POOLE, Colin. Encyclopedia of Analytical Science, Elsevier, 2005. ISBN: 978-0-12-369397-6, pp. 357-375.
14. LUBRAN, Michael M. - **Quality control of gamma counters. I. Experimental evaluation of sources of error**. Annals of Clinical & Laboratory Science. 7,1 (1977), pp. 57-67.
15. JAKOWIUK Adrian et al. - **Laboratory automatic measuring system for gamma specimens**. Nukleonika. 57, 4 (2012), pp. 633–635.
16. JANDRESKI, Mark A. - **Chemiluminescence Technology in Immunoassays**. Laboratory Medicine. 29, 9 (1998), pp. 555-560.
17. STEINITZ, Michael - **Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols**. 1<sup>st</sup> Ed. Humana Press Springer, 2014. ISBN: 978-1-62703-585-9
18. TEBO, Anne E. - **Recent Approaches To Optimize Laboratory Assessment of Antinuclear Antibodies**. Clinical and Vaccine Immunology. 24, 12 (2017).
19. DAMOISEAUX Jan et al. - **Autoantibodies 2015: From diagnostic biomarkers toward prediction, prognosis and prevention**. Autoimmunity Reviews. 14, 6 (2015), pp. 555-563.
20. BUCHNER Carol et al. - **Anti-Nuclear Antibody Screening Using HEp-2 Cells**. Journal of Visualized Experiments. 88 (2014).
21. RICCHIUTI Vincent et al. - **Automated processing and evaluation of Anti-nuclear Antibody Indirect Immunofluorescence Testing**. Frontiers in Immunology. 9 (2018).
22. SACK Ulrich et al. - **Autoantibody Detection Using Indirect Immunofluorescence on HEp-2 Cells**. Annals of the New York Academy of Sciences. 1173, 1 (2009), pp. 166–173.
23. INVERNIZZI Pietro - **Antinuclear antibodies: General introduction**. In: SHOENFELD, Yehuda; GERSHWIN, M. Eric; MERONI, Pier Luigi. Autoantibodies. Kidlington, Oxford: Elsevier, 2007. ISBN: 9780444527639, pp. 129-133.

24. BANHUK Fernanda et al. - **Relationships among Antibodies against Extractable Nuclear Antigens, Antinuclear Antibodies, and Autoimmune Diseases in a Brazilian Public Hospital.** *Autoimmune Diseases.* 2018 (2018).
25. AKIKUSA, Jonathan; CHOO, Sharon - **Laboratory Investigations.** In: PETTY Ross et al. *Textbook of Pediatric Rheumatology.* Saunders, 2016. ISBN: 978-0-323-24145-8, pp. 117-128.
26. WENZEL Joerg et al. - **Antibodies targeting extractable nuclear antigens: historical development and current knowledge.** *British Journal of Dermatology.* 145 (2001), 859-867.
27. WALLACE, Daniel; HAHN, Bevra Hannahs – **Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes.** 9<sup>th</sup> Ed. Elsevier, 2019. ISBN 978-0-323-47927-1.
28. HIEPE, Falk; DÖRNER, Thomas; BURMESTER, Gerd-Rüdiger - **Editorial Overview: Antinuclear Antibody- and Extractable Nuclear Antigen-Related Diseases.** *International Archives of Allergy and Immunology.* 123 (2000), pp. 5-9.
29. CHAN Edward et al. - **Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015.** *Frontiers in Immunology.* 6, 412 (2015) pp. 1-13.
30. ALSUBKI Roua et al. - **Association between antinuclear antibodies (ANA) patterns and extractable nuclear antigens (ENA) in HEp-2 cells in patients with autoimmune diseases in Riyadh, Saudi Arabia.** *Intractable & Rare Diseases Research.* 9, 2 (2020), pp. 89-94.
31. SHOENFELD, Yehuda; CERVERA, Ricard; GERSHWIN, M. Eric - **Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases.** Totowa: Humana Press Springer, 2008. ISBN: 978-1-60327-427-2.
32. LAKOTA Katja et al. - **Autoantibodies against dsDNA measured with nonradioactive Farr assay—an alternative for routine laboratories.** *Clinical Rheumatology.* 14, 3 (2019), pp. 353-359.
33. ALSHAIKI Fatma et al. - **Outcomes of rituximab therapy in refractory lupus: A meta-analysis.** *European Journal of Rheumatology.* 5, 2 (2018), pp. 118–126.
34. EGNER, William - **The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE.** *Journal of Clinical Pathology.* 53, 6 (2000), pp. 424–432.

