

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE FÁRMACIA**



**RELATORIO DE ESTÁGIO**  
**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

Ana Catarina Branco Aleixo

**LISBOA, 2013**

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE FÁRMACIA**



**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**

INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DE LISBOA FRANCISCO GENTIL, E.P.E

**ORIENTAÇÃO:**

DR.<sup>a</sup> MARIA CESALTINA LOURENÇO – IMUNOLOGIA

DR.<sup>a</sup> CIDÁLIA VIEIRA – BIOQUÍMICA

DR.<sup>a</sup> CARMO ORNELAS - VIROLOGIA

LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS NOVA ERA – LUZ

**ORIENTAÇÃO:**

DR. CARLOS COUTO MARQUES – HEMATOLOGIA

**MONOGRAFIA**

FACTORES DE RISCO DA TROMBOSE – AVALIAÇÃO LABORATORIAL

**ORIENTAÇÃO:**

PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> MARIA CRISTINA MARQUES

**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

Ana Catarina Branco Aleixo

**LISBOA, 2013**



**Relatório de Estágio e Monografia do  
Mestrado em Análises Clínicas**

**2013**

Ana-Catarina-Branco-Aleixo

## ÍNDICE

**I. Relatório de Estágio**

	<b>Pág.</b>
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. FASE PRÉ-ANALÍTICA</b>	<b>5</b>
<b>2.1. COLHEITA DE AMOSTRAS</b>	<b>5</b>
2.1.1. Colheita de Sangue	7
2.1.2. Colheita de Urina	9
2.1.3. Colheita de Outros Líquidos Biológicos	9
<b>3. IMUNOLOGIA</b>	<b>10</b>
<b>3.1. IMUNOQUÍMICA</b>	<b>11</b>
3.1.1. Nefelometria	11
3.1.1.1. Proteínas Doseadas no Laboratório de Imunologia	12
3.1.2. Electroforese	17
3.1.2.1. Electroforese das Proteínas Séricas	18
3.1.2.2. Electroforese de Hemoglobinas	19
3.1.3. Imunofixação	22
3.1.3.1. Pesquisa da Proteína de Bence Jones	23
3.1.4. Estudo das Proteínas do LCR	23
3.1.4.1. Imunofixação do LCR	24
3.1.5. Pesquisa de Crioglobulinas	25
<b>3.2. MARCADORES TUMORAIS</b>	<b>25</b>
3.2.1. Electroquimioluminescência	26
3.2.1.1. Parâmetros	27
<b>3.3. SEROLOGIA</b>	<b>28</b>
3.3.1. Serologia para <i>Salmonella</i>	29
3.3.2. Serologia para <i>Brucella</i>	30
3.3.3. Serologia para a Mononucleose Infecciosa	32
3.3.4. Serologia para <i>Echinococcus granulosos</i>	33

	Pág.
<b>ÍNDICE (CONTINUAÇÃO)</b>	
3.3.5. Titulação do Factor Reumatóide	34
3.3.6. Serologia para <i>Treponema pallidum</i>	35
3.3.7. Serologia para <i>Rickettsia conorii</i>	39
3.3.8. Serologia para <i>Aspergillus</i>	39
3.3.9. Serologia para <i>Streptococcus pyrogenes</i>	40
<b>3.4. AUTOIMUNIDADE</b>	<b>40</b>
3.4.1. Imunofluorescência Indirecta	41
3.4.2. Imunoensaios Enzimáticos	46
3.4.2.1. Immunoblot	46
3.4.2.2. MicroELISA	47
3.4.3. Doseamento do Factor Reumatóide	48
<b>4. BIOQUÍMICA</b>	<b>49</b>
<b>4.1. METODOLOGIA</b>	<b>50</b>
4.1.1. Espectrofotometria	50
4.1.2. Quimioluminescência	50
4.1.3. Turbidimetria	51
4.1.4. Potenciometria	51
<b>4.2. METABOLISMO DOS LÍPIDOS</b>	<b>52</b>
4.2.1. Colesterol Total	52
4.2.2. Triglicéridos	53
4.2.3. Lipoproteínas	53
4.2.3.1. Colesterol HDL	54
4.2.3.2. Colesterol LDL	54
<b>4.3. METABOLISMO ÓSSEO E MINERAL</b>	<b>55</b>
4.3.1. Cálcio	56
4.3.2. Fósforo	56
4.3.3. Magnésio	56
<b>4.4. EQUILÍBRIO ELECTROLÍTICO E ÁCIDO-BASE</b>	<b>57</b>
4.4.1. Ionograma	57
4.4.2. Gasometria Arterial	59
<b>4.5. FUNÇÃO RENAL</b>	<b>61</b>
4.5.1. Ácido Úrico	62
4.5.2. Creatinina	62
4.5.3. Ureia	62

## ÍNDICE (CONTINUAÇÃO)

	Pág.
<b>4.6. FUNÇÃO HEPÁTICA E BILIAR</b>	<b>63</b>
4.6.1. Aminotransferases – Alanina Aminotranferase e Aspartato Aminotransferase	64
4.6.2. Fosfatase Alcalina	65
4.6.3. Gama-glutamil Transferase	65
4.6.4. Bilirrubina Directa e Bilirrubina Total	66
<b>4.7. METABOLISMO DO FERRO</b>	<b>67</b>
<b>4.8. METABOLISMO DOS HIDRATOS DE CARBONO</b>	<b>68</b>
4.8.1. Glucose	68
4.8.2. HemoglobinaA <sub>1c</sub>	69
<b>4.9. FUNÇÃO MUSCULAR</b>	<b>70</b>
4.9.1. Creatina Quinase	70
4.9.2. Lactato Desidrogenase	70
<b>4.10. FUNÇÃO PANCREÁTICA</b>	<b>71</b>
4.10.1. Amilase	71
<b>4.11. PROTEÍNAS</b>	<b>72</b>
4.11.1. Proteínas Totais	72
4.11.2. Proteínas Urina/Líquido Cefalorraquidiano	73
4.11.3. Albumina	74
4.11.4. Proteína C Reactiva	74
4.11.5. β <sub>2</sub> -Microglobulina	75
4.11.6. Imunoglobulinas	76
<b>4.12. MARCADORES TUMORAIS</b>	<b>77</b>
<b>4.13. MARCADORES DE ANEMIA</b>	<b>79</b>
<b>4.14. MARCADORES CARDÍACOS</b>	<b>80</b>
<b>4.15. MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE FÁRMACOS</b>	<b>82</b>
<b>4.16. ANÁLISE DE URINA TIPO II</b>	<b>85</b>
4.16.1. Exame Físico e Químico da Urina	85
4.16.2. Exame Microscópico do Sedimento Urinário	92
<b>5. VIROLOGIA</b>	<b>99</b>
<b>5.1. MÉTODOS DE DETECÇÃO INDIRECTA</b>	<b>100</b>
5.1.1. Herpesvírus	100
5.1.2. Hepatites Víricas	106
5.1.3. Retrovírus	111
5.1.4. Testes Confirmatórios	112

**ÍNDICE (CONTINUAÇÃO)**

	<b>Pág</b>
<b>5.2. MÉTODOS DE DETECÇÃO DIRECTA</b>	<b>113</b>
5.2.1. Detecção e Tipagem do Vírus do Papiloma Humano	113
<b>6. CONTROLO DE QUALIDADE</b>	<b>115</b>
<b>6.1. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO (CQI)</b>	<b>115</b>
6.1.1. Laboratório de Imunologia	117
6.1.2. Laboratório de Bioquímica	123
6.1.3. Laboratório de Virologia	127
<b>6.2. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE (AEQ)</b>	<b>132</b>
6.2.1. Laboratório de Imunologia	133
6.2.2. Laboratório de Bioquímica	134
6.2.3. Laboratório de Virologia	135
<b>7. HEMATOLOGIA</b>	<b>138</b>
<b>7.1. HEMOGRAMA</b>	<b>139</b>
7.1.1. Esfregaço de Sangue Periférico	143
<b>7.2. CONTAGEM MANUAL DE RETICULÓCITOS</b>	<b>145</b>
<b>7.3. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO</b>	<b>147</b>
<b>7.4. ESTUDO DA HEMOSTASE</b>	<b>149</b>
7.4.1. Avaliação da Função Plaquetária	150
7.4.2. Avaliação Global da Coagulação	151
<b>7.5. PESQUISA DE AGLUTININAS FRIAS</b>	<b>154</b>
<b>7.6. HEMATOLOGIA – ALGUMAS CONSIDERAÇÕES</b>	<b>155</b>
<b>7.7. CONTROLO DE QUALIDADE</b>	<b>157</b>
7.7.1. Controlo de Qualidade Interno	157
7.7.2. Avaliação Externa da Qualidade	158
<b>8. CONCLUSÃO</b>	<b>159</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>160</b>

**ÍNDICE (CONTINUAÇÃO)****II. Monografia**

	<b>Pág</b>
LISTA DE ABREVIATURAS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>161</b>
<b>2. HEMOSTASE</b>	<b>164</b>
<b>2.1.</b> Avaliação Laboratorial da Função hemostática	166
<b>3. ETIOLOGIA DA TROMBOSE</b>	<b>168</b>
<b>3.1.</b> Alterações no Fluxo Sanguíneo	169
<b>3.2.</b> Lesão no Endotélio Vascular	169
<b>3.3.</b> Alterações na Natureza dos Constituintes Sanguíneos	170
<b>4. FACTORES DE RISCO</b>	<b>171</b>
<b>4.1.</b> Factores de Risco Adquiridos	172
<b>4.2.</b> Factores de Risco Hereditários	178
<b>5. AVALIAÇÃO LABORATORIAL DAS TROMBOFILIAS</b>	<b>186</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>192</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>193</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**AC** – anticorpo

**AEFA** – *Asociación Española de Farmacéuticos Analistas*

**AEQ** – Avaliação Externa da Qualidade

**AFP** –  $\alpha$ -Fetoproteína

**AgHBe** – antigénio de replicação viral

**AgHBs** – antigénio de superfície do HBV

**ALP** – fosfatase alcalina (do inglês, *alkaline phosphatase*)

**ALT** – alanina aminotransferase

**AMA** – anticorpos anti-mitocôndria (do inglês, *anti-mitochondrial antibodies*)

**ANA** – anticorpos anti-nucleares (do inglês, *anti-nuclear antibodies*)

**ANCA** – anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos (do inglês, *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*)

**Anti-HBc** – anticorpos anti-antigénio do *core* do HBV

**Anti-HBc IgM** – anticorpos IgM anti-antigénio do *core* do HBV

**Anti-HBe** – anticorpos anti-antigénio de replicação viral

**Anti-HBs** – anticorpos anti-antigénio de superfície do HBV

**anti-LKM** – anticorpos anti-microsomas hepáticos e renais (do inglês, *anti-liver, kidney microsomal antibodies*).

**AO** – Assistentes Operacionais

**APA** – anti-fosfolípidos (do inglês, *anti-phospholipid antibody*)

**APCA** – anticorpos anti-célula parietal (do inglês, *anti-parietal cell antibodies*)

**aPTT** – tempo de tromboplastina parcial activada (do inglês, *activated partial thromboplastin time*)

**AR** – artrite reumatóide

**ASMA** – anticorpos anti-músculo liso (do inglês, *anti-smooth muscle antibodies*)

**AST** – aspartato aminotransferase

**AT** – Assistentes Técnicos

**BHE** – barreira hematoencefálica

**CA** – antigénio carcinogénico (do inglês, *cancer antigen*)

**CA** – Conselho de Administração

**CEA** – antigénio carcinoembrionário (do inglês, *carcinoembryonic antigen*)

**CHGM** – concentração de hemoglobina globular média

**CID** – coagulação intravascular disseminada

**CK** – creatina quinase (do inglês, *creatine kinase*)

**CK-MB** – isoenzima MB da creatina-quinase

**LISTA DE ABREVIATURAS (CONTINUAÇÃO)**

- CL** – *clearance* da creatinina
- CLIA** – Imunoensaio por Quimioluminescência (do inglês, *Chemiluminescent Immunoassay*)
- CMIA** – quimioluminescência (do inglês, *chemiluminescent magnetic immunoassay*)
- CMV** – Citomegalovírus
- CQI** – Controlo de Qualidade Interno
- DDCT** – *diabetes control and complications trial*
- DDL** – Departamento de Diagnóstico Laboratorial
- DM** – dermatomiosite
- DNA** – ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
- dsDNA** – *double-stranded DNA*
- EA(D)** – antigénio precoce difuso (do inglês, *early antigen-diffuse*)
- EAM** – enfarte agudo do miocárdio
- EBNA-1** – anticorpos anti-antigénio nuclear do Vírus Epstein-Barr (do inglês, *Epstein-Barr Virus nuclear antigen-1*)
- EBV** – vírus de Epstein-Barr (do inglês, *Epstein-Barr virus*)
- EIA** – ensaio imunoenzimático (do inglês, *Enzyme Immunoassay*)
- ELISA** – *enzyme-linked immunosorbent assay*
- ENA** – antigénios nucleares extraíveis (do inglês, *extractable nuclear antigens*)
- f.e.m.** – força electromotriz
- F-actina** – filamentos de actina
- FFUL** – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
- FI** – factor intrínseco
- FLC** – cadeias leves livres (do inglês, *free light chain*)
- FPIA** – imunoensaio de fluorescência polarizada (do inglês, *fluorescence polarization immunoassay*)
- FTA-ABS** – *fluorescent treponemal antibody absorption*
- G6PDH** – enzima glucose-6-fosfato desidrogenase
- GFR** – taxa de filtração glomerular (do inglês, *glomerular filtration rate*)
- GGT** –  $\gamma$ -glutamil transferase
- GQR** – Gestão da Qualidade e Risco
- GV** – glóbulos vermelhos
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogénio
- HAV** – Vírus da Hepatite A (do inglês, *Hepatitis A Virus*)
- Hb** – hemoglobina
- HBV** – Vírus da Hepatite B (do inglês, *Hepatitis B Virus*)

**LISTA DE ABREVIATURAS (CONTINUAÇÃO)**

- HCV** – Vírus da Hepatite C (do inglês, *Hepatitis C Virus*)
- HDL** – lipoproteínas de alta densidade (do inglês, *high-density lipoprotein*)
- Hep-2** – células Hep-2 (do inglês, *human epithelial cell line: type 2*)
- HGM** – hemoglobina globular média
- HHV** – Herpesvírus Humano (do inglês, *Human Herpes Virus*)
- HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, *Human Immunodeficiency*)
- HLA** – antígenos leucocitários de classe 1 (do inglês, *human leukocyte antigen*)
- HPLC** – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)
- HPV** – Vírus do Papiloma Humano (do inglês, *Human Papillomavirus*)
- HSV** – Vírus Herpes Simplex (do inglês, *Herpes Simplex Virus*)
- Ht** – hematócrito
- HTLV** – Vírus T-linfotrópico Humano (do inglês, *Human T-lymphotropic Virus*)
- ICSH** – *International Council for Standardization in Hematology*
- IFI** – Imunofluorescência Indirecta
- Ig** – imunoglobulina
- INR** – *International Normalized Ratio*
- INSTAND e. V.** – *Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in Medizinischen Laboratorien e. V*
- IPAC** – Instituto Português de Acreditação
- IPOFG, E.P.E** – Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, E.P.E.
- ISE** – eléctrodo selectivo de iões (do inglês, *ion-selective membrane electrode*)
- ISI** – *International Sensitivity Index*
- Jo-1** – *Histidyl-tRNA synthetase*
- K3EDTA** – ácido etilenodiaminotetra-acético tri-potássio (do inglês, *tripotassium ethylenediamine tetraacetic acid*)
- LCR** – líquido cefalorraquidiano
- LD** – lactato desidrogenase
- LDL** – lipoproteínas de baixa densidade (do inglês, *low-density lipoprotein*)
- LED** – díodos de emissão de luz (do inglês, *light-emitting diode*)
- LES** – lúpus eritematoso sistémico
- MAC** – Mestrado em Análises Clínicas
- MCTD** – doença conectiva mista do tecido conjuntivo
- MGG** – *May-Grünwald-Giemsa*

**LISTA DE ABREVIATURAS (CONTINUAÇÃO)**

- MI** – mononucleose infecciosa
- MNI** – mononucleose infecciosa
- MPO** – mieloperoxidase
- MT** – marcadores tumorais
- NA** – não aplicável
- NC** – número de computador
- NCEP** – *National Cholesterol Education Program*
- NSE** – Enolase neuro-específica (do inglês, *neuron specific enolase*)
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- pCO<sub>2</sub>** – pressão parcial de dióxido de carbono
- PCR** – *polymerase chain reaction*
- PCR** – proteína C reactiva
- PDW** – coeficiente de dispersão plaquetária (do inglês, *Platelet Distribution Width*)
- PETINIA** – imunoensaio turbidimétrico homogéneo do tipo *microparticle-enhanced* (do inglês, *particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay*)
- PM** – polimiosite
- PNAEQ** – Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade
- pO<sub>2</sub>** – pressão parcial de oxigénio
- PSA** – antigénio específico da próstata - Total (do inglês, *prostate specific antigen*)
- QCMD** – *Quality Control Molecular Diagnostics*
- RA** – artrite reumatóide (do inglês, *rheumatoid arthritis*)
- RbP** – proteína de transporte do retinol (do inglês, *Retinol-binding Protein*)
- RDW** – coeficiente de dispersão eritrocitária (do inglês, *Red Cell Distribution Width*)
- RFLP** – *restriction fragment length polymorphism*
- RIQAS** – *Randox International Quality Assessment Scheme*
- RLUs** – unidades de luz relativas (do inglês, *relative light units*)
- RNA** – ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)
- RNP** – *ribonucleoprotein*
- rpm** – rotações por minuto
- RPR** – *rapid plasma reagin*
- SAP** – Serviço de Anatomia Patológica
- SCC** – antigénio de carcinoma de células escamosas (do inglês, *squamous cell carcinoma*)
- Scl70** – *Scleroderma antigen – 70 kDa*
- SIDA** – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- SLS** – lauril sulfato de sódio (do inglês, *sodium lauryl sulfate*)

**LISTA DE ABREVIATURAS (CONTINUAÇÃO)**

**Sm** – *Smith*

**SNC** – sistema nervoso central

**SNS** – Sistema Nacional de Saúde

**SPC** – Serviço de Patologia Clínica

**SS** – Síndrome de Sjögren

**SSA/Ro** – *Sjögren's syndrome – antigen A/index patient with anti-SSA antibody*

**SSB/La** – *Sjögren's syndrome – antigen B/ index patient with anti-SSB antibody*

**TASO** – anti-estreptolisina O

**TE** – erro total (do inglês, *Total Error*)

**Tea** – erro total admissível (do inglês, *allowable Total Error*)

**TMB** – tetrametilbenzidina

**TMP** – proteína transmembranar (do inglês, *transmembrane protein*)

**TP** – tempo de protrombina

**TPHA** – *treponema pallidum hemagglutination*

**UIBC** – capacidade não saturada de ligação do ferro (do inglês, *unsaturated iron binding capacity*)

**UK NEQAS** – *UK National External Quality Assessment Scheme*

**VCA** – antigénio da cápside viral (do inglês, *viral capsid antigen*)

**VDRL** – *Veneral Disease Research Laboratory*

**VGM** – volume globular médio

**LDL** – lipoproteínas de muito baixa densidade (do inglês, *very-low-density lipoprotein*)

**VPM** – volume plaquetário médio

**VS** – velocidade de sedimentação

**VSM47** – células musculares lisas (do inglês, *vascular smooth muscle*)

**VZV** – Vírus da Varicela Zoster (do inglês, *Varicella Zoster Virus*)

**WHO** – *World Health Organization*

**ÍNDICE DE FIGURAS**

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> – Fluxograma do Processo de Avaliação das Amostras.	7
<b>Figura 2.</b> – Perfil electroforético do soro de um indivíduo normal e respectivas fracções de proteínas.	18
<b>Figura 3.</b> – Padrões de fluorescência nuclear detectados em células HEp-2.	43
<b>Figura 4.</b> – Neutrófilos fixados com etanol, permitindo distinguir dois padrões de fluorescência.	46
<b>Figura 5.</b> – Exemplos de alguns elementos celulares presentes no sedimento urinário, observados ao Microscópio Óptico.	94
<b>Figura 6.</b> – Cilindro hialino presente no sedimento urinário, observado ao Microscópio Óptico.	96
<b>Figura 7.</b> – Exemplos de alguns cristais presentes no sedimento urinário, observados ao Microscópio Óptico.	97
<b>Figura 8.</b> – Perfil serológico da infecção por HBV.	110

**ÍNDICE DE TABELAS**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.</b> – Setores do Laboratório de Imunologia e respectivas metodologias.	10
<b>Tabela 2.</b> – Propriedades dos diferentes isotipos de imunoglobulinas humanas.	15
<b>Tabela 3.</b> – Padrões nucleares mais comuns e respectiva correlação clínica.	43
<b>Tabela 4.</b> – Significado clínico dos anticorpos pesquisados em substrato triplo, realçando as patologias onde aparecem títulos mais elevados	44
<b>Tabela 5.</b> – Sectores do Laboratório de bioquímica e respectivas metodologias.	49
<b>Tabela 6.</b> – Significado clínico dos lípidos e das lipoproteínas.	55
<b>Tabela 7.</b> – Significado clínico dos parâmetros envolvidos nos metabolismos ósseo e mineral.	57
<b>Tabela 8.</b> – Descrição e significado clínico do ionograma.	58
<b>Tabela 9.</b> – Significado clínico de alterações nos níveis séricos do ácido úrico, da creatinina e da ureia.	63
<b>Tabela 10.</b> – Aplicação e significado clínico das principais enzimas envolvidas na avaliação da função hepática.	66
<b>Tabela 11.</b> – Aplicação e significado clínico do ferro, da transferrina e da UIBC.	68
<b>Tabela 12.</b> – Principais funções e aplicações clínicas das classes IgA, IgG e IgM de imunoglobulinas.	76
<b>Tabela 13.</b> – Descrição, aplicação, correlação clínica, bem como aumentos inespecíficos que podem ser causa de falsos-positivos, certos estados fisiológicos, ou simplesmente níveis elevados benignos, dos marcadores tumorais doseados no Laboratório de Bioquímica.	78

**ÍNDICE DE TABELAS (CONTINUAÇÃO)**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 14.</b> – Descrição, aplicação e significado clínico dos marcadores de anemia.	80
<b>Tabela 15.</b> – Descrição e aplicação clínica da Troponina-I e da CK-MB.	81
<b>Tabela 16.</b> – Acção e aplicação clínica dos fármacos doseados no Laboratório de Bioquímica.	82
<b>Tabela 17.</b> – Metodologia utilizada no doseamento dos fármacos determinados no Laboratório de Bioquímica.	84
<b>Tabela 18.</b> – Resumo do significado clínico, causas patológicas e não patológicas, dos parâmetros que incluem o exame químico da urina.	91
<b>Tabela 19.</b> – Significado clínico dos cilindros urinários.	95
<b>Tabela 20.</b> – Sectores do Laboratório de Virologia e respectiva metodologia.	99
<b>Tabela 21.</b> – Interpretação possível para a detecção serológica de anticorpos específicos do EBV.	103
<b>Tabela 22.</b> – Marcadores serológicos da Hepatite B associados às várias fases da doença.	109
<b>Tabela 23.</b> – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC para o equipamento BN Prospec.	117
<b>Tabela 24.</b> – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC para o equipamento Cobas e411.	119
<b>Tabela 25.</b> – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC para o Proteinograma realizado nos equipamentos Hydrasys/Hydraplus.	119
<b>Tabela 26.</b> – Ensaios de Imunofluorescência monitorizados pelo CQI.	120
<b>Tabela 27.</b> – Ensaios monitorizados no MultiQC efectuados no equipamento Mago Plus.	120

**ÍNDICE DE TABELAS (CONTINUAÇÃO)**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 28.</b> – Ensaios monitorizados do CQI efectuados no equipamento EUROBlotMaster e manualmente.	121
<b>Tabela 29.</b> – Ensaios monitorizados do CQI executados manualmente.	122
<b>Tabela 30.</b> – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC, executados no Mago Plus.	123
<b>Tabela 31.</b> – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC para os equipamentos Architect c8000 (Bio) e ci8200 (Bio e Imuno).	123
<b>Tabela 32.</b> – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC para o equipamento Urisys 2400.	126
<b>Tabela 33.</b> – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC para o equipamento RapidLab 348.	126
<b>Tabela 34.</b> – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC para o equipamento TDX/FLX.	127
<b>Tabela 35.</b> – Relação entre ensaio e controlo Accurun.	128
<b>Tabela 36.</b> – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC, executados no equipamento Architect.	128
<b>Tabela 37.</b> – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC, executados no equipamento Liaison.	129
<b>Tabela 38.</b> – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC, executados manualmente.	130
<b>Tabela 39.</b> – Ensaios monitorizados do CQI, executados manualmente.	131
<b>Tabela 40.</b> – Ensaios de AEQ implementados no Laboratório de Imunologia.	133
<b>Tabela 41.</b> – Programas de AEQ utilizados nos ensaios do Laboratório de Bioquímica e respectiva frequência.	135
<b>Tabela 42.</b> – Ensaios de AEQ implementados no Laboratório de Virologia.	136

**ÍNDICE DE TABELAS (CONTINUAÇÃO)**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 43.</b> – Parâmetros e respectivas metodologias necessárias à sua execução.	138
<b>Tabela 44.</b> – Factores que afectam a VS.	148
<b>Tabela 45.</b> – Variações patológicas dos valores normais da VS.	149
<b>Tabela 46.</b> – Principais etiologias da variação no número de plaquetas.	151
<b>Tabela 47.</b> – Avaliação de alterações hemostáticas pelos testes PT e aPTT bem como as causas mais comuns.	154
<b>Tabela 48.</b> – Monitorização e periodicidade do CQI dos parâmetros efectuados, nos vários equipamentos, na valência de Hematologia.	158
<b>Tabela 49.</b> – Periodicidade da AEQ dos parâmetros efectuados, nos vários equipamentos, na valência de Hematologia.	158

## **RESUMO**

O presente trabalho constitui o elemento de avaliação final do Curso de Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL). O documento é constituído por duas partes fundamentais. A primeira parte corresponde ao Relatório de Estágio, onde é feita a apresentação dos locais de estágio, a caracterização dos respectivos laboratórios, bem como a descrição de cada uma das valências efectuadas, destacando os ensaios realizados, o controlo de qualidade interno e a avaliação externa da qualidade.

O Estágio Profissional em Análises Clínicas decorreu em dois locais distintos, no Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, E.P.E. (IPOLFG, E.P.E), onde foram realizadas as seguintes valências: Fase Pré-Analítica, Bioquímica, Imunologia e Virologia; e no Laboratório de Análises Clínicas Nova Era - Luz, Lda., onde foi realizada a valência de Hematologia.

A segunda parte corresponde à Monografia, na qual é desenvolvido o tema "*Factores de Risco da Trombose – Avaliação Laboratorial*", onde se procura identificar os factores de risco associados à trombose bem como apresentar as formas de avaliação laboratorial dos mesmos.

## **ABSTRACT**

The present document represents the element of final evaluation of the Master in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy, University of Lisbon (FFUL), and consists of two main parts. The first part corresponds to the Internship Report, where is made a presentation and a characterization of the laboratories where the internships took place, as well as a description of each of the internships areas, highlighting the assays performed, the internal quality control and external evaluation of quality.

The Professional Internship in Clinical Analysis where held in two different locations. At the Portuguese Institute of Oncology of Lisbon, Francisco Gentil, E.P.E. (IPOLFG, E.P.E), where the following internship areas were performed: Pre-analytical, Clinical Biochemistry, Immunology and Virology, and at the Clinical Laboratory Nova Era - Luz, Lda., where the internship in Hematology was held.

In the second part of this document is presented the theme "*Risk Factors for Thrombosis - Laboratory Evaluation*", where is made a brief description of the risk factors associated with thrombosis and a presentation of forms of laboratory assessment.

## 1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho constitui o elemento de avaliação final do Curso de Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL). Este documento é composto por duas partes fundamentais, que visam alcançar objetivos distintos mas interligados. Na primeira parte do documento, que corresponde ao Relatório de Estágio, é feita a apresentação dos locais do estágio profissional realizado, a caracterização dos respectivos laboratórios, bem como a descrição de cada uma das valências efectuadas, destacando os ensaios realizados, o controlo de qualidade interno e a avaliação externa da qualidade. Na segunda parte do documento, correspondente à Monografia, é desenvolvido o tema "*Factores de Risco da Trombose - Avaliação Laboratorial*".

O estágio profissional em Análises Clínicas é parte integrante do plano de estudos do Curso de Mestrado em Análises Clínicas e teve como objectivos gerais: promover a integração no meio profissional e o contacto com os outros profissionais de saúde; aplicar os conhecimentos adquiridos no curso num contexto real de trabalho; desenvolver a capacidade de trabalho em equipa e, igualmente, de trabalho autónomo; adquirir a capacidade de organização e de execução das actividades diárias de um laboratório; e promover o contacto com os doentes, aplicando princípios éticos e deontológicos.

O estágio profissional decorreu em dois locais distintos, no período compreendido entre Maio de 2010 e Fevereiro de 2011. No Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, E.P.E. (IPOLFG, E.P.E), foram realizadas as seguintes valências: Fase Pré-Analítica; Bioquímica; Imunologia e Virologia; e no Laboratório de Análises Clínicas Nova Era - Luz, Lda. foi realizada a valência de Hematologia.

O Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, E.P.E. é um centro oncológico multidisciplinar de referência para a prestação de serviços de saúde no domínio da oncologia, com actividade abrangente nas áreas de investigação, ensino, prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação e continuidade de cuidados, procurando assegurar aos seus utentes cuidados de saúde que correspondam às suas necessidades, prosseguindo o primado "*o doente em primeiro lugar*". Os outros valores que regem a actuação do Instituto e dos seus colaboradores são: a responsabilidade social; a cultura

do conhecimento como um bem em si mesmo; a cultura de excelência técnica, científica e do cuidar; e a cultura interna de multidisciplinaridade e de bom relacionamento no trabalho.

O IPOLFG, E.P.E. foi fundado em 29 de Dezembro de 1923, na altura com a designação de Instituto Português para o Estudo do Cancro. Desde essa data, o IPOLFG, E.P.E. dedica-se à luta organizada contra o Cancro em Portugal e à prestação de cuidados de saúde diferenciados, de acordo com as melhores práticas clínicas e procurando sempre a eficiente utilização dos recursos disponíveis. O IPOLFG, E.P.E é actualmente uma entidade pública empresarial, integrado no Sistema Nacional de Saúde (SNS), dotado de personalidade jurídica, autonomia administrativa, financeira e patrimonial.

O IPOLFG, E.P.E., com sede na Rua Professor Lima Basto, em Lisboa, tem a sua área geográfica de intervenção definida no âmbito das administrações regionais de saúde de Lisboa e Vale do Tejo, do Alentejo e do Algarve, sem prejuízo do que for estabelecido a nível nacional.

O IPOLFG, E.P.E organiza-se em três áreas de actividade: A) área clínica; B) área de ensino e investigação; e C) área de apoio logístico. Nestas áreas de actividade estão integrados os vários departamentos do Instituto que, por sua vez, agregam a maioria dos serviços e unidades funcionais existentes. No âmbito do presente trabalho interessa destacar o Serviço de Patologia Clínica (SPC), que em conjunto com o Serviço de Anatomia Patológica (SAP) formam o Departamento de Diagnóstico Laboratorial (DDL), integrado na área clínica, e a Gestão da Qualidade e Risco (GQR), que é responsável por, entre outras funções, coordenar e divulgar a política de qualidade definida pelo Conselho de Administração (CA) e coordenar os processos de certificação e acreditação. A GQR constitui uma das várias estruturas de apoio logístico existentes no Instituto.

O SPC é composto por cinco valências: Hematologia, Bioquímica, Imunologia, Microbiologia e Virologia, cada uma supervisionada por um Responsável de Laboratório; e três áreas de suporte: Urgência, Central de Colheitas e Gestão da Qualidade. O SPC executa cerca de 100.000 análises por mês, destas 62% são requisitadas a doentes em ambulatório, 32% a doentes internados e 6% em urgência. Actualmente, cerca de 75% das análises estão automatizadas.

O SPC encontra-se, na sua totalidade, acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) de acordo com a NP ISO 15189:2007, num processo que se iniciou em 2008 e que ficou concluído em Junho de 2011, após a Auditoria de Concessão em Novembro de 2010.

A área de Urgência do SPC corresponde a uma estrutura de apoio laboratorial ao Serviço de Urgência do IPOLFG, E.P.E., assegurado de forma rotativa por uma equipa pluridisciplinar, durante 24 horas por dia, 365 dias por ano. A Central de Colheitas é responsável pela sequência de actividades pré-analíticas, nomeadamente a colheita e triagem de amostras e, finalmente, a Gestão da Qualidade é responsável pela coordenação do Sistema de Gestão da Qualidade, na sua concepção, implementação, monitorização, melhoria e revisão.

A segunda fase do estágio profissional foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas Nova Era - Luz, Lda. que, juntamente com a Clínica Médica Nova Era, Lda., integram a Clínica Médica e Laboratorial Nova Era. Esta estrutura empresarial foi, em 2007, englobada no Grupo São João de Deus | Grupo de Saúde.

Ao longo da sua existência a Clínica Médica e Laboratorial Nova Era procurou aliar a componente das análises clínicas com a das consultas médicas, visando a prestação de um serviço de cuidados de saúde integrado, inovador e de elevada qualidade aos seus clientes.

O Grupo empresarial Nova Era teve a sua origem como Laboratório de Análises Clínicas, pelo que essa área sempre foi o seu principal foco de inovação, de especialização e de investimento. O Laboratório existente actualmente foi construído de raiz em 1999, à altura dotado com modernas tecnologias, que têm sido alvo de renovação com o tempo. O Laboratório Nova Era - Luz encontra-se organizado em seis sectores principais, o sector de Imunologia, Bioquímica, Hematologia, Microbiologia, Colheita de Amostras e Recepção e Triagem de Amostras. O Laboratório processa uma média de 150 amostras diárias.

O Laboratório de Análises Clínicas Nova Era-Luz, Lda. encontra-se localizado na zona das Laranjeiras, em Lisboa, e conta com postos de colheita de análises não só na cidade de Lisboa como também na região de Lisboa e Vale do Tejo. O referido Laboratório efectua, igualmente, a recolha de análises clínicas ao domicílio e tem acordos com as principais seguradoras e sistemas de saúde públicos e privados.

Os objectivos do presente trabalho são fazer uma apresentação dos locais de estágio, a descrição da fase pré-analítica e dos parâmetros efectuados nas diferentes valências bem como a respectiva identificação do tipo de produto biológico necessário à sua execução, o seu significado clínico, a metodologia utilizada nos vários equipamentos e, ainda, o controlo de qualidade interno e a avaliação externa da qualidade. Na Monografia é desenvolvido o tema "*Factores de Risco da Trombose – Avaliação Laboratorial*", no qual se procura definir a trombose e os mecanismos inerentes à ocorrência desta patologia, identificar os factores de risco associados à mesma, assim como os métodos laboratoriais que podem ser utilizados na avaliação destes factores.

## **2. FASE PRÉ-ANALÍTICA**

No Estágio Profissional realizado era parte integrante a Fase Pré-Analítica, valência realizada quase na sua totalidade no IPOLFG, E.P.E. e cuja duração global foi muito superior às 110 horas mínimas, estabelecidas no Regulamento dos Estágios Profissionalizantes do Mestrado em Análises Clínicas (MAC), o que me permitiu a aquisição de conhecimentos e experiência prática inestimáveis.

Os dados produzidos nos laboratórios de análises clínicas têm uma grande influência na tomada de decisão dos clínicos e no diagnóstico dos pacientes, o que é particularmente importante em pacientes com condições clínicas graves, como o cancro.

Neste contexto, a Fase Pré-Analítica vem sendo apontada por diferentes estudos como a etapa onde se verificam a maioria dos erros laboratoriais, sobretudo devido à dificuldade em controlar as várias “variáveis pré-analíticas”, nomeadamente a identificação/preparação do paciente, a colheita da amostra e a identificação, transporte e conservação dos produtos biológicos e em realizar a melhoria dos processos envolvidos. Esta fase é mais suscetível a erros devido ao factor humano associado, na medida em que a maioria dos processos não é automatizada, obrigando a muitas atividades manuais. Para garantir a obtenção de resultados com maior qualidade e mais confiáveis, isto é, reduzir a ocorrência de erros, é fundamental cumprir com os procedimentos/instruções de trabalho perfeitamente estabelecidas pelo SPC. Este Serviço dá igualmente muita importância à educação contínua de todos os profissionais envolvidos nos processos de obtenção e manipulação de amostras biológicas.

A Fase Pré-Analítica inicia-se com a solicitação da análise, passa por uma série de etapas e envolve vários procedimentos até terminar quando se inicia a análise laboratorial propriamente dita. Em seguida são descritas algumas das principais etapas e procedimentos da Fase Pré-Analítica.

### **2.1. COLHEITA DE AMOSTRAS**

A colheita de amostras é uma das actividades mais importante de um laboratório de análises clínicas, na medida em que afecta a qualidade e credibilidade dos resultados, constituindo também, na quase totalidade das vezes, o local de contacto privilegiado entre o doente e o laboratório.

As amostras são colhidas na Central de Colheitas do SPC, nos diversos Serviços do IPOLFG, E.P.E. ou nos Hospitais/Laboratórios privados que requisitam análises. Todas as amostras que são colhidas no Instituto são identificadas através de etiquetas de código de barras coladas nos tubos e posteriormente registadas no sistema informático Clinidata XXI. Os registos das actividades de colheita são fundamentais para assegurar a rastreabilidade das amostras, efectuada através do Número de Computador (NC) correspondente. O procedimento de colheita/recepção de amostras encontra-se documentado no Manual de Colheitas e Instruções, no qual estão definidas as responsabilidades e as metodologias de colheita de todos os tipos de amostras analisadas no laboratório, assim como os critérios de aceitação/rejeição das amostras e as acções correctivas a serem tomadas em caso de amostras que são rejeitadas. Alguns dos referidos critérios de rejeição são:

- Amostras não identificadas ou com insuficiente identificação do paciente;
- Amostras etiquetadas com NCs já processados;
- Amostras coaguladas;
- Amostras hemolisadas;
- Amostras com volume incorrecto;
- Amostras colhidas em tubos/materiais inadequados;
- Utilização de anticoagulante errado;
- Condições de transporte e de armazenamento inadequadas (ex.: temperatura, tempo, outras);
- Contaminação dos tubos/materiais utilizados pelos laboratórios;
- Problemas na centrifugação das amostras (tubos partidos).

As amostras que chegam à Pré-Analítica são recepcionadas pelos Assistentes Técnicos (AT) e/ou Técnicos e são conferidas com as respectivas requisições, com o pedido electrónico e, como referido anteriormente, identificadas por colocação de etiquetas (quando aplicável). As amostras provenientes da Central de Colheitas são transportadas para a Pré-Analítica do SPC, por Assistentes Operacionais (AO), em malas fechadas próprias. O transporte das restantes amostras, colhidas em outros locais, deve obedecer aos critérios estabelecidos no Manual de Colheitas.

Todas as amostras que chegam à Pré-Analítica ou aos Laboratórios são avaliadas de forma a verificar o cumprimento dos critérios de aceitação/rejeição de amostras (Figura 1.). As amostras recepcionadas são centrifugadas, quando aplicável, e distribuídas pelos diferentes laboratórios.

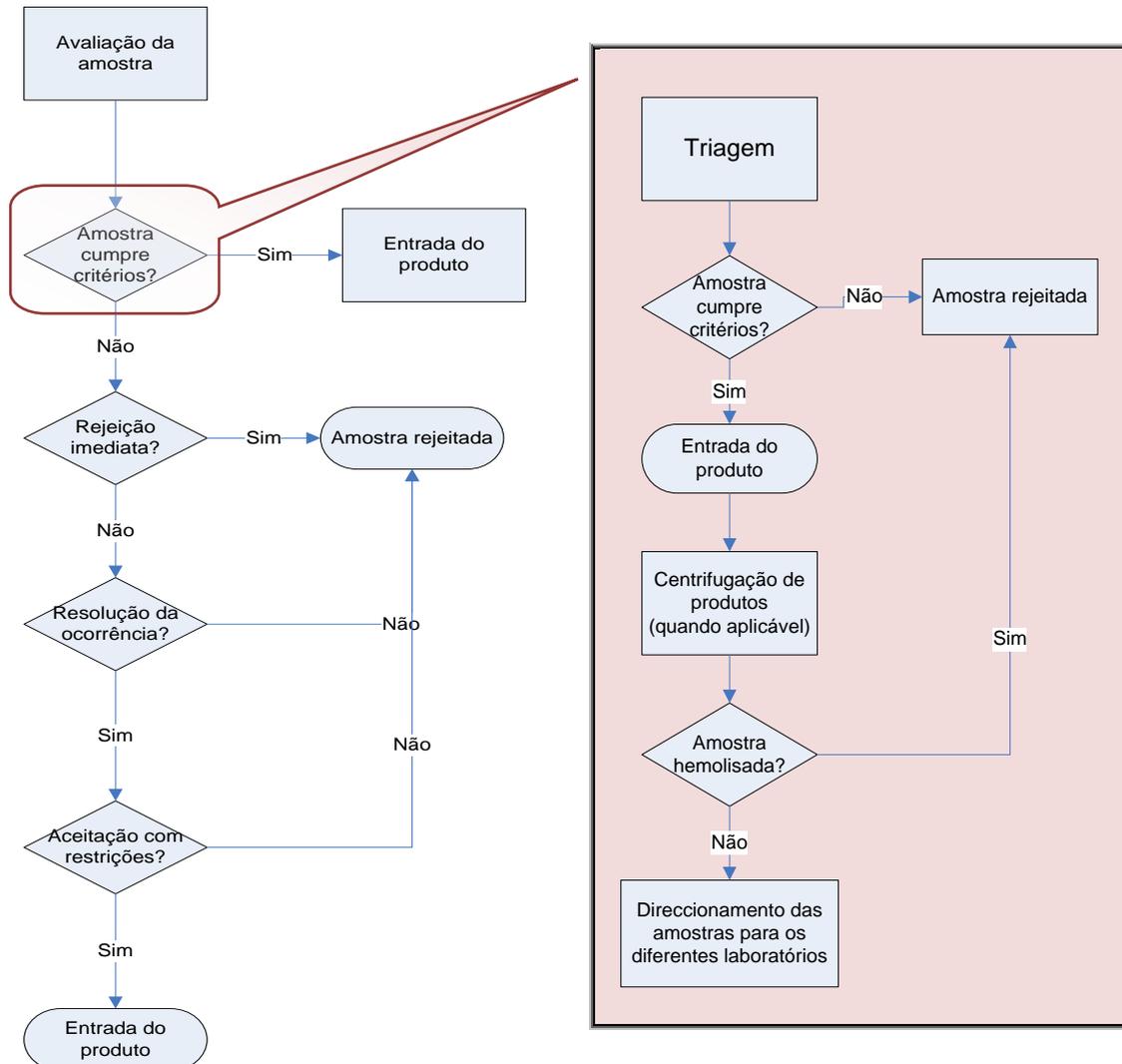


Figura 1. – Fluxograma do Processo de Avaliação das Amostras.

### 2.1.1. Colheita de Sangue

O sangue é o produto biológico mais utilizado nas análises clínicas, devido à presença da maior parte dos analitos estudados. De acordo com a Instruções de Trabalho do SPC, a colheita de sangue obedece a uma série de metodologias que visam assegurar a boa qualidade dos resultados bem como um bom nível de satisfação do paciente.

Antes da realização de qualquer colheita o Técnico deve proceder à higienização/protecção mãos, lavando-as com água e sabão ou passando por uma solução alcoólica a 70° ou, ainda, colocando uma luvas novas.

Depois de colocado o garrote, para melhor detecção das veias, o Técnico deve seleccionar a zona da punção, tendo sempre o cuidado de seguir os seguintes critérios:

- Seleccionar uma veia que seja facilmente palpável;
- Não seleccionar o braço do lado de uma mastectomia;
- Nunca puncionar uma fístula (hemodiálise);
- Não seleccionar um local do braço onde o doente foi submetido a uma infusão intravenosa;
- Não seleccionar um local com hematoma, edema ou contusão;
- Não seleccionar um local com múltiplas punções.

A zona onde se realiza a punção deve ser desinfectada com uma compressa celulósica embebida em álcool a 70%.

No que se refere à colheita de sangue propriamente dita, o paciente deve ter o braço totalmente esticado e apoiado e a palma da mão deve estar voltada para cima. O Técnico deve, então, introduzir a agulha, de forma suave e rápida, num ângulo de 15 a 45°, no centro da veia e 1-1.5 cm ao longo da veia. Assim que o sangue começar a fluir no tubo do sistema “*butterfly*” ou na seringa, deve ser pedido ao doente para abrir a mão. O Técnico deve puxar lentamente o êmbolo da seringa até obter o volume de sangue desejado. Quando se trata de sistema de vácuo, ele deve ajustar o primeiro tubo ao adaptador do sistema “*butterfly*” e aguardar que fique cheio, podendo então ser retirado e substituído pelo próximo. Neste momento o Técnico deve ter o cuidado de retirar o garrote o quanto antes e, posteriormente, ao retirar a agulha da veia, deve colocar uma compressa celulósica embebida em álcool a 70% na zona puncionada.

O Técnico deve, em seguida, colocar a agulha ou o sistema “*butterfly*” num contentor especial de perfurantes (tipo IV). No caso das colheitas efectuadas com agulhas e seringas, este deve distribuir o sangue pelos tubos previamente identificados, tendo o cuidado de evitar a hemólise. Finalmente, o Técnico deve tapar os tubos e agitar aqueles que têm anticoagulante, 3 a 5 vezes por inversão. As seringas devem ser colocadas num contentor com saco branco (tipo III);

Como referido, o sangue pode ser colhido em tubos secos, obtendo-se o soro, que é utilizado para efectuar a maioria das análises de Bioquímica e Imunologia ou, então, em tubos com anticoagulante, obtendo-se o plasma, que é utilizado sobretudo nas análises de Hematologia. Os anticoagulantes mais utilizados, no geral, são o EDTA e o citrato de sódio. É importante referir que o respeito pela proporção sangue/anticoagulante, que se verifica no acto da colheita, é essencial para a obtenção de resultados aceitáveis. Em regra, os tubos têm uma marca que indica o limite para enchimento com o sangue colhido.

### **2.1.2. Colheita de Urina**

A colheita da urina é um procedimento fácil de executar pelo próprio paciente, com excepção dos casos especiais, como os bebés ou os imobilizados/acamados, em que são usados sacos colectores.

Os diferentes tipos de urina, designados de acordo com o modo/período do dia em que são colhidos, bem como o seu propósito analítico são os seguintes:

- Primeira urina da manhã – Urina tipo II (mais concentrada);
- Urina aleatória (colhida a qualquer hora do dia) – Testes de rotina;
- Urina de 24 horas – Determinação de analitos que apresentem variação diurna.

### **2.1.3. Colheita de Outros Líquidos Biológicos**

A colheita de outros líquidos biológicos, como o líquido ascítico, pleural, cefalorraquidiano, entre outros, são geralmente solicitados para determinar analitos específicos e a sua colheita é, normalmente, um acto médico.