35. KEOGAN, Mary; KEARNS, Grainne; JEFFERIES, Caroline A. - **Extractable Nuclear Antigens and SLE: Specificity and Role in Disease Pathogenesis**. In: LAHITA, Robert. Systemic Lupus Erythematosus. Academic Press Elsevier, 2011. ISBN: 978-0-12-374994-9, pp. 259-274.
36. KEOHANE, Elaine; SMITH, Larry; WALENGA, Jeanine - **Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications**. 5<sup>th</sup> Ed. Saunders Elsevier, 2015. ISBN: 978-0-323-23906-6.
37. TURGEON, Mary Louise - **Clinical Hematology: Theory & Procedures**. 6<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Wolters Kluwe, 2018. ISBN: 978-1-496-33228-8.
38. YOUNG, Shauna C. Anderson; POULSEN, Keila B. – **Anderson's Atlas of Hematology**. 2<sup>nd</sup> Ed. Philadelphia: Wolters Kluwe, 2003. ISBN: 978-0-781-72662-7.
39. BUNN, H. Franklin; ASTER, Jon C - **Pathophysiology of Blood Disorders**. 1<sup>st</sup> Ed. The McGraw-Hill Companies, 2011. ISBN: 978-0-07-171377-1.
40. HOFFBRAND A. Victor et al. - **Postgraduate Haematology**. 7<sup>th</sup> Ed. Wiley-Blackwell, 2016. ISBN: 978-1-118-85432-7.
41. HOFFBRAND, A. Victor; MOSS Paul A. H. - **Hoffbrand's Essential Haematology**. 7<sup>th</sup> Ed. Wiley-Blackwell, 2015. ISBN: 978-1-118-40863-6.
42. BAIN, Barbara J.; BATES, Imelda; LAFFAN, Mike - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 12<sup>th</sup> Ed. Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-7020-6696-2.
43. WIWANITKIT, Viroj - **Plateletcrit, Mean Platelet Volume, Platelet Distribution Width: Its Expected Values and Correlation With Parallel Red Blood Cell Parameters**. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 10, 2 (2004), pp. 175–178.
44. SINGH, Abha; VARMA, Ruchi - **Role of Platelet Distribution Width (PDW) and Plateletcrit in the Assessment of Nonthrombocytopenic Preeclampsia and Eclampsia**. The Journal of Obstetrics and Gynecology of India. 68, 4 (2018), pp. 289–293
45. WAHED, Amer; DASGUPTA, Amitava - **Hematology and Coagulation: A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice**. 1<sup>st</sup> Ed. Elsevier, 2015. ISBN: 978-0-12-800241-4.
46. BAIN, Barbara J. - **Blood Cells: A Practical Guide**. 5<sup>th</sup> Ed. Wiley-Blackwell, 2015. ISBN: 978-1-118-81733-9.

47. GREER John P. et al. - **Wintrobe's Clinical Hematology**. 14<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Wolters Kluwe, 2019. ISBN: 978-1-496-34742-8.
48. HILLMAN, Robert S. et al. - **Hematology In Clinical Practice**. 5<sup>th</sup> Ed. The McGraw-Hill Companies, 2010. ISBN: 978-0-07-176653-1.
49. D'ONOFRIO, Giuseppe; ZINI, Gina - **Morphology of Blood Disorders**. 2<sup>nd</sup> Ed. Wiley-Blackwell, 2015. ISBN: 978-1-118-44260-9.
50. KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. – **Robbins and Cotran Pathologic Basis Of Disease**. 10<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Elsevier, 2020. ISBN: 978-0-323-53113-9
51. BATES, Shannon M.; WEITZ, Jeffrey I. – **Coagulation Assays**. *Circulation*. 112, 4 (2005), pp. e53-e60.
52. MILOS, Marija et al. - **Evaluation and performance characteristics of the coagulation system: ACL TOP analyzer - HemosIL reagents**. *The International Journal of Laboratory Hematology*. 31, 1 (2009), pp. 26-35.
53. TRIPODI, Armando - **D-Dimer Testing in Laboratory Practice**. *Clinical Chemistry*. 57, 9 (2011), pp. 1256-1262.
54. FAVALORO, Emmanuel J.; LIPPI, Giuseppe - **Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols**. 1<sup>st</sup> Ed. New York: Humana Press Elsevier, 2017. ISBN: 978-1-4939-7194-7.
55. KEY, Nigel S.; MAKRIS, Michael; LILLICRAP, David - **Practical Hemostasis and Thrombosis**. 3<sup>rd</sup> Ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2016. ISBN: 9781118344743.
56. SABA, Hussain I.; ROBERTS, Harold R. - **Hemostasis and Thrombosis: Practical Guidelines in Clinical Management**. 1<sup>st</sup> Ed. Wiley-Blackwell, 2014. ISBN: 978-0-470-67050-7.
57. DELOUGHERY, Thomas G. - **Hemostasis and Thrombosis**. 3<sup>rd</sup> Ed. Springer, 2015. ISBN: 978-3-319-09311-6.
58. PENGO Vittorio et al. - **Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection**. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 7, 10 (2009), pp. 1737-1740.
59. RASOOL, Zoab S.; TIWARI, Vivekanand. - **Biochemistry, Lupus Anticoagulant**. Treasure Island, Florida: StatPearls, 2020. Updated 23 July 2020. [Acedido a 20 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544357/>.

60. MARDE Victor J. et al. - **Hemostasis and Thrombosis Basic Principles and Clinical Practice**. 6<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Wolters Kluwe, 2013. ISBN: 978-1-60831-906-0.
61. SHAH Sahrish et al. - **Marked elevation of serum lactate dehydrogenase in primary myelofibrosis: clinical and prognostic correlates**. Blood Cancer Journal. 7, 12 (2017).
62. DOBROWOLSKI Jerome et al. - **Persistent Basophilia May Suggest an “Accelerated Phase” in the Evolution of CALR-Positive Primary Myelofibrosis Toward Acute Myeloid Leukemia**. Frontiers in Oncology. 9, 872 (2019).

# **ANEXOS**



**Anexo I** – Orientação para o estudo e diagnóstico, no SPC-CHUC, de doenças autoimunes. (Material cordialmente cedido pelo setor da Imunologia © 2020, SPC-CHUC.)