### 3. IMUNOLOGIA

O estágio profissional na valência de Imunologia é parte integrante do plano de estudos do Curso de Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O estágio decorreu no Laboratório de Imunologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil, E.P.E. (IPOLFG, E.P.E.), sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Maria Cesaltina Lourenço, no período compreendido entre 31 de Maio de 2010 e 3 de Setembro de 2010.

O Laboratório de Imunologia está integrado no Serviço de Patologia Clínica do IPOLFG, E.P.E., desenvolvendo um conjunto de actividades específicas como o diagnóstico e a monitorização de doenças de proliferação monoclonal plasmocitária, bem como de doenças autoimunes sistémicas e específicas de órgão, a serologia infecciosa, a determinação de alguns marcadores tumorais e a avaliação proteica em vários fluídos biológicos.

O Laboratório de Imunologia está organizado em quatro sectores, de acordo com as metodologias utilizadas (Tabela 1.) e a natureza dos parâmetros efectuados.

**Tabela 1.** - Sectores do Laboratório de Imunologia e respectivas metodologias.

Sector	Metodologia
<b>Imunoquímica</b>	Nefelometria Electroforese/Imunofixação Técnicas Manuais
<b>Marcadores Tumorais</b>	Electroquimioluminescência
<b>Serologia</b>	Micro-ELISA Nefelometria Técnicas Manuais
<b>Autoimunidade</b>	Imunofluorescência Indirecta Micro-ELISA <i>Immunoblot</i>

### **3.1. IMUNOQUÍMICA**

A Imunoquímica engloba um conjunto de metodologias que permitem explorar as reacções específicas que ocorrem entre antigénios e anticorpos.

Este sector do Laboratório de Imunologia dedica-se ao estudo das proteínas através das técnicas de electroforese e imunofixação e ao doseamento de proteínas individuais, por nefelometria, nomeadamente quando são detectadas alterações nos padrões electroforéticos (sobretudo na região das gama-globulinas). É também efectuada uma técnica manual para a pesquisa de crioglobulinas.

#### **3.1.1. Nefelometria**

##### Fundamento do Método

A nefelometria é um método de imunoenensaio (imunonefelometria) baseado numa reacção imunoquímica entre as proteínas presentes na amostra em estudo e anticorpos específicos, levando à formação de imunocomplexos que causam uma turvação do meio e dispersam a luz incidente que atravessa a amostra. A utilização desta metodologia permite medir a quantidade de material suspenso, a partir da medição da luz dispersa para um detector, o qual não está colocado na mesma direcção do feixe de luz incidente. Normalmente, os nefelómetros medem a intensidade da luz dispersa num ângulo de 90° em relação ao feixe de luz incidente. A intensidade da luz dispersa é directamente proporcional à quantidade de antigénio presente na amostra em estudo, desde que seja medida na zona de excesso de anticorpo, sendo determinada por comparação com diluições de um padrão de concentração conhecida.

##### Aplicação

Doseamento de proteínas específicas.

##### Amostras

Soro e Urina (amostras mais frequentes);

Líquido cefalorraquidiano (LCR) e outros líquidos biológicos.

##### Equipamento

BN ProSpec da Siemens.

### 3.1.1.1. Proteínas Doseadas no Laboratório de Imunologia

#### Pré-albumina

A pré-albumina é uma glicoproteína sintetizada no fígado, cuja principal função é o transporte da tiroxina e da proteína de transporte do retinol (vitamina A) (RbP, do inglês, *Retinol-binding Protein*).

A concentração sérica da pré-albumina reflecte a capacidade de síntese do fígado e encontra-se acentuadamente reduzida em condições de má nutrição. Devido ao seu período de semi-vida reduzido, cerca de dois dias, a pré-albumina pode ser útil na monitorização do estado nutricional e da eficácia da nutrição parentérica.

#### Albumina

A albumina é a principal proteína plasmática, representando mais de metade das proteínas totais séricas. É formada exclusivamente no fígado e serve como proteína de transporte e de ligação ao cálcio, ácidos gordos, bilirrubina, hormonas, entre outros. Contribui para a manutenção da pressão oncótica.

Concentrações séricas reduzidas de albumina (hipoalbuminemia) ocorrem em casos de insuficiência grave da capacidade de síntese hepática (ex. cirrose hepática, hepatite grave, má nutrição crónica), bem como em situações de perda acentuada de proteínas (ex. síndrome nefrótico, gastroenteropatia, queimaduras graves).

O doseamento de albumina na urina (microalbuminúria) permite avaliar defeitos na barreira de filtração glomerular, que estão geralmente associados a níveis aumentados de albumina na urina, podendo constituir um indicador de complicações renais, por exemplo na diabetes *mellitus*.

A concentração de albumina no LCR é uma medida da integridade da barreira hematoencefálica (BHE). A determinação do quociente de albumina LCR/Soro permite avaliar não só a integridade da BHE, como também a síntese intratecal de imunoglobulinas.

O doseamento da albumina pode também ser efectuado nos líquidos ascítico e pleural, para a diferenciação entre transudado e exsudado.

### **$\alpha_1$ -Antitripsina**

A  $\alpha_1$ -antitripsina é uma glicoproteína sintetizada no fígado e representa cerca de 90% da fracção das  $\alpha_1$ -globulinas, da electroforese sérica. É uma proteína de fase aguda com actividade anti-proteásica.

Tanto a deficiência hereditária de  $\alpha_1$ -antitripsina, como valores séricos elevados durante uma reacção de fase aguda, estão associados a síndromes específicos. Os estados de deficiência de  $\alpha_1$ -antitripsina têm frequentemente uma causa genética. Valores elevados de  $\alpha_1$ -antitripsina devem-se, na maioria dos casos, a uma reacção de fase aguda à infecção e inflamação.

### **Ceruloplasmina**

A ceruloplasmina é uma glicoproteína que migra na região das  $\alpha_2$ -globulinas da electroforese do soro, é a principal proteína de transporte do cobre. Além disso, é uma proteína de fase aguda que exhibe actividade enzimática como oxidase para vários substratos, podendo estar aumentada durante os processos inflamatórios.

Na doença de Wilson e no síndrome de Menke (perturbações hereditárias do metabolismo do cobre), os níveis séricos de ceruloplasmina são acentuadamente diminuídos. Níveis baixos de ceruloplasmina ocorrem também em doentes com insuficiência hepática e síndrome de perda de proteínas.

### **Haptoglobina**

A haptoglobina é uma glicoproteína sintetizada no fígado, que migra na região das  $\alpha_2$ -globulinas da electroforese sérica. Liga-se à hemoglobina libertada durante a lise dos eritrócitos. O complexo haptoglobina-hemoglobina formado é rapidamente eliminado da corrente sanguínea.

A libertação aumentada de hemoglobina, devido a hemólise intravascular resulta numa redução da concentração sérica de haptoglobina e, durante uma hemólise grave no consumo total de haptoglobina. É uma proteína de fase aguda que pode atingir níveis elevados em condições inflamatórias.

### **$\alpha_2$ -Macroglobulina**

A  $\alpha_2$ -macroglobulina é uma glicoproteína inibidora das proteases, embora de forma menos específica do que a  $\alpha_1$ -antitripsina. Transporta hormonas e enzimas e inibe factores do complemento e da hemostase.

Nos estados hiperfibrinolíticos, após cirurgia, na septicemia e na insuficiência hepática grave, os valores de  $\alpha_2$ -macroglobulina medidos, no soro, são frequentemente baixos. Os doentes com pancreatite aguda apresentam concentrações séricas baixas, que se correlacionam com a gravidade da doença.

O ensaio de  $\alpha_2$ -macroglobulina, na urina, tem uma importância primordial no diagnóstico diferencial do síndrome nefrótico, um rácio  $\alpha_2$ -macroglobulina/albumina elevado é indicativo de hematuria pós-renal.

No Laboratório de Imunologia, o doseamento da  $\alpha_2$ -macroglobulina é feito exclusivamente na urina.

### **$\alpha_1$ -Microglobulina**

A  $\alpha_1$ -microglobulina é uma glicoproteína de baixo peso molecular que é filtrada pelo glomérulo, sendo posteriormente reabsorvida pelos túbulos proximais.

O interesse clínico da determinação quantitativa da  $\alpha_1$ -microglobulina na urina é a identificação de proteinúrias tubulares. Concentrações aumentadas de proteínas de baixo peso molecular, como é o caso da  $\alpha_1$ -microglobulina, podem ser indicativas de lesão tubular, como acontece frequentemente nas nefrites, nefropatias diabéticas avançadas, após exposição a metais pesados ou após administração de fármacos nefrotóxicos.

### **Proteínas do Complemento – C3 e C4**

O sistema do complemento corresponde a um conjunto de proteínas séricas que se encontram em circulação, na forma inactiva. Tem como principais funções a amplificação biológica da resposta imunitária e a intervenção na resposta inflamatória, o que só acontece após a sua activação. O complemento pode ser activado por duas vias, a via clássica, desencadeada sobretudo por imunocomplexos ligados às células, e pela via alterna, activada sobretudo por corpos estranhos, como os microrganismos. O componente C3 é uma proteína-chave de ambas as vias, enquanto que a C4 é uma proteína exclusiva da via clássica. A activação anómala do complemento é

acompanhada por um consumo excessivo das proteínas C3 e C4, de modo que a diminuição das suas concentrações séricas permite o diagnóstico de patologias associadas às proteínas C3 e C4 do complemento.

Concentrações séricas diminuídas de C3 e C4 observam-se sobretudo no lúpus eritematoso sistémico (LES) activo e em formas de glomerulonefrite membranoproliferativa. Uma diminuição isolada da C4 pode manifestar-se no angioedema hereditário e em crioglobulinemias. Estes dois factores do complemento reagem como proteínas de fase aguda, podendo apresentar concentrações aumentadas nos processos inflamatórios.

### **Imunoglobulinas**

As imunoglobulinas (Ig) são proteínas produzidas pelos plasmócitos (linfócitos B diferenciados) após estimulação antigénica, funcionando como anticorpos, pois reconhecem os determinantes antigénicos que suscitam a sua produção. Cada imunoglobulina é constituída por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias leves idênticas,  $\kappa$  ou  $\lambda$ , e duas cadeias pesadas idênticas, unidas entre si por pontes dissulfureto. As cadeias pesadas definem cada uma das cinco classes de imunoglobulinas: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE; e determinam a sua actividade funcional. A classe IgG tem quatro subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A classe IgA tem duas subclasses: IgA1 e IgA2 (Tabela 2.).

Cada cadeia, leve e pesada, possui duas regiões funcionais, a região variável (V) responsável pelo reconhecimento do antígeno, e a região constante (C) com propriedades efectoras.

**Tabela 2.** - Propriedades dos diferentes isotipos de imunoglobulinas humanas.

<b>Classe (Subclasse)</b>	<b>Cadeias Pesadas</b>	<b>Função</b>
IgA (IgA1, IgA2)	$\alpha$ ( $\alpha 1$ , $\alpha 2$ )	Antimicrobiana
IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)	$\gamma$ ( $\gamma 1$ , $\gamma 2$ , $\gamma 3$ , $\gamma 4$ )	Opsonização Activação do Complemento Produzida em resposta a infecção secundária

Classe (Subclasse)	Cadeias Pesadas	Função
IgM	$\mu$	Activação do Complemento Produção em resposta a infecção primária
IgD	$\delta$	Receptor de antígeno de superfície (Linfócitos B) Função biológica desconhecida
IgE	$\epsilon$	Participa em reacções de hipersensibilidade imediata (alergias) e parasitoses

As imunoglobulinas migram na fracção das  $\gamma$ -globulinas da electroforese das proteínas séricas, sendo que as mais abundantes são as pertencentes à classe IgG. Quando se observam alterações nesta fracção, deve ser efectuado o doseamento das imunoglobulinas por nefelometria.

A diminuição das imunoglobulinas no soro, hipogamaglobulinemia, pode ocorrer em consequência de defeitos genéticos (imunodeficiências congénitas) ou adquiridos, como infecções e alguns tumores malignos. Por outro lado, o aumento dos níveis de imunoglobulinas pode ocorrer de forma policlonal (gamopatias policlonais), em que há uma produção heterogénea de anticorpos em resposta a quadros infecciosos e inflamatórios crónicos, a doenças hepáticas e autoimunes, ou de forma monoclonal (gamopatias monoclonais) a qual surge em resultado de uma única classe, ou subclasse, de imunoglobulinas produzidas por uma única linhagem de plasmócitos, como acontece no mieloma múltiplo (IgG ou IgA), na doença de Waldenström (IgM) e em algumas patologias benignas (exs. infecções urinárias, hepatite crónica, cirrose).

No Laboratório de Imunologia é efectuado o doseamento sérico das classes de imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE; e das quatro subclasses da IgG. As classes IgG, IgA e IgM também são quantificadas no LCR de forma a avaliar a síntese intratecal de imunoglobulinas. Além disso, é feita a determinação da IgG na urina para o estudo da proteinúria.

### **Cadeias Leves das Imunoglobulinas**

As imunoglobulinas são constituídas por duas cadeias leves,  $\kappa$  ou  $\lambda$ . Cada cadeia leve encontra-se ligada covalentemente a uma cadeia pesada e estas duas estão ligadas, também covalentemente, à região de ligação. Nos indivíduos saudáveis, a maioria das cadeias leves encontram-se deste modo no soro, ligadas às cadeias pesadas. No entanto, em algumas situações patológicas podem ser encontradas cadeias leves livres (FLC, do inglês, *Free Light Chain*).

As imunoglobulinas policlonais apresentam os dois tipos de cadeias leves,  $\kappa$  e  $\lambda$ , numa relação constante de 2:1, as imunoglobulinas monoclonais possuem cadeias leves de um só tipo,  $\kappa$  ou  $\lambda$ . O aumento da produção de imunoglobulinas completas ou de FLC monoclonais altera a relação das cadeias leves  $\kappa/\lambda$ . Assim, um quociente  $\kappa/\lambda$  alterado está geralmente associado à presença de uma gamapatia monoclonal (ex. mieloma múltiplo).

#### **3.1.2. Electroforese**

##### Fundamento do Método

A electroforese é uma técnica que permite a separação dos componentes ionizados presentes nas amostras em estudo. Consiste na migração dos diferentes analitos, a uma velocidade que é função da carga e do tamanho da espécie ionizada, quando colocados em suporte adequado (exs. acetato de celulose, gel de agarose ou poliacrilamida) e sujeitos a um campo eléctrico.

##### Parâmetros

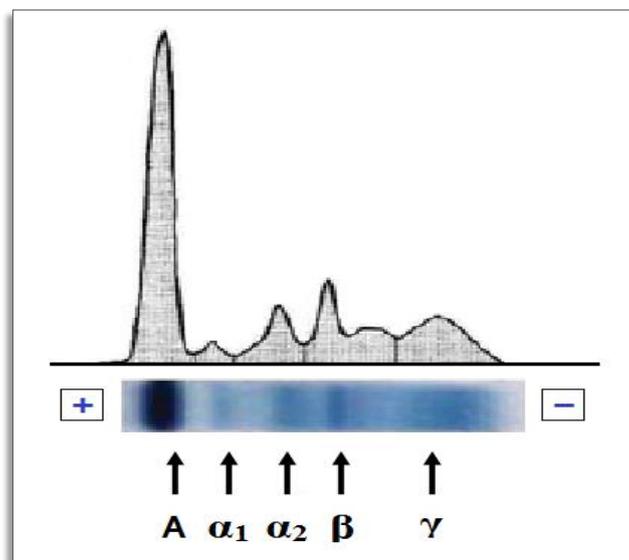
Proteinograma;  
Electroforese de Hemoglobinas.

##### Equipamento

Aparelho semi-automático de electroforese – Hydrasis da Sebia;  
Aplicador automático de amostras – Hydraplus da Sebia;  
Densitómetro/Scanner com *software* Phoresis da Sebia.

### 3.1.2.1. Electroforese das Proteínas Séricas

A electroforese das proteínas baseia-se no facto destas possuírem carga eléctrica, devido à presença de grupos carregados positiva e negativamente, e nas suas propriedades anfotéricas, podendo comportar-se como ácidos ou como bases, consoante o pH do meio. Quando sujeitas a um campo eléctrico, as proteínas podem migrar do ânodo para o cátodo ou vice-versa, consoante a sua carga (positiva ou negativa) e o pH do meio (ácido ou alcalino). Assim, as proteínas são separadas em diferentes fracções, podendo ser coradas e, posteriormente, medidas por densitometria. O resultado desta medição conduz a um “perfil electroforético” (Figura 2.) separando cinco fracções de proteínas que são, por ordem decrescente de mobilidade: albumina, alfa<sub>1</sub>-, alfa<sub>2</sub>-, beta- e gama-globulinas. Cada fracção contém uma ou mais proteínas.



**Figura 2.** – Perfil electroforético do soro de um indivíduo normal e respectivas fracções de proteínas.

### Proteinograma

A electroforese de proteínas é um parâmetro muito útil na rotina laboratorial, com vista à detecção de anomalias no perfil proteico.

### Amostra

Soro (o plasma é um tipo de amostra a evitar porque a presença de fibrinogénio introduz, nesta técnica, uma banda suplementar que pode dificultar a interpretação).

### Princípio do Teste

A electroforese das proteínas séricas baseia-se nos princípios da electroforese de zona executada num suporte adequado, neste caso utiliza-se a agarose por ser um suporte versátil e eficaz. Separa as proteínas do soro, submetendo-as a um campo eléctrico. Colocadas em meio alcalino (pH 9.2), estas moléculas anfotéricas adquirem uma carga global negativa e sob a influência do campo eléctrico migram do cátodo para o ânodo. Assim separadas, as diferentes fracções proteicas são coradas com negro de amido (o excesso de corante é posteriormente removido por passagens numa solução descorante com pH ácido) e medidas por densitometria (medição da quantidade de corante fixada ao longo do suporte), que dá uma quantificação relativa, em percentagem, das fracções proteicas.

Para determinações de rotina, as proteínas são separadas em cinco fracções de mobilidade. As proteínas mais representativas em cada fracção são as seguintes:

- Fracção da Albumina;
- Fracção das  $\alpha_1$ -globulinas:  $\alpha_1$ -antitripsina,  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida,  $\alpha_1$ -fetoproteína e  $\alpha$ -lipoproteína;
- Fracção das  $\alpha_2$ -globulinas:  $\alpha_2$ -macroglobulina, haptoglobina e ceruloplasmina;
- Fracção das  $\beta$ -globulinas: transferrina, ferritina, proteínas do complemento C3 e C4 e  $\beta$ -lipoproteína;
- Fracção das  $\gamma$ -globulinas: imunoglobulinas e proteína C reactiva.

### **3.1.2.2. Electroforese de Hemoglobinas**

A hemoglobina (Hb) humana é formada por quatro subunidades (tetrâmero) de cadeias peptídicas idênticas duas a duas, designadas globinas. Cada uma das subunidades está ligada ao grupo heme (contém ferro) ao qual se liga o oxigénio.

Devido a variações nas cadeias globínicas, distinguem-se vários tipos de hemoglobina, dos quais três são considerados normais, HbA ( $\alpha_2\beta_2$ , a mais abundante representando 97 a 98% da Hb total), HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ , cerca de 2,5%) e HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ , cerca de 1%). No recém-nascido, existe cerca de 80% de HbF que será substituída por HbA, seis meses após o nascimento.

As hemoglobinopatias, patologias que envolvem anomalias das hemoglobinas, constituem o grupo de patologias genéticas mais comuns na população humana e podem ser de dois tipos:

- Hemoglobinopatias do tipo qualitativo – **Variantes da Hemoglobina**, resultantes da alteração da estrutura de uma cadeia globínica, a maioria afectando as cadeias  $\alpha$ - ou  $\beta$ -globina, exs. HbS (drepanocitose), HbC e HbD;
- Hemoglobinopatias do tipo quantitativo – **Talassémias**, resultantes da ausência ou diminuição da síntese de uma cadeia globínica, exs.  $\beta$ -talassémia e  $\alpha$ -talassémia. A persistência hereditária da HbF também é uma hemoglobinopatia do tipo quantitativo.

#### Aplicação

Separação das hemoglobinas normais (A e A<sub>2</sub>) e detecção das principais variantes de hemoglobina (S ou D e C ou E).

#### Amostra

Sangue total colhido em tubo com anticoagulante.

#### Princípio do Teste

A electroforese das hemoglobinas é feita a partir do hemolisado, obtido por lavagem dos glóbulos vermelhos, em gel de agarose e em meio alcalino (pH 8,5), no qual as hemoglobinas migram para o ânodo. Após coloração com negro de amido e depois de retirado o excesso de corante com uma solução ácida, as fracções de hemoglobina podem ser analisadas visualmente por comparação com um padrão de referência, ou por densitometria.

#### **Interpretação**

A estrutura espacial da hemoglobina depende da natureza e sequência dos aminoácidos que formam as cadeias. A substituição dos aminoácidos (sobretudo nas cadeias  $\beta$ ), por mutação, é responsável pela formação de variantes das hemoglobinas, que têm diferentes cargas superficiais e conseqüentemente diferentes mobilidades electroforéticas.

### **Variantes da Hemoglobina**

**HbS** – É a variante de Hb mais comum e resulta de uma mutação no codão 6 do gene que codifica para a cadeia  $\beta$  da globina, na qual há uma substituição do ácido glutâmico pela valina. A presença de HbS é característica da drepanocitose, ou anemia das células falciformes. Produz efeitos deletérios porque, em desoxigenação, há uma redução da sua solubilidade e ocorre polimerização, levando à deformação dos glóbulos vermelhos (forma de foice característica – drepanócitos). A HbS migra entre a HbA e a HbA<sub>2</sub>.

**HbC** – é a segunda variante mais comum e resulta de uma mutação no codão 6 do gene que codifica para a cadeia  $\beta$  da globina, na qual há uma substituição do ácido glutâmico pela lisina. A carga positiva, resultante desta substituição, confere uma mobilidade electroforética reduzida à HbC e a sua migração sobrepõe-se à da HbA<sub>2</sub>. Os níveis elevados de HbA<sub>2</sub> são incompatíveis com a vida, pelo que este aumento pode dever-se na realidade à presença de HbC.

**HbD** – Resulta de uma mutação por substituição do ácido glutâmico pela glicina na posição 121 da cadeia  $\beta$ -globina. Apresenta uma mobilidade electroforética semelhante à da HbS, mas ao contrário desta, não se separa das hemoglobinas A e A<sub>2</sub>, pelo que é necessário recorrer a uma prova de falciformação que põe em evidência a polimerização da HbS, permitindo assim distinguir as variantes S e D da hemoglobina.

**HbE** - Resulta de uma mutação por substituição do ácido glutâmico pela lisina na posição 26 da cadeia  $\beta$ -globina. Apresenta uma mobilidade electroforética semelhante à HbC, sendo possível a sua distinção por electroforese em meio ácido.

### **Talassémias**

As talassémias pertencem ao grupo de hemoglobinopatias do tipo quantitativo, caracterizadas pela diminuição da síntese de uma das cadeias globínicas. Para compensar este défice há um aumento da síntese de outras cadeias para se formar o tetrâmero. Nas  $\beta$ -talassémias há uma redução de síntese das cadeias  $\beta$ , sendo substituídas pelas cadeias  $\delta$  que formam a HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), levando assim a um aumento da HbA<sub>2</sub>. Nas  $\alpha$ -talassémias há uma diminuição da síntese das cadeias  $\alpha$ , que afecta todas as fracções da hemoglobina (A, A<sub>2</sub> e F).

Em ambos os casos, a electroforese de hemoglobinas apresenta-se normal ou sem grandes alterações e não é suficientemente precisa para quantificar a HbA<sub>2</sub>, importante no diagnóstico da  $\beta$ -talassémia. Assim, a electroforese de hemoglobinas é útil na identificação de variantes da hemoglobina, no entanto para o estudo das talassémias é conveniente o recurso a outros métodos.

### **3.1.3. Imunofixação**

#### Princípio do Teste

A imunofixação combina as técnicas de electroforese e imunoprecipitação, permitindo detectar e identificar as imunoglobulinas monoclonais, marcadores das gamopatias, detectadas na electroforese das proteínas séricas. A imunofixação ocorre em quatro etapas:

- Separação das proteínas por electroforese em gel de agarose;
- Fixação e imunoprecipitação das proteínas separadas por electroforese: aplicação de anti-soros monoespecíficos e fixador, directamente sobre o gel, ao nível das pistas de migração, que se difundem sobre o gel; o fixador precipita todas as proteínas; os anti-soros de especificidades diferentes, anti-cadeias pesadas  $\gamma$  (IgG),  $\alpha$  (IgA) e  $\mu$  (IgM) e anti-cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$  (livres e ligadas), precipitam os antígenos correspondentes, formando complexos antígeno-anticorpo;
- As proteínas solúveis, não precipitadas, são removidas do gel por lavagem e absorção com papel de filtro, as proteínas precipitadas ficam retidas no interior da matriz do gel;
- Coloração das proteínas imunoprecipitadas com violeta ácido e comparação da posição das bandas imunoprecipitadas com as bandas anómalas, observadas após electroforese das proteínas;
- Para identificar de forma precisa a natureza das bandas monoclonais deve ser utilizado, paralelamente, um anti-soro poliespecífico de forma a produzir um padrão de referência electroforético de proteínas (pista de referência);
- A imunofixação é efectuada no aparelho semi-automático de electroforese – Hydrasis da Sebia, em amostras de soro.

### **Interpretação**

Uma amostra de soro normal apresenta uma zona corada difusa e de fundo leve, sem formação de bandas severas, ou de fundo límpido e sem coloração. Uma reacção policlonal produz um fundo de coloração difusa e sem formação de bandas severas. A presença de uma imunoglobulina monoclonal (gamapatia) é caracterizada por uma banda estreita e bem visível, devendo estar localizada ao mesmo nível de migração que a banda presente na pista de referência.

#### **3.1.3.1. Pesquisa da Proteína de Bence Jones**

Foi estabelecido que a proteína de Bence Jones corresponde às cadeias leves livres. Nas discrasias plasmocitárias, esta proteína é produzida em excesso por um único clone de plasmócitos neoplásicos. Trata-se de uma proteína de baixo peso molecular com um período de semi-vida curto, de 2 a 6 horas, sendo rapidamente filtrada pelo glomérulo e posteriormente reabsorvida pelos túbulos proximais, pelo que o seu aparecimento na urina só acontece quando é produzida em grandes quantidades, excedendo a capacidade de metabolização do rim.

A detecção da proteína de Bence Jones tem um mau prognóstico, podendo estar associada ao mieloma múltiplo a cadeias leves.

A sua pesquisa pode ser feita no soro ou na urina, por imunofixação, semelhante à descrita no ponto anterior, no entanto os anti-soros aplicados são diferentes. É utilizado um anti-soro trivalente anti-cadeias pesadas  $\gamma$  (IgG),  $\alpha$  (IgA) e  $\mu$  (IgM), anti-cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$  (conjugadas, livres e ligadas) e anti-cadeias leves livres  $\kappa$  e  $\lambda$ .

#### **3.1.4. Estudo das Proteínas do LCR**

O LCR é formado, principalmente, pelos plexos coróides. É pobre em proteínas e mais de 80% são provenientes do plasma, o que equivale normalmente a valores inferiores a 1% das proteínas plasmáticas. A composição do LCR é controlada pela barreira hematoencefálica (BHE), sendo que o aumento do teor proteico do LCR pode ser devido a alterações na permeabilidade da BHE ou à síntese intratecal de imunoglobulinas, ou a ambas.

Alterações na permeabilidade da BHE podem ocorrer na meningite, encefalite, tumor cerebral e hemorragia intra-craniana, enquanto que a síntese intratecal de imunoglobulinas ocorre normalmente em doenças do sistema nervoso central (SNC) como a esclerose múltipla, neurosífilis, entre outras.

O Aumento da síntese intratecal de imunoglobulinas é reflectido no aumento da razão LCR/soro de imunoglobulinas. O aumento desta razão também pode ocorrer pelo aumento da passagem de imunoglobulinas plasmáticas por ruptura da BHE. As imunoglobulinas derivadas dessa passagem podem ser corrigidas dividindo a razão LCR/soro de imunoglobulinas pelo índice LCR/soro de albumina, o que fornece o índice de imunoglobulinas. A albumina é utilizada como proteína de referência por ser sintetizada exclusivamente no fígado, assim mesmo em condições patológicas o teor de albumina no LCR tem origem unicamente no sangue, o que permite avaliar a integridade da BHE. Deste modo, valores elevados de imunoglobulinas e albumina indicam lesão da BHE.

#### **3.1.4.1. Imunofixação do LCR**

A imunofixação do LCR é utilizada para confirmar a existência de síntese intratecal de imunoglobulinas, tendo como objectivo a pesquisa de bandas oligoclonais, definidas como duas ou mais bandas discretas na região gama, que estão ausentes ou em menor intensidade na eletroforese do soro concomitante. A análise do soro e do LCR, em simultâneo, permite avaliar as diferenças nos padrões de migração electroforética das imunoglobulinas, entre as duas amostras. A técnica consiste numa electroforese de proteínas, em gel de agarose, seguida de imunofixação das proteínas com um anti-soro anti-IgG, pois na maioria dos casos as imunoglobulinas provenientes da síntese intratecal pertencem à classe IgG.

É feita uma análise comparativa do perfil de distribuição das imunoglobulinas no soro e no LCR, do mesmo doente, e a presença de síntese intratecal é indicada pela observação das seguintes situações:

- Padrão de distribuição diferente no soro e no LCR;
- Presença de bandas oligoclonais ou bandas monoclonais suplementares.

A confirmação da síntese intratecal de imunoglobulinas e a presença de um índice elevado de imunoglobulinas, calculado pela razão LCR/soro, são testes complementares úteis no diagnóstico de patologias desmielinizantes do SNC, nomeadamente a esclerose múltipla.

### **3.1.5. Pesquisa de Crioglobulinas**

As crioglobulinas são paraproteínas circulantes, caracterizadas por precipitarem a baixas temperaturas, entre os 0 e os 22°C. Podem ser complexos de imunoglobulinas policlonais ou monoclonais, neste caso pertencem sobretudo à classe IgM.

A pesquisa é efectuada por uma técnica manual, crioprecipitação, que consiste na colheita do sangue a 37°C, em tubo seco que deverá ser mantido a esta temperatura até à retracção do coágulo. O soro, após centrifugação, é separado em 2 tubos. Um tubo-teste que é colocado a 4°C e um tubo-controlo (negativo) colocado na estufa a 37°C.

A presença de crioglobulinas manifesta-se pela formação de uma película, ou precipitado esbranquiçado, ao fim de 7 dias, no entanto a observação do tubo deve ser feita diariamente.

A crioglobulinemia monoclonal está normalmente associada a doença de Waldenström, mielomas e alguns linfomas, enquanto que a crioglobulinemia policlonal encontra-se sobretudo no LES e hepatites crónicas (hepatite C).

A pesquisa de crioglobulinas é um teste de *screening*, pelo que para fazer diagnóstico é necessário recorrer a outros testes.

## **3.2. MARCADORES TUMORAIS**

Os marcadores tumorais (MT) são substâncias produzidas pelas células neoplásicas, ou por outras células induzidas pelas mesmas, de alguns tipos de tumores, que correspondem a alterações metabólicas e genéticas, podendo indicar a existência de um tumor. Normalmente são classificados de acordo com a sua origem ou estrutura química, podendo ser detectados no soro ou noutros fluídos biológicos.

Um MT ideal deveria ser específico para um determinado tipo de tumor, i.e. detectável exclusivamente em células malignas, e ser suficientemente sensível para

detectar a presença de um tumor, mesmo nos estadios mais precoces. Além disso, a quantidade de MT determinada deveria reflectir o estadio do tumor, correlacionando-se com a doença. No entanto, os MTs disponíveis actualmente não satisfazem estes requisitos no seu todo, pelo que não devem ser utilizados isoladamente para estabelecerem o diagnóstico de cancro.

Na prática clínica, os MTs são muito úteis no auxílio ou complemento ao diagnóstico, desde que utilizados em conjunto com outros meios, na avaliação da resposta à terapêutica e na sua monitorização, na detecção precoce de recidivas e no estabelecimento do prognóstico.

A determinação quantitativa do MT é muito útil no âmbito da avaliação da resposta à terapêutica, ou seja, uma diminuição dos níveis de MT deve reflectir uma resposta positiva ao tratamento, enquanto que o seu aumento poderá indicar que o tratamento não está a produzir os efeitos desejados.

No Laboratório de Imunologia é efectuado o doseamento de três marcadores tumorais, enolase neuro-específica, Cyfra 21-1 e CA 72-4. Outros marcadores tumorais, que por se utilizar uma metodologia diferente (quimioluminescência) na sua determinação, são doseados no Laboratório de Bioquímica, sendo abordados posteriormente nessa valência.

### **3.2.1. Electroquimioluminescência**

#### Fundamento do Método

A electroquimioluminescência é um método onde intervêm espécies altamente reactivas, geradas a partir de precursores estáveis, à superfície de um eléctrodo. Estas espécies reagem entre si, emitindo luz após a aplicação de uma corrente eléctrica.

São utilizados dois anticorpos monoclonais específicos do antigénio, um anticorpo monoclonal marcado com ruténio e um anticorpo monoclonal biotilado, estes ligam-se ao antigénio presente na amostra e reagem entre si formando um complexo *sandwich*.

Após a incorporação de micropartículas revestidas por estreptavidina, o complexo formado liga-se à fase sólida, constituída por essas micropartículas, pela interacção da biotina e da estreptavidina.

A mistura da reacção é então aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eléctrodo. A aplicação de uma corrente eléctrica ao eléctrodo, induz uma emissão de luz quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador. A luz medida é directamente proporcional à quantidade de marcador tumoral presente na amostra.

#### Amostra

Soro

#### Equipamento

COBAS 411 da Roche

### **3.2.1.1. Parâmetros**

#### **Enolase Neuro-específica**

A enolase é uma enzima da glicólise presente no fígado, músculo e tecido nervoso. Existem várias isoenzimas que, devido à sua estrutura dimérica, reagrupam duas das três subunidades possíveis:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . As isoformas  $\alpha\gamma$  e  $\gamma\gamma$ , denominadas enolase neuro-específica (NSE, do inglês, *neuron specific enolase*), são primariamente detectáveis em concentrações elevadas nos neurónios e nas células neuroendócrinas, bem como nos tumores com origem nestes.

A determinação da NSE é utilizada na monitorização terapêutica e na evolução de doentes com carcinoma das pequenas células do pulmão e neuroblastoma. A NSE é descrita como o marcador de primeira escolha na monitorização do carcinoma das pequenas células do pulmão, pois em 60 a 80% dos casos observam-se concentrações elevadas deste marcador.

A determinação da NSE não permite qualquer relação com a zona de metástases, mas existe uma boa correlação com a fase clínica, ou seja, com a extensão da doença, sendo útil como factor de prognóstico. Em resposta ao tratamento, observa-se um aumento temporário do nível da NSE, 24 a 72 horas, após o primeiro ciclo de terapêutica, em resultado da citólise das células tumorais, diminui em caso de remissão e torna a elevar-se em recidivas. Noutros tumores como o seminoma e tumores cerebrais, assim como em doenças pulmonares e cerebrais benignas, também podem ser encontrados valores de concentração aumentados de NSE.

### **CYFRA 21.1 – Fragmento da Citoqueratina 19**

As citoqueratinas são proteínas estruturais que formam subunidades de filamentos intermediários epiteliais. Foram identificados vinte polipéptidos diferentes de citoqueratina que, devido aos seus padrões de distribuição específicos, são adequados na utilização como marcadores de diferenciação em patologias tumorais. Os fragmentos de citoqueratina intactos são pouco solúveis, mas é possível detectar fragmentos solúveis no soro.

A principal aplicação do teste CYFRA 21.1 é a monitorização da evolução do carcinoma das células não-pequenas do pulmão. Também é utilizado como marcador na monitorização da evolução do cancro da bexiga mioinvasivo. Podem ser encontrados valores ligeiramente elevados em determinadas doenças hepáticas benignas e na insuficiência renal. A terapêutica bem sucedida é documentada por uma descida rápida do nível sérico de CYFRA 21.1 para um intervalo normal, um valor constante ou uma diminuição ligeira ou lenta indica remoção incompleta de um tumor ou a presença de múltiplos tumores com as correspondentes consequências a nível terapêutico e de prognóstico.

### **CA 72.4**

O CA 72.4 (*cancer antigen 72.4*) é um antígeno glicoproteico, aplicado sobretudo na monitorização terapêutica de carcinomas do estômago e dos ovários. Comparativamente a outros marcadores, a vantagem mais importante deste ensaio é sua especificidade para doenças benignas como a pancreatite, cirrose hepática, pneumopatias, doenças reumáticas, doenças ginecológicas, doenças benignas dos ovários, quistos ováricos, doenças da mama e doenças benignas e doenças benignas do aparelho gastrointestinal.

## **3.3. SEROLOGIA**

A serologia engloba um conjunto de técnicas úteis no auxílio ao diagnóstico de patologias infecciosas, que se baseiam na detecção sérica de anticorpos específicos produzidos contra antígenos, em resposta a um agente infeccioso.

Neste sector do Laboratório de Imunologia são utilizadas várias técnicas manuais e algumas técnicas automáticas, como a nefelometria e microELISA.

## **Aglutinação Directa – Técnica Manual**

### Princípio da Técnica

A técnica de aglutinação directa baseia-se no princípio de que quando o organismo humano é invadido por um agente microbiano patogénico, ocorre a formação de diversos anticorpos, nomeadamente aglutininas. Os soros contendo estas aglutininas específicas, em presença dos antígenos homólogos e em condições devidamente controladas, são capazes de causar aglutinação visível. O grau de aglutinação depende da concentração do antígeno, do número de anticorpos presentes e da temperatura.

Esta técnica tem como objectivo a pesquisa de anticorpos aglutinantes para antígenos do microrganismo em estudo.

### **3.3.1. Serologia para *Salmonella***

As bactérias do género *Salmonella*, vulgarmente designadas por salmonelas, são bacilos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

Na maioria dos casos, a salmonelose é adquirida por contacto fecal-oral através da ingestão de alimentos e água contaminados. As aves e os animais contaminados constituem o principal reservatório de *Salmonella* não *typhi* (normalmente responsável por infecções intestinais) e transmitem a doença ao homem. O reservatório de *Salmonella typhi* é o homem, que é também o principal disseminador da febre tifóide, na fase aguda da doença ou no estado de portador assintomático.

A nomenclatura dos diferentes serótipos de *Salmonella* é bastante controversa e tem sido proposta a criação de uma única espécie, *S. enterica*. No entanto, usa-se frequentemente o nome do serótipo como sendo o nome da espécie (ex. *S. paratyphi* A). A serotipagem baseia-se na caracterização dos antígenos somáticos (O), antígenos flagelares (H) e antígenos de superfície (Vi).

### Reacção de Widal

O diagnóstico laboratorial da febre tifóide (*S. typhi*) e paratifóide (*S. paratyphi* A e B) é feito, no Laboratório de Imunologia, pela reacção de Widal, a qual quantifica os anticorpos (aglutininas) anti-O e anti-H, presentes no soro do doente, por reacções de aglutinação directa em placa com suspensões antigénicas padronizadas de *Salmonella*

(*typhi* O e H; *paratyphi* AO, AH, BO e BH). É uma técnica manual semi-quantitativa e os resultados são expressos em título, dado pela última diluição do soro que ainda apresenta aglutinação.

### **Interpretação**

Uma elevação acentuada, títulos elevados, dos anticorpos O e H permite fazer o diagnóstico. No entanto, esta titulação tende a aumentar ao longo do tempo, pelo que é necessário avaliar duas ou mais amostras de soro, colhidas em intervalos de 3 a 5 dias após o início da doença. Um aumento progressivo do título de anticorpos é a principal evidência de infecção.

Os soros de indivíduos saudáveis podem revelar aglutinação positiva com os antígenos utilizados, devido a uma imunização prévia, uma infecção do passado ou à presença de anticorpos dirigidos a antígenos relacionados (reação cruzada). Em geral a titulação encontrada nestes casos é menor e permanecerá a um nível constante.

### **3.3.2. Serologia para *Brucella***

As bactérias do género *Brucella* são bacilos Gram-negativos intracelulares facultativos, que causam a brucelose, também conhecida como febre ondulante, febre de Malta ou febre mediterrânica, de acordo com os nomes dos microbiologistas que isolaram e descreveram estes microrganismos (ex. David Bruce, brucelose), com os locais onde ocorreram surtos e com as manifestações clínicas (ex. febre ondulante). Contudo, o termo mais utilizado é a brucelose. Esta doença é uma zoonose e pode ser transmitida ao homem por contacto directo com o animal infectado, por contacto indirecto através do consumo de produtos lácteos não pasteurizados ou inalação, as contaminações acidentais em laboratório, por exposição, também são frequentes.

A brucelose apresenta manifestações clínicas pouco específicas, por vezes assintomática, no entanto a manifestação mais frequente é a febre acompanhada por cefaleias, mialgias, artralgias, astenia, calafrios e suores.

Actualmente são reconhecidas seis espécies de *Brucella*, mas apenas quatro estão associadas à doença humana. A *Brucella melitensis* (reservatórios mais comuns, caprinos e ovinos), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (suínos e alguns roedores) e *B. canis* (cão).

O diagnóstico desta doença pode ser bacteriológico, baseado no isolamento e identificação da bactéria no sangue, medula óssea ou outros tecidos, ou serológico, que na ausência de confirmação bacteriológica, pode fazer um diagnóstico presuntivo através da pesquisa de anticorpos específicos no soro.

#### Reacção de Huddleson

A reacção de Huddleson é uma técnica de aglutinação directa em placa, tendo como objectivo a pesquisa de anticorpos aglutinantes para antígenos de *Brucella abortus*. Neste teste é utilizada uma suspensão antigénica padronizada de *B. abortus* para a pesquisa de anticorpos anti-*Brucella abortus*, sobretudo da classe IgM mas também IgG, presentes no soro dos doentes com suspeita de brucelose.

É uma técnica manual semi-quantitativa e os resultados são expressos em título, dado pela última diluição do soro que ainda apresenta aglutinação.

Os anticorpos da classe IgM surgem entre o 8º e o 10º dia após o início da doença (brucelose aguda) e títulos elevados são considerados um resultado positivo. A reacção é negativa em quase todos os casos de brucelose crónica e apresenta títulos baixos em situações de infecção subaguda.

#### Pesquisa de anticorpos totais anti-*Brucella abortus* (BrucellaCapt)

É uma técnica de imunocaptura e aglutinação para a detecção de anticorpos totais anti-*Brucella abortus*, que permite a detecção de anticorpos aglutinantes e também os incompletos, ou não-aglutinantes. Os anticorpos incompletos pertencem às classes IgG e IgA e surgem de forma persistente em níveis séricos elevados na brucelose crónica, pelo que a sua pesquisa é utilizada na detecção desta forma da doença.

Estes anticorpos reagem com o antígeno mas não têm capacidade de o aglutinar, pelo que é necessário juntar, num passo posterior, um soro anti-imunoglobulina humana para poder visualizar a reacção de aglutinação.

O teste é executado em microplacas, com poços em U, revestidas com imunoglobulinas anti-humanas, às quais se adiciona a amostra de soro em estudo e uma suspensão antigénica de *B. abortus*.

Os resultados são expressos em título, dado pela última diluição do soro que ainda apresenta aglutinação.

O teste é positivo quando se observa uma aglutinação distribuída pelas paredes do fundo do poço, e é negativo quando se observa um botão de bactérias no centro do poço. A detecção de títulos elevados sugere a existência de brucelose, mas deve ser sempre testado conjuntamente com outros testes e verificada a seroprevalência da doença antes de emitir um diagnóstico definitivo.

### **3.3.3. Serologia para a Mononucleose Infecciosa**

A mononucleose infecciosa (MNI) é uma infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV, do inglês *Epstein-Barr virus*) transmitida por via oral (saliva), sendo por este motivo também conhecida por doença do beijo. Afecta principalmente adolescentes e adultos jovens, 90% dos casos surgem entre os 10 e os 25 anos de idade, e é caracterizada por linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegália moderada e amigdalite acompanhada de febre, mal-estar, astenia, mialgias, entre outros.

Os linfócitos T respondem imunologicamente às células B infectadas, sobretudo através da activação e proliferação das células T supressoras (CD8), originando uma linfocitose e o aparecimento (mais de 10 %) de linfócitos atípicos, ou células de Downey, no sangue periférico.

#### Fundamento do Método

O diagnóstico serológico da MNI é feito através da determinação semi-quantitativa de anticorpos heterófilos associados à MNI (MONOSPOT). Trata-se de uma técnica de aglutinação directa em placa, na qual é utilizado um reagente constituído por partículas de látex revestidas com antigénios causadores da MNI, extraídos de eritrócitos de bovino (comuns a antigénios do EBV).

A presença de anticorpos específicos no soro do doente provoca aglutinação do reagente, que se traduz na formação de floculação.

Na presença de resultados positivos é efectuado um teste semi-quantitativo, idêntico ao procedimento anterior, mas utilizando a amostra de soro com diluições sucessivas até à determinação da última diluição que ainda apresenta aglutinação, esta corresponderá ao título do soro em anticorpos.

Podem surgir falsos-negativos associados a situações em que o doente permanece negativo para anticorpos heterófilos, ou eventualmente apresenta uma resposta tardia a este tipo de anticorpos. A prevalência destes anticorpos pode estender-se a meses ou anos após o desaparecimento dos sintomas e da fase aguda da doença, resultando uma cicatriz imunológica e não um marcador de doença. Por outro lado, existem situações em que a precocidade destes anticorpos é notória, pelo que a interpretação destes resultados deve ser cuidadosa e enquadrada no contexto clínico do doente.

### 3.3.4. Serologia para *Echinococcus granulosus*

O *Echinococcus granulosus* é um parasita pertencente à classe dos céstodes. O seu ciclo de vida envolve dois hospedeiros, o cão é o hospedeiro definitivo e a forma larvar desenvolve-se principalmente no fígado e pulmão do hospedeiro intermediário, herbívoros e, acidentalmente, o homem.

As formas larvares deste parasita podem evoluir, no organismo humano, para quistos, designados por quistos hidáticos, podendo instalar-se em tecidos do fígado e pulmão e causar uma patologia conhecida por hidatidose. A ruptura destes quistos é perigosa, podendo conduzir ao choque anafilático.

#### Fundamento do Método

A pesquisa de anticorpos anti-*Echinococcus granulosus* é executada através de uma técnica de hemaglutinação indirecta em microplaca, com fundo em U ou V. O reagente revelador é constituído por uma suspensão de eritrócitos de carneiro sensibilizados com o antigénio de *E. granulosus*. A presença de anticorpos específicos (anti-*Echinococcus*) provoca hemaglutinação do reagente revelador, que se traduz na formação de um halo mais ou menos alargado, de cor vermelho acastanhado que cobre a cúpula da placa. Na ausência de aglutinação os eritrócitos do reagente sedimentam no fundo da cúpula sob a forma de um botão punctiforme.

O reagente testemunha (controlo) é constituído por uma suspensão de eritrócitos de carneiro não sensibilizados e assegura a especificidade da reacção, eliminando as interferências devido à presença de aglutinas naturais (ex. anticorpos heterófilos).

É uma técnica manual semi-quantitativa e os resultados são expressos em título, dado pela última diluição do soro que ainda apresenta aglutinação.

### **3.3.5. Titulação do Factor Reumatóide**

Os factores reumatóides são auto-anticorpos, pertencentes predominantemente à classe IgM, dirigidos contra a região Fc da IgG humana. São marcadores biológicos de grande interesse diagnóstico nas situações de artrite reumatóide, uma vez que 70 a 90% dos doentes com esta patologia apresentam factores reumatóides. Além disso, a sua determinação correlaciona-se com o grau de evolução da doença. Contudo, existem tipos seronegativos de artrite reumatóide sem factores reumatóides detectáveis, estes podem ainda ocorrer noutras doenças reumáticas e não-reumáticas como a hepatite, endocardite, infecções virais e noutras doenças autoimunes, pelo que a sua detecção isolada não poderá constituir diagnóstico de artrite reumatóide.

No Laboratório de Imunologia, o factor reumatóide é determinado por duas técnicas, uma técnica mais sensível – RA teste (doseamento do factor reumatóide por nefelometria) que será abordada posteriormente no sector da autoimunidade, e uma técnica mais específica – Reacção de Waaler-Rose.

#### Reacção de Waaler-Rose

A reacção de Waaler-Rose é uma técnica de hemaglutinação indirecta em microplaca, com fundo em U ou V. O reagente revelador é constituído por uma suspensão de eritrócitos de carneiro sensibilizados com um antigénio IgG de carneiro. A presença de factor reumatóide sérico provoca hemaglutinação do reagente revelador que se traduz na formação de um halo mais ou menos alargado, de cor vermelho acastanhado que cobre a cúpula da placa. Na ausência de aglutinação, os eritrócitos do reagente sedimentam no fundo da cúpula sob a forma de um botão punctiforme.

O reagente testemunha (controlo) é constituído por uma suspensão de eritrócitos de carneiro não sensibilizados e assegura a especificidade da reacção, eliminando as interferências devido à presença de aglutininas naturais (ex. anticorpos heterófilos).

É uma técnica manual semi-quantitativa e os resultados são expressos em UI/mL. Este resultado é obtido a partir do título encontrado x factor (índice de sensibilidade) indicado no rótulo do reagente. O título é dado pela última diluição do soro que ainda apresenta aglutinação.

### 3.3.6. Serologia para *Treponema pallidum*

O *Treponema pallidum*, uma espiroqueta, é o agente etiológico da sífilis, infecção sexualmente transmissível, ainda hoje responsável por elevada morbidade e alguma mortalidade, em vários países. Na ausência de diagnóstico e tratamento, esta doença apresenta três fases evolutivas: a sífilis primária, caracterizada por uma lesão quase sempre solitária, indolor, de fundo limpo e duro, que tem várias designações como “cancro duro” ou de inoculação, lesão primária ou sífiloma; a sífilis secundária, que corresponde à disseminação do agente infeccioso por via sanguínea e linfática, na qual predominam as manifestações sistémicas; e a sífilis terciária, em que as manifestações da fase de disseminação se podem complicar, afectando o sistema nervoso e cardiovascular.

A sífilis também pode ser transmitida ao feto, durante a fase de gestação, especialmente a partir da décima semana de gravidez, sendo este tipo de transmissão designado de vertical. A criança pode apresentar sífilis congénita, ou porque contraiu a infecção através do sangue materno, via placenta, ou porque aquela se processou ao atravessar o canal de parto da mãe, ginecologicamente infectante. A sífilis congénita pode causar, no feto ou na criança, lesões deletérias de diverso grau e natureza, sendo que as mais graves se traduzem na morte *in utero* seguida de aborto.

O diagnóstico da sífilis é feito maioritariamente por reacções serológicas, detectando-se no soro dos doentes anticorpos (reaginas) que reagem *in vitro* com uma suspensão coloidal de lípidos, métodos não-treponémicos, ou com antigénios de *T. pallidum*, métodos treponémicos.

Os métodos não-treponémicos são inespecíficos e detectam anticorpos da classe IgG e IgM contra lípidos da superfície celular de *T. pallidum* e lípidos “cedidos” pelas células infectadas do hospedeiro. O antigénio utilizado é constituído por cardiolípidina (extraído de tecido animal), lecitina e colesterol. Os testes mais usados são o VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*) e o RPR (*Rapid Plasma Reagin*). Ambos medem a floculação dos antigénios lipídicos com o soro dos doentes infectados. O RPR utiliza partículas de carvão activado com os antigénios lipídicos adsorvidos e a reacção é visível a olho nu, não requer a descomplementação prévia do soro e pode ser executado no plasma. O VDRL é um teste rápido, mas requer que o soro do doente seja

descomplementado e requer o uso de microscopia. É o teste mais utilizado no rastreio da sífilis (é positivo em cerca de 70% dos casos de sífilis primária, 99% na sífilis secundária e negativo na sífilis tardia), na monitorização da eficácia terapêutica com antibióticos e no diagnóstico da neurosífilis.

São testes que, em caso de infecção sífilítica não tratada, podem ser positivos a partir da 2ª ou 3ª semana pós-infecção. Não detectam precocemente a sífilis e exibem falta de sensibilidade na sífilis tardia. Podem ocorrer resultados falsos-positivos, requerendo a confirmação dos resultados pelos métodos treponémicos. Tal facto deve-se ao aparecimento de anticorpos antilípídicos, em resposta a doenças não-treponémicas, agudas e crónicas, em que ocorre destruição tecidual (ex. doenças autoimunes), nas grávidas e nos idosos.

O teste VDRL também pode ser usado quantitativamente, permitindo avaliar a mais alta diluição do soro em que ocorre reacção positiva que, geralmente, vai decrescendo ao longo do tratamento com antibióticos.

VDRL e RPR positivos podem tornar-se negativos 6 a 20 meses após tratamento eficaz.

Os métodos treponémicos utilizam como antigénio o *T. pallidum*, sendo por isso mais específicos que os métodos não-treponémicos. Os testes mais usados são o FTA-ABS (*Fluorescent Treponemal Antibody Absortion*), o TPHA (*Treponema Pallidum Hemagglutination*) e a metodologia imunoenzimática ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

O FTA-ABS utiliza como antigénio a estirpe Nichol de *T. pallidum*, morta. Nos soros positivos, os anticorpos cobrem a estirpe antigénica, sendo a reacção visualizada com recurso a marcadores fluorescentes num microscópio de fluorescência. Este é o primeiro teste a tornar-se positivo na sífilis primária. É, igualmente, um bom teste para diagnosticar a sífilis congénita, se forem detectados IgM FTA no sangue do recém-nascido.

O TPHA utiliza uma suspensão de eritrócitos de peru (aves) sensibilizados com *Treponema pallidum*. A hemaglutinação ocorre com o soro do paciente com sífilis. É o método mais utilizado, pois é de fácil execução, leitura e interpretação dos resultados. Os testes treponémicos são usados na confirmação das reacções positivas de VDRL ou de RPR e detectam, mais precocemente, a sífilis primária e permanecem positivos na

sífilis tardia, quando os testes treponémicos revertem a negativos em alguns pacientes. Os testes treponémicos são pouco influenciados pela terapêutica, ao contrário do que acontece com o VDRL. A especificidade dos testes treponémicos é elevada, mas ocorrem, mesmo assim, resultados falsos-positivos, principalmente nos pacientes com elevado teor de  $\gamma$ -globulinas e nas doenças autoimunes (ex. LES).

### IgM – ELISA

Testes serológicos positivos em crianças, filhas de mães infectadas, podem traduzir a transferência placentária de anticorpos da mãe ou uma reacção imunológica específica à infecção. Estas duas possibilidades são distinguíveis, por testes do sangue da criança, colhido durante um período de seis meses. Nas crianças não infectadas, os títulos diminuem ao longo do tempo, geralmente até aos três meses de idade. Os títulos permanecem altos nas crianças com sífilis congénita. O doseamento do título, em IgM anti-*T. pallidum*, por metodologia imunoenzimática (ELISA) é de execução e interpretação fáceis.

### Algoritmo para o Diagnóstico Serológico da Sífilis

De acordo com a literatura recente e as últimas *guidelines* publicadas, o Laboratório de Imunologia estabeleceu o seguinte protocolo:

- **Teste de Screening/Diagnóstico**

Os testes recomendados para o *screening*, ou rastreio, da sífilis são os métodos treponémicos - EIA (ensaio imunoenzimático) IgG e IgM ou o TPHA. Os métodos não-treponémicos não são recomendados como testes de *screening* devido ao número elevado de falsos-negativos, normalmente associados a fenómenos de pró-zona.

Para o *screening*, o Laboratório optou por um teste de microELISA (EIA IgG e IgM), por ser sensível na infecção primária e automatizado. Este ensaio é efectuado no equipamento MAGO da Diamedix.

### MicroELISA

#### Fundamento do Método

O método microELISA é um imunoenensaio enzimático, do tipo *sandwich*, que permite a detecção de anticorpos no soro. Utilizam-se anticorpos

monoclonais para revestir a superfície de poliestireno da microplaca, que se unirão ao anticorpo presente na amostra, e para detectar o anticorpo ligado nas microplacas sensibilizadas (reagente conjugado, anticorpos monoclonais ligados à peroxidase). O excedente é eliminado por lavagem da placa e, posteriormente, adiciona-se o substrato, tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), que reagirá com o complexo formado, originando uma reacção de cor azul, que passa a amarelo quando se junta a solução de paragem (ácido). A absorvância (densidade óptica), das amostras e dos controlos, é medida por um espectrofotómetro a um comprimento-de-onda de 450 nm e é proporcional à quantidade de anticorpo presente na amostra em estudo. Os resultados são determinados com base num *cut-off* gerado especificamente pelo analisador.

#### Aplicação

Determinação quantitativa, *in vitro*, de anticorpos das classes IgG e IgM anti-*Treponema pallidum*

- **Teste Confirmatório**

Para este efeito, recomenda-se o uso de um teste treponémico, diferente do utilizado no *screening*.

O Laboratório optou por um teste TPHA - Determinação semi-quantitativa de anticorpos anti-*Treponema pallidum* por hemaglutinação indirecta.

O Laboratório dispõe ainda de um teste de microELISA para o doseamento de anticorpos anti-IgM (para efeitos de estadiamento da infecção).

- **Monitorização Terapêutica**

Neste caso é recomendado o uso de um teste não-treponémico, VDRL ou RPR. O Laboratório optou pelo RPR (semi-quantitativo).

Determina-se o título numa amostra colhida no dia em que se inicia o tratamento. A avaliação do declínio do título com a terapêutica baseia-se num *follow-up* 1, 2, 3, 6 e 12 meses após o início do tratamento. O título deve diminuir duas diluições, quatro vezes, nos primeiros seis meses.

### 3.3.7. Serologia para *Rickettsia conorii*

As bactérias do género *Rickettsia* são bacilos Gram-negativos intracelulares, desenvolvem-se estritamente nas células eucarióticas actuando como parasitas obrigatórios. São transmitidas por artrópodes (hospedeiro natural) e têm os mamíferos como reservatório, o homem é geralmente um hospedeiro eventual.

A *R. conorii* provoca a febre botonosa mediterrânea que se caracteriza pelo aparecimento de febre, exantema e mancha negra, ou de inoculação, na zona da picada.

A técnica clássica para o diagnóstico serológico consiste na imunofluorescência indirecta, mas pode ser substituída por uma técnica imunoenzimática com resultados bastante semelhantes em termos de sensibilidade e especificidade. Pode demonstrar-se IgM específica contra *R. conorii* desde a primeira semana da doença.

O doseamento de anticorpos IgG e/ou IgM para *R. conorii*, no soro humano, é efectuado por um teste imunoenzimático indirecto (microELISA, já descrito anteriormente) no equipamento MAGO da Diamedix.

### 3.3.8. Serologia para *Aspergillus*

A aspergilose, pela sua frequência e distribuição mundial, é um dos exemplos mais importantes de micose oportunista. É causada por fungos filamentosos do género *Aspergillus*, que vivem à custa de matéria orgânica em decomposição. As diferentes espécies deste género produzem esporos, cujas pequenas dimensões favorecem a sua disseminação no meio ambiente e a infecção aparece, geralmente, após a sua inalação. As formas invasivas da doença, que têm aumentado nos últimos dez anos, contituem os tipos de infecção mais graves, aparecem principalmente em pacientes neutropénicos (após terapêutica anti-cancerígena) e em pacientes tratados com imunossuppressores (transplantados de órgãos, particularmente transplante de medula óssea) e corticosteróides.

A determinação do antigénio galactomanano, de *Aspergillus*, é considerada um método serológico que facilita o diagnóstico da aspergilose invasiva. É efectuada por um método imunoenzimático em *sandwich*, de um só passo, no qual as amostras de soro são previamente tratadas pelo calor, em presença de EDTA, para dissociar os complexos imunes e precipitar as proteínas do soro que possam interferir com o teste.

Os resultados são semi-quantitativos e expressos sob a forma de um índice ( $I = \text{densidade óptica da amostra} / \text{média da densidade óptica dos cut-off}$ ), a partir do qual é possível estabelecer um resultado qualitativo (positivo ou negativo). No entanto, o resultado não deve ser utilizado isoladamente, mas sim em conjunto com os dados clínicos que suportem a interpretação.

### 3.3.9. Serologia para *Streptococcus pyrogenes*

As bactérias do género *Streptococcus* são Gram-positivas, anaeróbias facultativas. A maioria dos estreptococos que possuem o antigénio A de Lancefield pertencem à espécie *Streptococcus pyrogenes*, são beta-hemolíticos e considerados os principais agentes patogénicos responsáveis por infecções locais (exs. impetigo, eripisela, faringite), infecções disseminadas, ou sistémicas, (exs. escarlatina, febre puerperal, sépsis) e doenças pós-estreptocócicas, de índole imunológica, que se manifestam várias semanas após a infecção primária.

As espécies de *S. pyrogenes* produzem várias proteínas, algumas com actividade enzimática, entre as quais a estreptolisina O. É uma proteína hemolítica no estado reduzido, mas que é rapidamente inactivada na presença de oxigénio (O = oxigénio-lábil), responsável pela hemólise produzida nas zonas dos meios de cultura não expostas ao oxigénio, nas colónias do interior daqueles meios de cultura (meios de agar sangue). É uma proteína antigénica e a determinação de anticorpos específicos anti-estreptolisina O (TASO) é uma prova serológica muito usada para detectar infecções anteriores por *S. pyrogenes*. Valores elevados são encontrados nas doenças imunes pós-estreptocócicas, febre reumática e glomerulonefrite. A determinação quantitativa é efectuada por nefelometria, no equipamento BN ProSpec da Siemens.

## 3.4. AUTOIMUNIDADE

A autoimunidade inclui todos os mecanismos funcionais do sistema imunológico que estão envolvidos no reconhecimento de constituintes do próprio hospedeiro, o *self*, mecanismos esses que são essencialmente fisiológicos e intrínsecos ao funcionamento de toda a imunidade adaptativa. A identificação de autoanticorpos que reagem com componentes dos órgãos envolvidos em diferentes doenças humanas levou ao

reconhecimento de que o sistema imunológico pode ser autoagressivo e à identificação das doenças autoimunes. A etiopatogenia destas doenças é multifactorial, resultando da interação de factores genéticos e ambientais. As doenças autoimunes representam um grupo bastante heterogéneo com apresentações clínicas muito distintas, que podem ser sistémicas ou específicas de órgão, podendo também distinguir-se doenças em que há perturbação da selecção, regulação ou apoptose dos linfócitos, de outras em que há resposta aberrante a um antígeno particular. O sistema imunológico pode lesar a sinovial articular (artrite reumatóide), os ilhéus  $\beta$ -produtores de insulina no pâncreas (diabetes tipo 1), a mielina do sistema nervoso central e medula (esclerose múltipla), ou diferentes células e estratos da pele (exs. psoríase, vitiligo e penfigóide).

A prevalência das doenças autoimunes tem vindo a aumentar nas últimas décadas e, colectivamente, atingem pelo menos 5% dos europeus e norte-americanos, dos quais 2/3 são mulheres, situando-se entre as dez principais causas de morte no sexo feminino.

A detecção serológica dos autoanticorpos é muito útil, particularmente nas doenças sistémicas onde a grande diversidade de apresentação clínica, de sinais e de sintomas, tornam o diagnóstico diferencial complexo.

No Laboratório de Imunologia, a detecção serológica dos autoanticorpos é efectuada por imunofluorescência indirecta, e imunoensaios enzimáticos como *immunoblot* e microELISA.

### **3.4.1. Imunofluorescência Indirecta**

#### Fundamento do Método

A imunofluorescência indirecta é uma técnica que permite a determinação semi-quantitativa de autoanticorpos, presentes no soro. Trata-se de um procedimento que utiliza anticorpos fluorescentes, como marcadores para uma reacção de ligação antígeno-anticorpo. O teste efectua-se em duas etapas: na primeira, o soro do doente é diluído e colocado em contacto com o substrato e, os autoanticorpos eventualmente presentes na amostra em estudo ligar-se-ão aos antígenos do substrato, formando um complexo antígeno-anticorpo estável; na segunda etapa, é adicionado ao substrato um anti-soro polivalente conjugado com fluoresceína, que se ligará ao complexo antígeno-anticorpo formado na etapa anterior.

Após uma lavagem, para remover o conjugado em excesso, o substrato é observado ao microscópio de fluorescência. Um resultado é positivo quando se observa uma fluorescência brilhante verde-maçã no organelo ou tecido em estudo.

A imunofluorescência indirecta é a técnica de escolha para a pesquisa da maioria dos autoanticorpos. Apresenta como vantagens a fácil execução, a elevada sensibilidade e a possibilidade de detectar simultaneamente mais do que um autoanticorpo. No entanto, apresenta algumas limitações metodológicas e de interpretação, é uma técnica subjectiva, difícil de padronizar e os resultados são semi-quantitativos.

A escolha do substrato depende do tipo de anticorpo que se pretende pesquisar. No Laboratório de Imunologia são utilizados substratos como células HEp-2, *Crithidia lucilae*, substrato triplo, células VSM47, estômago de primata com solução de factor intrínseco e granulócitos.

### **Células HEp-2 – Pesquisa de Anticorpos Antinucleares**

As células HEp-2 (do inglês, *human epithelial cell line: type 2*) são células epiteliais humanas obtidas a partir do carcinoma da laringe. Estas células são utilizadas na pesquisa de anticorpos anti-nucleares (ANA, do inglês *anti-nuclear antibodies*) e têm como vantagens o facto de possuírem um núcleo grande com vários nucléolos (boa visualização de detalhes), grande diversidade de antígenos nucleares, elevada sensibilidade e especificidade e várias células nos diferentes estadios de mitose, permitindo a detecção de anticorpos dirigidos contra antígenos que apenas são expressos durante o ciclo celular (ex. anticorpo anti-centrómero).

Os ANA constituem um vasto grupo de auto-anticorpos que reagem com diversos componentes do núcleo como o dsDNA (*double-stranded DNA*), histonas, nucleossoma, antígenos nucleares extraíveis (ENA, do inglês *extractable nuclear antigens*) – Sm (*Smith*), RNP (*ribonucleoprotein*), SSA/Ro (*Sjögren's syndrome – antigen A/index patient with anti-SSA antibody*), SSB/La (*Sjögren's syndrome – antigen B/ index patient with anti-SSB antibody*), Jo-1 (*histidyl-tRNA synthetase*) e Scl70 (*scleroderma antigen – 70 kDa*), nucléolo, membrana nuclear e aparelho mitótico (centrómero, centríolo e fuso mitótico).

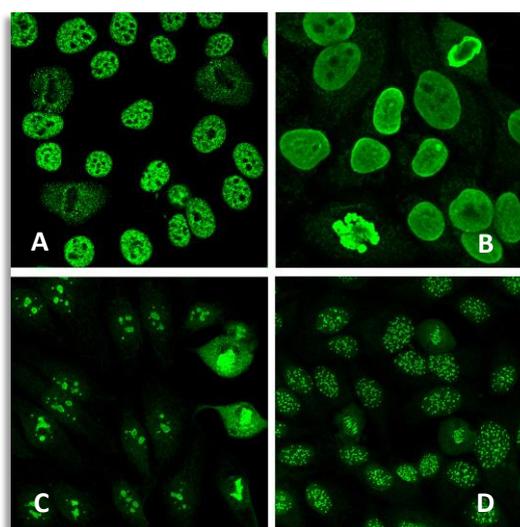
A identificação das especificidades dos ANA tem grande importância fisiopatológica e clínica em doenças autoimunes sistémicas como o lúpus eritematoso

sistêmico (LES), esclerodermia, Síndrome de Sjögren (SS), polimiosite (PM), dermatomiosite (DM), doença conectiva mista do tecido conjuntivo (MCTD), artrite reumatóide (AR), entre outras. Algumas especificidades dos ANA contribuem para o diagnóstico e podem ser utilizadas no estudo da evolução da doença, na monitorização terapêutica e no estabelecimento do prognóstico.

A presença de diferentes anticorpos anti-nucleares em células HEp-2 produz padrões de fluorescência nuclear diferentes (Figura 3.), pelo que estão relacionados com patologias diferentes. Os padrões de fluorescência nucleares mais comuns estão descritos na tabela seguinte.

**Tabela 3.** – Padrões nucleares mais comuns e respectiva correlação clínica.

Padrão Nuclear	Descrição	Correlação Clínica
Homogéneo	Fluorescência difusa e uniforme dos núcleos em interfase, mitoses positivas.	LES, lúpus induzido por fármacos, AR.
Mosqueado	Fluorescência granular fina ou grosseira dos núcleos em interfase, mitoses negativas.	LES, MCDT, SS, PM, esclerodermia.
Centrómero	Numerosos pontos fluorescentes, mitoses positivas.	Cirrose biliar primária.
Nucleolar	Fluorescência exclusiva dos nucléolos, mitoses positivas ou negativas.	Esclerodermia, miosite, LES.



**Figura 3.** – Padrões de fluorescência nuclear detectados em células HEp-2. [Legenda: A – Mosqueado; B – Homogéneo; C – Nucleolar; D – Centrómero.]

### ***Crithidia lucilae* – Pesquisa de Anticorpos Anti-dsDNA**

A *Crithidia lucilae* é um flagelado que possui uma mitocôndria gigante, o cinetoplasto, contendo uma massa de dsDNA circular muito condensada, que parece ser livre de histonas ou de quaisquer outros antígenos nucleares.

Este substrato é utilizado na pesquisa de anticorpos anti-dsDNA e apresenta uma elevada especificidade, devido à natureza do dsDNA circular no cinetoplasto.

Os anticorpos anti-dsDNA apresentam uma especificidade elevada para o LES, pelo que a sua detecção é importante no diagnóstico desta patologia.

### **Substrato Triplo (rim, estômago e fígado de roedores)**

O substrato triplo é obtido a partir de cortes de três tecidos, rim, estômago e fígado, de roedores e é utilizado na pesquisa de anticorpos anti-mitocôndria (AMA, do inglês, *anti-mitochondrial antibodies*), anticorpos anti-célula parietal (APCA, do inglês, *anti-parietal cell antibodies*), anticorpos anti-músculo liso (ASMA, do inglês, *anti-smooth muscle antibodies*) e anticorpos anti-microsomas hepáticos e renais (anti-LKM, do inglês, *anti-liver, kidney microsomal antibodies*). Os diferentes anticorpos são identificados de acordo com o padrão e localização da fluorescência ao nível dos três tecidos. Na Tabela 4. estão referidas as principais correlações clínicas com estes anticorpos.

**Tabela 4.** – Significado clínico dos anticorpos pesquisados em substrato triplo, realçando as patologias onde aparecem títulos mais elevados.

<b>Anticorpo</b>	<b>Significado Clínico</b>
AMA	<b>Cirrose biliar primária</b> Hepatite crónica Cirrose criptogénica
ASMA	<b>Hepatite crónica</b> Cirrose biliar primária Cirrose criptogénica
APCA	<b>Anemia perniciosa</b>
LKM	Hepatite crónica

### **Células VSM47**

As células musculares lisas VSM47 (do inglês, *vascular smooth muscle*) são utilizadas na pesquisa de anticorpos anti-filamentos de actina (F-actina), por exemplo no caso de um resultado positivo para ASMA.

A detecção de anticorpos anti-F-actina tem importância no diagnóstico da hepatite autoimune.

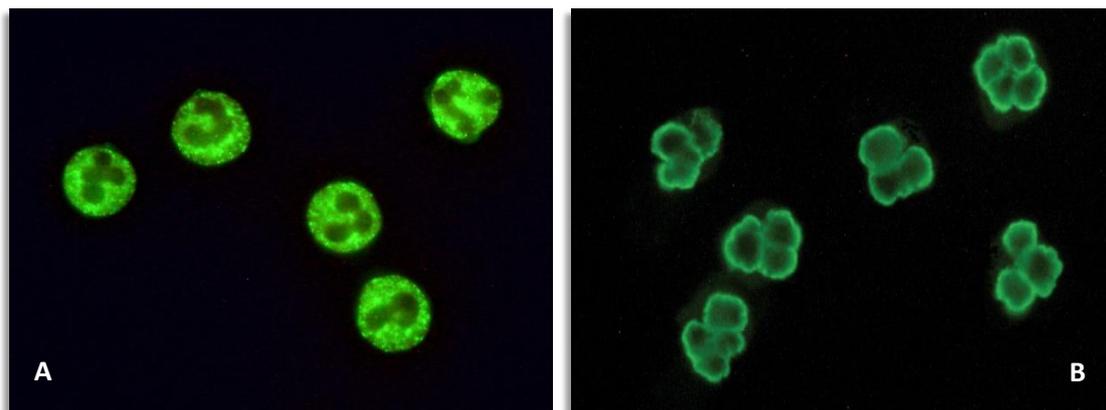
### **Estômago de Primata e Suspensão de Factor Intrínseco**

Esta preparação é utilizada na pesquisa de anticorpos anti-factor intrínseco (FI) e anti-célula parietal (APCA, do inglês *anti-parietal cell antibodies*). As lâminas contêm secções de estômago de primata e gotas microscópicas de uma solução com factor intrínseco.

As células parietais da mucosa gástrica produzem ácido hidróclorídrico (acidificação do suco gástrico) e factor intrínseco, uma glicoproteína que se liga à vitamina B12 com função importante na absorção pelo íleo distal. Entre 50 a 70% dos doentes com anemia perniciosa é detectada a presença de anticorpos anti-FI. Os anticorpos APCA podem estar relacionados com a gastrite autoimune (gastrite crónica atrofica) e anemia perniciosa.

### **Neutrófilos**

As preparações de neutrófilos humanos são utilizadas na pesquisa de anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA, do inglês, *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*), importantes marcadores de vasculites sistémicas e dos pequenos vasos. No entanto, estes anticorpos também podem estar associados a outras situações como doenças inflamatórias do intestino, doenças hepáticas e do tecido conjuntivo. As preparações são constituídas por neutrófilos fixados com etanol, permitindo a distinção entre dois padrões: C-ANCA – padrão citoplasmático, produzido por anticorpos que reagem com a proteinase 3 (PR3) e P-ANCA – padrão perinuclear, produzido por anticorpos que reagem com a mieloperoxidase (MPO) (Figura 4.). Estas enzimas, PR3 e MPO, encontram-se nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e têm antígenos que reagem com os anticorpos.



**Figura 4.** – Neutrófilos fixados com etanol, permitindo distinguir dois padrões de fluorescência.

[**Legenda:** A – C-ANCA (citoplasmático/anti-PR3); B – P-ANCA (perinuclear/anti-MPO).]

Os resultados positivos, obtidos por imunofluorescência indirecta, deverão ser confirmados por técnicas mais específicas como os imunoensaios enzimáticos, no Laboratório de Imunologia são utilizadas as metodologias de *immunoblot* e microELISA.

### 3.4.2. Imunoensaios Enzimáticos

#### 3.4.2.1. *Immunoblot*

A técnica *immunoblot* permite a identificação qualitativa de anticorpos. Os vários antígenos estão depositados em tiras de nitrocelulose, cada uma delas contém vários antígenos, permitindo a identificação de vários anticorpos num único teste. O princípio da técnica é semelhante à metodologia ELISA. A tira é incubada com a amostra de soro do doente diluída, na eventual presença de anticorpos, estes ligam-se aos respectivos antígenos e as ligações não específicas são removidas pela lavagem. Os complexos antígeno-anticorpo formados são detectados por uma anti-globulina humana conjugada com uma enzima (anti-IgG humana marcada com fosfatase alcalina) que se liga ao anticorpo. A reacção é revelada pela adição do substrato (NBT/BCIP – cloreto de azul de nitrotetrazolium / 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato), formando um composto corado.

É uma técnica automatizada e é efectuada no equipamento EUROBlotMaster da Euroimmun.

No Laboratório de Imunologia é utilizada a técnica *immunoblot* na pesquisa dos seguintes anticorpos:

- ANA (*ANA Profile* – autoanticorpos da classe IgG contra 14 antígenos diferentes: nRNP/Sm, Sm, SS-A (SS-A nativo e Ro-52), SS-B, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, CENP B, PCNA, dsDNA, nucleossomas, histonas, proteína-P ribossomal, e AMA-M2);
- anti-antígenos hepáticos (*Profile Autoimmune Liver Diseases* – autoanticorpos da classe IgG contra 9 antígenos diferentes: AMA-M2, M2-3E (BPO), Sp100, PML, gp210, LKM-1, LC-1, SLA/LP e Ro-52);
- anti-mieloperoxidase (MPO), anti-proteinase 3 (PR3) e anti-membrana basal glomerular (GBP);
- anti-antígenos associados a miosites;
- anti-antígenos associados a esclerose sistémica.

#### **3.4.2.2. MicroELISA**

A técnica de microELISA, descrita anteriormente, no sector da serologia, é utilizada na identificação e quantificação de auto-anticorpos. É uma técnica automatizada, sendo efectuada no equipamento MAGO da Diamedix.

No Laboratório de Imunologia utiliza-se a técnica de microELISA na pesquisa dos seguintes anticorpos:

- anti-dsDNA;
- anti-antígenos mitocondriais M2;
- APCA;
- anti-fosfolípidos (APA, do inglês, anti-phospholipid antibodies): anti- $\beta$ -2-glicoproteína I e anti-cardiolipina, importantes no diagnóstico do síndrome anti-fosfolipídico.

### **3.4.3. Doseamento do Factor Reumatóide**

Os factores reumatóides são autoanticorpos dirigidos contra a região Fc das imunoglobulinas e pertencem, geralmente, à classe IgM. A sua determinação tem interesse no auxílio ao diagnóstico da artrite reumatóide, pois a presença de factores reumatóides é detectada no soro de 70 a 90% dos doentes que sofrem desta patologia.

Como referido anteriormente, no Laboratório de Imunologia, o factor reumatóide é determinado por duas técnicas, a Reacção de Waaler-Rose, já descrita no sector da serologia, e por uma técnica mais sensível, o RA (*rheumatoid arthritis*) teste. Este parâmetro é doseado no soro, por nefelometria no equipamento BN ProSpec da Siemens.

#### 4. BIOQUÍMICA

O estágio profissional na valência de Bioquímica é parte integrante do plano de estudos do Curso de Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O estágio decorreu no Laboratório de Bioquímica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil, E.P.E. (IPOLFG, E.P.E.), sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Cidália Vieira, no período compreendido entre 6 de Setembro de 2010 e 3 de Dezembro de 2010.

O Laboratório de Bioquímica está integrado no Serviço de Patologia Clínica do IPOLFG, tendo como actividades principais a determinação de parâmetros de rotina, bem como de parâmetros mais especializados, nomeadamente o doseamento de fármacos, incluindo imunossuppressores, e a monitorização de doenças hemato-oncológicas.

O Laboratório de Bioquímica está organizado em três sectores, de acordo com a metodologia utilizada e a natureza dos parâmetros efectuados.

**Tabela 5.** – Sectores do Laboratório de Bioquímica e respectivas metodologias.

Sector	Metodologia
<b>Ensaio de Rotina</b> (e outros mais especializados)	Espectrofotometria
	Quimioluminescência
	Turbidimetria
	Potenciometria
	Imunoensaio Competitivos
<b>Gasometria</b>	Amperometria
	Potenciometria
<b>Análise de Urina</b>	Reflectofotometria

## 4.1. METODOLOGIA

### 4.1.1. Espectrofotometria

#### Fundamento do Método

A espectrofotometria é definida como uma medida da intensidade da luz a um determinado comprimento de onda e baseia-se na capacidade de absorção da radiação. Nos métodos espectrofotométricos, a amostra contendo o analito que se pretende determinar é misturada com um reagente líquido, esta reacção produz uma alteração na absorvância e conseqüente formação de um complexo corado. Esta alteração na absorvância, detectada por um fotodetector, é proporcional à concentração do analito presente na amostra em estudo. Normalmente, uma amostra mais concentrada produz um complexo de cor mais intensa, fazendo com que a quantidade de luz que atravessa o fotodetector seja menor. As reacções enzimáticas, de oxidação-redução ou colorimétricas, que provoquem uma alteração na absorvância podem ser detectadas por espectrofotometria.

### 4.1.2. Quimioluminescência

#### Fundamento do Método

A quimioluminescência corresponde à emissão de luz quando um electrão passa de um nível energético superior, ou do estado excitado, para um nível energético inferior. A excitação é causada por uma reacção química que envolve a oxidação de um composto orgânico (exs. luminol, isoluminol, acridínio ou luciferina) por um agente oxidante (exs. peróxido de hidrogénio, hipoclorito ou oxigénio).

O imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA, do inglês, *chemiluminescent magnetic immunoassay*) ocorre em dois passos. No primeiro passo, a amostra e as micropartículas paramagnéticas, revestidas de anticorpos contra o analito que se pretende determinar, são combinadas e incubadas. O analito, presente na amostra em estudo, liga-se aos anticorpos contra o analito. De seguida, é feita uma lavagem que retira todos os compostos que não ficaram ligados. No segundo passo, o conjugado de anticorpos contra o analito, marcado com acridínio, é adicionado. As soluções activadora (NaOH) e pré-activadora (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) são então adicionadas à mistura da solução.

A reacção quimioluminescente resultante é medida em unidades de luz relativas (RLUs, do inglês, *relative light units*), em que existe uma relação directa entre a concentração do analito presente na amostra e as RLUs detectadas no sistema óptico do equipamento.

### **4.1.3. Turbidimetria**

#### Fundamento do Método

A turbidimetria é uma medida da diminuição da intensidade da luz incidente causada pela dispersão, reflexão e absorção de um feixe de luz com uma dada intensidade. O detector está alinhado com o feixe de luz incidente e a quantidade de luz detectada diminui à medida que a turbidez do meio aumenta. O aumento da turbidez está relacionado com o aumento do número de partículas em suspensão. Assim, a concentração do analito presente na amostra em estudo é tanto maior quanto menor for a quantidade de luz medida. A turbidimetria pode ser utilizada no doseamento de proteínas específicas através de uma reacção de imunoprecipitação (imunoturbidimetria), medindo a quantidade de luz que consegue atravessar a amostra, na presença de imunocomplexos.

### **4.1.4. Potenciometria**

#### Fundamento do Método

A potenciometria baseia-se na medição da força electromotriz (f.e.m.) de células galvânicas, de tal modo constituídas que o potencial de um dos componentes do par electrolítico possa ser tomado como uma resposta às concentrações de espécies iónicas electroactivas presentes na solução. Neste sentido, as condições analíticas devem ser controladas para que a f.e.m. da célula galvânica dependa apenas de uma única espécie iónica, a espécie em estudo.

A potenciometria baseia-se na medição do potencial de um eléctrodo indicador em relação a um eléctrodo de referência. Este potencial depende das actividades das espécies iónicas que entram nas reacções redox (de oxidação-redução) correspondentes e é expresso através da equação de Nernst.

No âmbito das análises clínicas, o eléctrodo indicador utilizado é o eléctrodo selectivo de iões (ISE, do inglês, *ion-selective membrane electrode*), constituído por uma membrana de vidro com permeabilidade selectiva para os aniões, ou catiões, a analisar.

## 4.2. METABOLISMO DOS LÍPIDOS

O interesse no doseamento dos lípidos e das lipoproteínas baseia-se no facto de poderem ser indicativos de risco de doença cardiovascular. Alguns dos analitos que constituem o perfil lipídico de risco podem estar aumentados noutras doenças, como no hipotiroidismo, na diabetes ou em patologias renais. Desta forma, é importante descartar essas possíveis causas de alterações nestes parâmetros, antes de os tratar apenas como factores de risco cardiovascular.

O Painel para o Tratamento de Adultos do *National Cholesterol Education Program* (NCEP) recomenda que todos os adultos com idade superior ou igual a 20 anos devem medir, em jejum, os seus níveis de colesterol total, colesterol LDL (*low-density lipoprotein*), colesterol HDL (*high-density lipoprotein*) e triglicéridos, pelo menos uma vez em cada cinco anos como método de rastreio de doença cardíaca coronária.

### Amostras

Soro e Plasma

### Método

Espectrofotometria

### Equipamento

Architect C8000/Ci8200 da Abbott

### 4.2.1. Colesterol Total

O colesterol é um lípido esteróide sintetizado no fígado, associado à produção de hormonas esteróides e à síntese das paredes celulares.

O aumento dos níveis de colesterol tem sido apontado como um factor de risco para o desenvolvimento de doença das artérias coronárias. O seu doseamento é importante para o diagnóstico e classificação das hiperlipoproteinémias.

A quantificação dos níveis séricos de colesterol pode ainda ser utilizada como indicador da função hepática, da função biliar, da absorção intestinal e do funcionamento da tiróide.

Factores como o *stress*, a idade, o sexo, o equilíbrio hormonal e a gravidez afectam os níveis normais de colesterol.

#### **4.2.2. Triglicéridos**

Os triglicéridos são uma família de lípidos que podem ser absorvidos a partir da dieta (via exógena), ou produzidos no fígado por via endógena, a partir de hidratos de carbono e ácidos gordos. Muitos dos ácidos gordos existentes no organismo constituem os triglicéridos, sendo armazenados no tecido adiposo sob a forma de gordura.

A quantificação dos triglicéridos é importante no diagnóstico e tratamento das hiperlipidémias. Estas doenças podem ser genéticas ou secundárias a outras patologias incluindo nefrose, diabetes *mellitus* e perturbações endócrinas.

Segundo o NCEP, os triglicéridos constituem um factor de risco independente para o desenvolvimento da aterosclerose. Os indivíduos hipertensos, obesos e/ou diabéticos apresentam maior risco relativamente aos que não sofrem destas doenças.

#### **4.2.3. Lipoproteínas**

As lipoproteínas plasmáticas são partículas esféricas que contêm quantidades variáveis de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos e proteínas. Os fosfolípidos, o colesterol livre e as proteínas constituem a superfície exterior da partícula de lipoproteína, enquanto que o núcleo interior contém, sobretudo, colesterol esterificado e triglicéridos. As lipoproteínas solubilizam e transportam o colesterol e os triglicéridos na corrente sanguínea. As proporções relativas de proteínas e lípidos determinam a densidade destas lipoproteínas e fornecem uma base para a sua classificação. As classes de lipoproteínas são os quilomicrons, as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL,

do inglês, *very-low-density lipoprotein*), as lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês, *low-density lipoprotein*) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL, do inglês, *high-density lipoprotein*).

Diversos estudos clínicos demonstraram que as diferentes classes de lipoproteínas têm efeitos muito distintos e variados no risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

#### **4.2.3.1. Colesterol HDL**

A principal função das HDL, no metabolismo lipídico, é a captura e transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, através de um processo conhecido como transporte reverso do colesterol, um mecanismo proposto como cardioprotector, assim os elevados níveis de colesterol HDL têm sido associados à protecção contra doenças coronárias, enquanto que os níveis baixos de colesterol HDL estão associados ao aumento do risco de doença cardiovascular. Desta forma, a determinação dos níveis séricos de colesterol HDL constitui um importante auxiliar para a identificação dos doentes de risco.

#### **4.2.3.2. Colesterol LDL**

As LDL transportam o colesterol do fígado para os tecidos periféricos. As LDL contribuem para a formação de placas que irão entupir as artérias, levando à doença cardíaca coronária.

Todos os estudos apontam o colesterol LDL como factor-chave na patogénese da aterosclerose e da doença coronária. Mesmo dentro do intervalo de referência de concentrações de colesterol total, pode ocorrer um aumento do colesterol LDL com um elevado risco associado de doenças cardiovasculares.

Na Tabela 6. estão enumeradas várias situações que podem justificar as alterações encontradas no doseamento dos lípidos e das lipoproteínas, para além do risco associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

**Tabela 6.** – Significado clínico dos lípidos e das lipoproteínas.

Parâmetro	Aumento	Diminuição
<b>Colesterol Total</b>	Hipotireoidismo, diabetes (não controlada), patologia renal;	Doenças hepáticas, anemia;
<b>Triglicéridos</b>	Hipotireoidismo, alcoolismo, doença hepática, diabetes (não controlada);	–
<b>Colesterol HDL</b>	Terapia com estrogénios, consumo de álcool;	Tabagismo;
<b>Colesterol LDL</b>	Distúrbios hereditários do metabolismo do colesterol, dieta rica em gorduras saturadas;	Ingestão elevada de fibras, tratamento com determinados fármacos;

### 4.3. METABOLISMO ÓSSEO E MINERAL

Entre os vários processos homeostáticos do organismo, o metabolismo do cálcio é aquele que é controlado de forma mais rígida. A necessidade deste controlo deve-se ao facto do cálcio desempenhar um papel crucial no processo de sinalização intracelular, na membrana plasmática das células e no controlo da função de proteínas extracelulares, como as que participam na cascata da coagulação.

O cálcio extracelular está intimamente relacionado com o fósforo e, em menor extensão, com o magnésio.

#### Amostras

Soro, Plasma e Urina.

#### Método

Espectrofotometria.

#### Equipamento

Architect C8000/Ci8200 da Abbott.

#### 4.3.1. Cálcio

A quase totalidade do cálcio (cerca de 99%) do organismo encontra-se no osso. O restante está presente no soro e tem várias funções, como a redução da excitabilidade neuromuscular, a participação na coagulação sanguínea e a activação de algumas enzimas, nomeadamente as que participam na formação óssea.

A quantidade de cálcio sérico (calcemia) é mantida fixa pela acção conjugada da paratormona, da vitamina D e da calcitonina. Assim, o doseamento do cálcio é frequentemente utilizado como um teste de *screening*, pois os seus níveis são mantidos num intervalo muito estreito de concentrações. Alterações nos níveis de cálcio podem ser indicativas de diversos distúrbios metabólicos.

#### 4.3.2. Fósforo

A maior parte do fósforo do organismo (cerca de 80 a 85%) está presente na matriz óssea, sob a forma de hidroxiapatite, a restante encontra-se sob a forma de fósforo inorgânico e ésteres de fosfato. O cálcio e o fósforo séricos apresentam geralmente uma relação de reciprocidade, ou seja, quando os níveis de cálcio diminuem, os níveis de fósforo aumentam e vice-versa.

A quantificação do fósforo é normalmente utilizada, em conjunto com outros parâmetros, no diagnóstico de alterações relacionadas com o metabolismo do cálcio.

#### 4.3.3. Magnésio

O magnésio é um mineral essencial que está envolvido em várias funções bioquímicas. Desempenha um papel estrutural nos ácidos nucleicos e partículas ribossomais, é necessário como activador para várias enzimas, sobretudo as que convertem energia para a função muscular, e participa na fosforilação oxidativa para a produção de energia. É importante na estrutura óssea, mais de 50% do magnésio do organismo está complexado com o cálcio e o fosfato, no osso. Aproximadamente 35% do magnésio no plasma está ligado a proteínas, principalmente à albumina, pelo que as alterações na concentração de albumina podem afectar o magnésio.

O interesse da sua determinação, usado como *follow-up* quando os níveis de cálcio e potássio são baixos, consiste na avaliação de problemas musculares como fraqueza ou espasmos, ou arritmias cardíacas.

Na tabela seguinte encontra-se descrito o significado clínico dos parâmetros envolvidos no metabolismo ósseo e mineral.

**Tabela 7.** – Significado clínico dos parâmetros envolvidos nos metabolismos ósseo e mineral.

Parâmetro	Significado Clínico
<b>Cálcio</b>	<p>↑ – Hiperparatiroidismo, hipervitaminose D, mieloma múltiplo, algumas neoplasias ósseas;</p> <p>↓ – Hipoparatiroidismo, deficiência em vitamina D (ex. osteomalácia), esteatorreia, nefrose, nefrite, pancreatite.</p>
<b>Fósforo</b>	<p>↑ – Hipervitaminose D, hipoparatiroidismo, insuficiência renal;</p> <p>↓ – Raquitismo (deficiência em vitamina D), hiperparatiroidismo, síndrome de Fanconi.</p>
<b>Magnésio</b>	<p>↑ – Insuficiência renal glomerular, coma diabético;</p> <p>↓ – Perturbação da função neuromuscular, diarreia prolongada, síndromes de má absorção, hiperaldosteronismo, terapêutica diurética.</p>

[Legenda: valores séricos: ↑ – aumentado; ↓ – diminuído.]

#### 4.4. EQUILÍBRIO ELECTROLÍTICO E ÁCIDO-BASE

##### 4.4.1. Ionograma

O ionograma consiste na determinação da concentração dos iões sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ), o que permite avaliar, de uma forma global, o equilíbrio electrolítico do organismo.

Na Tabela 8. encontra-se uma descrição dos iões sódio, potássio e cloro, bem como o seu significado clínico.

Tabela 8. – Descrição e significado clínico do ionograma.

Parâmetro	Descrição	Significado Clínico
<b>Sódio</b>	Catião extracelular mais abundante tem um papel essencial na distribuição hídrica normal e na manutenção da pressão osmótica nos compartimentos do líquido extracelular. Os seus níveis sanguíneos são regulados pela excreção e reabsorção nos rins.	<p>↑ – Síndrome de Cushing, desidratação grave ou consumo elevado de sal sem a respectiva compensação em água, diabetes <i>insipidus</i>.</p> <p>↓ – Utilização excessiva de diuréticos, perda gastrointestinal (diarreia ou vômito prolongado), acidose metabólica, doença de Addison, doença renal.</p>
<b>Potássio</b>	Principal catião intracelular, responsável pela contracção muscular e pela manutenção do batimento cardíaco normal.	<p>↑ – Confusão mental, debilidade generalizada, entorpecimento, paralisia flácida nas extremidades, diminuição da frequência cardíaca (eventualmente, colapso do sistema vascular periférico e paragem cardíaca) – Podem estar relacionados a terapêutica intravenosa inadequada, desidratação, choque, cetoacidose diabética e queimaduras graves.</p> <p>↓ – Debilidade muscular, irritabilidade, batimento cardíaco acelerado (eventualmente, paragem cardíaca) – Podem ser causados por uma ingestão deficiente deste catião na dieta, por uma redistribuição do potássio extracelular e por aumento na perda de fluídos orgânicos ricos em potássio.</p>
<b>Cloro</b>	Principal anião extracelular, os seus níveis séricos correspondem normalmente a aumentos e diminuições do sódio.	<p>↑ – Acidose metabólica associada à diarreia prolongada e à perda de <math>\text{NaHCO}_3</math>, doença dos túbulos renais na qual há um decréscimo na excreção de <math>\text{H}^+</math>, levando a um decréscimo na reabsorção de <math>\text{HCO}_3^-</math></p> <p>↓ – Vômito prolongado acompanhado por perda de <math>\text{HCl}</math>, acidose metabólica, casos críticos da doença de Addison, perda de sal em consequência de doença renal.</p>

[Legenda: ↑ – aumentado; ↓ – diminuído.]