| ESTUDO E MONITORIZAÇÃO DE DOENÇAS AUTOIMUNES   |  |
|--|--|
| Parâmetro  | Metodologia/Equipamento  |
| <b>DOENÇAS AUTOIMUNES DO TECIDO CONJUNTIVO</b>   |  |
| Identificação de anticorpos dirigidos aos antígenos:<br>- DFS70, SS-A, SS-B, Ro-52, Scl-70, Jo-1, CENP B, PCNA, dsDNA, nucleossomas, histonas, proteína P ribossomal, AMA M2, RNP/Sm e Sm                    | Immunoblotting (EUROblotOne®)  |
| <b>ESCLEROSE SISTÊMICA</b>   |  |
| Identificação de anticorpos dirigidos aos antígenos:<br>- Scl-70, CENP A, CENP B, RP11, RP155, fibrilarina, NOR90, Th/To, PM-Scl-100, PM-Scl-75, Ku, PDGFR e Ro- 52  | Immunoblotting (EUROblotOne®)  |
| <b>VASCULITES</b>  |  |
| Anticorpos Anti-Citoplasma de Neutrófilo (ANCA)  | IFI (IF Sprinter®)<br>Substrato: Neutrófilos fixados com etanol e formalina  |
| Avaliação do padrão de imunofluorescência: Peri nuclear (P), Citoplasmática (C) ou peri nuclear atípica (x);<br>- Confirmação do padrão x-ANCA - identificação definitiva em neutrófilos fixados com metanol |  |
| Anticorpos Anti-Mieloperoxidase (MPO)  | FEIA (Immunocap 250®)  |
| Anticorpos Anti-Proteínase 3 (PR3)   |  |
| Anticorpos Anti-Membrana Basal Glomerular  | CLIA (Bioflash®) / Immunoblotting (EUROblotOne®)   |
| <b>AUTOANTICORPOS NA ANEMIA PERNICIOSA</b>   |  |
| Anticorpos Anti-Células Parietais Gástricas  | IFI (IF Sprinter®)<br>Substrato: Cortes de estômago, rim e fígado de rato e cortes de estômago de macaco (Confirmatório) |
| Anticorpos Anti-Fator Intrínseco   | ELISA (Analyzer I®)  |
| <b>AUTOANTICORPOS NA DIABETES MELLITUS</b>   |  |
| Anticorpos Anti-Células dos Ilhéus de Langherans (ICA)<br>Anticorpos Anti-Descarboxilase do Ácido-Glutâmico (GAD65)<br>Anticorpos Anti-Proteína Tirosina Fosfatase (IA2)                                     | CLIA (MAGLUMI 800®)  |
| Anticorpos Anti-Insulina   | Técnica manual + RIA (Wallac Wizard 1470® Automatic Gamma Counter)   |
| <b>AUTOANTICORPOS NA DOENÇA DE ADDISON</b>   |  |
| Anticorpos Anti-Supra-Renal  | IFI (Mago 4®)<br>Substrato: Cortes de glândula supra-renal de macaco   |
| Anticorpos Anti-21 Hidroxilase   | Técnica manual + ELISA (Mago 4®)   |
| <b>AUTOANTICORPOS NAS MIOSITES</b>   |  |
| Identificação de anticorpos dirigidos a antígenos:<br>- PL7, PL12, Jo1, SRP, PMScl 75 e 100, Ku, Mi2, OJ, EJ, SAE1, NXP2, MDA5 e TIF1g   | Immunoblotting (EUROblotOne®)  |
| <b>AUTOANTICORPOS NAS DERMATOSES AUTOIMUNES</b>  |  |
| Anticorpos anti-pele (substância intercelular, membrana basal epiderme)  | IFI (IF Sprinter®)<br>Substrato: Mosaico dermatológico   |
| Anticorpos Anti-Desmogleína 1/Anti-Desmogleína 3<br>Anticorpos Anti-BP180 / Anti-B230  | ELISA (Analyzer I®)  |