Amostras

Soro, Plasma ou Urina

Método

Potenciometria

Equipamento

Architect C8000/Ci8200 da Abbott

#### **4.4.2. Gasometria Arterial**

A gasometria arterial é um teste que efectua a medição do pH e de gases sanguíneos, como a pressão parcial de oxigénio ( $pO_2$ ) e a pressão parcial de dióxido de carbono ( $pCO_2$ ). Permite a identificação de alterações no equilíbrio ácido-base e é indispensável para avaliar o grau de uma insuficiência respiratória aguda, distinguindo hipoxemia com ou sem hipercapnia.

- Hipoxemia sem hipercapnia: A hipoxemia desencadeia uma hiperventilação, reflexo que permite que o  $CO_2$ , muito difundível, seja eliminado. Observa-se então hipocapnia e alcalose respiratória por hiperventilação alveolar.
- Hipoxemia com hipercapnia: A hipercapnia é acompanhada, muito frequentemente, de acidose respiratória mais ou menos compensada por um aumento do bicarbonato plasmático, consoante a insuficiência respiratória é mais ou menos recente.

O doseamento dos gases sanguíneos também é importante na monitorização terapêutica de doentes que estejam a receber oxigénio por ventilação mecânica, no sentido de determinar a quantidade correcta de gases a administrar.

Amostra

Sangue total – colhido por punção da artéria femoral ou radial, ao abrigo do ar, numa seringa impermeabilizada com heparina. O doseamento deve ser feito nos dez minutos que se seguem à colheita.

### Método

Potenciometria (pH e pCO<sub>2</sub>)

Amperometria (pO<sub>2</sub>)

### Equipamento

RapidLab 348 da Siemens

## **Amperometria**

### Fundamento do Método

A amperometria é uma técnica electroquímica utilizada para dosar a quantidade de analito em solução, através da aplicação de uma tensão fixa entre dois eléctrodos numa célula electroquímica, medindo a corrente que a atravessa. O eléctrodo de medição tem carga negativa e serve de cátodo no sistema eléctrico. O eléctrodo de referência tem carga positiva e serve de ânodo. Ambos os eléctrodos estão ligados a uma fonte de tensão externa. Quando a amostra entra em contacto com os dois eléctrodos, é aplicada uma tensão conhecida ao cátodo (eléctrodo de medição). Essa tensão faz com que as moléculas do analito em solução sejam atraídas para o cátodo, dando origem a uma reacção química (redução) que consome electrões. Os electrões são imediatamente substituídos na solução da amostra por uma reacção distinta (oxidação) que ocorre no ânodo (eléctrodo de referência). As duas reacções resultam numa corrente que pode ser medida, sendo directamente proporcional à concentração do analito, que reage no eléctrodo de medição, presente na amostra.

## **Significado Clínico da Gasometria Arterial**

**pH** – O pH exprime a actividade dos iões de hidrogénio numa solução, reflectindo o equilíbrio ácido-base no sangue. O pH tem significado clínico como forma de detectar determinados desequilíbrios ácido-base que podem ocorrer em diversas condições patológicas. Um desequilíbrio ácido-base causado inicialmente por uma insuficiência respiratória é denominado acidose ou alcalose respiratória primária, enquanto que o causado por doença renal ou gastrointestinal é denominado acidose ou alcalose metabólica.

**pCO<sub>2</sub>** – O dióxido de carbono é produzido durante o metabolismo normal da célula e é libertado no fluxo sanguíneo, onde é transportado para os rins e pulmões para ser excretado. O CO<sub>2</sub> é transportado pelo sangue sob a forma de íão bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), CO<sub>2</sub> dissolvido e ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), tem um papel importante na manutenção do pH do sangue. Em conjunto, o pH e a pCO<sub>2</sub> constituem uma ferramenta de diagnóstico mais segura na avaliação da função respiratória. Um **aumento do valor da pCO<sub>2</sub> e uma diminuição do pH** indicam acidose respiratória – condição em que o CO<sub>2</sub> é retido pelos pulmões. Uma **diminuição do valor da pCO<sub>2</sub> e um aumento do pH** indicam alcalose respiratória – condição em que os pulmões expiram demasiado CO<sub>2</sub> comparativamente à quantidade produzida.

**pO<sub>2</sub>** – A medição da pO<sub>2</sub> reflecte a tensão ou força motriz necessária para deslocar o oxigénio de um local para o seguinte, devido ao diferencial de pressões. Apesar de não ser uma medida do conteúdo de O<sub>2</sub>, este valor é uma ferramenta que permite avaliar a eficiência da troca de gases nos pulmões. É importante na avaliação do grau de hipoxemia existente no paciente.

#### 4.5. FUNÇÃO RENAL

Os rins desempenham um papel central nos mecanismos homeostáticos do organismo. Uma diminuição da função renal está fortemente relacionada com o aumento da morbidade e da mortalidade. As principais funções dos rins incluem a filtração, reabsorção e excreção de vários metabolitos. Assim, os rins integram estas funções para manter a homeostase e regular o meio interno.

A determinação de alguns parâmetros bioquímicos, tanto de rotina como exames mais específicos, constitui uma ferramenta útil no *screening* e no diagnóstico de alterações da função renal.

##### Amostras

Soro, Plasma ou Urina

##### Método

Espectrofotometria

##### Equipamento

Architect C8000/Ci8200 da Abbott

#### 4.5.1. Ácido Úrico

O ácido úrico é um metabolito das purinas, ácidos nucleicos e nucleoproteínas. Conseqüentemente, níveis alterados de ácido úrico podem indicar perturbações no metabolismo destas substâncias.

O ácido úrico é excretado pelos rins, mas em situações de disfunção renal pode acumular-se. A hiperuricemia pode levar à formação de depósitos de cristais de urato nas articulações (gota) ou nos rins (cálculos renais).

A determinação do ácido úrico permite avaliar se a inflamação nas articulações está relacionada com a gota e é útil para monitorizar a produção de ácido úrico, em pacientes sujeitos a tratamentos de quimioterapia ou radioactivos.

#### 4.5.2. Creatinina

A creatinina é eliminada do sangue circulante por filtração glomerular. Uma redução da função renal resulta num aumento dos níveis de creatinina sérica. Desta forma, a quantificação da creatinina sérica é utilizada no diagnóstico e monitorização da doença renal aguda e crónica, na determinação de uma estimativa da taxa de filtração glomerular (GFR, do inglês, *glomerular filtration rate*) ou para avaliar a função renal dos pacientes que fazem diálise. A análise da creatinina na urina é utilizada para calcular a *clearance* da creatinina.

##### **Cálculo da *clearance* da creatinina e expressão dos resultados:**

$$CL \text{ (mL/min)} = (Cr_{\text{Urina}} / Cr_{\text{Soro}}) \times (\text{Vol. (mL)} / 1440 \text{ min.})$$

$$\text{Clearance da Creatinina (mL/min/1.73m}^2\text{)}$$

#### 4.5.3. Ureia

As concentrações obtidas por este teste são utilizadas no diagnóstico de determinadas doenças renais e metabólicas. A determinação da ureia, no soro, é (constitui o teste mais) frequentemente utilizada para a avaliação da função renal. Este

teste é frequentemente requisitado em conjunto com a determinação da creatinina sérica para diagnóstico diferencial da hiperuremia, que pode ser:

- pré-renal (descompensação cardíaca, depleção hídrica, aumento do catabolismo de proteínas);
- renal (glomerulonefrite, nefrite crónica, rim policístico, nefrosclerose, nefrose tubular);
- pós-renal (obstruções do tracto urinário).

Na Tabela 9. encontra-se descrito o significado clínico do ácido úrico, da creatinina e da ureia.

**Tabela 9.** – Significado clínico de alterações nos níveis séricos do ácido úrico, da creatinina e da ureia.

Parâmetro	Significado Clínico
<b>Ácido Úrico</b>	<p>↑ – Gota, disfunção renal, leucemia tratada, policitemia, aterosclerose, diabetes, hipotiroidismo, algumas doenças genéticas;</p> <p>↓ – Doença de Wilson.</p>
<b>Creatinina</b>	<p>↑ – Disfunção renal que pode ter várias causas: toxidade provocada por fármacos, diabetes não controlada ou fluxo sanguíneo insuficiente nos rins, devido a choque ou insuficiência cardíaca congestiva.</p>
<b>Ureia</b>	<p>↑ – Disfunção renal, dieta rica em proteínas;</p> <p>↓ – Dieta pobre em proteínas, doença hepática.</p>

[**Legenda:** ↑ – aumentado; ↓ – diminuído.]

#### 4.6. FUNÇÃO HEPÁTICA E BILIAR

O fígado é responsável por numerosas e importantes funções essenciais. É no fígado que se produzem e armazenam aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas e minerais. Sintetiza algumas proteínas plasmáticas, factores de coagulação e proteínas transportadoras. É o principal local de desintoxicação de componentes exógenos, tais como fármacos e toxinas, e do catabolismo de várias hormonas, ajudando a regular os níveis hormonais plasmáticos.

Outras funções importantes do fígado são a conjugação da bilirrubina com o ácido glucorónico e a síntese de ácidos biliares, os quais regulam o metabolismo do colesterol e facilitam a absorção das gorduras provenientes da dieta.

Qualquer lesão do fígado que cause histólise e necrose celular, ao nível do hepatócito, faz com que haja libertação de várias enzimas, cuja medição no soro permite avaliar a extensão do dano hepático e diferenciar a patologia hepatocelular (funcional) da obstrutiva (mecânica). Por exemplo, as concentrações séricas elevadas das enzimas alanina aminotransferase (ALT) aspartato aminotransferase (AST) reflectem situações de dano hepatocelular.

Níveis elevados de fosfatase alcalina (ALP, do inglês, *alkaline phosphatase*) e de  $\gamma$ -glutamil transferase (GGT) revelam obstruções do sistema biliar.

A medição da bilirrubina permite avaliar a capacidade funcional do fígado e distinguir entre processos agudos e crónicos.

#### Amostras

Soro e Plasma.

#### Método

Espectrofotometria.

#### Equipamento

Architect C8000/Ci8200 da Abbott.

### **4.6.1. Aminotransferases – Alanina Aminotransferase e Aspartato Aminotransferase**

As aminotransferases são enzimas que catalisam a transferência do grupo amina de um aminoácido para um ácido  $\alpha$ -cetónico. Ambas são enzimas celulares, cujo aumento no soro é resultado da sua libertação para a corrente sanguínea em consequência da necrose celular.

A aspartato aminotransferase (AST) é constituída por duas isoenzimas, uma citoplasmática e outra mitocondrial, enquanto que a alanina aminotransferase (ALT) é exclusivamente citoplasmática. A AST está presente em vários tecidos como o coração, fígado, músculo esquelético, rim e células hematopoiéticas, enquanto que a ALT

encontra-se sobretudo no fígado, pelo que é considerada um indicador mais específico, do que a AST, para doenças hepáticas. No entanto, esta especificidade não é absoluta, pois a ALT também se encontra em tecidos como o rim, coração e músculo esquelético, mas em concentrações mais baixas. O período de semi-vida médio da AST em circulação é de  $17 \pm 5$  horas, enquanto que o da ALT é de  $47 \pm 10$  horas, pelo que os níveis séricos da AST diminuem mais rapidamente do que os da ALT.

#### **4.6.2. Fosfatase Alcalina**

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima composta por um grupo de pelo menos cinco isoenzimas que catalisam a hidrólise de monoésteres de fosfato, em pH alcalino. Está presente em praticamente todos os tecidos do organismo, especialmente nas membranas celulares, o que sugere a sua intervenção no transporte de metabolitos através das membranas. Encontra-se também na placenta, mucosa intestinal, rim, osso (osteoblastos) e fígado. A função exacta desta enzima é ainda desconhecida, embora pareça estar relacionada com o transporte de lípidos no intestino e com o processo de calcificação óssea.

Uma variedade de processos patológicos pode resultar na libertação de quantidades elevadas de ALP no sangue.

#### **4.6.3. Gama-glutamil Transferase**

A  $\gamma$ -glutamil transferase (GGT) é uma enzima que catalisa a transferência de resíduos  $\gamma$ -glutamil do glutatião para receptores peptídicos. Encontra-se sobretudo no rim, mas também no pâncreas, fígado, baço e intestino.

Embora o rim apresente o nível mais elevado de GGT, a enzima presente no soro parece ter origem, sobretudo no sistema hepatobiliar, apresentando-se elevada em muitas formas de doença hepática.

O aumento dos níveis de GGT é identificado mais precocemente e é mais acentuado relativamente a outras enzimas hepáticas em casos de obstrução hepatobiliar, por este motivo a GGT é considerada um indicador sensível para estas doenças. O álcool estimula a síntese de GGT e por isso o seu doseamento é útil para detectar casos de alcoolismo.

#### 4.6.4. Bilirrubina Directa e Bilirrubina Total

Após o final do seu ciclo de circulação, os glóbulos vermelhos são decompostos no sistema reticuloendotelial, principalmente no baço. O grupo heme resultante, assim que o ferro é removido, é convertido em bilirrubina. Este processo corresponde a aproximadamente 80% da bilirrubina produzida diariamente. As outras fontes de bilirrubina incluem a decomposição de mioglobina e citocromos e o catabolismo de glóbulos vermelhos imaturos na medula óssea.

Uma vez produzida, a bilirrubina é transportada para o fígado, ligada à albumina por ser insolúvel em água. Esta fracção de bilirrubina é denominada bilirrubina indirecta ou não-conjugada. No fígado, a bilirrubina é conjugada com o ácido glucorónico para formar a bilirrubina conjugada, ou bilirrubina directa, que é excretada através do sistema biliar para o intestino, onde é metabolizada pelas bactérias intestinais a um grupo de produtos colectivamente conhecidos como estercobilinogénio. A eliminação é quase completa e os níveis séricos são geralmente insignificantes.

A bilirrubina directa é a soma das fracções conjugadas, enquanto que a bilirrubina total é a soma das fracções não-conjugadas e conjugadas.

Na Tabela 10. é feita uma referência ao objectivo da determinação das enzimas descritas anteriormente, bem como o seu significado clínico.

**Tabela 10.** – Aplicação e significado clínico das principais enzimas envolvidas na avaliação da função hepática.

Parâmetro	Descrição	Significado Clínico
ALT	Avaliação da doença hepática (indicador mais específico do que a AST).	↑ – Hepatite, cirrose, mononucleose.
AST	Avaliação da doença hepática.	↑ – Patologias hepáticas, enfarte do miocárdio, trauma.
ALP	Avaliação de doenças ósseas e hepáticas.	↑ – Patologias hepáticas, patologias ósseas; durante o crescimento (devido à actividade osteoblástica); ↓ – Hipotiroidismo, hipofosfatemia, anemia peniciosa.

Parâmetro	Descrição	Significado Clínico
<b>GGT</b>	Avaliação de dano ou doença hepática (indicador sensível de doença hepatobiliar).	↑ – Obstrução biliar (icterícia obstrutiva), alcoolismo; hepatite infecciosa (aumentos moderados).
<b>Bilirrubina Directa</b>	Testar a capacidade do fígado para conjuguar a bilirrubina e excretá-la.	↑ – Obstrução hepática, cirrose, hepatite, algumas doenças hereditárias (ex. síndrome de Dubin-Johnson).
<b>Bilirrubina Total</b>	Avaliação da função hepática.	↑ – Hepatite, cirrose, doenças hemolíticas, obstrução hepática.

[Legenda: ↑ – aumentado; ↓ – diminuído.]

#### 4.7. METABOLISMO DO FERRO

A maior parte do ferro do organismo é proveniente da dieta, sendo consumido no estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), este é convertido na forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) após a ingestão, e é absorvido sobretudo no duodeno e no jejuno. O ferro circula no sangue ligado à transferrina, uma  $\beta$ -globulina sintetizada no fígado, que actua como proteína de transporte. Na medula óssea, os precursores eritróides utilizam parte do ferro disponível, sendo o restante armazenado sob a forma de ferritina e de hemossiderina nas células do sistema reticuloendotelial do fígado, baço e medula óssea.

O doseamento do ferro e da capacidade latente de fixação do ferro (UIBC, do inglês, *unsaturated iron binding capacity*), ou capacidade não saturada de ligação do ferro, que traduz a quantidade de transferrina não saturada, é efectuado em amostras de soro e plasma, no equipamento Architect C8000/Ci8200 da Abbott, por espectrofotometria. A quantificação da transferrina é igualmente determinada em amostras de soro e plasma, no mesmo equipamento, mas pelo método de imunoturbidimetria.

Na Tabela 11. está descrito o objectivo da determinação do ferro, da transferrina e da IUBC, bem como o seu significado clínico.

**Tabela 11.** – Aplicação e significado clínico do ferro, da transferrina e da UIBC.

Parâmetro	Aplicação	Significado Clínico
<b>Ferro</b>	Avaliação do <i>status</i> de ferro (a medição da ferritina e da transferrina podem fornecer informação mais detalhada).	↑ – Hemocromatose e doença hepática; ↓ – Anemia devido a má absorção resultante de doença gastrointestinal; dieta pobre em ferro, perda de sangue.
<b>Transferrina</b>	Avaliação do <i>status</i> de ferro e do estado nutricional; útil no diagnóstico diferencial da anemia.	↑ – Anemia ferropénica; ↓ – Patologia hepática crónica, síndrome nefrótica; excesso de ferro devido a transfusões múltiplas ou hemocromatose.
<b>UIBC</b>	Diagnóstico e tratamento da anemia.	Terapêutica em situações de excesso de ferro.

[Legenda: ↑ – aumentado; ↓ – diminuído.]

## 4.8. METABOLISMO DOS HIDRATOS DE CARBONO

### 4.8.1. Glucose

A glucose é a principal fonte de energia para muitos tecidos, é regulada pela insulina, cortisol e glicogénio. Alterações no metabolismo da glucose correspondem, na maioria dos casos, a uma hiperglicemia ou, em menor extensão, a uma hipoglicemia.

Constitui o ensaio mais frequentemente utilizado para auxiliar o diagnóstico e o tratamento da diabetes. Níveis elevados de glucose (hiperglicemia) também podem ocorrer em casos de neoplasma pancreático, hipertiroidismo e hiperfunção cortical, bem como noutras disfunções. Níveis de glucose reduzidos (hipoglicemia) podem resultar da terapêutica excessiva com insulina ou de várias doenças hepáticas.

#### Amostras

Soro, Plasma, Urina e Líquido Cefalorraquidiano.

### Método

Espectrofotometria.

### Equipamento

Architect C8000/Ci8200 da Abbott.

## **4.8.2. HemoglobinaA<sub>1c</sub>**

A hemoglobinaA<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>, ou hemoglobina glicada) corresponde a uma molécula de hemoglobina ligada covalentemente a uma molécula de glucose. A sua determinação é utilizada como meio auxiliar na monitorização do controlo a longo prazo da glucose, presente no sangue de indivíduos com diabetes *mellitus*, destinando-se ao diagnóstico desta patologia (Norma DGS 033/2011).

Os indivíduos aos quais foi diagnosticada diabetes *mellitus* apresentam, geralmente, uma percentagem elevada de HbA<sub>1c</sub>. A diabetes não controlada pode originar complicações graves como a hiperglicemia e a cetose. Além disso, podem ocorrer a longo prazo outras complicações, tais como doença cardiovascular, retinopatia, nefropatia e neuropatia. Vários estudos, incluindo o DDCT (*Diabetes Control and Complications Trial*), demonstraram que o controlo a longo prazo da diabetes pode prevenir este tipo de complicações.

O ensaio para a determinação de HbA<sub>1c</sub> mede a concentração desta relativamente à concentração de hemoglobina total (HbT), sendo efectuado por duas medições de concentrações separadas. Estas concentrações são utilizadas para determinar a percentagem de HbA<sub>1c</sub>. A amostra de sangue total é pré-tratada com um agente de desnaturação da hemoglobina para lisar os eritrócitos e degradar a hemoglobina pela pepsina, formando um hemolisado. As duas determinações são feitas a partir deste hemolisado. A concentração de hemoglobina total é determinada por espectrofotometria, enquanto que a concentração de HbA<sub>1c</sub> é determinada por imunoturbidimetria, ambas são efectuadas no equipamento Architect C8000/Ci8200 da Abbott. A percentagem de HbA<sub>1c</sub> é dada pela relação HbA<sub>1c</sub> / HbT com um factor de conversão.

## 4.9. FUNÇÃO MUSCULAR

A avaliação da função muscular, nomeadamente danos no tecido muscular, é feita com base na determinação da actividade das enzimas creatina quinase e lactato desidrogenase.

O doseamento destas enzimas é efectuado em amostras de soro e plasma, por espectrofotometria, no equipamento Architect C8000/Ci8200 da Abbott.

### 4.9.1. Creatina Quinase

A creatina quinase (CK, do inglês, *creatine kinase*) catalisa a transferência de um grupo fosfato da creatina-fosfato para o ADP, o que permite a reconstituição das reservas de ATP.

É muito abundante no músculo esquelético, no miocárdio e no cérebro. A CK é um dímero cujas subunidades M (músculo), B (cérebro, do inglês, *brain*) estão na origem de três isoenzimas: CK-MM (músculo esquelético), CK-BB (cérebro) e CK-MB (miocárdio). A actividade da CK é maior no músculo estriado e no coração, relativamente aos outros tecidos, como o cérebro, pelo que a sua determinação é um indicador importante de dano muscular ou cardíaco.

O aumento dos valores séricos de CK pode ocorrer em vários tipos de patologias que causem distrofia muscular, como a distrofia de Duchenne, a miosite ou a polimiosite. Os seus valores também podem aumentar em consequência da prática de exercício físico intenso. A actividade da CK aumenta após danos no miocárdio, nomeadamente a fracção MB. Nesta situação, a determinação da CK-MB é feita em conjunto com outros parâmetros, como a troponina-I, para o diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio, que será referida adiante no ponto dos marcadores cardíacos. Níveis baixos de CK são encontrados em indivíduos com índices baixos de massa muscular.

### 4.9.2. Lactato Desidrogenase

A lactato desidrogenase (LD) é uma enzima que pode ser encontrada na maioria dos tecidos, como o coração, pulmão, fígado, rim e músculo esquelético. Existe em cinco formas, numeradas de LD-1 a LD-5 consoante os tecidos onde predomina. Uma vez que

a concentração de LD nos tecidos é cerca de 500 vezes superior à existente no plasma, a ocorrência de danos numa pequena porção de tecido pode conduzir a um aumento significativo da sua actividade no soro. Assim, a principal aplicação da LD é a detecção de pequenas lesões nos tecidos.

Níveis aumentados de LD ocorrem numa série de condições patológicas, uma vez que a sua distribuição é bastante alargada. Exemplos dessas condições são o enfarte do miocárdio, a hemólise (anemia hemolítica) e as doenças hepáticas, pulmonares e musculares.

#### **4.10. FUNÇÃO PANCREÁTICA**

##### **4.10.1. Amilase**

A  $\alpha$ -amilase é uma enzima produzida no pâncreas e nas glândulas salivares. Os indivíduos saudáveis apresentam uma actividade baixa, mas mensurável, de  $\alpha$ -amilase no soro e na urina. A medição da actividade desta enzima é útil para o diagnóstico da pancreatite e de outras perturbações pancreáticas, que têm como consequência o aumento da actividade da  $\alpha$ -amilase no soro e na urina.

Níveis elevados de amilase sérica encontram-se na pancreatite aguda, ou na pancreatite crónica recidivante. Estão também associados a síndromes abdominais dolorosos sem lesão pancreática, pelo que a amilase, apesar de sensível, não é um teste específico de doença pancreática. Níveis diminuídos de amilase sérica podem ocorrer em algumas doenças hepáticas.

##### Amostras

Soro, Plasma e Urina.

##### Método

Espectrofotometria.

##### Equipamento

Architect C8000/Ci8200 da Abbott.

#### 4.11. PROTEÍNAS

As proteínas são parte integrante das células, fluídos e órgãos, estando envolvidas em múltiplos processos. As proteínas com interesse para a Bioquímica Clínica são as que circulam no sangue, estas incluem as proteínas plasmáticas, as proteínas de transporte e as proteínas de defesa, que exercem a sua função principalmente na circulação e no fluido extracelular. Muitas destas proteínas são sintetizadas no fígado, a partir de aminoácidos essenciais, com excepção das imunoglobulinas que são produzidas pelos linfócitos B.

Outras proteínas que por vezes são encontradas na circulação são as que apresentam, principalmente, funções intracelulares. Podem entrar na corrente sanguínea, a partir das células onde foram formadas e a sua presença no sangue muitas vezes reflecte algum tipo de dano para a célula.

##### 4.11.1. Proteínas Totais

As proteínas plasmáticas são sintetizadas principalmente no fígado, plasmócitos, nódulos linfáticos e medula óssea. O valor das proteínas totais séricas pode sofrer variações por alteração de uma ou mais proteínas específicas ou por alterações do volume de água no plasma. Em caso de doença, quer o nível plasmático de proteínas totais quer o rácio das fracções individuais podem estar significativamente alterados em relação aos seus valores normais. Alterações nas proporções de proteínas plasmáticas podem ocorrer em uma ou várias fracções das proteínas e, frequentemente, sem alteração na quantidade de proteínas totais.

As alterações nos níveis de proteínas totais apresentam uma correlação clínica variada e o interesse da sua determinação é, essencialmente, o uso como teste de *screening* para avaliar se os níveis proteicos estão de acordo com o esperado.

Situações de hipoproteinemia podem ser causadas por:

- síndrome nefrótica;
- hemorragia generalizada;
- má absorção das proteínas;
- queimaduras graves;
- síndromes de retenção de sal e de Kwashiorkor (carência aguda de proteínas).

A hiperproteinemia pode ocorrer em:

- casos graves de desidratação
- mieloma múltiplo

#### Amostras

Soro e Plasma.

#### Método

Espectrofotometria.

#### Equipamento

Architect C8000/Ci8200 da Abbott.

### **4.11.2. Proteínas Urina/Líquido Cefalorraquidiano**

#### Proteínas na Urina

O papel do sistema renal na conservação das proteínas plasmáticas é há muito reconhecido. Em condições fisiológicas normais, as proteínas de baixo peso molecular, como a insulina (diabetes), atravessam os glomérulos em quantidades relativamente elevadas. As proteínas de dimensões intermédias, como a transferrina e a albumina, também conseguem atravessar os glomérulos, mas em quantidades mais pequenas. A maior parte destas proteínas é reabsorvida nos túbulos renais. O doseamento das proteínas na urina tem um papel importante na avaliação da função renal e na monitorização de fármacos nefrotóxicos.

A proteinúria pode ocorrer em três situações específicas:

- permeabilidade glomerular acrescida (albumina);
- reabsorção tubular deficiente (proteínas de baixo peso molecular);
- secreção anormal de proteínas para o tracto urinário.

#### Proteínas no líquido cefalorraquidiano (LCR)

Como referido anteriormente, na secção de Imunologia, a presença da maior parte das proteínas no LCR é consequência da difusão, a partir do plasma, através da barreira

hematoencefálica (BHE). Os níveis elevados de proteínas no LCR surgem em consequência de um aumento da permeabilidade da BHE ou da síntese intratecal de imunoglobulinas, ou de ambas. Assim, o objectivo da quantificação das proteínas no LCR é a investigação de patologias como a meningite, tumores cerebrais e infecções do sistema nervoso central.

#### Amostras

Urina (preferencialmente amostras de 24 horas) e LCR.

#### Método

Turbidimetria.

#### Equipamento

Architect C8000/Ci8200 da Abbott.

### **4.11.3. Albumina**

A albumina, também já abordada na secção da Imunologia, é a principal proteína do soro em indivíduos normais. É sintetizada no fígado, está envolvida no transporte de várias substâncias e contribui para a manutenção da pressão oncótica.

Geralmente, níveis séricos diminuídos de albumina ocorrem em diversas patologias, incluindo doença renal, hepática, má absorção, desnutrição, queimaduras graves, infecções e situações de malignidade. Níveis aumentados podem resultar de situações de desidratação.

No Laboratório de Bioquímica, o doseamento da albumina é efectuado em amostras de soro e plasma, por espectrofotometria, no equipamento Architect C8000/Ci8200 da Abbott.

### **4.11.4. Proteína C Reactiva**

A proteína C reactiva (PCR) é a proteína de fase aguda mais precoce, cuja concentração aumenta devido a processos inflamatórios, sobretudo na resposta a infecção pneumocócica (bacteriana), doença histolítica e a uma variedade de outros estados patológicos.

A PCR é utilizada como marcador, ou indicador genérico, de diagnóstico de infecções e inflamação, além de servir para monitorizar a resposta a terapêutica farmacológica ou a cirurgia. Trata-se de um parâmetro muito sensível, no entanto é pouco específico.

#### Amostras

Soro e Plasma.

#### Método

Imunoturbidimetria.

#### Equipamento

Architect C8000/Ci8200 da Abbott.

### **4.11.5. $\beta_2$ -Microglobulina**

A  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2M$ ) é um constituinte da cadeia leve dos antígenos leucocitários de classe I (HLA, do inglês, *human leukocyte antigen* – complexo *major* de histocompatibilidade). Como resultado do metabolismo e degradação de HLA, a  $\beta_2M$  aparece na sua forma livre e pode ser encontrada em baixa concentração no soro, urina e outros fluidos biológicos. A  $\beta_2M$  livre é eliminada do organismo por filtração glomerular, seguida de reabsorção tubular e degradação.

Os níveis séricos de  $\beta_2M$  são frequentemente elevados em pacientes com uma variedade de desordens linfoproliferativas e inflamatórias, reflectindo um aumento da síntese desta proteína. Níveis séricos anormalmente elevados de  $\beta_2M$  estão associados a disfunção renal e filtração glomerular reduzida, reflectindo uma diminuição da excreção urinária.

Em algumas desordens renais, a  $\beta_2M$  também pode ser determinada na urina, sendo a sua concentração muito elevada em situações de intoxicação por aminoglicosídeos, por metais pesados e necrose tubular aguda. Também é útil na diferenciação entre patologias renais glomerulares e tubulares.

#### Amostras

Soro, Plasma e Urina.

Método

Imunoturbidimetria.

Equipamento

Architect C8000/Ci8200 da Abbott.

**4.11.6. Imunoglobulinas**

As imunoglobulinas, referidas anteriormente na secção de Imunologia, são proteínas essenciais na defesa do organismo contra substâncias estranhas. São produzidas pelos plasmócitos (linfócitos B diferenciados) após estimulação antigénica, funcionando como anticorpos, pois reconhecem os determinantes antigénicos que suscitam a sua produção.

No Laboratório de Bioquímica, é efectuado o doseamento das imunoglobulinas pertencentes às classes IgA, IgG e IgM, em amostras de soro e plasma, por imunoturbidimetria, no equipamento Architect C8000/Ci8200 da Abbott.

Na tabela seguinte encontra-se uma breve descrição da função, bem como as diferentes aplicações clínicas, de cada uma das três classes de imunoglobulinas referidas.

**Tabela 12.** – Principais funções e aplicações clínicas das classes IgA, IgG e IgM de imunoglobulinas.

Classe de Imunoglobulina	Função	Aplicação Clínica
<b>IgA</b>	Importante na protecção das mucosas.	Episódios recorrentes de infecção, sobretudo do tracto respiratório inferior.
<b>IgG</b>	Importante na resposta imunitária secundária.	Avaliação da imunidade humoral, monitorização terapêutica do mieloma a IgG.
<b>IgM</b>	Primeira a ser produzida na resposta imunitária primária.	Determinar se uma infecção é aguda (IgM) ou crónica (IgG).

#### 4.12. MARCADORES TUMORAIS

Como referido anteriormente na secção de Imunologia, os marcadores tumorais (MT) são substâncias produzidas pelas células neoplásicas, ou por outras células induzidas pelas mesmas, de alguns tipos de tumores, que correspondem a alterações metabólicas e genéticas, podendo indicar a existência de um tumor. Normalmente são classificados de acordo com a sua origem ou estrutura química, podendo ser detectados no soro ou noutros fluídos biológicos.

Na prática clínica, os MTs são muito úteis no auxílio ou complemento ao diagnóstico, desde que utilizados em conjunto com outros meios, na avaliação da resposta à terapêutica e na sua monitorização, na detecção precoce de recidivas e no estabelecimento do prognóstico.

No Laboratório de Bioquímica é efectuado o doseamento dos seguintes marcadores tumorais:

- $\alpha$ -Fetoproteína (AFP);
- CA 125 (*cancer antigen 125*);
- CA 15.3;
- CA 19.9;
- Antígeno Carcinoembrionário (CEA, do inglês, *carcinoembryonic antigen*);
- Antígeno Específico da Próstata – Total (PSA, do inglês *prostate specific antigen*);
- Antígeno de Carcinoma de Células Escamosas (SCC, do inglês *squamous cell carcinoma*).

Na Tabela 13. estão resumidas algumas propriedades dos referidos marcadores tumorais.

##### Amostras

Soro e Plasma (AFP também pode ser determinada no líquido amniótico; PSA exclusivamente no soro).

##### Método

Quimioluminescência.

Equipamento

Architect Ci8200 da Abbott.

**Tabela 13.** – Descrição, aplicação, correlação clínica, bem como aumentos inespecíficos que podem ser causa de falsos-positivos, certos estados fisiológicos, ou simplesmente níveis elevados benignos, dos marcadores tumorais doseados no Laboratório de Bioquímica.

Marcador Tumoral	Descrição	Aplicação	Correlação Clínica	Aumentos Inespecíficos
<b>AFP</b>	Glicoproteína sintetizada sobretudo no fígado e no saco vitelino do feto; Propriedades físico-químicas e composição em aminoácidos muito semelhantes à albumina	Monitorização do tratamento; Detecção de recidivas.	Tumor não-seminomatoso do testículo; Carcinoma hepatocelular primário.	Patologias hepáticas benignas (exs. hepatite viral aguda e crónica, cirrose), gravidez, persistência hereditária da AFP, processos de regeneração hepática.
<b>CA 125</b>	Antigénio glicoproteico de superfície, da família das mucinas, secretado a partir da superfície das células tumorais do ovário.	Confirmação do diagnóstico; Monitorização do tratamento; Detecção de recidivas.	Cancro epitelial do ovário; Patologias malignas não ováricas (exs. carcinoma endocervical, hepático, pancreático, pulmonar, do cólon, estômago, tracto biliar, uterino, da trompa de falópio, da mama e do endométrio).	Cirrose, hepatite, endometriose, primeiro trimestre de gravidez, quistos ováricos, doença inflamatória pélvica.
<b>CA 15.3</b>	Antigénio glicoproteico do tipo mucinoso.	Estadiamento da doença; Monitorização do tratamento; Detecção de recidivas.	Cancro da mama (estádios II e III); Tumores malignos não mamários (exs. tumor pulmonar, do cólon, pancreático, hepático primário, ovárico, cervical e endometrial).	Estados clínicos não malignos, tais como cirrose, hepatite, distúrbios autoimunes e doenças benignas do ovário e da mama.
<b>CA 19.9</b>	Antigénio glicolípídico presente nos epitélios do tracto gastrointestinal fetal e em muitas células das mucosas do adulto.	Monitorização do tratamento; Detecção de recidivas.	Cancro do pâncreas Carcinoma colorrectal, gástrico e hepático (menos frequente).	Hepatite, cirrose, pancreatite e outras doenças gastrointestinais.
<b>CEA</b>	Glicoproteína normalmente encontrada nas células epiteliais embrionárias e fetais (proteínas oncofetais).	Monitorização do tratamento; Detecção de recidivas.	Carcinoma colorrectal, gástrico, da mama, pulmonar, prostático, pancreático e dos ovários.	Defeitos na metabolização por insuficiência renal ou hepática, doença de Crohn, colite ulcerosa, enfisema, pancreatite; Aumento discreto em fumadores.

Marcador Tumoral	Descrição	Aplicação	Correlação Clínica	Aumentos Inespecíficos
<b>PSA Total</b>	Glicoproteína produzida essencialmente nas células epiteliais glandulares da próstata.	Rastreio de doentes assintomáticos; Confirmação do diagnóstico; Monitorização do tratamento; Detecção de recidivas.	Cancro da próstata.	Outras patologias prostáticas, incluindo prostatite e hiperplasia benigna da próstata.
<b>SCC</b>	Subfracção do antigénio tumoral TA-4, obtido a partir de células escamosas do colo do útero.	Monitorização do tratamento; Detecção de recidivas.	Carcinomas das células escamosas do colo do útero e da esfera otorrinolaringológica (ouvido, nariz e garganta) e cancro do pulmão.	Insuficiência renal e doença hepatobiliar por diminuição da capacidade de eliminação do antigénio.

#### 4.13. MARCADORES DE ANEMIA

Alguns distúrbios metabólicos podem surgir como resultado de uma dieta inadequada ou como indicador da presença de doença, tal como a anemia. Existem vários tipos de anemia, pelo que é necessário algum cuidado no seu diagnóstico e tratamento.

Exemplos de alguns testes que funcionam como indicadores das funções metabólicas e do estado nutricional são a ferritina, os folatos e a vitamina B12 (Tabela 14.), sendo utilizados como marcadores de anemia.

##### Amostras

Soro e Plasma (os folatos também podem ser determinados em sangue total).

##### Método

Quimioluminescência.

##### Equipamento

Architect Ci8200 da Abbott.

**Tabela 14.** – Descrição, aplicação e significado clínico dos marcadores de anemia.

Parâmetro	Descrição	Aplicação	Significado Clínico
<b>Ferritina</b>	Proteína que funciona como reserva de ferro para o organismo.	Avaliação da quantidade de ferro armazenada.	↑ – Excesso de ferro, inflamação, múltiplas transfusões de sangue; ↓ – Deficiência em ferro.
<b>Folatos</b>	Vitamina que actua como cofactor em vários processos metabólicos. Necessário para a função do glóbulo vermelho e importante na divisão celular; Especialmente necessário durante a gravidez para o normal desenvolvimento do feto, pois a sua deficiência pode causar defeitos no tubo neural.	Avaliação da causa da anemia macrocítica (juntamente com a Vitamina B12); Monitorização terapêutica quando os seus níveis são baixos	↑ – Anemia perniciosa; ↓ – Má nutrição, má absorção (ex. doença celíaca), alcoolismo.
<b>Vitamina B12</b>	Vitamina, cobalamina, envolvida na formação dos glóbulos vermelhos. Importante na função nervosa.	Identificar a deficiência quando a concentração de ferro é baixa e se verifica a presença de glóbulos vermelhos grandes (anemia macrocítica); Monitorização terapêutica quando os seus níveis são baixos	↑ – Falência renal, doença hepática, doenças mieloproliferativas; ↓ – Má absorção, má nutrição, anemia perniciosa.

[**Legenda:** ↑ – aumentado; ↓ – diminuído.]

#### 4.14. MARCADORES CARDÍACOS

O enfarte do miocárdio ocorre quando o fluxo sanguíneo é diminuído em consequência do estreitamento das artérias coronárias, isquémia. A resultante falta de oxigénio causa danos ou mesmo necrose das células cardíacas, com consequente libertação de proteínas específicas na corrente sanguínea. Estas proteínas, designadas por marcadores cardíacos, são importantes no diagnóstico do enfarte agudo do miocárdio (EAM).

Os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) para a definição de EAM são a presença de dois dos três elementos seguintes: alterações inequívocas do electrocardiograma, alterações inequívocas da enzima Troponina-I cardíaca (TnIc – isoforma cardíaca da Troponina-I) no soro, e dor no peito prolongada.

A actual directriz do Comité Conjunto da *European Society of Cardiology/American College of Cardiology* apoia a utilização da TnIc como o marcador preferencial de lesão do miocárdio. Um nível elevado de Troponina-I não é, por si só, suficiente para estabelecer um diagnóstico. Outros marcadores, tais como a isoenzima MB da Creatina-Quinase (CK-MB) e a mioglobina podem ser utilizados em conjunto com os resultados da Troponina-I no diagnóstico de EAM.

#### Amostras

Soro ou Plasma

#### Método

Quimioluminescência

#### Equipamento

Architect Ci8200 da Abbott

Na Tabela 15. encontram-se descritos os marcadores cardíacos quantificados no Laboratório de Bioquímica.

**Tabela 15.** – Descrição e aplicação clínica da Troponina-I e da CK-MB.

Parâmetro	Descrição	Objectivo e Frequência dos Testes
<b>Troponina-I</b>	Proteína encontrada maioritariamente nas células do músculo cardíaco, libertada na circulação quando há danos nestas células.	Diagnóstico de EAM; Repetição do teste a cada 6 a 8 horas durante vários dias; Permanece elevada até 10 dias após um EAM.
<b>CK-MB</b>	Isoenzima da creatina-quinase mais específica para o miocárdio (embora também esteja presente noutros tecidos, mas em menor quantidade), libertada pelas células do tecido cardíaco após dano.	Diagnóstico de EAM com base na ascensão e queda características da CK-MB durante um período de cerca de 12 horas a 2 dias após o EAM; Utilização em conjunto com a Troponina-I, teste mais sensível e específico para avaliar o dano no tecido cardíaco.

#### 4.15. MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE FÁRMACOS

Os fármacos que normalmente exigem monitorização dos seus níveis no sangue, são aqueles que têm uma janela terapêutica estreita. Isto significa que existe um intervalo, para valores de concentração, muito bem definido em que o fármaco é activo e eficaz, sem ser tóxico. Se os níveis do fármaco se encontrarem abaixo do limite inferior, este é ineficaz. Se ultrapassarem o limite superior, podem tornar-se tóxicos, afectando a função hepática ou renal.

Garantir que o paciente está a receber o tratamento adequado é importante quando se usam fármacos com uma janela terapêutica estreita. Os valores da janela terapêutica podem variar de acordo com a população, o local e as técnicas ou métodos de ensaio utilizados, pelo que cada laboratório deverá estabelecer os seus próprios intervalos.

Na Tabela 16. estão descritos os fármacos doseados no Laboratório de Bioquímica.

**Tabela 16.** – Acção e aplicação clínica dos fármacos doseados no Laboratório de Bioquímica.

Classe	Fármaco	Acção e Aplicação Clínica
<b>Drogas Terapêuticas</b>	Ácido Valpróico	Anticonvulsivante utilizado isoladamente ou em combinação com outros fármacos para o tratamento de crises convulsivas.
	Carbamazepina	Controlo de convulsões.
	Digoxina	Glicósido cardíaco para o tratamento de insuficiência cardíaca e de alguns tipos de arritmias cardíacas.
	Fenitoína	Controlo de convulsões.
	Fenobarbital	Controlo de convulsões.
	Teofilina	Anti-asmático utilizado no tratamento crónico da asma e de outras doenças broncoespásticas.
<b>Antibióticos</b>	Amicacina	Aminoglicosídeo semi-sintético que exhibe actividade bactericida contra uma variedade de agentes patogénicos, incluindo microrganismos resistentes a outros aminoglicosídeos.
	Vancomicina	Glicopéptido tricíclico geralmente usado no tratamento de infecções por <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina.

Classe	Fármaco	Ação e Aplicação Clínica
<b>Imunossupressores</b>	Ciclosporina	Substância de primeira escolha (undecapéptido de origem fúngica) para a terapêutica imunossupressora após o transplante de órgãos sólidos; Meio auxiliar no tratamento de doentes submetidos a transplante renal, hepático e cardíaco.
	Tacrolimus	Imunossupressor eficaz no tratamento da rejeição a transplantes renais e hepáticos.
<b>Cistostáticos</b>	Metotrexato	Antineoplásico utilizado isoladamente ou em combinação com outros fármacos antineoplásicos no tratamento da leucemia e de outras patologias.

A metodologia utilizada no doseamento de fármacos é variada (Tabela 17.). No Laboratório de Bioquímica, além do método de quimioluminescência (CMIA, descrito anteriormente), são utilizados os seguintes métodos:

- **Imunoensaio Turbidimétrico Homogêneo do Tipo *microparticle-enhanced* (PETINIA, do inglês, *particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay*).**

#### Fundamento do Método

Este imunoensaio baseia-se no princípio da imunoturbidimetria, mas é utilizado no doseamento de fármacos por serem moléculas de pequenas dimensões. Consiste numa competição, relativamente aos locais de ligação ao anticorpo, entre o fármaco presente na amostra e o fármaco revestido com micropartículas.

- **Imunoensaio Enzimático Homogêneo Competitivo**

#### Fundamento do Método

O ensaio baseia-se na competição entre o fármaco presente na amostra e o fármaco exógeno marcado com a enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) relativamente a locais de ligação ao anticorpo.

Uma vez que a actividade da G6PDH diminui à medida que a enzima se une aos anticorpos, a concentração do fármaco na amostra pode ser quantificada em termos de actividade enzimática. A G6FDH activa converte o NAD em NADH originando uma alteração na absorvância, medida espectrofotometricamente.

• **Imunoensaio de Fluorescência Polarizada (FPIA, do inglês, *fluorescence polarization immunoassay*)**

Fundamento do Método

É um imunoensaio competitivo entre o fármaco presente na amostra (antigénio, Ag) e o antigénio marcado com a fluoresceína (Ag-F), para os locais de ligação ao anticorpo (Ac). Se a amostra contém baixa concentração de Ag, há alta concentração do complexo Ag-F-Ac e a polarização é alta. Se a amostra contém alta concentração de Ag, há baixa concentração do complexo Ag-F-Ac e a polarização é baixa. Devido às propriedades rotacionais das moléculas em solução, o grau de polarização é directamente proporcional ao tamanho da molécula e inversamente proporcional à quantidade de fármaco presente na amostra em estudo.

**Tabela 17.** – Metodologia utilizada no doseamento dos fármacos determinados no Laboratório de Bioquímica.

Método	Fármaco
<b>PETINIA</b>	Ácido Valpróico; Digoxina; Amicacina; Vancomicina.
<b>Imunoensaio enzimático homogéneo competitivo</b>	Carbamazepina; Fenitoína; Fenobarbital; Teofilina.
<b>FPIA</b>	Metotrexato
<b>CMIA</b>	Ciclosporina Tacrolimus

Todos os ensaios para a quantificação de fármacos são efectuados em amostras de soro e plasma, com excepção da ciclosporina e do tacrolimus nos quais é utilizada uma amostra de sangue total colhido com EDTA. Todos os ensaios são feitos no equipamento Architect C8000/Ci8200 da Abbott, excepto o metotrexato que é efectuado no equipamento TDxFLx da Abbott.

#### **4.16. ANÁLISE DE URINA TIPO II**

A análise de urina fornece uma ampla variedade de informações clínicas úteis, no que respeita a patologias renais e do tracto urinário inferior.

A análise de urina tipo II consiste no exame físico e químico da urina e no exame microscópico do sedimento urinário.

A amostra utilizada é, preferencialmente, a primeira urina da manhã, fresca e não centrifugada. A amostra de urina não deve aguardar mais de duas horas antes do ensaio.

##### **4.16.1. Exame Físico e Químico da Urina**

O exame físico e químico de urina é efectuado no equipamento Urisys 2400 da Roche, um sistema automatizado que permite a determinação qualitativa ou semi-quantitativa, de pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue, na urina, assim como a densidade, a cor e o aspecto. Esta determinação é feita através do uso de tiras de teste pelo método da reflectofotometria (espectrofotometria de reflectância)<sup>1</sup>.

##### **Reflectofotometria**

###### Fundamento do Método

A luz emitida por uma lâmpada LED (díodos de emissão de luz), com comprimento de onda e ângulo definidos, incide na superfície das tiras de teste, constituídas por pequenos quadrados de celulose absorventes e impregnados com substâncias químicas (reagentes). Quando a tira de teste entra em contacto com a urina, ocorre uma reacção

---

<sup>1</sup> Nos casos em que o volume de amostra é insuficiente (ex. amostra pediátrica) a análise automática de urina não é possível, sendo efectuada por técnica manual, na qual a tira de teste é mergulhada na amostra e a leitura é feita por comparação visual das cores obtidas com a tabela respectiva.

química que produz uma mudança de cor. A luz proveniente das tiras, captada pelo fotodetector, é reflectida e diminui proporcionalmente à intensidade da cor produzida. Após converter a luz detectada para valores de reflectância, o sistema compara-os com os intervalos de referência definidos para cada parâmetro e transmite resultados semi-quantitativos.

A cor é avaliada com um algoritmo específico contra o branco da tira de teste. Este branco é designado por zona de compensação e não contém reagentes.

### **Exame físico da urina**

#### Cor

A cor normal da urina é amarela, que se deve, sobretudo, à presença de um pigmento denominado urocromo. Este pigmento é um produto do metabolismo endógeno que, em condições normais, é produzido a velocidade constante. A quantidade de urocromo produzida depende do metabolismo, por exemplo nas doenças da tiróide e no jejum a quantidade aumenta.

Como o urocromo é excretado de forma constante, a intensidade da cor amarela pode fornecer uma estimativa aproximada da concentração urinária. A urina diluída será pálida, enquanto que uma amostra concentrada será mais escura, devido a variações no estado de hidratação do organismo. Essas diferenças na cor amarela da urina são normais.

A cor da urina pode variar desde a quase ausência de cor até ao negro. Estas variações podem ser de natureza patológica, ou não. Actividade física, funções metabólicas normais e ingestão de determinados alimentos e medicamentos, são exemplos de factores que alteram a cor da urina, sem causar doença. No entanto, existem variações de cor com importância clínica, como por exemplo de praticamente incolor (poliúria típica da diabetes *insipidus*), passando pelo vermelho (possibilidade da presença de eritrócitos), até ao negro (presença, p. ex., de ácido homogentísico, característico da alcaptonúria).

#### Aspecto

O aspecto é um termo geral que se refere à transparência da amostra de urina. A urina normal é límpida, porém pode aparecer uma turvação causada pela precipitação de cristais amorfos, não patológicos. A presença de células epiteliais escamosas e de muco,

principalmente na urina de mulheres, também pode ser normal, apesar da opacidade. Outras substâncias que causam turvação na urina são os leucócitos, eritrócitos, bactérias, lípidos, esperma, linfa, leveduras, matéria fecal e contaminação externa (ex. uso de cremes vaginais). Muitas destas substâncias não são patogênicas, mas como a presença de leucócitos, eritrócitos e bactérias é indício de patogenicidade, o facto da amostra se apresentar turva pode ser motivo de suspeita.

Deverá ser tido em conta que a urina transparente nem sempre é sinónimo de normalidade. Contudo, com a grande sensibilidade dos testes que incluem o exame químico, muitas alterações existentes na urina transparente serão detectadas antes da análise microscópica.

### Densidade

A densidade permite avaliar a capacidade de reabsorção renal. Como a urina, na realidade, é água que contém substâncias químicas dissolvidas, a densidade urinária é uma medida das substâncias dissolvidas na amostra, reflectindo o grau de diluição ou concentração da urina.

Valores de densidade baixos podem ser encontrados em casos de diabetes *insipidus*, pielonefrite e glomerulonefrite, enquanto que valores de densidade elevados podem ocorrer em situações de desidratação e insuficiência da glândula supra-renal.

## **Exame químico da urina**

### pH

A importância da determinação do pH urinário está relacionada com a detecção de possíveis distúrbios electrolíticos de origem metabólica ou respiratória e com o tratamento de problemas urinários, cuja solução passe por manter a urina a um determinado pH.

A precipitação de substâncias químicas inorgânicas dissolvidas na urina produz cristais urinários e cálculos renais, essa precipitação depende do pH urinário e pode ser controlada mantendo-se a urina a um pH incompatível com a precipitação de determinadas substâncias químicas, que causam a formação desses cálculos. O conhecimento do pH urinário é importante na identificação de cristais observados durante o exame microscópico do sedimento urinário.

A manutenção da acidez urinária pode ser útil no tratamento de infecções do tracto urinário causadas por microrganismos, que não se conseguem reproduzir em meio ácido. O controlo do pH urinário é feito essencialmente através da dieta, embora também possam ser usados medicamentos para esse fim.

Como o pH da urina recém-eliminada não atinge valores superiores a 9, quer em condições normais quer em situações patológicas, ao ser determinado um pH desse valor, conclui-se que a amostra foi indevidamente conservada e que é necessário proceder a uma nova colheita para que a análise seja considerada válida.

### Proteínas

A detecção de proteínas é a análise química de rotina mais indicativa de patologia renal. A urina normal tem uma quantidade muito pequena de proteínas, geralmente séricas (de baixo peso molecular, filtradas selectivamente pelos glomérulos) e proteínas produzidas no tracto urogenital. A albumina, por ter baixo peso molecular, é a principal proteína sérica encontrada na urina normal.

A proteinúria indica que proteínas que não deveriam ser filtradas estão a atravessar o glomérulo, sugerindo lesão glomerular.

### Glucose

Em circunstâncias normais, quase toda a glucose filtrada pelos glomérulos é reabsorvida no túbulo proximal. Por este motivo, a urina contém quantidades mínimas de glucose.

Se os níveis sanguíneos de glucose forem elevados (hiperglicemia), como acontece na diabetes *mellitus*, os túbulos deixam de transportá-la, aparecendo na urina. O limiar de reabsorção renal no caso da glucose é de 160 a 180 mg/dL. Este valor é significativamente superior ao limite de diagnóstico da diabetes *mellitus* (126 mg/dL), o que significa que a glicosúria não tem sensibilidade suficiente para detectar precocemente esta doença. No entanto, a glicosúria pode não estar acompanhada de hiperglicemia, como acontece nas doenças que afectam a reabsorção tubular, em lesões do sistema nervoso central e distúrbios da tiróide.

Muitas mulheres grávidas, que podem ter diabetes gestacional, apresentam glicosúria durante o terceiro trimestre de gestação, necessitando de monitorização para determinar a existência de diabetes.

### Corpos Cetónicos

Os corpos cetónicos incluem três produtos intermediários do metabolismo dos lípidos, a acetona, o ácido acetoacético e o ácido  $\beta$ -hidroxibutírico. Normalmente não aparecem quantidades mensuráveis de corpos cetónicos na urina, pois os lípidos metabolizados são completamente degradados. Contudo, quando o uso de hidratos de carbono, como principal fonte de energia, fica comprometido e as reservas de lípidos do organismo precisam de ser metabolizadas, podem ser detectados corpos cetónicos na urina.

A determinação da cetonúria é muito útil para o acompanhamento e monitorização da diabetes *mellitus* porque demonstra deficiência de insulina, o que indica a necessidade de regular a quantidade de insulina administrada no tratamento.

### Sangue

O sangue pode estar presente na urina sob a forma de eritrócitos íntegros (hematúria) ou de hemoglobina livre (hemoglobinúria) como resultado da destruição dos eritrócitos. A presença de hematúria ou de hemoglobinúria tem sempre grande importância clínica e deve ser acompanhada por outros exames para verificar se é uma situação de origem patológica, ou não. A hematúria está mais relacionada com distúrbios de origem renal ou urogenital e, não tendo origem patológica, é observada após exercício físico intenso ou durante a menstruação. A hemoglobinúria pode ocorrer como resultado da lise dos eritrócitos no tracto urinário, ou pode ser causada por hemólise intravascular com consequente filtração de hemoglobina através dos glomérulos.

Quando se detecta a presença de sangue na análise química da urina, deve-se fazer o exame microscópico do sedimento para distinguir a hematúria da hemoglobinúria.

A mioglobina, proteína encontrada no tecido muscular, reage positivamente com a análise química para a detecção de sangue na urina. Deve-se suspeitar da sua presença em pacientes com distúrbios decorrentes de destruição do tecido muscular. O diagnóstico de mioglobinúria baseia-se, geralmente, na anamnese do paciente e em testes serológicos para detecção de níveis elevados de enzimas por destruição do tecido muscular.

### Bilirrubina

A presença de bilirrubina na urina pode ser a primeira indicação de patologia hepática. A bilirrubina conjugada aparece na urina quando o seu ciclo normal de

degradação é interrompido pela obstrução do ducto biliar ou quando a integridade do fígado está comprometida, permitindo a sua passagem para a circulação. A hepatite e a cirrose são exemplos comuns de doenças que causam lesão hepática com resultante bilirrubinúria.

### Urobilinogénio

O urobilinogénio é um pigmento biliar, resultante da redução da bilirrubina pelas bactérias intestinais. Aproximadamente metade do urobilinogénio é reabsorvido pelo intestino, entra na circulação portal e volta para o intestino através do ducto biliar. O urobilinogénio aparece na urina porque, ao entrar na circulação portal pode passar pelos rins e ser filtrado pelos glomérulos. Desta forma, o urobilinogénio encontra-se normalmente em pequenas quantidades na urina, podendo aumentar em patologias hepáticas e nos distúrbios hemolíticos.

### Nitritos

A presença de nitritos permite detectar possíveis infecções do tracto urinário. Muitas bactérias patogénicas (ex. género *Proteus*) apresentam a capacidade de reduzir nitratos a nitritos, levando ao seu aparecimento na urina. Este teste não se destina a substituir o exame cultural de urina como principal meio de diagnóstico de infecções bacterianas, mas sim detectar os casos em que a necessidade de cultura pode não ser evidente.

A detecção de nitritos é útil para o diagnóstico precoce das infecções da bexiga (cistite), muitas vezes assintomáticas ou ligeiramente sintomáticas. A cistite não tratada pode levar a complicações graves (ex. pielonefrite), pelo que a detecção de bacteriúria, através da presença de nitritos, e subsequente antibioterapia poderá evitar essas complicações.

### Leucócitos

Os leucócitos aparecem frequentemente na urina. A piúria indica uma possível infecção no sistema urogenital.

Os leucócitos possuem, nos seus grânulos azurófilos, proteínas com actividade esterásica, pelo que a detecção dessas esterases granulocitárias é utilizada para detectar a presença de leucócitos.

Na Tabela 18. encontra-se um resumo do significado clínico dos parâmetros referidos anteriormente.

**Tabela 18.** – Resumo do significado clínico, causas patológicas e não patológicas, dos parâmetros que incluem o exame químico da urina.

Parâmetro	Significado Clínico
<b>pH</b>	<p>Acidose respiratória ou metabólica;                      Alcalose respiratória ou metabólica;                      Alterações na secreção e reabsorção de ácidos e bases pelos túbulos renais;                      Precipitação de cristais e formação de cálculos;                      Tratamento das infecções do tracto urinário;                      Identificação de amostras insatisfatórias.</p>
<b>Proteínas</b>	<p>Lesão da membrana glomerular;                      Comprometimento da reabsorção tubular;                      Mieloma múltiplo (proteína de Bence Jones);                      Nefropatia diabética;                      Pré-eclâmpsia;                      Proteinúria ortostática ou postural.</p>
<b>Glucose</b>	<p>Diabetes <i>mellitus</i>;                      Reabsorção tubular deficiente;                      Lesões do sistema nervoso central;                      Distúrbios da tiróide;                      Gravidez.</p>
<b>Corpos Cetónicos</b>	<p>Diabetes <i>mellitus</i> (incapacidade de metabolizar os hidratos de carbono);                      Controlo da dose de insulina;                      Carência alimentar em hidratos de carbono;                      Perda excessiva de hidratos de carbono.</p>
<b>Sangue</b>	<p>Hematúria;                      Cálculos renais;                      Glomerulonefrite;                      Pielonefrite;                      Tumores;                      Trauma;                      Exposição a produtos tóxicos;                      Exercício físico intenso;</p>

Parâmetro	Significado Clínico
<b>Sangue</b>	Hemoglobinúria; Reacções transfusionais; Anemia hemolítica; Queimaduras graves; Infecções; Exercício físico intenso; Mioglobinúria; Danos no tecido muscular; Coma prolongado; Convulsões; Esforço físico intenso.
<b>Bilirrubina</b>	Hepatite; Cirrose; Outras doenças hepáticas; Obstrução biliar.
<b>Urobilinogénio</b>	Deteção precoce de doenças hepáticas; Distúrbios hemolíticos.
<b>Nitritos</b>	Cistite; Pielonefrite; Avaliação de antibioterapia; Monitorização de pacientes com elevado risco de infecção do tracto urinário; Seleção de amostras para exame cultural de urina.
<b>Leucócitos</b>	Infecção do tracto urinário; Seleção de amostras para cultura.

#### 4.16.2. Exame Microscópico do Sedimento Urinário

A existência de parâmetros positivos na tira de teste ou a solicitação expressa do clínico constituem os critérios para a execução do exame microscópico do sedimento urinário.

O exame microscópico do sedimento urinário tem como objectivo detectar e identificar os elementos insolúveis presentes na amostra de urina, nomeadamente

leucócitos, eritrócitos, cilindros, células epiteliais, bactérias, leveduras, parasitas e cristais.

O sedimento urinário normal pode conter vários elementos figurados. Até mesmo a presença de um pequeno número de elementos geralmente considerados patológicos, como eritrócitos, leucócitos e cilindros, podem ser normais. Deste modo, muitas amostras de urina contêm apenas raras células epiteliais ou filamentos de muco.

### Preparação da Amostra

A amostra de urina, após ter sido analisada no sistema automático, é centrifugada a 1500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. O sobrenadante é decantado e procede-se à ressuspensão do sedimento em aproximadamente 1 mL da própria urina. O sedimento obtido é então observado ao microscópio óptico.

## **Elementos que podem ser visualizados no exame microscópico do sedimento urinário**

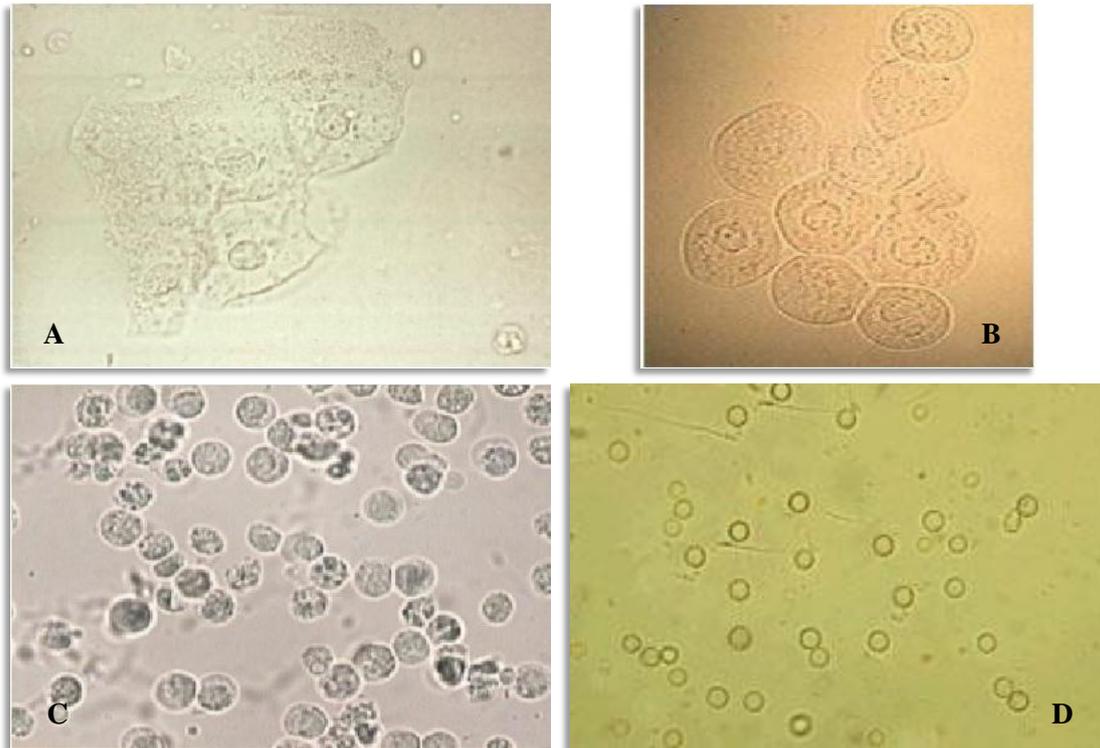
### Células Epiteliais

É comum encontrar células epiteliais no sedimento urinário, já que provêm dos tecidos de revestimento do sistema urogenital. A menos que estejam presentes em grande número, representam a descamação celular normal do epitélio.

Na urina encontram-se três tipos de células epiteliais, que são classificadas de acordo com a sua origem no sistema urogenital. As mais frequentes são as células epiteliais escamosas e as células do epitélio de transição (Figura 5., A e B, respectivamente), raramente têm significado clínico, a não ser que apareçam em número muito elevado e com morfologia anômala. As que apresentam maior importância clínica são as células do epitélio tubular renal, sugestivas de necrose tubular. A sua presença traduz a existência de patologias que causam lesão tubular, entre as quais pielonefrite, infecções virais, rejeição a transplante e efeitos secundários a glomerulonefrite.

### Eritrócitos e Leucócitos

A importância e o significado clínico destas células já foram referidos anteriormente na secção da análise química da urina (Figura 5., C e D).



**Figura 5.** – Exemplos de alguns elementos celulares presentes no sedimento urinário, observados ao Microscópio Óptico.

[**Legenda:** **A** – Células epiteliais escamosas; **B** – Células do epitélio de transição; **C** – Leucócitos; **D** – Eritrócitos.]

### Bactérias

Normalmente a urina não tem bactérias. No entanto, se as amostras não forem colhidas em condições estéreis pode ocorrer contaminação bacteriana sem significado clínico. As amostras que permanecem à temperatura ambiente por muito tempo também podem apresentar quantidades detectáveis de bactérias, que representam apenas a multiplicação dos organismos contaminantes.

Geralmente, a presença de bactérias só é registada quando observada em amostras recém-colhidas e em conjunto com a detecção de leucócitos.

### Elementos Leveduriformes e Parasitas

As leveduras, geralmente da espécie *Candida albicans*, podem ser observadas na urina de pacientes com diabetes *mellitus* e de mulheres com candidíase vaginal.

O parasita encontrado com mais frequência na urina é a *Trichomonas vaginalis*, devido à contaminação por secreções vaginais.

Tanto as leveduras como os parasitas surgem, principalmente, em casos de contaminação dos órgãos genitais, pelo que se deve referir a sua presença no sentido de confirmar essas situações.

### Cilindros

Os cilindros são os únicos elementos exclusivamente de origem renal encontrados no sedimento urinário. O seu principal componente é a proteína de Tamm-Horsfall, excretada pelas células dos túbulos renais, que se encontra na urina normal e em amostras patológicas. Esta proteína não é detectável pela tira de teste, não sendo responsável pelo elevado nível de proteínas urinárias frequentemente relacionado com a presença de cilindros.

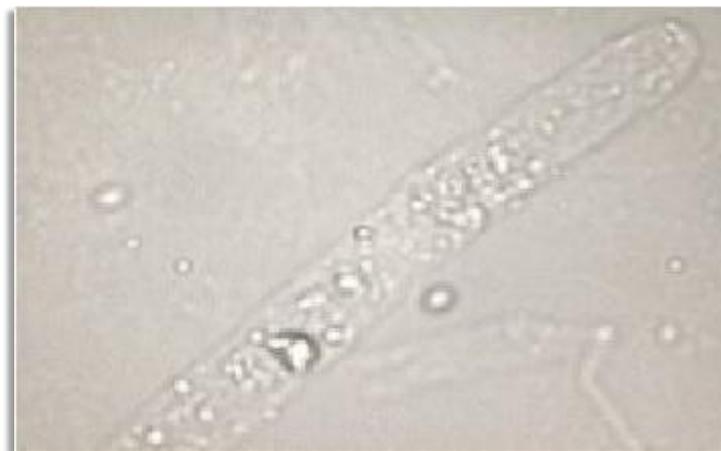
A aparência dos cilindros é influenciada pelo tamanho do túbulo onde foram formados, pelos materiais presentes no filtrado no momento da sua formação e pelo tempo que permaneceram no túbulo. Quaisquer elementos presentes no filtrado tubular, tais como células, bactérias, grânulos e pigmentos, podem prender-se à matriz do cilindro e estão na base da sua classificação.

Os tipos de cilindros encontrados no sedimento urinário representam diferentes quadros clínicos, resumidos na Tabela 19..

**Tabela 19.** – Significado clínico dos cilindros urinários.

Tipo de Cilindro	Origem	Significado Clínico
<b>Hialino</b> (mais frequentes) [Figura 6.]	Secreção tubular da proteína de Tamm-Horsfall que se agrega às fibrilhas.	Glomerulonefrite, pielonefrite, doença renal crónica, insuficiência cardíaca congestiva.
<b>Eritrocitário</b>	Eritrócitos ligados à matriz da proteína de Tamm-Horsfall.	Glomerulonefrite.
<b>Leucocitário</b>	Leucócitos ligados à matriz da proteína de Tamm-Horsfall.	Pielonefrite, nefrite intersticial aguda.
<b>Epiteliais</b>	Células tubulares que permanecem ligadas à proteína de Tamm-Horsfall.	Lesão do túbulo renal.

Tipo de Cilindro	Origem	Significado Clínico
<b>Granuloso</b>	Desintegração dos cilindros leucocitários, lisossomas das células tubulares ou agregados proteicos.	Lesão tubular inespecífica, geralmente patológica.
<b>Céreo</b>	Cilindros hialinos e granulosos.	Estase do fluxo urinário.
<b>Lipídico</b>	Corpos adiposos.	Síndrome nefrótica.
<b>Largo</b>	Formação nos ductos colectores ou nos túbulos distais.	Extrema estase urinária (por vezes designado “cilindro da insuficiência renal”).



**Figura 6.** – Cilindro hialino presente no sedimento urinário, observado ao Microscópio Óptico.

### Cristais

Os cristais encontram-se frequentemente no sedimento urinário. Embora raramente tenham significado clínico, deve-se proceder à sua identificação para confirmar se representam ou não um estado patológico. Os cristais são formados pela precipitação de sais na urina submetidos a alterações de pH, de temperatura ou de concentração, o que afecta a sua solubilidade. Os sais precipitados aparecem na urina na forma de cristais verdadeiros ou de material amorfo, que também se inclui na categoria de cristais urinários.

A urina normal recém-eliminada pode conter cristais formados nos túbulos ou, com menos frequência, na bexiga.

A principal razão para a identificação dos cristais urinários é detectar a presença de alguns tipos relativamente anormais, que podem representar certos distúrbios, como doenças hepáticas, erros inatos do metabolismo ou lesão causada pela cristalização de metabolitos de fármacos nos túbulos.

O recurso mais útil na identificação dos cristais é o conhecimento do pH da urina, pois este determinará o tipo de substâncias químicas precipitadas. Os cristais são geralmente classificados de acordo com o pH da urina em que estão presentes, ácido ou alcalino.

Os cristais mais frequentemente encontrados na urina ácida são os uratos, constituídos por ácido úrico, os uratos amorfos e os cristais de oxalato e cálcio (Figura 7., A).

A maioria dos cristais presentes na urina alcalina são os fosfatos, como o fosfato triplo (ou “tampa de caixa”, designação dada devido à sua morfologia característica - Figura 7., B), o fosfato amorfo e o fosfato de cálcio.



**Figura 7.** – Exemplos de alguns cristais presentes no sedimento urinário, observados ao Microscópio Óptico.

[**Legenda:** **A** – Cristais de oxalato de cálcio; **B** – Cristal de fosfato triplo ou “tampa de caixa”.]

Os cristais considerados patológicos encontram-se principalmente em urina ácida ou neutra, como por exemplo os cristais de cistina, que aparecem em casos de erro metabólico congénito impedindo a reabsorção da cistina pelo túbulo proximal e os cristais de leucina e de tirosina que apenas ocorrem em casos de patologia hepática grave.

No exame microscópico do sedimento urinário podem ainda ser encontrados artefactos de vários tipos, principalmente em amostras colhidas em condições impróprias. Os artefactos mais comuns são as gotículas de gordura, que podem ser confundidas com eritrócitos. A presença de pêlos e fibras também pode induzir em erro, devido à sua semelhança com cilindros. Assim, é importante despistar estas situações de modo a obter uma interpretação correcta dos resultados.

## 5. VIROLOGIA

De acordo com o plano de estágio, o estágio profissional na valência de Virologia está inserido na valência de Imunologia, sendo parte integrante do plano de estudos do Curso de Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O estágio decorreu no Laboratório de Virologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil, E.P.E. (IPOLFG), sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Carmo Ornelas, no período compreendido entre 6 de Dezembro de 2010 e 30 de Dezembro de 2010.

O Laboratório de Virologia do IPOLFG funciona num espaço físico próprio e é uma entidade independente do Laboratório de Imunologia, por este motivo considero ser mais correcto fazer uma descrição da Virologia num capítulo próprio.

O Laboratório de Virologia está integrado no Serviço de Patologia Clínica do IPOLFG, tendo como actividades principais a detecção directa dos vírus através da Biologia Molecular – PCR em tempo real (do inglês, *real-time polymerase chain reaction*) com tecnologia “*In House*” e detecção de antigenémias, a detecção indirecta dos vírus por serologia e a manutenção de serotecas e DNAtecas para estudos retrospectivos dos pacientes, quando necessário.

O Laboratório de Virologia está organizado em dois sectores, consoante o tipo de detecção dos vírus, directa ou indirecta, e a metodologia utilizada (Tabela 20.).

**Tabela 20.** – Sectores do Laboratório de Virologia e respectiva metodologia.

Sector	Metodologia
Serologia – Detecção Indirecta	CMIA CLIA IFI ELISA <i>Immunoblotting</i> (confirmatórios)
Biologia Molecular – Detecção Directa	PCR em Tempo Real RFLP Inno-Lipa Microarrays

## 5.1. MÉTODOS DE DETECÇÃO INDIRECTA

No sentido estrito a serologia refere-se à determinação de anticorpos no soro do doente, mas num sentido mais lato envolve a determinação quer de antigénios quer de anticorpos, pelo que o diagnóstico indirecto é baseado na verificação da resposta imunológica do hospedeiro.

A metodologia utilizada, no Laboratório de Virologia, para a detecção indirecta (*screening*) é a seguinte:

- Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência (CMIA) – este método permite a detecção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos. Encontra-se descrito no capítulo 4.1. da Bioquímica;
- Imunoensaio por Quimioluminescência (CLIA, do inglês, *Chemiluminescent Immunoassay*) – este método baseia-se no mesmo princípio da CMIA, mas permite uma detecção quantitativa dos anticorpos;
- Imunofluorescência Indirecta (IFI) e ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) - técnicas descritas anteriormente no capítulo 3.4. da Imunologia;

### 5.1.1. Herpesvírus

#### Citomegalovírus

A infecção por Citomegalovírus (CMV), membro da família *Herpesviridae*, pode ser primária ou secundária. A infecção pode ser adquirida por diferentes vias de transmissão e em diferentes períodos da vida (infecção congénita e infecção pós-natal). Após a infecção primária, o CMV entra numa fase de latência durante a qual o vírus pode ser encontrado nos linfócitos B. A subsequente reactivação da replicação vírica (infecção secundária) pode ocorrer concomitantemente com mudanças no relacionamento entre o hospedeiro e o vírus, tais como gravidez, doença grave, terapia imunossupressora ou *stress*.

A infecção congénita é transmitida por via placentar ou durante o nascimento, e pode ocorrer mesmo na mulher grávida já com anticorpos anti-CMV presentes (reinfecção com vírus exógeno). Se uma mulher seronegativa contrair uma infecção primária por CMV durante a gravidez, as consequências podem ser aborto,

mortinatalidade ou mal-formações congénitas. O quadro clínico da infecção congénita é sempre grave e inclui atraso psicomotor, surdez, coriorretinite, microcefalia, hidrocefalia, doenças cardíacas, hepatite, hepatoesplenomegália, trombocitopénia. A taxa de mortalidade é bastante alta.

A maioria dos indivíduos (40 a 90%) adquire a infecção primária por CMV durante a infância ou na idade adulta. As infecções pós-natais são transmitidas por contacto com fluídos biológicos contaminados (urina, saliva, leite materno, sémen, fezes), hemoderivados infectados e, ocasionalmente, órgãos transplantados. Nos indivíduos imunocompetentes, o quadro clínico da infecção pós-natal por CMV é geralmente leve ou assintomático (exs. febre, mal-estar geral). Ao contrário, nos doentes imunocomprometidos, os sintomas podem ser graves devido a infecção disseminada e incluem esplenomegália, pneumonia, anemia hemolítica, miocardite e encefalite. Nestes casos, a doença pode ser fatal.

A resposta imunitária contra o CMV envolve a síntese de anticorpos da classe IgM algumas semanas após a infecção e, de anticorpos da classe IgG uma semana após a infecção. Os níveis de IgM anti-CMV aumentam geralmente por algumas semanas e vão diminuindo lentamente num período de quatro a seis meses. Ocasionalmente, a IgM pode permanecer na circulação durante vários anos.

O ensaio de IgM específica é essencial no diagnóstico da infecção aguda por CMV, a qual é difícil de identificar apenas pelos sintomas. Nem sempre é possível distinguir a infecção primária da secundária, pois a reactivação pode induzir a síntese de IgM em pacientes imunocomprometidos. O ensaio de IgG específica é útil para distinguir os indivíduos com a doença adquirida daqueles que não a adquiriram, sendo particularmente importante na adopção de uma profilaxia adequada em indivíduos susceptíveis.

#### Amostras

Soro ou Plasma

#### Método – Equipamento – Ensaio

CMIA – Architect i2000Sr da Abbott – CMV IgM e CMV IgG

CLIA – Liaison da DiaSorin – CMV IgM e CMV IgG

## Vírus de Epstein-Barr

O Vírus de Epstein-Barr (EBV, do inglês, Epstein-Barr *Virus*), membro da família *Herpesviridae*, é o agente responsável pela mononucleose infecciosa (MI) e está envolvido no linfoma de Burkitt, no carcinoma nasofaríngeo e no síndrome linfoproliferativo ligado ao cromossoma X. A sua difusão é ubiquitária, pelo que infecta aproximadamente 95% dos indivíduos, ao longo da sua vida, em todo o mundo.

O EBV transmite-se principalmente por via oral, replica-se no epitélio orofaríngeo e é libertado na saliva pelos linfócitos B infectados. Durante a infância, a infecção primária por EBV é geralmente assintomática. Durante a adolescência ou a idade adulta, é contraída, geralmente, uma MI sintomática. Após a infecção primária, o vírus fica latente durante toda a vida.

O diagnóstico da MI baseia-se nos sintomas, caracterizados por dor de garganta, febre, linfadenite e mal-estar geral, associados a manifestações hematológicas (linfocitose) e serológicas (presença de anticorpos heterófilos circulantes e/ou anticorpos dirigidos contra proteínas específicas do EBV).

Vários agentes patogénicos de doenças infecciosas podem provocar sintomatologia semelhante à da MI, como o CMV, *Toxoplasma gondii*, vírus da hepatite, vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês, *human immunodeficiency virus*), entre outros. Em geral, o diagnóstico da MI aguda por EBV é confirmado por um teste para anticorpos heterófilos (efectuado no Laboratório de Imunologia – capítulo 3.3. deste relatório). No entanto, é difícil estabelecer um diagnóstico quando o teste para anticorpos heterófilos é negativo ou a sintomatologia é atípica.

A MI negativa ao teste para anticorpos heterófilos ocorre em 10 a 20% dos adultos e, em percentagem mais elevada, em crianças com MI aguda. O diagnóstico de MI, nesses doentes, pode ser confirmado através da detecção de anticorpos dirigidos contra proteínas específicas do EBV, como o antígeno da cápside viral (VCA, do inglês, *viral capsid antigen*) e o antígeno precoce difuso (EA-D, do inglês, *early antigen-diffuse*). A presença de anticorpos da classe IgM anti-VCA é essencial para estabelecer diagnóstico de MI aguda. Contudo, é recomendado confirmar a presença dos anticorpos IgG anti-EA ou anticorpos específicos anti-antígeno nuclear do EBV (EBNA-1, do inglês, Epstein-Barr *nuclear antigen-1*) da classe IgG ou IgM.

Os testes serológicos para as infecções por EBV permitem detectar respostas imunitárias características em função do tempo (Tabela 21.).

**Tabela 21.** – Interpretação possível para a detecção serológica de anticorpos específicos do EBV.

VCA IgM	VCA IgG	EA IgG	EBNA IgG	Interpretação
–	–	–	–	Seronegatividade
+	+	–	–	Infecção Primária (fase precoce)
-/+	+	+	–	Infecção Aguda
–	+	–	+	Infecção Passada
–	+	+	+	Reactivação do Vírus

#### Amostras

Soro ou Plasma

#### Método – Equipamento – Ensaio

CLIA – Liaison da DiaSorin – VCA IgM, VCA IgG, EBNA IgG e EA IgG

#### **Vírus da Varicela Zoster**

O Vírus da Varicela Zoster (VZV, do inglês, *varicella zoster virus*) é o agente etiológico da varicela e pertence à família *Herpesviridae*. A varicela é uma doença viral aguda, altamente contagiosa, caracterizada por exantema papulovesiculoso difuso. A doença tem distribuição ubiqüitária, aparecendo predominantemente no Inverno e na Primavera. Apresenta uma evolução geralmente benigna se se manifestar durante a infância, mas tende a ser mais grave nos adultos e pode ser fatal, sobretudo nos recém-nascidos e nos indivíduos imunocomprometidos. Após a infecção primária o VZV permanece em estado latente nos gânglios nervosos e, após a reactivação, pode causar o herpes zoster, uma doença que afecta sobretudo os idosos e os indivíduos imunocomprometidos, caracterizada por dor aguda bem localizada e erupção unilateral de lesão vesiculares semelhantes às da varicela. Os anticorpos da classe IgM anti-vírus

da varicela zoster podem ser detectados durante a infecção primária e durante a reactivação.

A determinação do estado imunitário do doente, relativamente ao VZV, pode ser bastante útil no acompanhamento de doentes imunocomprometidos e na administração de fármacos antivíricos. Embora as infecções possam ser prevenidas, ou alteradas, pela administração de imunoglobulinas anti-VZV ou tratadas com fármacos antivirais, a varicela pode ser controlada apenas através da vacinação.

#### Amostras

Soro ou Plasma

#### Método – Equipamento – Ensaios

CLIA – Liaison da DiaSorin – VZV IgM e VZV IgG

### **Vírus Herpes Simplex**

O Vírus Herpes Simplex (HSV, do inglês, *Herpes Simplex Virus*) pertence à família *Herpesviridae*. Existem dois tipos naturais de HSV, com características biológicas e epidemiológicas diferentes, podendo ser reconhecidos pelas endonucleases de restrição ou por análise antigénica. Os dois tipos de vírus causam infecções humanas, as quais variam em gravidade desde leves afecções cutâneas (vesículas) a encefalite.

O HSV de tipo 1 (HSV-1) infecta geralmente as membranas mucosas do olho, a boca e as junções mucocutâneas da face, sendo também uma das causas mais comuns da encefalite esporádica grave nos adultos. O HSV de tipo 2 (HSV-2) está geralmente associado a lesões genitais, o herpes genital é, actualmente, uma das doenças sexualmente transmitidas mais comuns. No entanto, a associação entre o local da infecção e o tipo de HSV envolvido não é absoluta.

Uma vez ocorrida a infecção, o HSV persiste num estado latente nos gânglios sensoriais, de onde pode reemergir e causar a recorrência periódica da infecção induzida por vários estímulos. Os indivíduos imunocomprometidos estão mais susceptíveis a infecções recorrentes por HSV.

Um diagnóstico rápido e exacto da infecção pelo HSV é indispensável para a administração de terapêutica antivírica específica e para minimizar a propagação da infecção.

Amostras

Soro ou Plasma

Método – Equipamento – Ensaio

CLIA – Liaison da DiaSorin – HSV-1 IgG e HSV-2 IgG

**Herpesvírus Humano tipo 6**

O Herpesvírus Humano tipo 6 (HHV-6, do inglês, *Human Herpes Virus 6*) pertence à família *Herpesviridae* foi inicialmente descrito em 1986 e isolado de doentes com disfunções linfoproliferativas. Posteriormente, foi confirmado que o HHV-6 é o agente etiológico da doença infantil *Roseola infantum*, e tem sido associado com outras manifestações de doenças em crianças, incluindo hepatite fulminante, encefalite, linfadenite necrosante histiocítica e infecção disseminada.

Em adultos, a infecção por HHV-6 é menos comum, com evidência documentada mostrando que o HHV-6 pode estar associado a casos de hepatite, doença semelhante à mononucleose, esclerose múltipla, entre outros.

O HHV-6 é ubíquo na população humana, com a infecção a ocorrer tipicamente no início da infância deixando poucos adultos susceptíveis a infecção principal. Embora a prevalência de anticorpos HHV-6 seja elevada nas crianças, o seu nível diminui para titulações baixas após a infecção. Níveis elevados de anticorpos da classe IgG anti-HHV-6, no soro, podem ser indicadores de exposição recente a HHV-6. A detecção de anticorpos da classe IgM anti-HHV-6 pode ser usada apenas no auxílio ao diagnóstico de infecção primária por este vírus.

Amostras

Soro ou Plasma

Método – Equipamento – Ensaio

CLIA – Liaison da DiaSorin – HHV-6 IgG

IFI – HHV6 IgG e HHV6 IgM

ELISA – HHV6 IgG

### **Herpesvírus Humano tipo 8**

O Herpesvírus Humano tipo 8 (HHV-8), também conhecido por Herpesvírus Associado ao Sarcoma de Kaposi, é classificado como um herpesvírus gama e é semelhante ao EBV no seu tropismo para as células B e na sua capacidade para permanecer em estado latente. Actualmente, existe uma forte evidência epidemiológica acerca do papel etiológico do HHV-8 na patogénese do sarcoma de Kaposi.

A transmissão ocorre por contacto sexual, pela saliva e por órgãos transplantados. A frequência da seroprevalência para HHV-8 na população geral varia entre 5% e 35%. Vários estudos demonstraram a presença de títulos elevados de anticorpos da classe IgG em doentes com sarcoma de Kaposi, mas não em dadores normais. Desta forma, a frequência da seroprevalência para HHV-8 é diferente relativamente ao EBV, HHV-6, CMV ou HSV-1, onde mais de 80% da população é positiva para anticorpos para estes vírus.

#### Amostras

Soro ou Plasma

#### Método – Equipamento – Ensaios

IFI – HHV8 IgG

### **5.1.2. Hepatites Víricas**

#### **Vírus da Hepatite A**

A hepatite A é uma doença autolimitada e é frequentemente um distúrbio subclínico, particularmente em crianças. Uma vez que as infecções sintomáticas pelo Vírus da Hepatite A (HAV, do inglês, *Hepatitis A Virus*), membro da família *Picornaviridae*, podem não ser clinicamente distinguíveis da infecção pelo vírus da hepatite B ou C, os testes serológicos constituem uma ferramenta importante para estabelecer um diagnóstico correcto.

Durante a fase aguda da infecção pelo HAV, os anticorpos da classe IgM anti-HAV surgem no soro do doente e são quase sempre detectáveis no início da sintomatologia. Na maioria dos casos, a resposta dos anticorpos IgM atinge o pico no primeiro mês da doença, podendo persistir até seis meses.

### Amostras

Soro ou Plasma

### Método – Equipamento – Ensaio

CMIA – Architect i2000Sr da Abbott – HAV IgM

## **Vírus da Hepatite B**

A Hepatite B é causada pelo Vírus da Hepatite B (HBV, do inglês, *Hepatitis B Virus*), membro da família *Hepadnaviridae*. É transmitido por via sanguínea, sexual e perinatal, sendo a última um dos modos mais graves e eficientes de transmissão.

O HBV afecta sobretudo o fígado (hepatócitos), tendo a capacidade de induzir infecções persistentes e está geralmente associado ao desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (infecção crónica).

A hepatite B pode ocorrer de forma aguda, aquando do primeiro contacto com o vírus, é geralmente assintomática (em cerca de 90% dos casos), no entanto, podem ocorrer sintomas como a icterícia, fadiga, dores abdominais, náuseas e vómitos, que resultam da necrose dos hepatócitos. Geralmente as transaminases encontram-se elevadas (sobretudo a ALT). A forma aguda da infecção pode evoluir, ou não, para a forma crónica.

Os principais marcadores serológicos, antigénios e anticorpos, que podem ser detectados durante uma infecção por HBV são os seguintes:

- **AgHBs (antigénio de superfície do HBV):** Durante a infecção o HBV produz um excesso de AgHBs, podendo ser detectado no sangue de indivíduos infectados. É responsável pela ligação do vírus às células hepáticas, sendo a estrutura alvo dos anticorpos neutralizadores. O AgHBs é o primeiro marcador serológico após a infecção pelo HBV e pode ser detectado durante infecção aguda e crónica, desaparecendo no período de convalescença. O ensaio do AgHBs é útil na identificação de indivíduos infectados, de forma a evitar a transmissão do vírus, e na monitorização do estado da infecção, juntamente com outros marcadores serológicos da hepatite B.

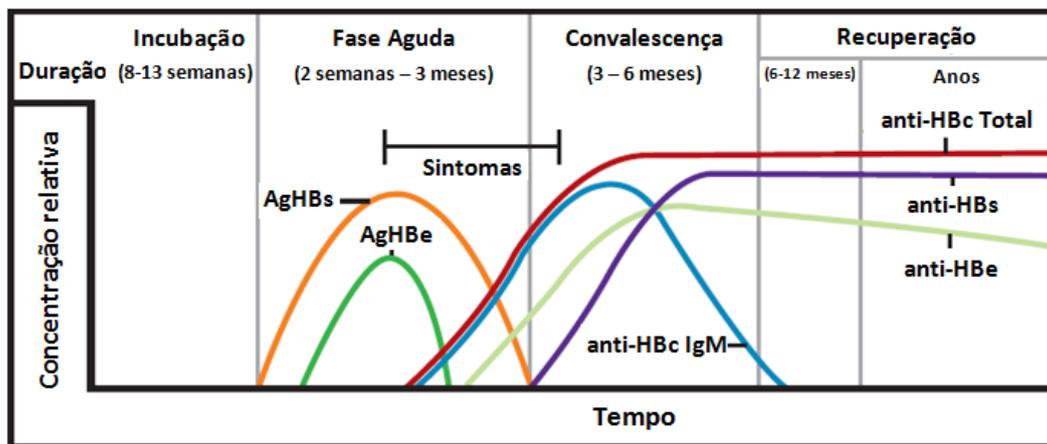
- **Anti-HBs (anticorpos anti-antígeno de superfície do HBV):** Os ensaios para determinação de anticorpos anti-HBs são frequentemente utilizados para monitorizar o sucesso da vacinação contra a hepatite B, bem como para a monitorização da convalescença e recuperação dos indivíduos infectados pela hepatite B. A detecção de anticorpos anti-HBs num indivíduo assintomático pode indicar exposição anterior ao HBV.
- **Anti-HBc (anticorpos anti-antígeno do *core* do HBV):** Também designado por *core* total, a sua determinação pode ser utilizada como um indicador de infecção presente ou passada pelo HBV. Na ausência e informação relativa a outros marcadores do HBV, deve ser considerado que o indivíduo com níveis detectáveis de anticorpos anti-HBc pode estar activamente infectado ou que a infecção pode ter sido debelada, deixando o indivíduo imunizado. A presença de anticorpos anti-HBc não permite diferenciar infecção aguda de crónica.
- **Anti-HBc IgM (anticorpos IgM anti-antígeno do *core* do HBV):** Os anticorpos víricos, específicos da classe IgM, são detectados na maioria das infecções agudas, pelo que são considerados um marcador fiável da fase aguda da doença. Na fase de convalescença, os anticorpos IgM anti-HBc mantêm níveis detectáveis após o desaparecimento de AgHBs que vão diminuindo ao longo do tempo. Os anticorpos IgM anti-HBc também podem ser detectados em doentes com infecção crónica por HBV.
- **AgHBe (antígeno de replicação viral):** A determinação do AgHBe pode ser utilizada para monitorizar o progresso da infecção pelo HBV, sendo detectado na fase inicial da infecção, após o aparecimento do AgHBs. Os títulos de ambos aumentam rapidamente durante o período de replicação viral da infecção aguda. O AgHBe pode persistir, juntamente com o AgHBs nos casos de infecção crónica.
- **Anti-HBe (anticorpos anti-antígeno de replicação viral):** A seroconversão do AgHBe em anticorpos anti-HBe, durante a infecção aguda pelo HBV, é geralmente indicativa de resolução da infecção, de um nível reduzido de infecciosidade ou de resposta à terapêutica em doentes com infecção crónica.

Na tabela seguinte encontra-se uma descrição dos marcadores serológicos do HBV associados a cada uma das fases da doença.

**Tabela 22.** – Marcadores serológicos da Hepatite B associados às várias fases da doença.

Interpretação	AgHBs	Anti-HBc Total	Anti-HBs	AgHBe	Anti-HBe	Anti-HBc IgM
Fase de Incubação	+	-	-	-	-	-
Fase Aguda Precoce	+	-	-	+	-	-
Fase Aguda	+	+	-	+	-	+
Início da Seroconversão	+	+	-	-	+	+
Portador Crónico com Seroconversão Tardia	+	+	-	-	+	-
Portador Crónico sem Seroconversão	+	+	-	+	-	-
Fase de Convalescença	-	+	-	-	+	+
Início da Recuperação	-	+	-	-	+	-
Possível Reacção Cruzada ou Período de Janela	-	+	-	-	-	-
Negativo para HBV	-	-	-	-	-	-
Imunização/ Infecção Passada	-	+/-	+	-	-	-

Na figura seguinte é possível observar o perfil dos marcadores serológicos do HBV ao longo do tempo.



**Figura 8.** – Perfil serológico da infecção por HBV.

### Amostras

Soro ou Plasma

### Método – Equipamento – Ensaio

CMIA – Architect i2000Sr da Abbott – AgHBs; Anti-HBc Total; Anti-HBs; AgHBe; Anti-HBe; Anti-HBc IgM.

### **Hepatite C**

A hepatite C é causada pelo Vírus da Hepatite C (HCV, do inglês, *Hepatitis C Virus*), pertencente à família *Flaviviridae*. A transmissão ocorre geralmente por via sanguínea e raramente por via sexual. Durante muito tempo foi considerada a hepatite pós-transfusional mais frequente, actualmente o risco de contágio pós-transfusional é fraco, devido à obrigatoriedade de despiste para todos os dadores de sangue.

A presença de anticorpos anti-HCV indica que um indivíduo pode ter sido infectado pelo HCV, ser portador de HCV infeccioso e/ou transmitir infecção por HCV. Apesar da maioria dos indivíduos infectados poder ser assintomática, a infecção pelo HCV pode estar associada ao desenvolvimento de hepatite crónica, cirrose e/ou num aumento do risco de carcinoma hepatocelular.