| DOENÇA HEPÁTICA AUTOIMUNE  |   |
|--|---|
| PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE AUTOANTICORPOS ASSOCIADOS A HEPATITE AUTOIMUNE   |   |
| Anticorpos Anti-Músculo Liso (ASMA)<br>Anticorpos Anti-F Actina  | IFI (IF Sprinter®)<br>Substrato: Cortes de mucosa gástrica, rim, fígado de rato e células de cultura da aorta de rato (VSM)   |
| Anticorpos Anti-LKM (Liver Kidney Microsomal Antigen)<br>Anticorpos Anti-LC1 (Liver Cytosol Type 1)  | IFI (IF Sprinter®)<br>Substrato: Cortes de mucosa gástrica, rim, fígado de rato e células de cultura da aorta de rato (VSM)<br>ELISA (Analyzer I®)<br>Immunoblotting (EUROblotOne®) |
| Anticorpos Anti-Antigénio Hepático Solúvel e Pancreático (SLA/LP)  | ELISA (Analyzer I®)<br>Immunoblotting (EUROblotOne®)  |
| PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE AUTOANTICORPOS ASSOCIADOS A COLANGITES   |   |
| Anticorpos Anti Mitocondriais  | IFI (IF Sprinter®)<br>Substrato: Cortes de mucosa gástrica, rim, fígado de rato e células de cultura da aorta de rato (VSM)   |
| Anticorpos Anti-Piruvato Desidrogenase (IgG)- M2   | ELISA (Analyzer I®) / FEIA (Immunocap 250®)   |
| Identificação de anticorpos dirigidos aos antigénios:<br>- AMA-M2, M2-3E, Sp 100, PML, Gp 210, LKM-1, LC-1, SLA/LP, SS-A, Ro-52, SCL-70, CENP A, CENP B e PGDH | Immunoblotting (EUROblotOne®)   |
| AUTOANTICORPOS NO SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO   |   |
| Anticorpos Anti-Cardiolipinas (IgG, IgM)   | CLIA (Bioflash®) – Screening  |
| Anticorpos Anti-β2-Glicoproteína I (IgG, IgM)  | & ELISA (Mago 4®) - Amostras positivas por CLIA   |
| AUTOANTICORPOS DA DOENÇA CELÍACA   |   |
| Anticorpos Anti-Transglutaminase Tecidual (IgA e IgG)<br>Anticorpos Anti-Gliadina Deaminada (IgA e IgG)  | FEIA (Immunocap 250®)   |
| Anticorpos Anti-Endomísio (IgA e IgG)  | IFI (Mago 4®)<br>Substrato: Cortes de fígado de primata   |
| AUTOANTICORPOS NA ARTRITE REUMATÓIDE   |   |
| Anticorpos Anti Peptídeo Citrulinado Cíclico (CCP)   | FEIA (Immunocap 250®)   |
| AUTOANTICORPOS NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL   |   |
| Anticorpos Anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) (IgA e IgG)  | ELISA (Mago 4®)   |
| Anticorpos Anti x-ANCA   | IFI (Mago 4®)<br>Substrato: Neutrófilos fixados em metanol  |

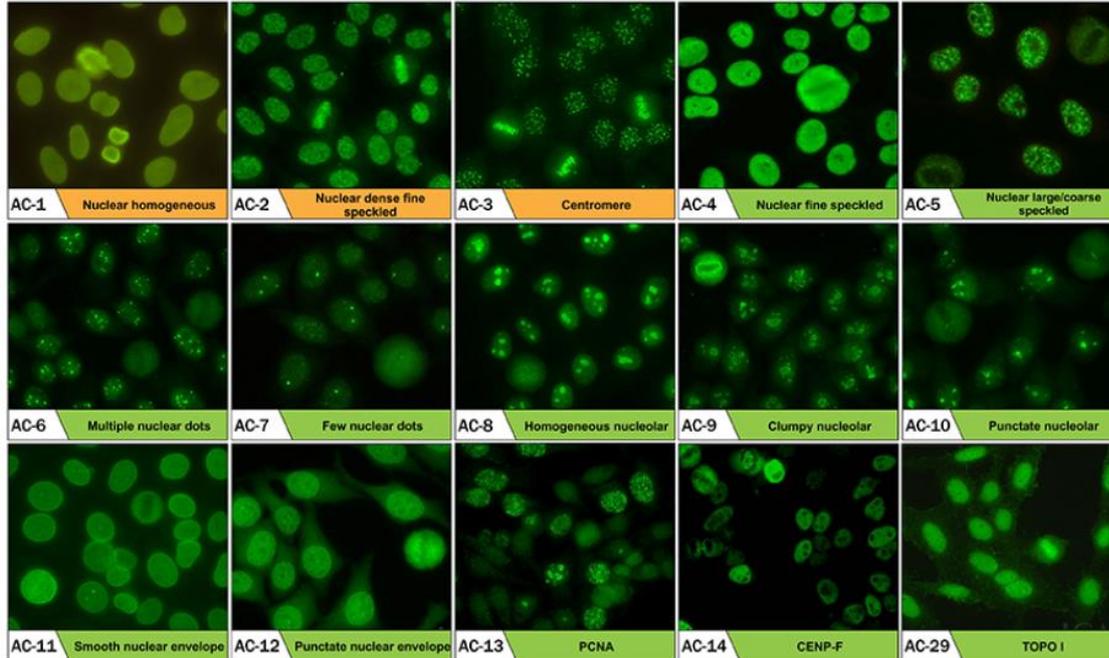
| AUTOANTICORPOS NA MIASTENIA GRAVIS  |   |
|---|---|
| Anticorpos Anti Músculo Estriado  | IFI (IF Sprinter®)<br>Substrato: Músculo iliopsoas de macaco          |
| Anticorpos Anti Receptor da Acetilcolina<br>Anticorpos Anti-MuSK  | Técnica manual + RIA (Wallac Wizard 1470® Automatic<br>Gamma Counter) |
| AUTOANTICORPOS NAS POLINEUROPATIAS AUTOIMUNES   |   |
| Identificação de anticorpos IgM e IgG dirigidos aos<br>antígenos Gangliosídeos:<br>- GQ1b, GT1b, GD1b, GD1a, GM3, GM2, GM1)   | Immunoblotting (EUROblotOne®)   |
| AUTOANTICORPOS NOS SÍNDROMES PARANEOPLÁSICOS  |   |
| Identificação de anticorpos IgG dirigidos aos<br>seguintes antígenos Neurais:<br>- Hu, Yo, Ri, PNMA2/Ta, CV2.1, Anfifisina,<br>recoverin, SOX1, Titina, GAD65, Zic4, Tr | Immunoblotting (EUROblotOne®)   |