### Amostras

Soro ou Plasma

### Método – Equipamento – Ensaio

CMIA – Architect i2000Sr da Abbott – HCV IgG

### 5.1.3. Retrovírus

Os Retrovírus pertencem à família *Retroviridae* e são caracterizados por possuírem um genoma RNA, sendo capazes de replicar o RNA viral por transcrição reversa, pela acção da enzima transcriptase reversa.

#### **Vírus da Imunodeficiência Humana**

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), é transmitido por contacto sexual, exposição a sangue ou produtos sanguíneos e infecção pré-natal ou perinatal do feto ou do recém-nascido, respectivamente. Após exposição ao vírus, quase todos os indivíduos passam por uma fase de latência, antes de se manifestar a severa imunodepressão que caracteriza a SIDA. Os anticorpos anti-HIV são quase sempre detectados em doentes com SIDA e em indivíduos assintomáticos infectados com o HIV.

Actualmente o HIV é classificado em dois tipos, o Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1) e o Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2 (HIV-2). Os dois tipos são muito semelhantes na estrutura morfológica, organização genómica, tropismo celular (linfócitos T CD4+), vias de transmissão e capacidade de causar SIDA. No entanto, o HIV-2 é menos patogénico do que o HIV-1 e as infecções pelo HIV-2 apresentam um período de latência mais longo com uma progressão mais lenta da doença, títulos virais inferiores e taxas de transmissão vertical e horizontal inferiores.

A proteína imunogenética principal, e o alvo antigenémico, para a detecção sérica da infecção pelo HIV é a proteína transmembranar TMP (do inglês, *transmembrane protein*) viral (HIV). Os anticorpos anti-TMP encontram-se geralmente entre os primeiros a aparecer quando se dá a seroconversão dos indivíduos infectados pelo HIV. Pouco tempo depois da infecção pelo HIV, mas antes da seroconversão, os antígenos do HIV podem ser detectados em amostras de soro ou plasma. A proteína estrutural do HIV mais frequentemente utilizada como marcador de antigenémia é a proteína do *core* p24. Os anticorpos anti-antígeno p24 são utilizados para detectar o antígeno p24 do HIV antes da seroconversão, diminuindo desta forma a janela de seroconversão e melhorando a detecção precoce da infecção pelo HIV. O ensaio utilizado no Laboratório de Virologia (HIV Ag/Ac) trata-se de um ensaio combinado que permite a detecção simultânea do antígeno p24 e de anticorpos anti-HIV tipo 1 e/ou tipo 2.

Amostras

Soro ou Plasma

Método – Equipamento – Ensaio

CMIA – Architect i2000Sr da Abbott – Anticorpos HIV-1/2 e antígeno p24 do HIV-1

**Vírus T-Linfotrófico Humano**

O Vírus T-linfotrófico Humano (HTLV, do inglês, *Human T-lymphotropic Virus*) divide-se em dois tipos, o HTLV tipo I (HTLV-I) e o HTLV tipo II (HTLV-II). O HTLV-I está etiológicamente associado a estados neoplásicos, como a leucemia das células T em adultos, e a uma variedade de doenças neurológicas desmielinizantes, nomeadamente mielopatia espástica tropical associada a HTLV e, mais recentemente, polimiosite e artrite. A transmissão do HTLV-I e do HTLV-II ocorre por via sexual, transfusão de componentes sanguíneos celulares infectados, consumo de drogas intravenosas ou transmissão perinatal através da amamentação. A detecção de anticorpos anti-HTLV-I e anti-HTLV-II auxilia no diagnóstico de infecção pelo HTLV e a garantir a segurança das dádivas de sangue.

Amostras

Soro ou Plasma

Método – Equipamento – Ensaio

CMIA – Architect i2000Sr da Abbott – HTLV-I/II IgG

**5.1.4. Testes Confirmatórios**

Os testes confirmatórios são efectuados pela técnica de *Immunoblotting*.

*Immunoblotting* – Fundamento do Método

Na técnica de *immunoblotting*, as proteínas das amostras (antígenos) são submetidas a electroforese num gel de poliacrilamida e após a sua separação são transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Esta é tratada com o anticorpo marcado com uma sonda radioactiva.

As bandas antigénicas que tenham fixado o anticorpo são então visualizadas por auto-radiografia. A técnica pode ser modificada para que a detecção seja feita por métodos imunoenzimáticos.

- Confirmatório HIV-1 e HIV-2: Técnica de *Western-Blot* contendo proteínas virais e proteínas precursoras para a detecção dos anticorpos HIV-1/2.
- Confirmatório HTLV-I e HTLV-II: Imunoensaio INNO-LIA.

## 5.2. MÉTODOS DE DETECÇÃO DIRECTA

Considera-se diagnóstico directo aquele em que é pesquisado o organismo ou os seus determinantes antigénicos ou componentes estruturais.

No Laboratório de Virologia é utilizada a técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) em Tempo Real.

### Ensaio

- Carga viral HSV-1
- Carga viral HSV-2
- Carga viral Varicela Zoster
- Carga viral CMV
- Carga viral EBV
- Carga viral HHV-6
- Carga viral HHV-8
- Carga viral Hepatite B
- Carga viral Hepatite C

### Equipamento

Abi Prism Sequence Detection Systems da Applied Biosystems

### 5.2.1. Detecção e Tipagem do Vírus do Papiloma Humano

O Vírus do Papiloma Humano (HPV, do inglês, *Human Papillomavirus*), inicialmente reconhecido como agente etiológico das verrugas cutâneas, é um membro

da família *Papillomaviridae*. A sua transmissão ocorre sobretudo por via sexual, podendo ocorrer também por contacto directo com material infectado (ex. feridas).

O HPV é o principal factor de risco para o aparecimento de cancro do colo do útero. Sendo um vírus que apresenta vários tipos e subtipos, pode conduzir a diferentes patologias de maior ou menor risco, e não apenas a esta neoplasia. Existem genótipos de HPV de baixo ou de alto risco, sendo que os de alto risco (carcinogénicos) incluem os genótipos HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33 e HPV 45, entre outros, apesar de que os genótipos responsáveis pela maioria dos cancros são HPV 16 e 18.

Para prevenir uma posterior infecção pelo HPV, é necessário conhecer as formas de transmissão e os factores que aumentem a probabilidade de contrair a infecção, de modo a evitá-los. No entanto, no caso de um indivíduo já estar infectado, um diagnóstico precoce e o conhecimento dos sintomas mais comuns têm a maior importância. Quando detectado precocemente, este cancro é um dos que tem maior sucesso no tratamento. Actualmente, uma forma eficaz de prevenir diferentes patologias associadas a infecções pelo HPV é a vacinação.

O objectivo do rastreio é detectar alterações antes da manifestação de quaisquer sintomas, antes do cancro se desenvolver, e até mesmo a presença do vírus, antes de qualquer alteração celular, permitindo um tratamento com sucesso. Nem todas as lesões evoluem para cancro, essa evolução depende do genótipo de HPV envolvido, sendo que a maioria regride espontaneamente. Também é possível a co-existência de mais do que um genótipo do HPV no organismo humano.

No Laboratório de Virologia a detecção e a tipagem do HPV é efectuada a partir de biópsia de tecido colo do útero de acordo com o seguinte protocolo:

- Extracção e purificação de DNA.
- Quantificação do DNA (PCR em tempo real): Se o resultado for negativo, o resultado é negativo para HPV. Se for positivo, o procedimento é seguido com a genotipagem.
- A genotipagem pode ser efectuada por RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), Inno-Lipa ou Microarrays.

## **6. CONTROLO DE QUALIDADE**

A qualidade dos cuidados de saúde prestados ao doente oncológico são particularmente importantes e têm constituído, ao longo dos anos, uma aposta clara do IPOLFG, E.P.E.. Prosseguindo a Política e os Objectivos da Qualidade definidos, tem sido feito um esforço constante no sentido de harmonizar e melhorar os padrões de cuidados, tanto a nível clínico, como a nível organizacional e de gestão, de modo a garantir não só as condições de segurança mínimas de tratamento oncológico, mas também a melhorar o acesso dos cidadãos a cuidados de saúde de elevada qualidade e a aumentar a satisfação dos utentes e clínicos.

Neste sentido, o SPC do IPOLFG, E.P.E. obteve recentemente a acreditação da totalidade dos seus ensaios, nas suas várias valências, de acordo com a NP EN ISO 15189:2007, procurando manter a Política de Qualidade perfeitamente estabelecida e reconhecida no Instituto e que já em 2004 lhe permitiu ser pioneiro na acreditação de laboratórios no domínio da oncologia, através da acreditação do Laboratório de Virologia de acordo com a norma NP EN ISO/IEC 17025:2000.

O SPC pretende ser reconhecido como um serviço de referência na área da Oncologia em Portugal e, como tal, funciona e está organizado segundo princípios e normas de qualidade bem definidos, nas várias fases do “processo” de diagnóstico – Fase Pré-Analítica, Fase Analítica e Fase Pós-analítica. A Garantia de Qualidade é assegurada pelo Controlo de Qualidade Interno (CQI) e por programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), nacionais ou internacionais.

### **6.1. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO (CQI)**

O CQI é um conjunto de actividades desenvolvidas durante o processo analítico que visam assegurar a qualidade dos resultados que estão a ser produzidos, por forma a garantir que os mesmos são adequados ao fim a que se destinam, reduzindo, desse modo, a incerteza das decisões tomadas pelos clínicos no diagnóstico, prognóstico e terapêuticas a serem administradas aos indivíduos.

O CQI trata-se de um controlo intralaboratorial que consiste na análise de amostras-controlo (materiais de referência), cujos valores analíticos são conhecidos, avaliando a precisão e exactidão dos métodos. Os materiais de referência devem apresentar a mesma matriz das amostras analisadas, existindo 3 níveis: Patológico Baixo, Normal e Patológico Elevado. Este controlo permite garantir a reprodutibilidade dos resultados, verificar a calibração dos sistemas analíticos e a ocorrência de não conformidades que desencadearão acções correctivas. Deste modo, o CQI baseia-se num processo estatístico que permite monitorizar e avaliar a fiabilidade dos resultados das amostras dos utentes do Instituto, a partir da utilização regular de materiais de referência. Realce, ainda, para o facto dos resultados obtidos para os materiais de referência permitirem também avaliar o desempenho temporal dos métodos bem como a estabilidade dos reagentes, através de programas dedicados para análise e tratamento de dados.

O CQI tem a mais-valia, entre outras, de revelar as diferentes variações ou tipos de erro que podem ocorrer na rotina diária de um laboratório de análises clínicas. Nesta matéria, importa diferenciar os Erros Aleatórios dos Erros Sistemáticos. Os Erros Aleatórios correspondem a erros positivos ou negativos, cuja direcção e magnitude não pode ser prevista e que se revelam através da dispersão em redor da média, de um conjunto de medições efectuadas na mesma amostra. Estão, assim, relacionados com a precisão de um dado método. Os Erros Sistemáticos assumem sempre a mesma direcção (positivo ou negativo) e, portanto, provocam um desvio da média em relação ao valor “convencionalmente exacto” da grandeza que está a ser medida. Deste modo, estes erros estão relacionados com a exactidão de um método. A combinação dos dois tipos de erro referidos anteriormente representa o Erro Total (TE, do inglês *Total Error*) que pode estar associado com uma determinada medição. O TE descreve a contribuição conjunta dos erros aleatórios e sistemáticos, podendo funcionar como estimativa da incerteza de medição. O Erro Total Admissível (TEa, do inglês *allowable Total Error*) corresponde ao intervalo de erro estipulado pelo laboratório, com base em referências nacionais ou internacionais, que serve de base para caracterizar as margens de erro aceitáveis para um determinado método, tendo em consideração a utilização clínica prevista para os resultados. Os critérios de aceitação para os diversos ensaios são definidos segundo este TEa. Importa realçar que cabe ao Responsável pelo Laboratório / Responsável da Qualidade, com base no seu julgamento profissional, estabelecer os valores de TEa quando estes não estejam disponíveis de acordo com o descrito inicialmente.

Nos laboratórios do SPC a monitorização do CQI é efectuada através de duas formas, de acordo com a natureza do ensaio. Deste modo, são utilizados os programas MultiQC ou InterQC para os ensaios quantitativos e os critérios definidos pelo fornecedor e/ou pelo laboratório para os ensaios qualitativos e alguns ensaios semi-quantitativos.

### 6.1.1. Laboratório de Imunologia

O Laboratório de Imunologia faz a monitorização do CQI para os ensaios da Imunologia realizados nos equipamentos BN ProsPec, Cobas e411 e para o Proteinograma realizado no equipamento Hydrasys/Hydraplus, através do *software* MultiQC6. Este *software* permite a monitorização diária<sup>2</sup> do CQI para os ensaios de Imunologia referidos.

As tabelas seguintes discriminam os diferentes ensaios realizados no laboratório e avaliados no MultiQC, indicando a monitorização, a periodicidade e o critério de aceitação utilizado – Tolerância/TEa (Erro Total Admissível).

**Tabela 23.** – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC para o equipamento **BN Prospec**.

Ensaio	Monitorização	Periodicidade	TEa
Alfa-1-Micro Ur	1 nível	Quando há amostras	43.9%
Alfa-2-Macro Ur	1 nível	Quando há amostras	34.7%
Albumina	2 níveis	Quando há amostras	<2000 mg/dL → 200 mg/dL >2000 mg/dL → 10%
Albumina LCR	1 nível	Quando há amostras	<100 mg/dL → 10 mg/dL >100 mg/dL → 10%
Albumina Ur	1 nível	Quando há amostras	46.1%
Alfa-1-Antitripsina	3 níveis	Quando há amostras (2 níveis)	20%
C3	3 níveis	Quando há amostras (2 níveis)	12%

<sup>2</sup> A periodicidade dos controlos dos diferentes ensaios, definida como diária, indica que os controlos devem ser sempre em simultâneo com as amostras, de modo a validar uma corrida analítica.

Ensaio	Monitorização	Periodicidade	TEa
C4	3 níveis	Quando há amostras (2 níveis)	11.5%
Ceruloplasmina	3 níveis	Quando há amostras (2 níveis)	7.9%
Haptoglobina	3 níveis	Diária (2 níveis)	27.3%
IgA LCR	1 nível	Quando há amostras	15%
IgM LCR	1 nível	Quando há amostras	15%
IgG LCR	1 nível	Quando há amostras	15%
IgG	3 níveis	Quando há amostras (2 níveis)	8%
IgG Ur	1 nível	Quando há amostras	20%
IgG <sub>1</sub>	3 níveis	Quando há amostras (2 níveis)	15%
IgG <sub>2</sub>	3 níveis	Quando há amostras (2 níveis)	15%
IgG <sub>3</sub>	3 níveis	Quando há amostras (2 níveis)	15%
IgG <sub>4</sub>	3 níveis	Quando há amostras (2 níveis)	15%
IgE	3 níveis	Quando há amostras (2 níveis)	20%
IgM	3 níveis	Quando há amostras (2 níveis)	16.8%
IgD	1 nível	Quando há amostras	20%
Kappa	3 níveis	Diária (2 níveis)	15.0%
Kappa Livre	2 níveis	Diária (1 nível)	30%
Lambda	3 níveis	Diária (2 níveis)	15.0%
Lambda livre	2 níveis	Diária (1 nível)	20%
Pré-albumina	3 níveis	Diária (2 níveis)	14.5%
RA	1 nível	Quando há amostras	13.5%
TASO	1 nível	Quando há amostras	10%

**Tabela 24.** – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC para o equipamento **Cobas e411**.

Ensaios	Monitorização	Periodicidade	TEa
CA 72.4	2 níveis	2x por semana	20%
NSE	2 níveis	2x por semana	20%
Cyfra 21.1	2 níveis	2x por semana	28.2%

**Tabela 25.** – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC para o **Proteinograma** realizado nos equipamentos **Hydrasys/Hydraplus**.

Ensaios	Monitorização	Periodicidade	TEa
Albumina	2 níveis	Diária (1 nível)	10%
Alfa-1 globulina	2 níveis	Diária (1 nível)	15.7%
Alfa-2 globulina	2 níveis	Diária (1 nível)	12.6%
Beta-2 globulina	2 níveis	Diária (1 nível)	15%
Gama globulina	2 níveis	Diária (1 nível)	16.8%

### **Imunofixação**

Às técnicas de **Imunofixação** (técnicas qualitativas), efectuadas no equipamento Hydrasys, são aplicados os critérios do fornecedor para a monitorização do CQI.

**Imunofixação – Soro;**

**Imunofixação / Bence Jones – Soro;**

**Imunofixação / Bence Jones – Urina;**

### **Autoimunidade**

#### **a) Técnicas de Imunofluorescência**

Às Técnicas de **Imunofluorescência** são aplicados os critérios do fornecedor para a monitorização do CQI, de acordo com o descrito na tabela seguinte.

**Tabela 26.** – Ensaios de **Imunofluorescência** monitorizados pelo CQI.

Ensaio	Monitorização	Periodicidade
ANA	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária
ANCA	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária
FI	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária
Tecidos	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária
VSM47	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária
DNA	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária

### b) Técnicas de ELISA

A monitorização do CQI das Técnicas de **ELISA**, realizadas no Laboratório para a área da Autoimunidade, é feita através do *software* MultiQC. As tabelas que se seguem discriminam as diferentes técnicas executadas pelo Laboratório.

**Tabela 27.** – Ensaios monitorizados no MultiQC efectuados no equipamento **Mago Plus**.

Ensaio	Monitorização	Periodicidade	Tolerância
ATC anti-Cardiolipina IgG	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
ATC anti-Cardiolipina IgM	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
ATC anti- $\beta$ 2Glicop I IgG	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
ATC $\beta$ 2Glicop I IgM	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
ATC anti-APCA	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%

Ensaio	Monitorização	Periodicidade	Tolerância
ATC anti-dsDNA-Ncx	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
ATC anti-AMA-M2-3E	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%

É de salientar o facto dos valores do CQI das Técnicas ELISA serem introduzidos manualmente na Base de Dados MultiQC.

### c) Técnicas de *Immunoblot*

Às Técnicas de *Immunoblot* são aplicados os critérios do fornecedor para a monitorização do CQI, quer as que são realizadas no equipamento EUROBlotMaster, quer as executadas manualmente.

**Tabela 28.** – Ensaio monitorizados do CQI efectuados no equipamento EUROBlotMaster e manualmente.

Ensaio	Monitorização	Periodicidade
ANA Profile 3 IgG	Controlo Interno Controlo Positivo	Por Corrida Por Kit
Perfil Miosites IgG	Controlo Interno Controlo Positivo	Por Corrida Por Kit
Perfil anti-MPO,PR3 IgG	Controlo Interno Controlo Positivo	Por Corrida Por Kit
Perfil Esclerose sistémica IgG	Controlo Interno Controlo Positivo	Por Corrida Por Kit
Perfil Hepático IgG	Controlo Interno Controlo Positivo	Por Corrida Por Kit
Perfil anti-Ag neuronais IgG	Controlo Interno Controlo Positivo	Por Corrida Por Kit
Perfil anti-gangliósidos IgG	Controlo Interno Controlo Positivo	Por Corrida Por Kit

## Serologia

### a) Ensaio qualitativos e semi-quantitativos

Nos ensaios qualitativos e semi-quantitativos são aplicados os critérios do fornecedor para a monitorização do CQI.

**Tabela 29.** – Ensaio monitorizados do CQI executados **manualmente**.

Ensaio	Monitorização	Periodicidade
RPR	Controlo Negativo	Por Corrida
	Controlo Positivo	Por Corrida
TPHA (R hemaglutinação)	Controlo Negativo	Por Corrida
	Controlo Positivo	Por Corrida
R. Widal	Controlo Negativo	NA
	Controlo Positivo	Por Corrida
Monotest	Controlo Negativo	Por Corrida
	Controlo Positivo	Por Corrida
R. Huddleson	Controlo Negativo	NA
	Controlo Positivo	Por Corrida
Brucella Capt	Controlo Negativo	Por Corrida
	Controlo Positivo	Por Corrida
Waalser-Rose (R hemaglutinação)	Controlo Negativo	Por Corrida
	Controlo Positivo	Por Corrida
Hidatidose (R hemaglutinação)	Controlo Negativo	Por Corrida
	Controlo Positivo	Por Corrida
Aspergillus	Controlo Negativo	Por Corrida
	Controlo Positivo	Por Corrida

### b) Ensaio automáticos

Aplica-se a todos os ensaios de Serologia realizados no laboratório por técnica de ELISA e a monitorização do CQI é feita através do *software* MultiQC.

**Tabela 30.** – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC, executados no **Mago Plus**.

Ensaios	Monitorização	Periodicidade	Tolerância
Treponema pallidum IgG/IgM	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
Treponema pallidum IgM	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%

### 6.1.2. Laboratório de Bioquímica

O Laboratório de Bioquímica do SPC faz, actualmente, a monitorização do CQI através do *software* MultiQC6. Este *software* permite a monitorização diária<sup>3</sup> do CQI para os ensaios de Bioquímica que são realizados.

As tabelas seguintes discriminam os diferentes ensaios realizados no laboratório e avaliados no MultiQC, indicando a monitorização, a periodicidade e o critério de aceitação utilizado – Tolerância/TEa (Erro Total Admissível).

**Tabela 31.** – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC para os equipamentos **Architect c8000 (Bio)** e **ci8200 (Bio e Imuno)**.

Ensaios	Monitorização	Periodicidade	TEa
Ácido úrico	3 níveis	Manhã/tarde	17%
ALT	3 níveis	Manhã/tarde	<60 U/L→8 U/L >60 U/L→15%
Albumina	3 níveis	Diária	10%
Amilase	3 níveis	Diária	14.6%
AST	3 níveis	Manhã/tarde	15.2%
β-microglobulina	2 níveis	Diária	<2 µg/mL→ 0.2 µg/mL >2 µg/mL→10%
Bilirrubina Directa	3 níveis	Manhã/tarde	15%

<sup>3</sup> A periodicidade dos controlos dos diferentes ensaios, definida como diária, indica que os controlos devem ser sempre em simultâneo com as amostras, de modo a validar uma corrida analítica.

Ensaio	Monitorização	Periodicidade	TEa
Bilirrubina Total	3 níveis	Manhã/tarde	20%
Cálcio	3 níveis	Manhã/tarde	1 mg/dL
Colesterol	3 níveis	Diária	8.5%
Creatina Quinase	3 níveis	Diária	<100 U/L→15 U/L >100 U/L→15%
Creatinina	3 níveis	Manhã/tarde/noite	15%
Ferro	3 níveis	Diária	15%
Fosfatase alcalina	3 níveis	Manhã/tarde	<100 U/L→15 U/L >100 U/L→15%
Fósforo	3 níveis	Manhã/tarde	10.2%
γ-GT	3 níveis	Manhã/tarde	<60 U/L→8 U/L >60 U/L→15%
Glucose	3 níveis	Manhã/tarde	10%
Hemoglobina A1c	2 níveis	4ª feira	<10% →0.5 g/dL >10% →5%
Colesterol HDL	3 níveis	Diária	11.1%
Imunoglobulina A	3 níveis	Diária	13.5%
Imunoglobulina G	3 níveis	Diária	8%
Imunoglobulina M	3 níveis	Diária	16.8%
Sódio	3 níveis	Manhã/tarde/noite	4 mmol/L
Potássio	3 níveis	Manhã/tarde/noite	5.8%
Cloro	3 níveis	Manhã/tarde/noite	5%
LDH	3 níveis	Manhã/tarde	20%
Colesterol LDL	3 níveis	Diária	13.6%
Magnésio	3 níveis	Manhã/tarde/noite	25%
PCR	2 níveis	Diária	10%
Proteínas Totais	3 níveis	Diária	10%
Transferrina	3 níveis	Diária	5%
Triglicéridos	3 níveis	Diária	25%
Ureia	3 níveis	Manhã/tarde	15.7%

Ensaio	Monitorização	Periodicidade	TEa
Proteínas Urina/LCR	2 níveis	Diária	15%
CK-MB	3 níveis	Diária	25%
Troponina - I	3 níveis	Diária	15%
Ácido valpróico	3 níveis	Quando há amostras	15%
Carbamazepina	3 níveis	Quando há amostras	25%
Digoxina	3 níveis	Quando há amostras	20%
Fenitoína	3 níveis	Quando há amostras	25%
Fenobarbital	3 níveis	Quando há amostras	10%
Teofilina	3 níveis	Quando há amostras	25%
Amicacina	3 níveis	Diária	<20 µg/mL→2 µg/mL >20 µg/mL→10%
Vancomicina	3 níveis	Diária	<20 µg/mL→2 µg/mL >20 µg/mL→10%
Ciclosporina	3 níveis	3ª e 6ª feira	25%
Tacrolimus	3 níveis	2ª e 5ª feira	25%
Ferritina	3 níveis	Diária	16%
Folatos	3 níveis	Diária	<7 ng/mL→30% >7 ng/mL→15%
Vitamina B12	3 níveis	Diária	<100 pg/mL→27.1 pg/mL >100 pg/mL→20%
α-fetoproteína	3 níveis	Diária	<30.12 ng/mL→6.02 ng/mL >30.12 ng/mL→20%
CA 125	2 níveis	Diária	20%
CA 15.3	2 níveis	Diária	20.9%
CA 19.9	2 níveis	Diária	39%
CEA	2 níveis	Diária	20%
PSA total	2 níveis	Diária	33.6%
SCC	3 níveis	Diária	20%

Os valores dos controlos para os equipamentos **Architect c8000 (Bio)** e **ci8200 (Bio e Imuno)** são transmitidos automaticamente para o programa.

**Tabela 32.** – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC para o equipamento **Urisys 2400**.

<b>Ensaio Urina tipo II (parâmetros)</b>	<b>Monitorização</b>	<b>Periodicidade</b>
Bilirrubina	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária
Corpos cetónicos	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária
Densidade	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária
Glucose	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária
Hemoglobina	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária
Leucócitos	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária
Nitritos	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária
pH	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária
Proteínas	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária
Urobilinogénio	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária

Os valores dos controlos para o equipamento **Urisys 2400** são transmitidos automaticamente para o programa. Os controlos Negativo e Positivo devem estar dentro dos intervalos definidos.

**Tabela 33.** – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC para o equipamento **RapidLab 348**.

<b>Ensaios</b>	<b>Monitorização</b>	<b>Periodicidade</b>	<b>TEa</b>
pCO <sub>2</sub>	3 níveis	Diária	<25 mmHg→2 mmHg >25 mmHg→8%

Ensaio	Monitorização	Periodicidade	TEa
pH	3 níveis	Diária	0.04
pO <sub>2</sub>	3 níveis	Diária	<100 mmHg→5 mmHg >100 mmHg→5%

**Tabela 34.** – Ensaio monitorizados do CQI no MultiQC para o equipamento **TDX/FLX**.

Ensaio	Monitorização	Periodicidade	TEa
Metotrexato	6 níveis	Diária ou quando há amostras	<1 µmol/L→0.1 µmol/L >1 µmol/L→10%

### 6.1.3. Laboratório de Virologia

No Laboratório de Virologia a monitorização do CQI é realizada através de três formas:

▶ **Ensaio Quantitativo**

- InterQC
- MultiQC

▶ **Ensaio Qualitativo**

- Critérios definidos pelo fornecedor e/ou pelo laboratório

▶ **Ensaio Quantitativo**

a) **InterQC**

Este *software* permite a monitorização semanal dos ensaios realizados no equipamento Architect, através de controlos multiconstituintes para diversos analitos – Accurun 2600 e Accurun 3000.

**Tabela 35.** – Relação entre ensaio e controlo Accurun.

Vírus	Ensaio	Controlo
Hepatite B	Ag HBs	Accurun 3000
	Core Total	Accurun 2600
Hepatite C	HCV IgG	Accurun 2600
HIV	HIV 1/2	Accurun 3000
HTLV	HTLV 1/2	Accurun 3000

Para além de permitir verificar se o CQI se encontra dentro dos valores aceitáveis, é ainda possível a comparação com outros laboratórios que efectuam a mesma técnica, usando o mesmo equipamento, funcionando igualmente como programa de AEQ.

#### b) InterQC

Este *software* permite a monitorização do CQI do Laboratório para os ensaios de **Serologia e Biologia Molecular**. Para esta monitorização existem duas Bases de Dados implementadas:

- Ensaios automáticos – MultiQC EA e MultiQC AUT
- Ensaios manuais – MultiQC CV

#### Serologia

Aplica-se a todos os ensaios de Serologia realizados por Técnica de ELISA e Quimioluminescência. As Tabelas 36, 37 e 38 discriminam as diferentes técnicas executadas pelo Laboratório, indicando a metodologia para a respectiva avaliação.

**Tabela 36.** – Ensaios monitorizados do CQI no MultiQC, executados no equipamento Architect.

Vírus	Ensaio	Monitorização	Periodicidade	TEa
Hepatite A	Hepatite A IgM	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%

Vírus	Ensaio	Monitorização	Periodicidade	TEa
Hepatite B	Ag HBs	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
	Core Total	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	25%
	Anti-HBs	Controlo Negativo Controlo Positivo 1 Controlo Positivo 2	Diária	30%
	Ag HBe	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
	Anti-HBe	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
	Core IgM	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
Hepatite C	Hepatite C	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
HIV	HIV 1/2 + Ag p24	Controlo Negativo Controlo Positivo 1 Controlo Positivo 2 Controlo Positivo Ag	Diária	30%
HTLV	HTLV 1/2	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
Citomegalovirus	CMV IgM	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
	CMV IgG	Controlo Negativo Controlo Positivo 1 Controlo Positivo 2	Diária	30%

**Tabela 37.** – Ensaio monitorizados do CQI no MultiQC, executados no equipamento **Liaison**.

Vírus	Ensaio	Monitorização	Periodicidade	Tolerância
Herpes Simplex Tipo 1 e 2	HSV1 IgG	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
	HSV2 IgG	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%

Vírus	Ensaio	Monitorização	Periodicidade	Tolerância
Varicela Zoster	VZV IgM	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
	VZV IgG	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
Citomegalovirus	CMV IgM	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
	CMV IgG	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
Vírus Epstein-Barr	VCA IgM	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
	VCA IgG	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
	EBNA IgG	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%
	EA IgG	Controlo Negativo Controlo Positivo	Diária	30%

**Tabela 38.** – Ensaio monitorizados do CQI no MultiQC, executados **manualmente**.

Vírus	Ensaio	Monitorização	Periodicidade	Tolerância
Vírus Herpes Humano Tipo 6	HHV6 IgG	Controlo Negativo Controlo Positivo Calibrador	Diária	30%

Importa realçar que os valores dos controlos para os equipamentos Architect e Liaison são transmitidos automaticamente para o programa MultiQC, enquanto que os valores dos restantes ensaios são introduzidos manualmente (ensaio manual).

### Biologia Molecular

Os valores de CQI de Biologia Molecular (Ensaio *In House* Kit Comercial) são introduzidos manualmente na Base de Dados MultiQC. A periodicidade dos controlos dos diferentes ensaios, definida como diária, indica que os controlos devem ser sempre em simultâneo com as amostras, de modo a validar uma corrida analítica.

► **Ensaaios Qualitativos**

Nos ensaios qualitativos são aplicados critérios de fornecedores ou critérios definidos pelo laboratório.

**Tabela 39.** – Ensaaios monitorizados do CQI, executados **manualmente**.

Vírus	Ensaaios	Monitorização	Periodicidade
HIV	Confirmatório HIV 1 e HIV2	Controlo Negativo	Por corrida
		Controlo Positivo HIV 1	Por corrida
		Controlo Positivo HIV 2	Por corrida
HTLV	HTLV 1/2 ELISA	Controlo Negativo	Por corrida
		Controlo Positivo	Por corrida
	Confirmatório HTLV	Controlo Negativo	Por corrida
		Controlo Positivo	Por corrida
Herpes Humano Tipo 6	HHV6 IgM	Controlo Negativo	Diária
		Controlo Positivo	Diária
		Resultados	Diária
Herpes Humano Tipo 8	HHV8 IgG	Controlo Negativo	Diária
		Controlo Positivo	Diária
		Resultados	Diária
Vírus Papiloma Humano	HPV SYBR Green	Controlo Negativo HPV	Por corrida
		Controlo Negativo Albumina	Por corrida
		Controlo Positivo HPV (5 diluições em duplicado)	Por corrida
		Controlo Positivo Albumina (5 diluições em duplicado)	Por corrida
	HPV MicroArrays	Controlo Negativo	Por corrida
	HPV INNOLIPA	Controlo Positivo	Por corrida

## 6.2. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE (AEQ)

A AEQ corresponde a um método de avaliação do desempenho de um Laboratório, através da monitorização/avaliação dos resultados laboratoriais obtidos, por meio de Programas Externos ou Interlaboratoriais efectuados por uma entidade externa. Todos os laboratórios do SPC participam em Programas de AEQ, nacionais ou internacionais, que visam permitir, entre outros, a melhoria da comparabilidade/uniformidade interlaboratorial, a recolha de dados de desempenho dos métodos, a avaliação do desempenho dos equipamentos e reagentes, a verificação da existência de factores que afectam a qualidade dos resultados, a validação retrospectiva de resultados e ser mais um elemento de avaliação dos laboratórios (ex.: Acreditação – constitui-se como um requisito obrigatório para a Acreditação de acordo com as Normas NP EN ISO/IEC 17025:2000 e NP EN ISO 15189:2007).

Para a realização da AEQ, nos Laboratórios do SPC são analisadas amostras-controlo correspondentes a cada parâmetro, enviadas pelos organizadores dos Programas, e os respectivos resultados são comparados com os resultados de outros laboratórios participantes, obtidos pelo mesmo método ou métodos similares. Esta comparação permite, assim, determinar a exactidão dos resultados e identificar os erros ou tendências. Deste modo, com a participação nos Programas de AEQ, o Laboratório procura assegurar que os resultados obtidos para os diversos parâmetros realizados se aproximam ao máximo do valor real (exactidão) dentro de uma variabilidade analítica permitida e, igualmente, que face aos resultados serão desencadeadas as acções preventivas e/ou correctivas necessárias, quando existam não conformidades.

Os Laboratórios do SPC participam nos seguintes Programas de AEQ:

- **PNAEQ** – Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, I.P.);
- **INSTAND e. V.** – *Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in Medizinischen Laboratorien e. V.*;
- **QCMD** – *Quality Control Molecular Diagnostics*;
- **RIQAS** – *Randox International Quality Assessment Scheme*;
- **UK NEQAS** – *UK National External Quality Assessment Scheme*.

### 6.2.1. Laboratório de Imunologia

O Laboratório de Imunologia tem implementado Programas de AEQ para todos os parâmetros, desde que estejam disponíveis.

**Tabela 40.** – Ensaios de AEQ implementados no Laboratório de Imunologia.

Equipamento	Ensaios	Programa AEQ	Periodicidade
BN ProSpec	$\alpha$ -1-Micro, $\alpha$ -2-Macro Ur	Não disponível	NA
	$\alpha$ -1-Antitripsina, Albumina, C3, C4, Ceruloplasmina, IgE Haptoglobina, Kappa, Lambda, Kappa Livre, Lambda livre, RA e TASO Pré-albumina	RIQAS	2 x Mês (1 amostra)
		PNAEQ (INSA, I.P.)	2 x Ano (2 amostras)
	IgD	Não disponível	NA
	Albumina Ur	INSTAND e.V.	6 x /Ano (2Am)
	Albumina, IgA, IgM e IgG LCR	INSTAND e.V.	4 x /Ano (2Am)
	IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub> , IgG <sub>3</sub> e IgG <sub>4</sub>	Não disponível	NA
	IgG Ur	NA	NA
Cobas e 411	IgG,IgA, IgM	NA	NA
	CA 72.4, NSE, Cyfra 21.1	INSTAND e.V.	2 x /Ano (2Am)
Hydrasys/Hydraplus	Proteinograma	PNAEQ (INSA, I.P.)	4 x /Ano (2Am)
	Imunofixação	NEQAS	6 x /Ano (Soro e urina)
	Imunofixação Bence-Jones	NEQAS	6 x /Ano (Soro e urina)
	Imunofixação LCR	NEQAS	6 x /Ano (1Am)
	Electroforese das hemoglobinas	PNAEQ (INSA, I.P.)	2 x /Ano (2Am)
Autoimunidade		NEQAS	5 x /Ano (2Am)
	ANA IIF	MBL	1x/Ano
		Euroimmun	2 x /Ano (3Am)
	DNA IFI	NEQAS	5 x /Ano (2Am)

Equipamento	Ensaio	Programa AEQ	Periodicidade
Autoimunidade	DNA IFI	MBL	1x/Ano
		Euroimmun	2 x /Ano (2Am)
	ASMA /F -actina	INSTAND e.V.	2 x /Ano (2Am)
		MBL	1x/Ano
	AMA	INSTAND e.V.	2 x /Ano (2Am)
		MBL	1x/Ano
	APCA	INSTAND e.V.	2 x /Ano (2Am)
		MBL	1x/Ano
	LKM -1	INSTAND e.V.	2 x /Ano (2Am)
	ANCA IFI, PR3, MPO	NEQAS	5 x /Ano (2Am)
		Euroimmun	2 x /Ano (2Am)
	ATC anti-Cardiolipina IgG, IgM, ATC anti-β2Glicop I IgG,IgM	NEQAS	5 x /Ano (2Am)
		Euroimmun	2 x /Ano (2Am)
Serologia	Sífilis	NEQAS	2 x /Ano (2Am)
		INSTAND e.V.	2 x /Ano (2Am)
		PNAEQ (INSA, I.P.)	3 x /Ano (1Am)
	Brucelose	PNAEQ (INSA, I.P.)	3 x /Ano (1Am)
	Salmonelose	INSTAND e.V.	2 x /Ano (2Am)
	Hidatidose	INSTAND e.V.	1 x /Ano (2Am)

As amostras são processadas de acordo com o descrito nos métodos de ensaio, tendo em conta as instruções disponibilizadas pelo Programa de AEQ.

Os resultados dos diversos programas de AEQ são avaliados pelo Responsável do Laboratório e o respectivo relatório é assinado e datado. São também assinaladas no relatório as não conformidades existentes.

### 6.2.2. Laboratório de Bioquímica

Todos os parâmetros efectuados na Bioquímica são avaliados através de programas de AEQ.

**Tabela 41.** – Programas de AEQ utilizados nos ensaios do Laboratório de Bioquímica e respectiva frequência.

Entidade Organizadora	Parâmetro	Frequência Anual / Nº Amostras
PNAEQ (INSA, I.P.)	Urina tipo II	3 x Ano (2 amostras)
	Imunologia (proteínas específicas)	2 x Ano (2 amostras)
	Hemoglobina Glicada	2 x Ano (2 amostras)
	Química Clínica Rotina	4 x Ano (2 amostras)
	Marcadores Cardíacos	5 x Ano (2 amostras)
INSTAND e.V.	Drogas Terapêuticas (Amica/Vanco/MTX)	6 x Ano (2 amostras)
	Gases no Sangue	6 x Ano (2 amostras)
	Urina Química II	6 x Ano (2 amostras)
	Marcadores Tumorais	6 x Ano (2 amostras)
RIQAS	Química Clínica Geral (soro)	2 x mês (1 amostra)
	Proteínas Específicas	2 x mês (1 amostra)
	Imunoensaios	2 x mês (1 amostra)
NEQAS	Ciclosporina	1 x mês (3 amostras)
	Tacrolimus	1 x mês (3 amostras)

As amostras da AEQ são processadas como qualquer outra amostra.

Os resultados do AEQ são introduzidos no *software* MultiQC e os respectivos relatórios são assinados e datados. O Responsável do Laboratório avalia os resultados para verificar a existência de Não Conformidades e/ou Tendências.

### 6.2.3. Laboratório de Virologia

O Laboratório de Virologia tem implementado programas de AEQ para a Serologia e Biologia Molecular, sempre que disponíveis.

**Tabela 42.** – Ensaios de AEQ implementados no Laboratório de Virologia.

Ensaios	Programa AEQ	Periodicidade
Serologia Hepatite A	INSTAND e.V.	2 x / Ano (2 amostras)
Serologia Hepatite B	INSTAND e.V.	2 x / Ano
	InterQC (Ag HBs, Core)	Semanal
Serologia Hepatite C	INSTAND e.V.	2 x / Ano
	InterQC	Semanal
Serologia HIV (inclui confirmatório)	INSTAND e.V.	2 x / Ano
	InterQC	Semanal
Serologia HTLV	InterQC	Semanal
Serologia Vírus Herpes Simplex 1 e 2 IgG	INSTAND e.V.	2 x / Ano
Serologia Varicela IgG e IgM	INSTAND e.V.	2 x / Ano
Serologia Citomegalovírus IgG e IgM	INSTAND e.V.	2 x / Ano
Serologia Vírus Epstein-Barr VCA IgG, EBNA IgG, EA IgG e VCA IgM	INSTAND e.V.	2 x / Ano
Serologia Vírus Herpes 6 IgG e IgM	Não disponível	NA
Serologia Vírus Herpes 8 IgG	Não disponível	NA
Carga Viral Vírus Hepatite B	QCMD	1 x / Ano
Carga Viral Vírus Hepatite C	QCMD	1 x / Ano
Carga Viral Herpes 1 e 2	QCMD	1 x / Ano
Carga Viral Varicela	QCMD	1 x / Ano
Carga Viral Citomegalovirus	QCMD	1 x / Ano
	INSTAND e.V.	1 x / Ano
Carga Viral Vírus Epstein-Barr	QCMD	1 x / Ano
	INSTAND e.V.	1 x / Ano
Carga Viral Herpes 6	QCMD	1 x / Ano

<b>Ensaio</b>	<b>Programa AEQ</b>	<b>Periodicidade</b>
Carga Viral Herpes 8	Não disponível	NA
Vírus Papiloma Humano	NEQAS	3 x / Ano
	QCMD	1 x / Ano
	WHO HPV LabNet	Variável

As amostras são processadas de acordo com o descrito nos métodos de ensaio, tendo em conta as instruções disponibilizadas pelo Programa de AEQ.

## 7. HEMATOLOGIA

O estágio profissional na valência de Hematologia é parte integrante do plano de estudos do Curso de Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O estágio decorreu no Laboratório de Análises Clínicas Nova Era - Luz, sob a orientação do Dr. Carlos Couto Marques, no período compreendido entre 10 de Janeiro de 2011 e 11 de Fevereiro de 2011.

O Laboratório Nova Era - Luz encontra-se organizado em vários sectores, como referido anteriormente no capítulo da Introdução. No sector da Recepção e Triagem é efectuada a entrada de todas as amostras e a sua distribuição para os diferentes sectores, consoante a natureza dos testes requisitados. As amostras que não são colhidas no Laboratório, são transportadas pelos colaboradores do mesmo, em malas próprias devidamente acondicionadas. Num primeiro passo, as amostras são avaliadas de forma a verificar se cumprem os critérios de aceitação, referidos anteriormente na Fase Pré-Analítica. Após esta avaliação, a entrada dos produtos é efectuada através da leitura da etiqueta com código de barras, colocada no tubo de amostra durante a colheita, pelo sistema informático e-Deialab. Este sistema está ligado aos diversos equipamentos, possibilitando a transmissão dos resultados obtidos para os computadores do Laboratório. Após este processo, as amostras são direccionadas para os vários sectores/equipamentos, como referido inicialmente.

O sector da Hematologia está organizado de acordo com as metodologias utilizadas e a natureza dos parâmetros efectuados (Tabela 43.).

**Tabela 43.** – Parâmetros e respectivas metodologias necessárias à sua execução.

Parâmetros	Metodologia
Hemograma	Impedância com Focagem Hidrodinâmica Citometria de Fluxo Fluorescente SLS
VS	Método de Westergreen (equivalente)
PT aPTT Fibrinogénio	Coagulometria

Parâmetros	Metodologia
Separação das Frações da Hemoglobina	Cromatografia de Troca Iônica
Doseamento da HbA <sub>2</sub> e HbA <sub>1c</sub>	HPLC
Crioglobulinas e Aglutininas Frias	Técnica Manual

## 7.1. HEMOGRAMA

O hemograma é uma das análises de rotina mais requisitadas e permite a determinação dos seguintes parâmetros:

- Eritrograma – Hematócrito, Concentração de Hemoglobina, Número de Glóbulos Vermelhos Circulantes e Índices Eritrocitários (Volume Globular Médio, Hemoglobina Globular Média, Concentração de Hemoglobina Globular Média e Coeficiente de Dispersão Eritrocitária);
- Leucograma – Contagem Total de Glóbulos Brancos e respectiva Fórmula Leucocitária (Neutrófilos, Eosinófilos, Basófilos, Linfócitos e Monócitos – NEBLM);
- Contagem Automática de Plaquetas – para além do número de plaquetas, fornece o Plaquetócrito e dois índices plaquetários, o Volume Plaquetário Médio (VPM) e o Coeficiente de Dispersão Plaquetária (PDW, do inglês, *Platelet Distribution Width*).

### Aplicação

Determinação quantitativa e qualitativa das três séries celulares.

### Amostra

Sangue total colhido em tubo com K<sub>3</sub>EDTA (ácido etilenodiaminotetra-acético tri-potássio, do inglês, *tripotassium ethylenediamine tetraacetic acid*)

- Mecanismo de Acção: O K<sub>3</sub>EDTA remove o cálcio ionizado (Ca<sup>2+</sup>) através de um processo de quelação, deixando de haver cálcio disponível para que ocorra a coagulação do sangue.

### Equipamento

XT-1800i da Sysmex

### Metodologia Utilizada no Contador Hematológico XT-1800i

O contador hematológico XT-1800i utiliza um laser dodo que lhe confere a sensibilidade necessária para quantificar e diferenciar os elementos figurados do sangue, através do método da citometria de fluxo fluorescente e tecnologias orientadas de hidrodinâmica.

A contagem dos glóbulos vermelhos (GV) e das plaquetas  efectuada num canal próprio pelo método da impedância com focagem hidrodinâmica. O objectivo da focagem hidrodinâmica  minimizar a perda e a variaao dos impulsos eléctricos na zona de detecao e a recirculaao de células, de forma a evitar erros nas contagens celulares. A separaao destas duas populaoes celulares  efectuada por discriminadores automáticos, baseados em algoritmos complexos.

A contagem dos leucócitos e a diferenciaao das populaoes celulares  efectuada por citometria de fluxo fluorescente, o princípio  o mesmo da citometria de fluxo tradicional mas com recurso a um corante fluorescente de polimetina, altamente específico. Esta marcaao por fluorescência revela a relaao núcleo-citoplasma em cada célula. A combinaao entre a dispersão lateral de luz (conteúdo celular), a dispersão frontal (volume celular) e a fluorescência (quantidade de material genético, DNA e RNA) permite diferenciar as subpopulaoes leucocitárias.

O doseamento da hemoglobina  efectuada num canal próprio pelo método lauril sulfato de sódio (SLS, do inglês, *sodium lauryl sulfate*), livre de cianeto. Este método apresenta uma boa correlaao com o método de referência (cianometahemoglobina).

### **Impedância**

#### Fundamento do Método

O método da impedância, originalmente designado por Princípio de Coulter, baseia-se na detecao e na mediao de alteraoes na condutividade eléctrica, que surgem quando uma partícula (ou célula) num líquido condutor, passa através de uma pequena fenda existente na célula de contagem. Este fenomeno origina um impulso eléctrico. O número de impulsos está relacionado com a quantificaao celular e a amplitude (intensidade) do impulso está relacionada com a dimensão da célula.