Laboratório de Autoimunidade

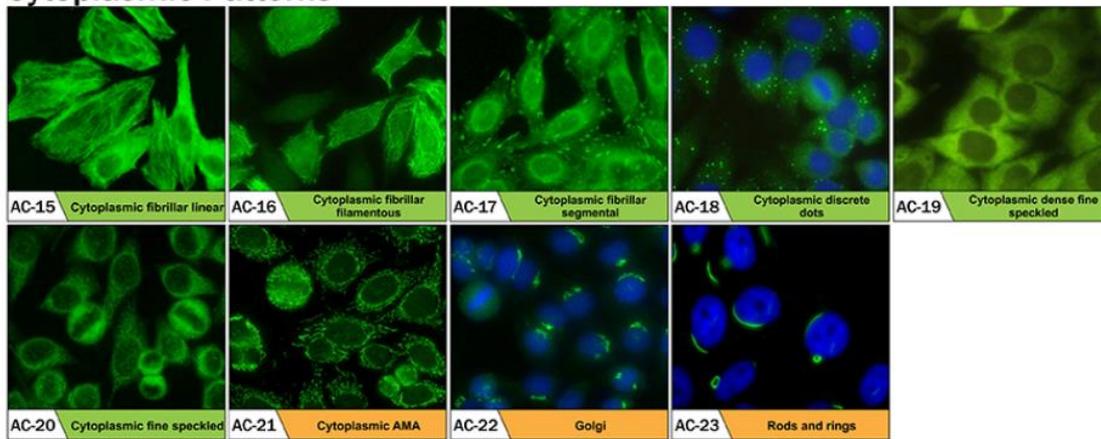
SPC-CHUC

Ano de 2020

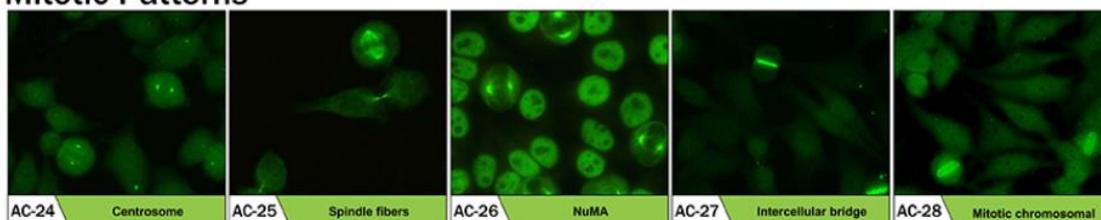
### Nuclear Patterns



### Cytoplasmic Patterns



### Mitotic Patterns



Expert-level report Competent-Level

Copyright @ ICAP - 2018

Anexo 2 – Padrões de fluorescência correspondentes aos ANA.