## **Eritrograma**

### **Hematócrito**

O Hematócrito (Ht) é definido como o volume relativo ocupado pelos GV, num dado volume de sangue total, o qual foi centrifugado em condições padronizadas. É expresso em percentagem do volume de sangue total (método clássico) ou L/L (recomendação do ICSH – *International Council for Standardization in Hematology*).

O Ht é determinado directamente através da detecção individual do volume de cada eritrócito.

### **Interesse da Determinação**

- Detecção de anomalias e poliglobulias;
- Informação sobre o aspecto do plasma;
- Determinação dos índices eritrocitários.

### **Causas de Erro na Determinação**

- Má homogeneização da amostra de sangue;
- Hemólise do sangue (erro por defeito);
- Leitura, se não for descontada a camada leucocitária (erro por excesso).

### **Hemoglobina**

O interesse no doseamento da hemoglobina (Hb), para além do cálculo dos índices eritrocitários, está relacionado com:

- Detecção de anemias;
- Avaliação do grau de anemia;
- Apreciação do efeito do tratamento da anemia.

A Hb é dada num valor de concentração, expressa em g/dL.

### **Contagem de Glóbulos Vermelhos**

O número de GV circulantes, presentes num dado volume de sangue (por litro), é um parâmetro importante para o cálculo dos índices eritrocitários.

## Índices Eritrocitários

### 1. Volume Globular Médio (VGM)

Indica o volume médio de um GV do indivíduo e é expresso em fentolitros (fL), é calculado directamente a partir do histograma dos GV.

- Diminuído: presença de GV menores (micrócitos) → microcitose
- Aumentado: presença de GV maiores (macrócitos) → macrocitose
- Normal: normócitos (normocitose) ou combinação entre micrócitos e macrócitos → anisocitose

### 2. Hemoglobina Globular Média (HGM)

Indica o peso médio da hemoglobina contida num GV médio do indivíduo e é expressa em picogramas (pg).

Cálculo:

$$\text{HGM (pg)} = \frac{\text{Hb (g/dL)}}{\text{GV (x10}^{12}\text{/L)}} \times 10$$

### 3. Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM)

Indica a concentração média de hemoglobina do indivíduo por unidade de volume de GV e é expressa em g/dL.

Cálculo:

$$\text{CHGM (g/dL)} = \frac{\text{Hb (g/dL)}}{\text{Ht (L/L)}} \times 10$$

A HGM e a CHGM estão relacionadas com o conteúdo de hemoglobina nos GV, pelo que valores diminuídos destes índices ocorrem em situações de hipocromia (GV hipocrómicos). Os valores normais indicam normocromia (GV normocrómicos).

- HGM aumentada: geralmente em situações de macrocitose;
- CHGM aumentada (raro): situações de esferocitose (não existem GV hiperocrómicos).

#### 4. Coeficiente de Dispersão Eritrocitária (RDW, do inglês, *Red Cell Distribution Width*)

Indica o coeficiente de variação na distribuição do volume eritrocitário. O cálculo é executado pelo contador automático a partir do histograma de distribuição de volume dos GV, sendo expresso em percentagem (coeficiente de variação). Valores elevados de RDW indicam anisocitose.

A validação dos resultados do hemograma é feita tendo em conta a idade, o sexo, o contexto clínico do paciente e eventuais sinais de alarme emitidos pelo contador automático. Também devem ser tidas em consideração outras indicações relevantes, nomeadamente a informação obtida no acto da colheita e os resultados de outros parâmetros laboratoriais (exs. ferro, ferritina, transferrina, velocidade de sedimentação, entre outros). No decorrer da validação, são seleccionadas as amostras que requerem repetição e/ou execução do esfregaço sanguíneo para observação ao microscópio.

#### **7.1.1. Esfregaço de Sangue Periférico**

O esfregaço de sangue periférico consiste numa preparação de uma fina camada de células sobre uma lâmina de vidro, para um exame microscópico. A observação do esfregaço de sangue periférico é efectuada sempre que seja necessário confirmar e/ou complementar os resultados fornecidos pelo hemograma ou por solicitação expressa do clínico.

A finalidade do esfregaço de sangue inclui:

- Observação da morfologia dos glóbulos vermelhos;
- Observação da morfologia dos glóbulos brancos e estabelecimento da fórmula leucocitária (identificar os diferentes tipos de leucócitos e definir a percentagem de cada um);
- Observação e contagem das plaquetas.

#### Amostra

Sangue fresco, obtido no acto da colheita, preferencialmente sem adição de anticoagulante.

## Técnica

### ► Execução

1. Depositar uma gota de sangue perto da extremidade de uma lâmina;
2. Segurar a lâmina com uma mão, de forma a que a gota fique mais próxima do dedo indicador;
3. Com a outra mão, segurar uma lamela que se apoia na lâmina à esquerda da gota, de forma a que ambas façam um ângulo de 30° a 45°;
4. Deslocar a lamela (sempre apoiada na lâmina) até encontrar a gota, deixando que esta se difunda ao longo da lamela;
5. Com um movimento uniforme, deslizar a lamela no sentido da extremidade livre até que o sangue se esgote;
6. Depois de seco, identificar a amostra marcando a cabeça do esfregaço com lápis de carvão.

### ► Coloração

É efectuada a coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG). A coloração MGG trata-se de uma coloração panótica que combina as vantagens de vários corantes, corando elementos acidófilos, granulações neutrófilas e granulações azurófilas.

- Eosina (corante ácido): cora os componentes citoplasmáticos básicos da célula (eosinófilos ou acidófilos), de rosa-alaranjado;
- Azul de Metileno (corante básico): cora o núcleo e componentes citoplasmáticos ácidos (basófilos), de azul-arroxeadado;
- Azur de Metileno: cora as granulações azurófilas de vermelho-púrpura.

A eosina e o azul de metileno coram as granulações neutrófilas de rosa.

A policromatofilia corresponde a uma coloração acinzentada das células, devido à presença de proporções idênticas de componentes ácidos e básicos. A metacromasia (situação anormal) ocorre quando os componentes celulares, que fixam a eosina ou o azul de metileno, não adquirem as cores características.

Na observação do esfregaço de sangue, corado, ao microscópio óptico é efectuada a pesquisa ou a confirmação de alterações quantitativas ou qualitativas dos glóbulos

vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas. Seguem-se alguns exemplos de alterações que podem ser observadas no esfregaço de sangue periférico:

- **Alterações na série vermelha:**

Alterações da dimensão – anisocitose, microcitose, macrocitose;

Alterações da cor – anisocromia, hipocromia, policromatofilia;

Alterações da cor e/ou do tamanho – dimorfismo;

Alterações da forma – poiquilocitose (presença de várias formas anormais sem uma forma predominante, no caso de estar presente deve ser especificada. Exs: esferócitos, dianócitos, drepanócitos, acantócitos, dacriócitos, entre outros);

Presença de inclusões eritrocitárias – pontuado basófilo, anéis de Cabot, corpos de Howell-Jolly, entre outros;

Alterações na distribuição – *rouleaux* (GV empilhados), aglutinação;

Alterações associadas a um aumento da eritropoiese – presença de eritroblastos (células imaturas).

- **Alterações na série branca:**

Variações no grau de segmentação nuclear dos neutrófilos;

Granulação tóxica dos neutrófilos;

Presença de linfócitos atípicos;

Presença de blastos das várias linhagens leucocitárias.

- **Alterações na série plaquetária:**

Presença de agregados plaquetários;

Anisocitose;

Presença de células imaturas.

## 7.2. CONTAGEM MANUAL DE RETICULÓCITOS

Os reticulócitos são os precursores imediatos dos glóbulos vermelhos maduros. São já células anucleadas mas, dada a sua imaturidade, ainda conservam restos de RNA no citoplasma, sobretudo RNA ribossomal, que pode ser evidenciado através de uma coloração vital.

Fundamento da Técnica

Evidenciar os reticulócitos presentes na corrente sanguínea, através da utilização de corantes vitais (ou supravitais) de natureza básica, como o azul de metileno novo ou o azul de cresil brilhante (no Laboratório é utilizado o azul de cresil brilhante), que vão precipitar o RNA citoplasmático residual sob a forma de grânulos e filamentos (reticulado).

Amostra

Sangue fresco sem anticoagulante ou sangue total colhido em tubo com EDTA, até duas horas após a colheita.

Procedimento

1. Após efectuada a coloração, observar ao microscópio óptico com objectiva de imersão (100x) e restringindo o campo (disco de papel com perfuração central colocado sobre a ocular);
2. Contar os reticulócitos que se observam quando se contam 1000 células anucleadas.

Cálculos e Apresentação do Resultado

- Percentagem:

1000 células anucleadas (GV + reticulócitos) ————— N reticulócitos  
 100 células anucleadas (GV + reticulócitos) ————— X [n.º de reticulócitos (%)]

$$\text{n.º de reticulócitos (\%)} = \frac{N \times 100}{1000} = N \times 0,1$$

- Valor absoluto (por litro):

1000 células anucleadas (GV + reticulócitos) ————— N reticulócitos  
 n.º GV/L (células anucleadas) ————— X [n.º de reticulócitos/L]

$$\text{n.º de reticulócitos/L} = \frac{N \times \text{n.º GV/L}}{1000}$$

Causas de Erro na Contagem:

- Deposição de partículas de corante à superfície dos GV;
- Presença de inclusões eritrocitárias;
- Existência de níveis elevados de glucose (inibição da reacção).

O principal interesse da contagem de reticulócitos está relacionado com a apreciação da actividade eritropoiética da medula, permitindo:

- Diagnosticar se uma anemia é regenerativa ou arregenerativa;
- Monitorizar o tratamento de anemias;
- Verificar se há regeneração sanguínea após uma grande perda globular (hemorragia ou hemólise).

### 7.3. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

A velocidade de sedimentação (VS) é definida como a velocidade de queda espontânea dos elementos figurados do sangue (GV são os mais numerosos) em suspensão no plasma.

A VS resulta de vários mecanismos, como os seguintes:

- Diferença de gravidade específica existente entre os GV (mais densos) e o plasma;
- Atracção electrostática gerada entre as cargas eléctricas negativas presentes na membrana dos GV e as cargas eléctricas positivas de certas proteínas plasmáticas → formação de *rouleaux*;
- Contra-corrente plasmática.

A VS é expressa em unidade de distância (mm), que os GV “percorrem”, ao longo de uma hora, e inclui três etapas distintas:

- 1ª etapa: Agregação ( $\pm 10$  min.) – corresponde à formação de pilhas de GV (*rouleaux*);
- 2ª etapa: Sedimentação (ou queda rápida,  $\pm 40$  min.) – corresponde à queda dos *rouleaux* a velocidade constante;
- 3ª etapa: Sedimentação Final ( $\pm 10$  min.) – corresponde ao empilhamento dos GV no fundo do tubo.

Amostra

Sangue total colhido em tubo com EDTA.

Método

A determinação da VS é efectuada num equipamento automático com obtenção de resultados equivalentes ao método de Westergreen (método de referência).

A amostra é aspirada para um capilar e, posteriormente, centrifugada. A leitura é feita por fotometria de infravermelhos a um comprimento de onda de 950 nm. Os impulsos eléctricos, captados por um fotodetector, por unidade de tempo, são directamente relacionados com a concentração de GV presentes no capilar, sendo obtida uma curva de sedimentação para cada amostra. Os valores obtidos são convertidos em valores comparados com o método de referência.

Equipamento

Ves-Matic 30 Plus da Menarini.

Existem três tipos de factores que afectam a VS (Tabela 44.), factores globulares, plasmáticos e mecânicos.

**Tabela 44.**– Factores que afectam a VS.

<b>Factores Globulares</b>	Formação de <i>rouleaux</i> ; Número, forma e tamanho dos GV.
<b>Factores Plasmáticos</b>	Viscosidade do sangue; ↑ Fibrinogénio; ↑ Globulinas plasmáticas ( $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ ).
<b>Factores Mecânicos</b>	Altura, diâmetro e limpeza do tubo; Posição do tubo (vertical); Enchimento incorrecto do tubo; Vibrações; Temperatura; Tempo de espera (GV tornam-se esféricos); Proporção sangue/anticoagulante.

[Legenda: ↑ - aumento]

O aumento da VS pode estar associado a variações fisiológicas como a idade, o sexo (feminino), o período menstrual e a gravidez. As variações patológicas dos valores normais podem levar a um aumento ou a uma diminuição da VS, como descrito na tabela seguinte.

**Tabela 45.** – Variações patológicas dos valores normais da VS.

<b>Aumento da VS</b>	<p>Infecções agudas e crónicas (exs. tuberculose, sífilis);</p> <p>Processos inflamatórios agudos (ex. apendicite);</p> <p>Doenças reumáticas (exs. febre reumática, artrite reumatóide);</p> <p>Necrose tecidual;</p> <p>Leucemias, mielomas, plasmocitomas e neoplasias em geral;</p> <p>Anemias.</p>
<b>Diminuição da VS</b>	<p>Poliglobulias;</p> <p>Hipofibrinogénemia;</p> <p>Situações associadas a alterações da forma do GV.</p>

#### 7.4. ESTUDO DA HEMOSTASE

A hemostase é um processo complexo que permite preservar a normal funcionalidade da circulação, assegurar permanentemente a prevenção de hemorragia espontânea e promover a paragem das hemorragias resultantes de qualquer lesão vascular. Depende de complexas interações entre a parede dos vasos, as plaquetas e os processos de coagulação e fibrinólise.

A Hemostase engloba uma sequência de reacções locais que culmina no controlo da hemorragia, é regulada por diferentes mecanismos e inclui várias fases:

- Resposta vascular – constrição do vaso lesado;
- Hemostase primária – formação do trombo plaquetário;
- Hemostase secundária – coagulação (formação do coágulo de fibrina);
- Hemostase terciária – fibrinólise (destruição do coágulo de fibrina e manutenção da permeabilidade do vaso).

O estudo da hemostase é essencial para a detecção de patologias hemorrágicas e trombóticas bem como para a monitorização da terapêutica anticoagulante.

### **7.4.1. Avaliação da Função Plaquetária**

A avaliação da função plaquetária é possível através do estudo da hemostase primária, que inclui a contagem de plaquetas e do tempo de hemorragia (testes de rastreio).

#### **Tempo de Hemorragia**

O tempo de hemorragia avalia a interacção entre as plaquetas e a parede dos vasos sanguíneos bem como a subsequente formação do coágulo, de modo independente da cascata da coagulação. Existe uma relação quase linear entre a contagem das plaquetas e o tempo de hemorragia. É utilizado como teste de rastreio para a doença de von Willebrand e para disfunções plaquetárias (congénitas ou adquiridas).

#### Fundamento da Técnica

O tempo de hemorragia é efectuado pela técnica de Duke, por incisão no lobo da orelha. A variação normal do tempo de hemorragia é entre 2 e 9 minutos (tempo decorrido entre a incisão e o estancar do sangramento).

Uma das principais limitações desta técnica é o facto de não discriminar os defeitos vasculares de trombocitopenia ou de disfunção plaquetária. É influenciada pelo hematócrito, pelo estado da pele e pelo modo de execução da técnica. Não se correlaciona com a perda de sangue durante a cirurgia, nem com a necessidade de transfusões.

O tempo de hemorragia encontra-se prolongado nas seguintes situações:

- Trombocitopenia (moderada);
- Disfunção plaquetária;
- Terapêutica com aspirina;
- Deficiência ou anomalia do factor de von Willebrand, fibrinogénio ou factor V;
- Anomalias nas paredes dos pequenos vasos;
- Anemia.

#### **Contagem de Plaquetas**

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos do megacariócito plaquetário. A sua contagem é particularmente útil, por apresentarem uma boa correlação com o risco de hemorragia. Dadas as reduzidas dimensões das plaquetas e a sua tendência para

aderirem a superfícies estranhas e a agregarem-se quando activadas, são de quantificação mais difícil comparativamente aos glóbulos vermelhos e aos leucócitos.

A contagem de plaquetas é efectuada no contador automático, como referido anteriormente, ou por método manual directo – contagem em câmara de Neubauer, para confirmação dos resultados.

Na tabela 46. estão descritas, resumidamente, algumas das principais etiologias da trombocitopénia e da trombocitose.

**Tabela 46.** – Principais etiologias da variação no número de plaquetas.

<b>Trombocitopénia (↓)</b>	<b>Trombocitose (↑)</b>
Produção insuficiente;	Trombocitémia essencial;
Destruição aumentada;	Trombocitose reactiva e transitória;
Distribuição alterada;	Esplenectomia;
Diluição.	Patologia esplénica ou trombose da veia esplénica.

[Legenda: ↓ - diminuição; ↑ - aumento]

O interesse da contagem de plaquetas verifica-se em várias situações, como as seguintes:

- Pré-operatório;
- Indivíduos com problemas hemorrágicos;
- Doentes sujeitos a tratamento com citostáticos e/ou radioterapia (monitorização da terapêutica);
- Monitorização de terapêutica anticonvulsionante;
- Sempre que o tempo de hemorragia esteja prolongado.

#### **7.4.2. Avaliação Global da Coagulação**

A coagulação sanguínea (hemostase secundária) é um processo multifactorial e dinâmico, com proteólise limitada, que culmina na formação de trombina em quantidades suficientes para a conversão do fibrinogénio em fibrina. A cascata da coagulação é classicamente dividida em duas vias distintas, a via intrínseca e a via extrínseca, que conduzem à formação do coágulo de fibrina. Apesar de serem iniciadas por mecanismos diferentes, ambas convergem para uma via comum e, actualmente podem ser consideradas como um todo.

No Laboratório Nova Era são efectuados os seguintes testes de rastreio, para a avaliação global da coagulação:

- Tempo de Protrombina (TP);
- Tempo de Tromboplastina Parcial Activada (aPTT).

O doseamento do fibrinogénio plasmático é considerado um teste específico.

#### Amostra

Plasma citratado na proporção de 9 volumes de sangue para 1 volume de citrato (o citrato de sódio apresenta um mecanismo de acção semelhante ao EDTA, que actua por quelação impedindo a coagulação do sangue).

#### Equipamento

Sysmex CA-500 da Siemens

### **Determinação do Tempo de Protrombina**

O tempo de protrombina (TP) corresponde ao tempo de recalcificação de um plasma citratado e pobre em plaquetas, na presença de excesso de tromboplastina e iões cálcio.

O TP avalia a via extrínseca bem como a subsequente via comum. Reflecte alterações em três dos factores dependentes da vitamina K (factor II, VII e X), do fibrinogénio e do factor V. É utilizado na monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais e no controlo da actividade da síntese hepática.

#### Fundamento do Método

Este teste consiste na adição de uma tromboplastina completa (equivalente à tromboplastina tecidual) a plasma citratado e na avaliação do tempo de coagulação após adição de cálcio.

Na tentativa de obviar a enorme discrepância entre os diferentes tipos de testes que avaliam o TP, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs que as tromboplastinas fossem padronizadas, segundo uma preparação de referência internacional e criou o *International Sensitivity Index* (ISI). Após a determinação do ISI da tromboplastina, os resultados podem ser refereridos como *International Normalized Ratio* (INR).

Conceptualmente, o INR é a razão entre o TP do paciente e o TP de referência, em segundos. As medições do TP são convertidas em INR pela seguinte fórmula:

$$\text{INR} = \left( \frac{\text{PT amostra}}{\text{PT ref.}} \right)^{\text{ISI}}$$

### Determinação do Tempo de Tromboplastina Parcial Activada

O tempo de tromboplastina parcial activada (aPTT, do inglês, *activated partial thromboplastin time*) corresponde ao tempo de recalcificação de um plasma citratado e pobre em plaquetas, na presença de uma substância fosfolipídica.

O aPTT avalia a via intrínseca da cascata da coagulação, pelo que testa os factores XII, XI, IX e VIII. Avalia também a via comum (factores X, V, II e I) e o fibrinogénio. É utilizado na monitorização terapêutica com heparina.

#### Fundamento do Método

Neste teste são utilizados substitutos de fosfolípidos incapazes de activar a via extrínseca. O plasma é colocado em presença de um destes fosfolípidos pró-coagulantes, de um activador por contacto e de cálcio. Regista-se, então, o tempo que o plasma leva a coagular.

Um plasma com deficiência num factor de coagulação da via extrínseca (avaliado pelo PT) ou da via intrínseca (avaliado pelo aPTT) levará mais tempo a formar um coágulo, relativamente a um plasma normal.

Na tabela seguinte (Tabela 47.) encontra-se um resumo da avaliação de alterações hemostáticas pelos testes de rastreio.

**Tabela 47.** – Avaliação de alterações hemostáticas pelos testes PT e aPTT bem como as causas mais comuns.

Teste de Rastreio	Sistema Afectado	Anomalias Indicadas pelo Alongamento	Causas mais Comuns
PT	Via intrínseca: N Via extrínseca: ↑ Via comum: ↑	Deficiência ou inibição de um ou mais dos seguintes factores da coagulação: VII, X, V, II, fibrinogénio.	Patologia Hepática; Tratamento com anticoagulantes orais; Coagulação Intravascular Disseminada (CID).

Teste de Rastreio	Sistema Afectado	Anomalias Indicadas pelo Alongamento	Causas mais Comuns
aPTT	Via intrínseca: ↑ Via extrínseca: N Via comum: ↑	Deficiência ou inibição de um ou mais dos seguintes factores da coagulação: XII, XI, IX, VIII, X, V, II, fibrinogénio.	Tratamento com heparina; CID.

### Doseamento do Fibrinogénio

O fibrinogénio é o precursor da fibrina e o seu doseamento é considerado um teste específico para a avaliação da coagulação. Os testes específicos devem ser efectuados sempre que se verifiquem alterações nos testes de rastreio, e são necessários para determinar a natureza do defeito.

#### Fundamento do Método

O doseamento do fibrinogénio baseia-se no método de Clauss, no qual a adição de trombina promove a conversão do fibrinogénio em fibrina. O tempo decorrido desde a adição de trombina até à formação do coágulo é inversamente proporcional ao nível de fibrinogénio.

#### Significado Clínico

Níveis elevados de fibrinogénio estão associados a um aumento do risco trombótico, enquanto que níveis baixos podem ocorrer em situações como a doença hepática ou a CID. Como o fibrinogénio é uma proteína de fase aguda, está frequentemente elevado durante os processos inflamatórios.

## 7.5. PESQUISA DE AGLUTININAS FRIAS

As aglutininas frias (ou crioaglutininas) são autoanticorpos, geralmente da classe IgM, dirigidos contra o antígeno de superfície dos eritrócitos, sendo capazes de os aglutinar a frio. Fixam-se sobre os eritrócitos a uma temperatura entre 0° e 4°C, aglutinando-os até uma temperatura próxima de 20 a 25°C.

Nos indivíduos saudáveis, geralmente são encontrados títulos baixos de aglutininas frias. A suspeita da sua existência ocorre quando os eritrócitos se encontram aglutinados nas paredes do tubo, ou quando se obtêm resultados aberrantes dos índices eritrocitários, VGM e CHGM.

### Técnica

1. A amostra de sangue colhida, com citrato de sódio, é colocada num tubo de vidro e centrifugada a 3000 rpm, durante 2 minutos. Posteriormente é feita uma lavagem dos eritrócitos (pelo menos 3 vezes).
2. Em 5 tubos são colocados 500 µL de soro fisiológico. No primeiro tubo não se coloca o soro do doente (tubo-controlo), nos restantes 4 tubos é efectuada uma diluição seriada, por homogeneização com a pipeta, do soro do doente (500 µL). No último tubo, os 500 µL restantes são rejeitados.
3. É preparada uma solução (10 mL soro fisiológico + 50 µL solução de lavagem dos eritrócitos). São colocados 500 µL desta solução em todos os tubos, incluindo o controlo.
4. Os tubos são colocados no frigorífico *overnight* a uma temperatura entre 2° e 8°C.
5. No dia seguinte, é verificado se ocorreu aglutinação.

### Significado Clínico

As aglutininas frias podem ocorrer em casos de linfoma, cirrose, sarcoidose e em várias patologias infecciosas, como a pneumonia por micoplasma, mononucleose infecciosa, listeriose, entre outras.

A doença das aglutininas frias trata-se de uma anemia hemolítica autoimune, que aparece sobretudo no sexo masculino após os 60 anos de idade, sendo revelada por uma acrocianose provocada pelo frio devido à aglutinação dos eritrócitos nos capilares cutâneos. Nestas situações são obtidos títulos elevados de aglutininas frias.

## **7.6. HEMATOLOGIA – ALGUMAS CONSIDERAÇÕES**

### **Estudo das Hemoglobinopatias**

O estudo das hemoglobinopatias foi anteriormente descrito no capítulo da Imunologia (Electroforese de Hemoglobinas), no entanto, no Laboratório Nova Era, é utilizada uma técnica diferente.

Neste Laboratório, a separação das várias fracções da hemoglobina – HbA<sub>2</sub>, HbF e as variantes S e C, é efectuada por cromatografia de troca iónica em conjunto com um gradiente de eluição.

### **Cromatografia de Troca Iónica**

#### Fundamento do Método

Os métodos cromatográficos baseiam-se na separação dos componentes de uma mistura, devido à diferente afinidade desses componentes na presença de duas fases, a fase estacionária e a fase móvel. A cromatografia de troca iónica é uma variante da cromatografia líquida, na qual é utilizada uma coluna de resinas de troca iónica (carácter catiónico). A separação dos analitos é conseguida por aplicação de um gradiente de eluição.

#### Amostra

Sangue total hemolisado.

#### Equipamento

HbGold da Drew Scientific

### **Doseamento da Hemoglobina A<sub>2</sub> e da Hemoglobina A<sub>1C</sub>**

Como referido no capítulo da Imunologia, a quantificação da HbA<sub>2</sub> é importante no diagnóstico da  $\beta$ -talassémia. No Laboratório Nova Era, o doseamento da HbA<sub>2</sub> é efectuado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *high performance liquid chromatography*). Esta técnica é também utilizada para o doseamento da HbA<sub>1C</sub>, explicada no capítulo da Bioquímica (Metabolismo dos Hidratos de Carbono).

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

#### Fundamento do Método

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de cromatografia em coluna, que utiliza um líquido como fase móvel, e equipamentos sofisticados para separar os componentes da amostra em estudo, pela interacção entre a fase estacionária e a fase móvel.

### Amostra

Sangue total colhido em tubo com K<sub>3</sub>EDTA.

### Equipamento

ADAMS A1<sub>C</sub> HA-8160 da Arkray

No Laboratório Nova Era, a pesquisa de Crioglobulinas é efectuada por uma técnica manual que se encontra descrita no capítulo da Imunologia (Imunoquímica).

## **7.7. CONTROLO DE QUALIDADE**

A explicação de conceitos importantes no âmbito do controlo de qualidade, que inclui o controlo de qualidade interno (CQI) e a avaliação externa da qualidade (AEQ), encontra-se descrita no capítulo do Controlo de Qualidade.

### **7.7.1. Controlo de Qualidade Interno**

O CQI dos sistemas automáticos é efectuado, em simultâneo com os ensaios, diariamente após a manutenção do equipamento, salvo algumas excepções referentes a análises que não são requisitadas com regularidade. Nesses casos, o CQI só é feito quando essas análises são pedidas.

Para a avaliação dos resultados do CQI são criados gráficos de Levey-Jennings, para os níveis de controlo de cada parâmetro. A análise destes gráficos permite avaliar o comportamento dos controlos, através da aplicação das regras de Westgard. Esta avaliação tem por objectivo a validação dos métodos analíticos e a aplicação de medidas correctivas, caso seja necessário. Na execução de técnicas manuais o controlo é sempre feito em simultâneo com o ensaio.

A calibração é efectuada sempre que os valores dos controlos se encontrem fora dos limites, quando os reagentes são mudados ou de acordo com os critérios do fornecedor.

Na tabela seguinte encontram-se descritas a monitorização e a periodicidade do CQI dos ensaios efectuados na valência de Hematologia.

**Tabela 48.** – Monitorização e periodicidade do CQI dos parâmetros efectuados, nos vários equipamentos, na valência de Hematologia.

Equipamento	Parâmetro	Monitorização	Periodicidade
XT-1800i	Hemograma	3 níveis	Diária
Ves-Matic 30 Plus	VS	2 níveis	Diária
Sysmex CA-500	PT	2 níveis	Diária
	aPTT		
	Fibrinogénio		
ADAMS A1 <sub>C</sub> HA-8160	HbA1 <sub>C</sub> HbA2	2 níveis	Diária
HbGold	Fracções da Hemoglobina	NA	NA

[Legenda: NA – Não Aplicável]

### 7.7.2. Avaliação Externa da Qualidade

O Laboratório Nova Era participa no programa de AEQ da AEFA (*Asociación Española de Farmacéuticos Analistas*) para todos os ensaios.

Na tabela seguinte está descrita a periodicidade da AEQ para os parâmetros efectuados na valência de Hematologia.

**Tabela 49.** – Periodicidade da AEQ dos parâmetros efectuados, nos vários equipamentos, na valência de Hematologia.

Equipamento	Parâmetro	Periodicidade
XT-1800i	Hemograma	3 x Ano
Ves-Matic 30 Plus	VS	1 x Ano
Sysmex CA-500	PT	1 x Ano
	aPTT	
	Fibrinogénio	
ADAMS A1 <sub>C</sub> HA-8160	HbA1 <sub>C</sub> HbA2	1 x Ano
HbGold	Fracções da Hemoglobina	1 x Ano

## **8. CONCLUSÃO**

O Mestrado em Análises Clínicas (MAC) e, sobretudo, o Estágio Profissional que integra este Curso constituiu uma excelente oportunidade de valorização pessoal e profissional pois possibilitou a aquisição de importantes e válidos conhecimentos, competências e experiência, fundamentais para a carreira profissional pela qual pretendo enveredar.

Os estágios profissionais nos Laboratórios do Serviço de Patologia Clínica (SPC), do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, E.P.E. (IPOLFG, E.P.E), e no Laboratório de Análises Clínicas Nova Era - Luz, Lda. foram experiências enriquecedoras e as expectativas que tinha relativamente aos mesmos bem como os objectivos propostos foram alcançados. Devo realçar e elogiar como aspectos mais importantes dos estágios que realizei a boa integração nas equipas de trabalho; os conhecimentos, a disponibilidade e simpatia dos profissionais de saúde com que contactei; o contacto com os doentes; a exigência do trabalho, não só no que refere à quantidade e multiplicidade de tarefas realizadas diariamente (mais sentida no IPOLFG, E.P.E.), mas também no que diz respeito ao rigor e à qualidade que é exigida; a possibilidade de aplicar os conhecimentos ministrados no MAC; e a enorme quantidade de conhecimentos e de “ferramentas” que são adquiridas em todo o percurso.

A realização deste estágio proporcionaram-me uma formação extra, actualizada e consistente nas várias valências descritas no presente documento, só possível de alcançar em contexto real de trabalho, permitindo desse modo, e de forma muito objetiva, consolidar os ensinamentos recebidos no Curso. Além do referido, esta experiência profissional possibilitou o desenvolvimento de competências de planeamento, organização, de trabalho autónomo e em grupo.

Para finalizar, considero que podia ter tido um pouco mais de contacto com a fase de validação dos resultados. É uma área que me despertou bastante interesse e que julgo importante ser dada mais relevância para futuros estagiários.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Amaral E. Coagulação e fibrinólise, XI Curso Pós-Graduação e Atualização em Hematologia Coagulopatias e Trombose da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2011.
- Apontamentos das cadeiras de hematologia I e II, imunologia, métodos instrumentais de análise e virologia, II Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2009.
- Arosa F, Cardoso E, Pacheco F. Fundamentos de imunologia. Lisboa: Lidel; 2007. 978-972-757-396-7.
- Bradwell AR, Hughes RG. Atlas of hep-2 patterns. 3ª ed. Birmingham: The Binding Site; 2007. 9780704425958.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4ª ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.
- Caquet R. Guia prático de análises clínicas. Lisboa: Climepsi; 2004. 972-796-024-3.
- Chaitoff K. Learning guide immunoassay. USA: Abbott Laboratories, Diagnostics Division; 2010.
- Cunha M. Manual da Qualidade do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Lisboa, Francisco Gentil, E.P.E.
- Ferreira W, Sousa J. Microbiologia volume 2. Lisboa: Lidel; 2000. 972-757-112-3.
- Filella X. Utilidad clínica de los marcadores tumorales, Programa de Formación Continuada a Distancia; 2010.
- French P, Gomberg M, Janier M. Iusti: 2008 european guidelines on the management of syphilis. International Journal of STD & AIDS 2009;20:300-309.
- Guimarães AC, Wolfart M, Brisolará M, Dani C. O laboratório clínico e os erros pré-analíticos. Revista HCPA;31(1) – Artigo de Revisão.
- Instruções de Trabalho do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Lisboa, Francisco Gentil, E.P.E.
- <http://www.ipolisboa.min-saude.pt>
- Hughes R, Surmacz M, Karim A, Bradwell. Atlas of tissue autoantibodies. 3ª ed. Birmingham: The Binding Site; 2008. 9780704427013.
- Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Dacie and lewis practical haematology. 10ª ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2006. 0-443-06660-4.
- Métodos de Ensaio dos Laboratórios de Bioquímica, Imunologia e Virologia do Instituto Português de Lisboa, Francisco Gentil, E.P.E.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 6ª ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2009. 978-0-323-05470-6.
- Pinto AM. Fisiopatologia fundamentos e aplicações. Lisboa: Lidel; 2007. 978-972-757-429-2.
- Pinto AM. Fisiopatologia fundamentos e aplicações. Lisboa: Lidel; 2007. 978-972-757-429-2.
- Rapidlab analisador de pH/gases sanguíneos 348 – manual do operador. Bayer HealthCare LLC; 2003.
- Rebelo L. Virologia em laboratório – fase pré-Analítica, 1º Curso de Virologia Molecular em Oncologia. Laboratório de Virologia do IPOLFG, E.P.E.
- Reed R. Learning guide clinical chemistry. USA: Abbott Laboratories, Diagnostics Division; 2010.
- Regulamento Interno do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, E.P.E.
- Strasinger S, Diloranzo M. Urinalysis and body fluids. 5ª ed. F. A. Davis Company; 2008.

# Monografia

## **Factores de Risco da Trombose – Avaliação Laboratorial**



### **Mestrado em Análises Clínicas**

**ORIENTAÇÃO**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Cristina Marques**

**Ana Catarina Branco Aleixo**

**ÍNDICE**

	<b>Pág.</b>
LISTA DE ABREVIATURAS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**ADN** – ácido desoxirribonucleico

**aPTT** – tempo de tromboplastina parcial activada

**AVC** – acidente vascular cerebral

**DCVs** – Doenças Cardiovasculares

**DGS** – Direcção-Geral da Saúde

**EAM** – enfarte agudo do miocárdio

**FT** – factor tecidual

**FVa** – factor V activado

**HDL** – *high-density lipoprotein*

**HIV** – *human immunodeficiency virus*

**INR** – *International Normalized Ratio*

**IMC** – índice de massa corporal

**MTHFR** – metileno-tetra-hidrofolato redutase

**NCEP ATP III** – *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PAI-1** – inibidor do activador do plasminogénio endotelial (do inglês, *plasminogen activator inhibitor type 1*)

**PAI-2** – inibidor do activador do plasminogénio placentário (do inglês, *plasminogen activator inhibitor type 2*)

**PCR** – polymerase chain reaction

**PROC** – gene da proteína C (do inglês, *protein-coding gene*)

**RPCa** – resistência à proteína C activada

**SAAF** – síndrome dos anticorpos antifosfolipídicos

**TEP** – tromboembolismo pulmonar

**TP** – tempo de protrombina

**tPA** – activador tecidual do plasminogénio

**TT** – tempo de trombina

**TVP** – trombose venosa profunda

**ÍNDICE DE FIGURAS**

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> – Adesão e agregação plaquetárias em resultado de lesão vascular.	164
<b>Figura 2.</b> – Modelo clássico da cascata da coagulação.	165
<b>Figura 3.</b> – Sistema fibrinolítico.	166
<b>Figura 4.</b> – Esquema representativo da Tríade de Virchow.	168
<b>Figura 5.</b> – Inibição da coagulação pelo sistema proteína C - proteína S.	180
<b>Figura 6.</b> – Metabolismo da homocisteína.	184

**ÍNDICE DE TABELAS**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.</b> – Etiologia dos estados trombóticos.	171
<b>Tabela 2.</b> – Classificação das trombofilias de acordo com o risco trombótico.	178
<b>Tabela 3.</b> – Prevalência (%) e modo de transmissão de algumas trombofilias hereditárias.	179
<b>Tabela 4.</b> – Critérios para o rastreio das trombofilias hereditárias e adquiridas.	186
<b>Tabela 5.</b> – Precauções na requisição e na interpretação dos resultados laboratoriais.	187
<b>Tabela 6.</b> – Avaliação laboratorial das trombofilias.	188

## **RESUMO**

A trombose está inserida no grupo das doenças cardiovasculares, que constituem a principal causa de morte a nível mundial, incluindo Portugal.

A doença trombótica é normalmente categorizada em dois grupos distintos de patologias, a trombose arterial e a trombose venosa, consoante o trombo, ou coágulo, se desenvolva nas artérias ou no sistema venoso, respectivamente. Existem, também, algumas diferenças relativas à fisiopatologia, aos factores de risco e à terapêutica instituída, nos referidos grupos de patologias, no entanto são cada vez mais as evidências de que esta separação não é absoluta, sobretudo devido à partilha de alguns factores de risco.

A trombofilia engloba um conjunto de várias anomalias específicas, adquiridas ou hereditárias, que conduzem a um estado de hipercoagulabilidade e a um consequente aumento do risco de trombose venosa ou arterial, ou ambas. O rastreio universal das trombofilias não está recomendado, pelo que a sua avaliação laboratorial só deve ser efectuada após minuciosa avaliação clínica.

**Palavras-chave:** trombose, factores de risco, trombofilias, rastreio, avaliação laboratorial.

## **ABSTRACT**

Thrombosis is included in the group of cardiovascular diseases, which are the most important cause of death worldwide, including Portugal.

Thrombotic disease is usually regarded as two different diseases, arterial thrombosis and venous thrombosis, depending if the thrombus or clot develops in the arteries and the venous system, respectively. There are also some differences in the pathophysiology, risk factors and treatment strategies in these groups of diseases however are increasing the evidences that this separation is not absolute, mainly due to the sharing of certain risk factors.

Thrombophilia includes a set of several specific acquired or inherited abnormalities that leads to a hypercoagulable state and a consequent increased risk of venous or arterial thrombosis, or both. Universal screening for thrombophilia is not recommended, so its laboratory evaluation should be made only after thorough clinical assessment.

**Key-words:** thrombosis, risk factors, thrombophilia, screening, laboratory evaluation.

## **1. INTRODUÇÃO**

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte a nível mundial, incluindo Portugal [1,2]. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2008 morreram de DCVs cerca de 17,3 milhões de pessoas a nível mundial, particularmente de enfarte agudo do miocárdio (EAM) e de acidente vascular cerebral (AVC), representando 30% de todas as causas de morte [3]. Cerca de 80% destas mortes por DCVs ocorreram em países com baixo ou médio nível de rendimento, distribuindo-se de forma muito idêntica entre homens e mulheres. Em Portugal, e segundo a Direcção-Geral da Saúde (DGS), as doenças cardiovasculares, só em Portugal Continental, no ano de 2011, provocaram mais de 20 mil mortes [2].

As DCVs são causadas por alterações cardíacas e nos vasos sanguíneos e abrangem um vasto conjunto de situações clínicas, afectando o sistema circulatório em diferentes localizações, nomeadamente a doença cardíaca coronária, a doença cerebrovascular, a hipertensão arterial, a doença arterial periférica, a insuficiência cardíaca, a trombose e a embolia pulmonar [4].

A trombose é a formação de um coágulo (trombo) no interior dos vasos sanguíneos de um indivíduo, devido à acção de um factor que lesa a parede do vaso ou faz o sangue estagnar no seu interior [5]. O trombo é uma massa de sangue coagulado constituído por camadas de fibrina e de células sanguíneas (plaquetas, eritrócitos e leucócitos) [4,5], que se forma quando estão presentes um ou mais factores de predisposição da designada Tríade de Virchow. Deste modo, em termos clássicos, é reconhecido que a trombose é geralmente causada por um ou mais acontecimentos anormais na referida Tríade de Virchow, nomeadamente anomalias dos constituintes sanguíneos, anomalias da parede vascular e alterações do fluxo sanguíneo. A perturbação do equilíbrio constante entre a hemostase, que favorece o aparecimento do trombo e evita a hemorragia, e a fibrinólise, que promove a destruição dos referidos coágulos de sangue, mas também a hemorragia, é de fundamental importância na fisiopatologia da trombose [4].

A trombose é normalmente categorizada em dois grupos distintos de patologias [6], a trombose arterial e a trombose venosa, consoante o trombo ou coágulo se desenvolva nas artérias ou no sistema venoso, respectivamente. A trombose arterial, cujas manifestações clínicas mais comuns são o EAM, o AVC e a doença arterial periférica,

é, na maioria dos casos, uma consequência da aterosclerose, ou seja, da existência de um processo inflamatório ou lesão endotelial das artérias de médio e grande calibre e/ou da turbulência do fluxo sanguíneo [4,6]. No caso da trombose venosa, as manifestações clínicas mais comuns são a trombose venosa profunda, a tromboflebite e o tromboembolismo pulmonar (TEP), mais raramente este tipo de trombose pode ocorrer noutros locais, como por exemplo nas veias da retina, nas veias intra-abdominais, nos membros superiores [6].

A doença trombótica, tanto arterial como venosa, é mais comum com o aumento da idade e está frequentemente associada à existência de factores de risco [7]. Muitos dos factores de risco, ou indicadores de risco (como também são designados), predis põem os indivíduos para a trombose arterial ou para a trombose venosa, sendo que, salvo algumas excepções (por exemplo: o síndrome antifosfolipídico e a hiperhomocisteinémia), os referidos factores de risco são distintos entre estas duas grandes categorias de doenças [6].

Alguns dos principais factores de risco associados à trombose arterial são o tabagismo, ausência de actividade física regular, dislipidemia, hipertensão arterial, diabetes, obesidade, síndrome metabólico, menopausa e hiperhomocisteinémia. Alguns dos principais factores de risco adquiridos associados à trombose venosa são a imobilização prolongada, uso de contraceptivos orais e terapêutica hormonal de substituição, viagens aéreas, gravidez, puerpério, neoplasias e infecções [6]. Adicionalmente aos factores de risco referidos, o sistema de coagulação sanguíneo pode, igualmente, ser responsável pela ocorrência e desenvolvimento de aterosclerose e de trombose venosa [8]. A trombose é, portanto, o exemplo de uma doença de natureza multicausal (ou complexa), onde os factores de risco adquiridos e hereditários desempenham um papel significativo.

O rastreio das trombofilias tem como objectivo detectar as causas mais frequentes e bem definidas de tromboembolismo. O rastreio universal das trombofilias não está recomendado, pelo que a sua investigação laboratorial só deve ser efectuada após minuciosa avaliação clínica, tendo em conta critérios específicos de forma a evitar erros de interpretação e terapêuticas desnecessárias. Muitas vezes, mais importante do que a identificação de determinada trombofilia é a identificação dos factores de risco trombóticos de forma a instituir um adequado plano de prevenção, evitando a recorrência do evento trombótico [9].

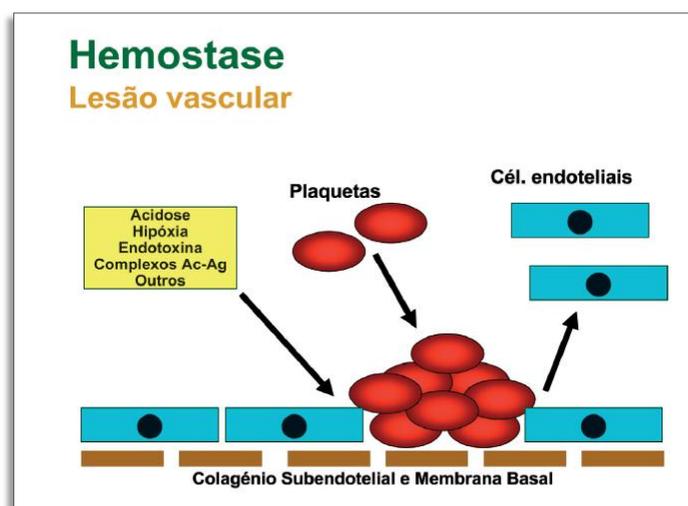
O objectivo da presente monografia é a descrição dos vários factores de risco, adquiridos e hereditários, associados ao desenvolvimento de eventos trombóticos bem como a respectiva avaliação laboratorial.

## 2. HEMOSTASE

A hemostase é um processo fisiológico complexo que permite preservar a normal funcionalidade da circulação sanguínea, assegurar permanentemente a prevenção de hemorragia espontânea e promover a paragem das hemorragias resultantes de qualquer lesão vascular [10], tendo um papel importante na manutenção da integridade vascular e da fluidez do sangue [11].

O sistema hemostático engloba três componentes fundamentais, os vasos (endotélio e restante parede vascular), as proteínas plasmáticas (procoagulantes, anticoagulantes e do sistema fibrinolítico) e as plaquetas, que devem ser normais em número e em função [11,12]. Este sistema é dependente de interações complexas entre os referidos componentes, que devem estar presentes no seu estado totalmente funcional, em quantidades adequadas e nos locais próprios, de forma a impedir a perda excessiva de sangue após lesão vascular e, simultaneamente, prevenir a trombose [12].

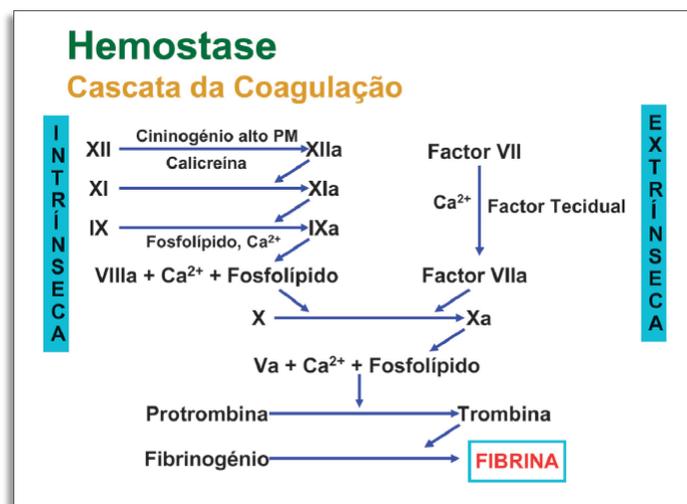
Quando ocorre uma lesão vascular, independentemente do “agente agressor”, a exposição do colagénio subendotelial e da membrana basal conduz à adesão e agregação plaquetárias e à activação da coagulação (Figura 1.), levando à formação de um trombo plaquetário (hemostase primária) que previne a saída de sangue do compartimento vascular, permitindo os eventos de reparação subsequentes.



**Figura 1.** – Adesão e agregação plaquetárias em resultado de lesão vascular.

[Retirado de 11]

Duas vias distintas, intrínseca e extrínseca, conduzem à formação do coágulo de fibrina (hemostase secundária). Apesar de serem iniciadas por mecanismos distintos, ambas convergem para uma via comum. A via intrínseca é activada em resposta a alterações da parede vascular na ausência de lesão tecidual, enquanto que a via extrínseca é activada quando ocorre uma agressão tecidual. A cascata é complexa e envolve a interacção de múltiplos factores, pelo que o potencial de disfunção pode ocorrer em qualquer uma das várias etapas (Figura 2.) [11].



**Figura 2.** – Modelo clássico da cascata da coagulação.

[Retirado de 11]

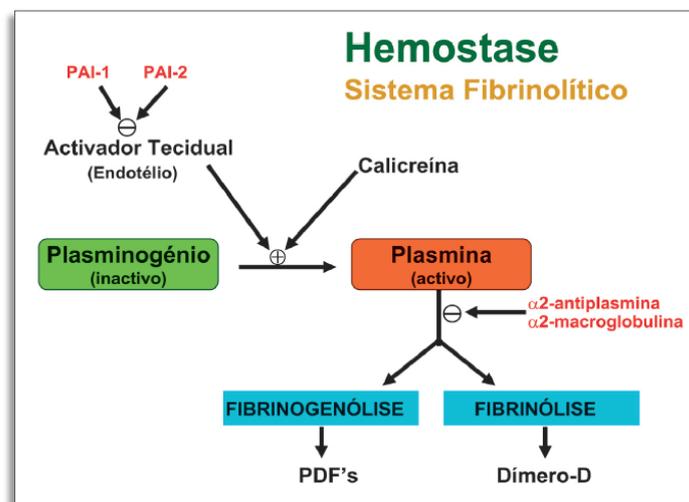
Este é o modelo clássico da cascata da coagulação e o de maior utilidade do ponto de vista clínico [10]. Tem sido proposto um novo conceito da coagulação, no qual começa a ser cada vez mais evidente a existência de apenas uma via, onde os factores da coagulação interagem com as membranas de determinadas células (plaquetas, células endoteliais, monócitos, entre outras) para gerar trombina e formar o trombo [13].

Tal como noutros processos biológicos o sistema da coagulação é regulado por vários mecanismos inibidores, que têm por objectivo limitar a extensão das várias reacções bioquímicas e a possível disseminação do processo da coagulação, sendo de destacar os seguintes:

- Sistema da proteína C/proteína S e antitrombina;

- Inibição das serina-proteases (factores activados II, X, IX, XI, XII e calicreína) pela antitrombina;
- Prostaglandinas.

Assim como a formação do coágulo, também a sua destruição é importante no processo de reparação da lesão. A fibrinólise (hemostase terciária) é mediada pelo activador tecidual do plasminogénio (tPA) que se liga à fibrina, activando a plasmina. A plasmina, por sua vez, degrada a fibrina, podendo ser inactivada pela  $\alpha$ 2-antiplasmina e pela  $\alpha$ 2-macroglobulina. A fibrinólise é bloqueada pelo inibidor do activador do plasminogénio, produzido pelo endotélio (PAI-1) e o produzido pela placenta (PAI-2) (Figura 3.) [11].



**Figura 3.** – Sistema fibrinolítico.

[Retirado de 11]

Um equilíbrio constante entre a hemostase, que favorece o aparecimento do trombo e evita a hemorragia, e a fibrinólise, que promove a destruição do trombo, é fundamental para a homeostasia individual [4].

## 2.1. AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA FUNÇÃO HEMOSTÁTICA

A avaliação laboratorial da função hemostática inclui testes de rastreio, usados para mensurar efeitos combinados de factores que influenciam uma fase particular da

hemostase, que podem ser complementados com testes específicos que avaliam o nível ou a função de um factor da coagulação, ou a função plaquetária, para o estabelecimento de um diagnóstico correcto. Desta avaliação fazem parte os seguintes testes:

- Avaliação da função plaquetária – contagem de plaquetas (teste de rastreio) e testes mais específicos.
- Avaliação da coagulação plasmática – tempo de tromboplastina parcial activada (aPTT): avalia a via intrínseca (factores VIII, IX, XI, XII) e a via comum, e é utilizado na monitorização terapêutica da heparina; tempo de protrombina (TP): avalia a via extrínseca (VII) e a via comum, e é utilizado no controlo da terapêutica com anticoagulantes orais; tempo de trombina (TT): avalia a conversão do fibrinogénio em fibrina.
- Avaliação dos mecanismos reguladores da coagulação – antitrombina, proteína C, proteína S e resistência à proteína C activada (RPCa).
- Avaliação do sistema fibrinolítico – Dímero-D, plasminogénio, tPA e PAI-1 [10].

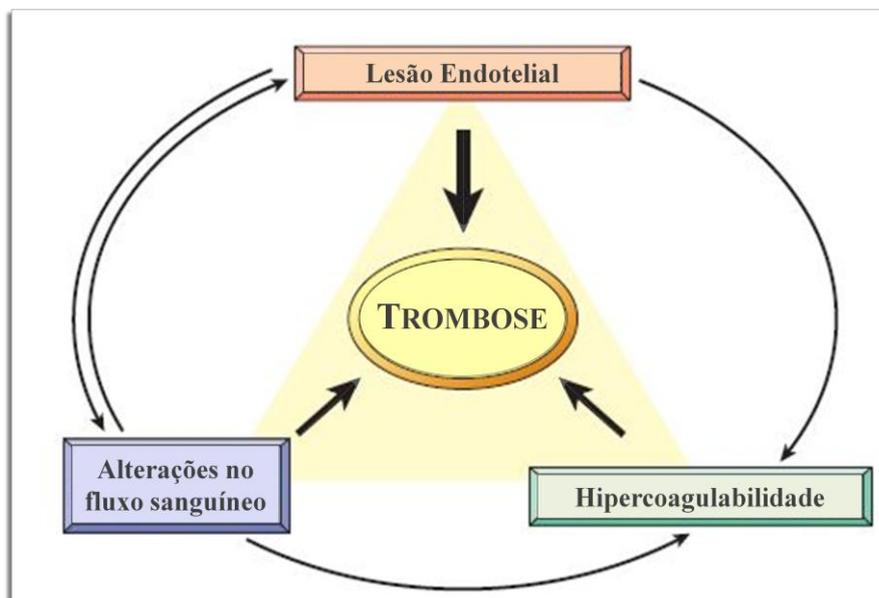
Os dois últimos pontos serão abordados adiante, no contexto da avaliação laboratorial das trombofilias.

### 3. ETIOLOGIA DA TROMBOSE

Em meados do século XIX (1854) o patologista alemão Rudolf Virchow estabeleceu que a obstrução vascular e, conseqüentemente, a trombose eram favorecidas por um conjunto de acontecimentos. Desta forma, os factores de predisposição para a trombose são os seguintes:

- Alterações no fluxo sanguíneo (estase/turbulência);
- Lesão no endotélio vascular;
- Alterações na natureza dos constituintes sanguíneos (hipercoagulabilidade).

Apesar da sua importância há muito reconhecida, estes fenómenos vasculares, hemorreológicos e hematológicos, designados por Tríade de Virchow (Figura 4.), permanecem válidos e relevantes até aos dias de hoje.



**Figura 4.** – Esquema representativo da Tríade de Virchow.

[Adaptado de 14]

Estas factores de predisposição podem ocorrer isoladamente ou em simultâneo, sendo que o risco de trombose aumenta com o número de factores envolvidos [12].

### **3.1. ALTERAÇÕES NO FLUXO SANGUÍNEO**

Os trombos arteriais formam-se nas artérias, nos locais em que existe turbulência do fluxo sanguíneo e/ou lesão endotelial, causados geralmente por fenómenos ateroscleróticos. Constituem a principal causa de oclusão das artérias de médio e de grande calibre, como as coronárias, as artérias do polígono de Willis, as carótidas e a aorta. As manifestações mais comuns da trombose arterial são o acidente vascular cerebral (AVC) e o enfarte agudo do miocárdio (EAM). Os trombos arteriais são geralmente constituídos por uma “massa” de plaquetas, pequenas quantidades de fibrina e pobres em eritrócitos e leucócitos, sendo designados por “trombos brancos” [4].

Os trombos venosos formam-se no sistema venoso, sobretudo em condições de fluxo sanguíneo lento (estase) e são constituídos por grandes quantidades de fibrina e numerosos eritrócitos, sendo designados por “trombos vermelhos” [4,12].

Nos membros inferiores, a drenagem venosa é feita graças à contracção muscular e à presença de válvulas venosas que promovem a ascensão da coluna de sangue até ao coração, contrariando a força de gravidade. Um mau funcionamento deste sistema, altera o fluxo sanguíneo promovendo a estase e, conseqüentemente, a trombose venosa nesses membros. Para contrariar a possibilidade de ocorrência de trombos venosos devem ser promovidas a prática de exercício físico, a elevação das pernas durante o repouso, a utilização de meias de contenção elástica e evitar a imobilização, sobretudo no período pós-operatório, para facilitar o retorno venoso e evitar a estase.

Um tipo de trombose venosa, sem sinais inflamatórios prévios, afectando as veias profundas dos membros inferiores é a trombose venosa profunda (TVP). Os trombos que aqui se formam estão pouco aderentes às paredes dos vasos, podendo soltar-se e percorrer a circulação (sob a forma de êmbolos) até aos pulmões, levando ao tromboembolismo pulmonar (TEP) [4].

### **3.2. LESÃO NO ENDOTÉLIO VASCULAR**

A ocorrência de lesão no endotélio vascular leva a uma activação de factores procoagulantes da cascata da coagulação. A trombose arterial tem início, geralmente, com a adesão plaquetária à superfície do endotélio comprometido ou a constituintes do

subendotélio que se encontrem expostos, como é o caso do colagénio. A lesão nas células endoteliais desempenha um papel importante no desenvolvimento da trombose arterial [12].

### **3.3. ALTERAÇÕES NA NATUREZA DOS CONSTITUINTES SANGUÍNEOS**

As alterações na natureza dos constituintes sanguíneos levam a um “estado de hipercoagulabilidade”, definido como um estado de instabilidade parcial do sistema da hemostase com diminuição do limite de resistência à trombogénese, havendo risco acrescido de se gerar trombina e, conseqüentemente, formação de fibrina [15].

A hipercoagulabilidade e o seu sinónimo, a trombofilia, referem-se a qualquer anomalia, hereditária ou adquirida, do sistema hemostático, conferindo um risco aumentado de trombose venosa ou arterial, ou ambas. O conceito de hipercoagulabilidade ganhou uma ampla aceitação e tem sido considerado que estas alterações hemostáticas são importantes na fisiopatologia da trombose. A avaliação destas anomalias tem-se revelado útil no acompanhamento dos pacientes [12].

O estado de hipercoagulabilidade pode ser classificado em primário ou secundário. O estado de hipercoagulabilidade primário é raro, existindo uma condição primária de instabilidade do sistema hemostático, geralmente provocada por uma anomalia qualitativa ou quantitativa (exs: deficiência congénita de inibidores naturais da coagulação, anomalia funcional do fibrinogénio – disfibrinogénemia, anomalia do plasminogénio e anomalia dos activadores do plasminogénio). O estado de hipercoagulabilidade secundário é mais frequente que o anterior, no qual existe uma condição subclínica predisponente à activação da coagulação (exs: gravidez, contracepção oral, redução do fluxo sanguíneo, pós-operatório, neoplasias) [15].

#### 4. FACTORES DE RISCO

A trombofilia engloba um conjunto de várias anomalias específicas, adquiridas ou hereditárias, que condicionam um estado de hipercoagulabilidade e um consequente aumento do risco de trombose venosa ou arterial, ou ambas.

Apesar de estarem descritas várias trombofilias (Tabela 1.) elas não são todas iguais, não têm a mesma prevalência e distribuição geográfica e não têm o mesmo impacto clínico em termos de risco trombótico [9].

**Tabela 1.** – Etiologia dos estados trombóticos.

<b>Trombofilias</b>	
<b>Hereditários</b>	<b>Adquiridos</b>
<p><b>Defeito na Inibição dos Factores de Coagulação</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Factor V de Leiden / RPCa;</li> <li>▪ Mutação do gene da protrombina G20210A;</li> <li>▪ Deficiência de antitrombina;</li> <li>▪ Deficiência de proteína C;</li> <li>▪ Deficiência de proteína S.</li> </ul>	<p><b>Patologias / Síndromes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Neoplasias;</li> <li>▪ Terapêutica com estrogénios;</li> <li>▪ Síndrome metabólico;</li> <li>▪ Obesidade;</li> <li>▪ Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2;</li> <li>▪ Síndrome dos anticorpos antifosfolipídicos;</li> <li>▪ Infecções.</li> </ul>
<p><b>Alterações na fibrinólise</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Disfibrinogénemia;</li> <li>▪ Deficiência de plasminogénio;</li> <li>▪ Deficiência do tPA;</li> <li>▪ Excesso de PAI-1.</li> </ul>	<p><b>Estados Fisiológicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Gravidez e puerpério;</li> <li>▪ Pós-operatório;</li> <li>▪ Imobilidade;</li> <li>▪ Idade avançada.</li> </ul>
<p><b>Outros</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Grupo sanguíneo não-O.</li> </ul>	<p><b>Outros</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tabagismo;</li> </ul>
<b>Mistas</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hiperhomocistinemia;</li> <li>▪ Actividade elevada do factor VIII;</li> <li>▪ Aumento do fibrinogénio.</li> </ul>	

A trombose venosa e a trombose arterial são tradicionalmente consideradas processos distintos, nomeadamente no que respeita à fisiopatologia, aos factores de risco e ao tratamento. No entanto, são cada vez mais as evidências de que esta separação não é absoluta, sobretudo devido à partilha de alguns factores de risco [16].

#### **4.1. FACTORES DE RISCO ADQUIRIDOS**

##### **Idade**

Existe um aumento exponencial entre a idade e o risco de ocorrência de eventos trombóticos arteriais e venosos [17,18]. Em termos grosseiros, estima-se que anualmente, um em cada dez mil indivíduos, com idade inferior a quarenta anos, sofra de algum tipo de evento trombótico, enquanto que em indivíduos com idade superior a setenta e cinco anos, a relação passa a ser de um em cada dez indivíduos [19].

As razões para que o risco de trombose dependa do avanço da idade ainda não são suficientemente claras, no entanto é possível que se deva a uma combinação de factores, como a diminuição da prática regular de exercício físico e, conseqüentemente, uma diminuição da mobilidade, o “desgaste” dos vasos sanguíneos, provocando lesões na parede vascular e, em última instância, o seu rompimento [17,18,19], resultando em estase venosa e num aumento da activação sistémica da coagulação do sangue [17,18].

Existem várias alterações no sistema hemostático dos idosos. A existência de uma associação causal entre estas alterações e o desenvolvimento de trombose é provável, mas ainda não está absolutamente esclarecida, devido à falta de estudos prospectivos que demonstrem o desenvolvimento das manifestações clínicas da trombose em comparação com indivíduos idosos saudáveis [18].

##### **Imobilidade**

A imobilidade pode ser devida a situações transitórias como o período pós-cirúrgico, traumatismo, internamento ou viagens, a factores sócio-económicos como a diminuição da prática de exercício físico e a redução do tempo de lazer, ou mesmo ao factor idade.

No geral, a imobilidade está associada ao aumento do risco de trombose venosa, sendo que o risco é tanto maior quanto maior for o período de imobilização, sobretudo

nas situações transitórias, nas quais o risco permanece durante algum tempo, mesmo após a fase de imobilização.

O mecanismo pelo qual as referidas condições representam um factor de risco para o desenvolvimento de trombose venosa, resulta de uma combinação entre a estase venosa e a acumulação local de factor tecidual (FT), isto é, um estado de hipercoagulabilidade [17,18,20].

### **Síndrome Metabólico, Obesidade e Diabetes *mellitus* tipo 2**

O aumento da imobilidade, em combinação com uma dieta cada vez mais rica gorduras, tem resultado no aparecimento do síndrome metabólico, obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2 [17].

Actualmente, uma das definições mais utilizadas para o síndrome metabólico é a que foi proposta em 2001 pelo *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III), que se baseia na presença de pelo menos três dos seguintes critérios de diagnóstico: obesidade, níveis elevados de triglicéridos, níveis de colesterol HDL (*high-density lipoprotein*) diminuídos, hipertensão e hiperglicemia (em jejum) [18].

A obesidade é definida pela presença de um índice de massa corporal (IMC) de cerca de 30 Kg/m<sup>2</sup> [20] e pode conferir um risco aumentado de trombose venosa, independente do síndrome metabólico. Os indivíduos obesos tendem a desenvolver um estado de imobilização, o qual pode levar à formação de coágulos por estase venosa (diminuição do retorno venoso), pelo que é possível que estes indivíduos adquiram um estado protrombótico [18,21]. Existem estudos que demonstram uma correlação entre o aumento do IMC e o Factor VIII, o qual é um factor de risco quer para a trombose venosa, quer para a trombose arterial [21].

A obesidade, o síndrome metabólico e a diabetes *mellitus* tipo 2 são factores que aumentam o risco de trombose arterial, provavelmente por exercerem uma influência nociva na parede das artérias e efeitos sistémicos na inflamação, coagulação e fibrinólise. Vários estudos epidemiológicos também sugerem uma associação entre estes três factores e a trombose venosa [17,18,21].

### **Tabagismo**

O tabagismo constitui um factor de risco para a trombose arterial [21] e parece não ser relevante no desenvolvimento da trombose venosa. Alguns estudos sugerem que o hábito de fumar resulta numa activação sistémica da coagulação e da inflamação, o que, de certa forma, pode justificar um envolvimento mais marcado deste factor no desenvolvimento da trombose arterial [17,21].

### **Malignidade**

O cancro é reconhecido como um dos mais importantes factores de risco adquiridos para a trombose venosa. A trombose venosa é a segunda maior causa de morte em doentes oncológicos hospitalizados, seguida das infecções [18].

O aumento do risco de trombose venosa, em pacientes com neoplasias, resulta de uma combinação entre três factores: os que estão associados ao tumor propriamente dito, os que têm a ver com o hospedeiro e os que se relacionam com a terapêutica.

A massa tumoral pode provocar estase sanguínea por compressão dos vasos. As células neoplásicas podem promover a libertação de FT a partir dos órgãos afectados, durante o processo de metastização. Dados de vários estudos epidemiológicos indicam ainda a existência de uma heterogeneidade significativa para o risco de trombose venosa, de acordo com a localização do tumor (tecidos neoplásicos diferentes). Esses mesmos estudos revelaram que a taxa de incidência de trombose é mais elevada em casos de linfoma, cancro do pâncreas e cerebral, comparativamente a tumores do ovário, cólon, rim, pulmão, entre outros.

Os mecanismos propostos para a relação entre a terapêutica, nomeadamente a quimioterapia, e o risco de ocorrência de eventos trombóticos incluem uma lesão directa, induzida pelo agente quimioterápico, no endotélio e um aumento da expressão da actividade do FT pelos macrófagos e monócitos, induzindo assim uma resposta procoagulante por parte do hospedeiro.

Outro mecanismo protrombótico resultante da terapêutica antitumoral está, provavelmente, relacionado com a hepatotoxicidade causada pela radio- e quimioterapia, levando a uma redução dos níveis plasmáticos de anticoagulantes naturais (antitrombina, proteína C e proteína S) [18,20].

### **Contraceptivos Orais e Terapêutica Hormonal de Substituição**

Vários estudos têm sido feitos no sentido de investigar a relação existente entre o uso de contraceptivos orais e o risco de desenvolvimento de trombose. Contudo, devido à heterogeneidade dos contraceptivos orais utilizados e das populações estudadas, por vezes os resultados são contraditórios. Em alguns estudos, verificou-se que o risco para a trombose venosa era superior em mulheres que usavam contraceptivos orais de terceira geração, ou seja, os que contêm desogestrel ou gestodeno, comparativamente com mulheres que usavam contraceptivos orais de segunda geração, contendo levonorgestrel.

No entanto, outros autores realçam que a diferença entre o uso de contraceptivos orais de segunda ou terceira geração, para o risco de trombose venosa, é mínima, e que provavelmente o desenvolvimento da referida patologia está mais relacionado com estados trombofílicos congénitos ou adquiridos.

Desta forma, a existência de um mecanismo que explique de forma inequívoca como o uso de contraceptivos orais pode induzir um estado protrombótico, ainda não foi identificado. No entanto, pensa-se que os estrogénios possam ter um efeito directo na parede vascular, mais relevante na trombose arterial, e que promovam alterações nos factores da coagulação [17,18].

Vários estudos também têm demonstrado que o uso de terapêutica hormonal de substituição está associado ao risco de desenvolvimento de trombose. De certa forma, estes resultados são surpreendentes, pois a quantidade de estrogénios presente neste tipo de fármacos é muito baixa, demonstrando que o uso de estrogénios e o risco de trombose não apresentam uma relação linear. No entanto, a incidência da trombose é mais elevada em mulheres durante a pós-menopausa relativamente a mulheres em idade fértil, pelo que o uso de terapêutica hormonal de substituição pode ser considerado um factor de risco mais absoluto do que o uso de contraceptivos orais [19].

### **Infecções**

As infecções agudas aumentam, de forma transitória, o risco de trombose arterial e trombose venosa. Os mecanismos que podem justificar esta situação estão relacionados com a imobilização e o desenvolvimento de um estado de hipercoagulabilidade sistémica, para o caso da trombose venosa.

Há cada vez mais interesse no estudo de um possível aumento do risco de trombose, venosa e arterial, em indivíduos com infecção por HIV (*human immunodeficiency virus*), talvez devido aos efeitos do próprio vírus ou da terapia antirretroviral [17].

### **Gravidez e Puerpério**

A trombose venosa é uma das principais causas de mortalidade materna em todo o mundo (a taxa de mortes maternas por trombose venosa é de 0.12 por 10,000 nados-vivos e nados-mortos). A idade materna avançada, a obesidade e a pré-eclâmpsia foram identificados em cerca de 70% das mulheres com trombose venosa relacionada com a gravidez ou puerpério [18].

Do ponto de vista biológico, a gravidez normal é caracterizada por um estado de hipercoagulabilidade, estando associada a alterações hemostáticas que incluem o aumento da concentração de vários factores procoagulantes (factores II, V, VIII, IX, X, XII, aumento *major* do fibrinogénio), a diminuição da concentração de anticoagulantes naturais (proteína S, aumento da resistência à proteína C activada na ausência da mutação do factor V de Leiden) e uma redução, ou supressão, da actividade fibrinolítica (aumento do PAI-2) [11,18].

Estas alterações auxiliam na manutenção da função placentária durante a gravidez e a minimizar a perda de sangue excessiva durante o parto, no entanto predis põem à trombose materna e a complicações vasculares placentárias [18].

Durante a gravidez é fundamental a manutenção de um rigoroso equilíbrio entre as propriedades protrombóticas e antitrombóticas do sangue/parede vascular prevenindo quer a trombose, quer a hemorragia [11].

O TF é amplamente produzido na placenta e encontra-se aumentado no líquido amniótico, mas não no plasma, e, em conjunto com a trombomodulina, estão envolvidos não apenas na hemostase mas também na diferenciação dos vasos sanguíneos da placenta. O descolamento da placenta durante o parto e a subsequente libertação de substâncias trofoblásticas, no local de separação, são responsáveis, em conjunto com a hemoconcentração pós-parto, pelo risco particularmente elevado de trombose venosa durante o puerpério. Três semanas após o parto, a coagulação sanguínea e a fibrinólise encontram-se geralmente normalizadas [18].

### Síndrome dos Anticorpos Antifosfolipídicos

O síndrome dos anticorpos antifosfolipídicos (SAAF) é uma das formas mais importantes de trombofilia adquirida [11,18], não só devido à sua prevalência, mas também devido à sua significativa morbidade e mortalidade [11]. Trata-se de uma doença autoimune caracterizada pela presença de anticorpos antifosfolípidos circulantes, estando associada à trombose venosa e arterial e/ou a complicações na gravidez, incluindo a morte fetal [18].

Os anticorpos antifosfolípidos clinicamente relevantes incluem não só o anticoagulante lúpico e os anticorpos anticardiolipina, mas também um subgrupo de anticorpos recentemente identificados: anticorpos anti- $\beta_2$ -glicoproteína I [11,18], fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina e anexina V. De todos estes anticorpos, os mais bem caracterizados são o anticoagulante lúpico e os anticorpos anticardiolipina, sendo os estudos mais recentes sobre a anexina V [11].

O termo “anticorpos antifosfolípidos” é muito utilizado mesmo não estando correcto, porque os anticorpos não são dirigidos contra os fosfolípidos *per si*, mas sim contra vários cofactores de proteínas que actuam na superfície da membrana fosfolipídica ( $\beta_2$ -glicoproteína I, protrombina, proteína C, proteína S, anexina V, factor XII da coagulação, entre outros). Os complexos resultantes interagem com diversos tipos de células, incluindo células endoteliais, monócitos e plaquetas, e todas elas desempenham funções importantes na hemostase e na trombogénese. A activação indirecta destas células resulta na libertação de mediadores protrombóticos e pró-inflamatórios (exs. micropartículas transportadoras de TF, interleucina-6, proteínas do complemento), levando à activação plaquetária e das vias da coagulação. Estudos recentes mostraram que os anticorpos antifosfolípidos reagem directamente com a parede dos vasos e causam alterações funcionais nas lipoproteínas plasmáticas (HDL), aumentando o risco de trombose arterial [18].

Estão descritos dois tipos de SAAF, o primário, que ocorre na ausência de doença subjacente, e o secundário, relacionado com o lupus eritematoso sistémico, com outras doenças autoimunes, com neoplasias ou com outras condições patológicas [11].

## 4.2. FACTORES DE RISCO HEREDITÁRIOS

A trombofilia hereditária é caracterizada por um conjunto de condições genéticas que aumentam o risco de eventos trombóticos (Tabela 2.) e que podem ser causadas por insuficiente inibição da cascata da coagulação, quer por mutações que resultam em deficiência dos inibidores naturais da coagulação, quer por mutações que levam ao aumento do nível/função dos factores da coagulação. O primeiro grupo de mutações aumenta o risco para o desenvolvimento de trombose quando afecta os inibidores naturais da coagulação, nomeadamente a antitrombina, a proteína C e a proteína S. O segundo grupo de mutações afecta o Factor V, resultando num Factor V mutante, conhecido como Factor V de Leiden, com aumento da resistência à inactivação feita pela proteína C, e a protrombina, levando a um aumento dos níveis basais de protrombina (mutação G20210A do gene da protrombina). Estas duas mutações são as mais frequentes entre a população caucasiana e têm prevalência quase nula entre a população de raça negra e asiática [22].

**Tabela 2.** – Classificação das trombofilias de acordo com o risco trombótico.

### **Alto Risco Trombótico – Trombofilias Major**

Homozigotia Factor V de Leiden  
 Homozigotia Protrombina G20210A  
 Défice de Antitrombina  
 Síndrome de anticorpos antifosfolipídicos (SAAF)  
 Défices combinados (Dupla heterozigotia para Factor V de Leiden e Protrombina G20210A)

### **Moderado Risco Trombótico – Trombofilias Minor**

Heterozigotia Factor V de Leiden  
 Heterozigotia Protrombina G20210A  
 Défice de proteína C  
 Défice de proteína S  
 Persistência de Anticorpos antifosfolipídicos

### **Baixo Risco Trombótico**

Mutação da MTHFR (Polimorfismo C677T)  
 Mutação do PAI-1  
 Hiperhomocisteinémia

As trombofilias hereditárias mais prevalentes (Tabela 3.) e com significado clínico são as heterozigotias para o factor V de Leiden e para o gene da protrombina G20210A. Os défices de proteína C e S têm um potencial trombogénico comparável, mas são muito mais raras [9,11]. A homozigotia para as mutações do PAI-1 e da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR C677T), a principal causa de hiperhomocisteinémia congénita, embora relativamente frequentes têm um baixo risco trombótico [11]. O défice de antitrombina, as homozigotias (factor V de Leiden e protrombina G20120A) e as heterozigotias combinadas, apesar de muito raras, são altamente trombogénicas [9,11].

**Tabela 3.** – Prevalência (%) e modo de transmissão de algumas trombofilias hereditárias.

<b>Trombofilia</b>	<b>Transmissão</b>	<b>População geral Caucasianos</b>	<b>População com TVP</b>	<b>TVP na gravidez</b>
Deficiência Antitrombina	Autossómica Dominante	0.02	1 – 2	60
Deficiência Proteína C	Autossómica Dominante	0.2 – 0.5	3 – 4	10 – 30
Deficiência Proteína S	Autossómica Dominante	0.08	2	10 – 30
Factor V Leiden	Autossómica Dominante	5	20 – 40	40
Factor VIII	–	11	–	–
Protrombina G20210A	Autossómica Dominante	2 – 5	6	30
MTHFR C677T (homozigotia)	Autossómica Recessiva	10	–	–

[Legenda: – indisponível/desconhecido. Adaptado de 27 e 22]

As principais trombofilias hereditárias são as seguintes:

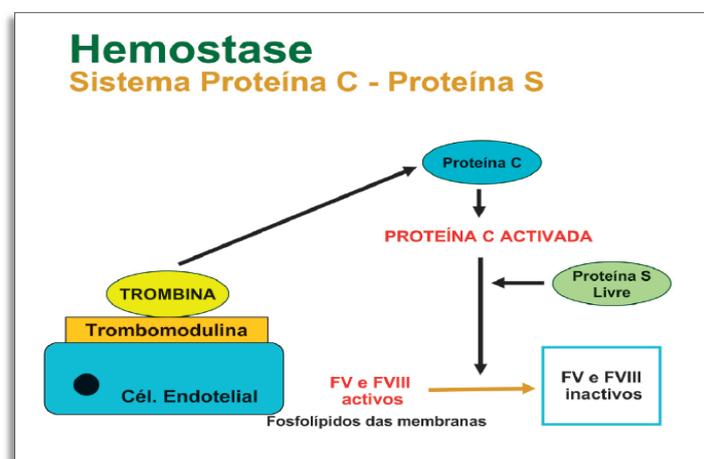
### **Deficiência de Antitrombina, Proteína C e Proteína S**

Foram descritas inúmeras mutações de transmissão autossómica dominante, em doentes com défice de proteína C, proteína S ou antitrombina (Tabela 3.).

A antitrombina, anteriormente designada por antitrombina III, é um anticoagulante natural que inibe virtualmente as proteases da coagulação, sobretudo o factor Xa e a trombina (IIa) [12,22].

Existem dois tipos de deficiência de antitrombina: o tipo I, deficiência de antitrombina clássica, é a mais comum e consiste numa deficiência quantitativa com níveis de antitrombina plasmática inferiores a metade do valor normal. Na deficiência de antitrombina tipo II, os níveis plasmáticos de antitrombina estão dentro dos limites da normalidade, mas a sua actividade está diminuída devido à produção de uma variante do normal, tratando-se de uma deficiência qualitativa [9,12,22]. Esta deficiência tem uma prevalência de 0.02% na população geral (Tabela 3.) [9], e manifesta-se geralmente por TVP dos membros inferiores, TEP [15,22], ou trombose das veias mesentéricas, em doentes com menos de 35 anos de idade e na ausência de outros factores de risco. A deficiência de antitrombina é a trombofilia hereditária mais grave, tendo uma taxa de incidência anual de trombose de 0.87 – 1.6% em indivíduos heterozigóticos, a mais elevada entre todas as trombofilias hereditárias [9].

A proteína C actua por inactivação dos factores activados V e VIII, necessita da proteína S como cofactor e é activada pela trombina quando esta se liga à trombomodulina endotelial (Figura 5.). A proteína S existe em duas formas, circula livre no plasma e tem acção anticoagulante como cofactor da proteína C, ou encontra-se ligada à proteína de fase aguda C4b (*complement C4b-binding protein*), não tendo, nesta forma, actividade anticoagulante. A síntese de proteína S e de proteína C ocorre no fígado e é dependente da vitamina K [9,12].



**Figura 5.** – Inibição da coagulação pelo sistema proteína C - proteína S. [Retirado de 11]

A deficiência de proteína C é herdada de forma autossômica dominante (Tabela 3.) e caracteriza-se por uma ausência de inativação dos factores activados V e VIII com consequente hipercoagulabilidade [11].

Existem dois tipos de deficiência da proteína C. No tipo I há uma deficiência quantitativa de proteína C no sangue, sendo esta a forma mais comum de deficiência da proteína C, resultando numa diminuição da síntese ou da estabilidade da proteína C. No tipo II, a actividade da proteína C está mais reduzida do que os níveis de antigénio, o que revela a ocorrência de síntese de moléculas de proteína C disfuncionais [15,22]. O gene da proteína C (PROC, do inglês, *protein-coding gene*) pode sofrer inúmeras mutações (são hoje conhecidas 160) com perda de função que levam ao fenótipo de deficiência de proteína C [22].

Quanto à deficiência da proteína S, transmitida de forma autossômica dominante [11], estão descritos três tipos. No tipo I, aparecem diminuídos os níveis de proteína S total (deficiência quantitativa). No tipo II, a actividade da proteína S como cofactor está diminuída, mas existem valores normais de proteína S total e livre (deficiência qualitativa), sendo um distúrbio muito raro e difícil de diagnosticar. No tipo III estão diminuídos os níveis de proteína S livre, mas os níveis de proteína S total encontram-se normais (deficiência quantitativa de proteína S livre) [22].

Os défices de proteína C e de proteína S têm prevalências de cerca de 0.2 – 0.5% e de 0.08%, respectivamente, na população geral (Tabela 3.), e manifestam-se geralmente da mesma forma, TVP dos membros inferiores, trombozes venosas mesentéricas, trombozes venosas renais, trombozes dos seios venosos cerebrais ou tromboflebitas superficiais, em indivíduos com idade inferior a 30 anos. A incidência anual de trombose é de 0.43 – 0.72% e de 0.5 – 1.65% para os portadores de défices de proteína C e proteína S, respectivamente. Os portadores são quase sempre heterozigóticos. Nos portadores homozigóticos, a deficiência apresenta-se precocemente como *purpura fulminans* neonatal ou através de trombozes venosas maciças, e é geralmente fatal. [15,22].

### **Resistência à Proteína C Activada e Factor V de Leiden**

A resistência à proteína C activada (RPCa) é a causa mais frequente de trombofilia hereditária. Resulta, na maior parte das vezes, de uma mutação pontual no gene do

factor V (mutação R506Q) com substituição da glutamina pela arginina na posição 506 do factor V activado (FVa). O FVa mutante (FV R506Q), comumente designado por factor V de Leiden é resistente à inactivação pela proteína C activada porque perde um dos locais de acção proteolítica desta enzima. O factor V de Leiden é o factor de risco para trombose mais prevalente na população caucasiana, cerca de 5% (Tabela 3.), no entanto é raro nas populações nativas de África ou da Ásia, o que explica em parte a raridade de fenómenos tromboembólicos nestas populações [11,22]. O risco de trombose venosa é cerca de 5 vezes superior nos indivíduos heterozigóticos e 40 vezes nos homozigóticos [23]. Este risco aumenta substancialmente quando estão presentes outros factores de risco como a gravidez, cirurgia, contraceptivos orais e outros. Importa referir que a RPCa pode ocorrer, embora raramente, na ausência da mutação do Factor V de Leiden, devido a outros factores genéticos (FV Hong Kong R306G e FV Cambridge R306T) ou mesmo de forma não hereditária, mas associada a factores adquiridos, como por exemplo utilização de contraceptivos orais [22].

### **Mutação G20210A no Gene da Protrombina**

A mutação no gene da protrombina, transmitida de forma autossómica dominante, consiste na substituição da guanina pela adenina na posição 20210, numa região não transcrita do gene. Esta mutação leva a um aumento da concentração plasmática de protrombina [11,22,23] e, como a protrombina é um precursor da trombina, ocorrerá um aumento secundário nos níveis de trombina e conseqüentemente um estado de hipercoagulabilidade. A prevalência desta mutação é de 2 – 5% na população geral e resulta num risco aumentado de cerca de 2 a 3 vezes para o desenvolvimento de trombose venosa [22,23]. Tal como o Factor V de Leiden, é rara nos indivíduos de raça negra e nos asiáticos [22].

### **Grupo Sanguíneo**

Os indivíduos com grupo sanguíneo não-O apresentam um risco aumentado de trombose em 2 a 4 vezes, relativamente aos indivíduos de tipo sanguíneo O. O grupo sanguíneo está associado a níveis reduzidos do Factor de von Willebrand, devido a um aumento da sua libertação, e ao Factor VIII, e, conseqüentemente, a um aumento de risco trombótico [23].

## **Disfibrinogenémia**

A disfibrinogenémia é definida como uma alteração funcional do fibrinogénio, podendo apresentar uma baixa afinidade para a plasmina ou uma resistência à lise pela plasmina.

Este defeito é transmitido de forma autossómica dominante e estão descritas mais de cem variantes [15]. A disfibrinogenémia como factor de risco para a trombose é muito rara [12].

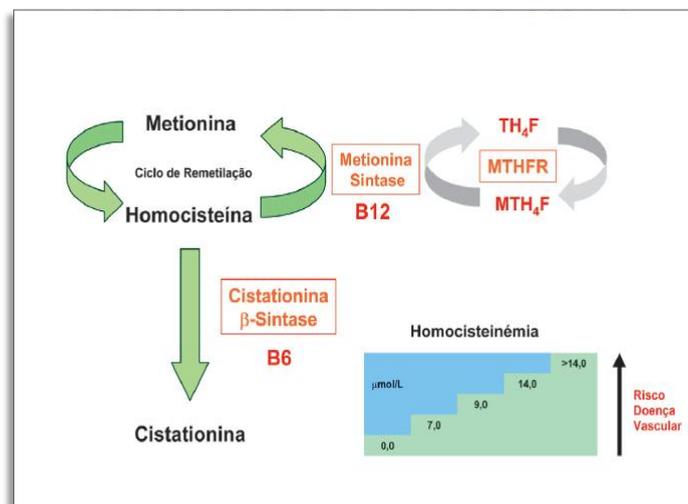
Devem ainda ser considerados os factores de risco congénitos que provocam alterações no sistema fibrinolítico:

- **Deficiência do plasminogénio** – Alterações qualitativas e quantitativas no plasminogénio têm sido observadas em pacientes com trombose venosa recorrente. A alteração quantitativa é transmitida de forma autossómica dominante, enquanto que os defeitos qualitativos do plasminogénio (displasminogenemia) são geralmente herdados de forma autossómica recessiva. A displasminogenemia é comum em indivíduos japoneses e alguns estudos sugerem que a deficiência quantitativa do plasminogénio poderá não estar associada ao aumento do risco de trombose [12].
- **Deficiência do tPA** – A deficiência em tPA pode estar relacionada com defeitos na sua síntese ou com uma diminuição da sua libertação, em resposta à oclusão venosa, a partir da parede dos vasos sanguíneos. Esta deficiência é considerada um potencial mecanismo para o desenvolvimento de trombose [12]. É transmitida de forma autossómica dominante e é muito rara [15].
- **Aumento do PAI-1** – Têm sido descritas várias anomalias genéticas associadas ao inibidor do activador tecidual do plasminogénio (PAI-1), que funciona como o principal inibidor circulante da fibrinólise [11]. Esta mutação no gene do PAI-1 está associada a um aumento do risco de trombose venosa e arterial [12].

Os indivíduos homozigóticos para o alelo 4G/4G têm um nível 3 a 5 vezes superior de PAI-1 circulante com subsequente inibição do sistema fibrinolítico e desenvolvimento de um estado de hipercoagulabilidade [11].

## Hiperhomocisteinémia

A homocisteína é um aminoácido derivado da metionina, é metabolizado através de uma reacção de remetilação (Figura 6.) [11,22] e normalmente circula no plasma com uma concentração de 5 – 16  $\mu\text{mol/L}$ . A hiperhomocisteinémia é um estabelecido factor de risco de trombose venosa e arterial e pode ser exacerbada pela deficiência de cofactores do metabolismo da metionina como a vitamina B6, a vitamina B12 e o ácido fólico. A hiperhomocisteinémia induz uma disfunção endotelial (com perda das propriedades vasodilatadoras e antitrombóticas dependentes do endotélio) e proliferação do músculo liso vascular, ambos processos-chave nos modelos actuais de aterogénese e trombose.



**Figura 6.** – Metabolismo da homocisteína.

[Retirado de 11]

Esta perturbação pode ser classificada em três categorias de acordo com o aumento da concentração plasmática da homocisteína, em jejum:

- Grave – concentração superior a 100  $\mu\text{mol/L}$ ;
- Moderada – valores de concentração entre 25 e 100  $\mu\text{mol/L}$ ;
- Ligeira – valores de concentração entre 16 e 24  $\mu\text{mol/L}$ .

As formas graves resultam da deficiência homozigótica autossómica recessiva de cistationina β-sintase ou da metileno-tetra-hidro-folato redutase (MTHFR) e manifestam-se com sintomatologia neurológica, aterosclerose prematura e tromboembolismo

recorrente. As formas ligeiras e moderadas resultam das deficiências autossômicas dominantes (heterozigotia) de cistationina  $\beta$ -sintase ou, com mais frequência, da homozigotia para a variante termolábil de MTHFR C667T [11]. O polimorfismo C677T da MTHFR, enzima importante no metabolismo da homocisteína, leva a uma redução de mais de 50% da actividade da MTHFR [22]. A sua prevalência, na população caucasiana, é de cerca de 10% (Tabela 3.).

### **Aumento da Actividade do Factor VIII**

A presença de níveis basais elevados de Factor VIII tem provavelmente uma causa genética, em alguns casos, parece haver um padrão hereditário, embora ainda não tenha sido identificado um polimorfismo ou uma mutação em concreto, e está associada a um risco aumentado para o desenvolvimento de trombose venosa [11,22]. Tem uma prevalência de cerca de 11% na população geral (Tabela 3.) [22].

## 5. AVALIAÇÃO LABORATORIAL DAS TROMBOFILIAS

A investigação laboratorial das trombofilias deve ser efectuada de forma criteriosa (Tabela 4.). Um rastreio excessivo ou inapropriado pode ser mais lesivo do que benéfico para o paciente [9,24].

**Tabela 4.** – Critérios para o rastreio das trombofilias hereditárias e adquiridas.

<b>História pessoal ou familiar de trombose venosa</b>
<b>Trombose antes dos 50 anos na ausência de factores de risco transitórios</b>
<b>Tromboembolismo recorrente</b>
<b>Trombose atípica</b> (mesentérica, esplénica, hepática, renal, cerebral)
<b>Parente do primeiro grau com mutação específica</b>
<b>Patologia obstétrica</b> (excluir trombofilia adquirida - SAAF) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Uma ou mais mortes <i>in utero</i> inexplicadas de fetos morfologicamente normais (&gt;10 semanas de gestação)</li> <li>• Três ou mais abortos espontâneos consecutivos (&lt;10 semanas), excluídas causas anatómicas e cromossómicas</li> <li>• Um ou mais nascimentos prematuros (&lt;34 semanas), de fetos morfologicamente normais, associados a eclâmpsia ou pré-eclâmpsia grave ou insuficiência placentar.</li> </ul>

Perante uma suspeita de trombofilia devem ser pedidas análises e estudos genéticos (Tabela 6.), das quais deve fazer parte um estudo imunológico sumário se houver clínica sugestiva de doenças autoimunes [9].

No rastreio das trombofilias é fundamental tomar precauções na requisição e interpretação dos resultados laboratoriais (Tabela 5.) [9,24].

Na fase aguda da trombose venosa e nos indivíduos sob anticoagulação oral alguns resultados laboratoriais podem ser falseados ou difíceis de interpretar. A gravidez e a

terapêutica com estrogénios (contraceção oral ou terapêutica hormonal de substituição) diminuem a proteína S circulante. Os testes genéticos podem ser realizados em qualquer altura, uma vez que os seus resultados não são influenciados por factores externos [22].

**Tabela 5.** – Precauções na requisição e na interpretação dos resultados laboratoriais.

Não fazer o estudo das trombofilias durante o episódio trombótico agudo (aguardar 6 meses)

Não fazer o estudo sob efeito de terapêutica anticoagulante (heparina ou anticoagulantes orais - aguardar 6 semanas após término da terapêutica)

O síndrome nefrótico, as hepatopatias, os contraceptivos orais e a terapêutica hormonal de substituição diminuem a concentração dos anticoagulantes orais

A gravidez aumenta o factor VIII e diminui a proteína S (ter em conta os valores de referência para os vários trimestres)

Excluir hiperhomocisteinémia secundária adquirida por deficiência de ácido fólico, vitamina B6 e B12.

Após serem consideradas as condições acima referidas, o rastreio das trombofilias (Tabela 6.) deve então começar por uma contagem de plaquetas e pelo estudo básico da coagulação (tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial activado, doseamento do fibrinogénio), devendo ter em conta o seguinte:

- A anticoagulação oral aumenta o *International Normalized Ratio* (INR) e o TP;
- A heparina não fraccionada, ao contrário da heparina de baixo peso molecular, altera o aPTT;
- O fibrinogénio aumenta fisiologicamente com a gravidez e em várias situações patológicas [9,11].

**Tabela 6.** – Avaliação laboratorial das trombofilias.

**Avaliação global da coagulação**

Contagem de plaquetas  
Tempo de Protrombina TP - INR  
Tempo de Tromboplastina Parcial aPTT  
Fibrinogénio

**Anticoagulantes naturais**

Antitrombina  
Proteína C  
Proteína S (total e fracção livre)

**Actividade do Factor VIII**

**Anticoagulante lúpico**

**Anticardiolipina IgM e IgG**

**Homocisteinemia em jejum**

**Genotipagem de mutações com risco trombótico**

Protrombina G20210A  
Teste de resistência à proteína C activada (VR 2-5)  
Factor V de Leiden  
Pesquisa da mutação FVL apenas se RPCA (Ratio) < 2  
Não requisitar por rotina:  
MTHFR (variantes C677T e A1298C)  
Doseamento de PAI-1 plasmático

**Proteína C, Proteína S e Antitrombina**

A determinação da actividade antigénica da proteína C, da proteína S (livre e total) e da antitrombina é efectuada através de testes imunorreativos que detectam, quer defeitos quantitativos, quer qualitativos ou funcionais. A terapêutica com heparina induz um declínio nos níveis de antitrombina e os anticoagulantes orais têm o mesmo efeito nas concentrações das proteínas C e S. Se os níveis de actividade da proteína S estiverem diminuídos, a determinação das duas fracções, livre e total (funcional), permite definir melhor o defeito, uma vez que a gravidez diminui a actividade desta proteína. Em alguns casos de deficiência hereditária de proteína S é possível encontrar níveis baixos da fracção livre com concentrações normais ou *borderline* da proteína S total.

Os testes para a avaliação da actividade das proteínas C e S podem mostrar valores falsamente positivos se a mutação para o Factor V de Leiden estiver presente, pelo que é importante excluir esta mutação perante valores alterados destas proteínas [9].

### **Teste de Resistência à Proteína C Activada**

O teste de resistência à proteína C activada (valor de referência 2 – 5) é um teste funcional de rastreio que serve para excluir a mutação para o Factor V de Leiden. Uma RPCa (*Ratio*) inferior a 2 significa que há resistência e implica a genotipagem para o fator V de Leiden, efectuada a partir na análise do ADN (ácido desoxirribonucleico) obtido a partir de células mononucleares do sangue periférico. Na gravidez ocorre frequentemente uma resistência fisiológica à proteína C ativada, devido à diminuição dos níveis de proteína S, pelo que é necessário a identificação da mutação do Fator V de Leiden, por PCR (*polymerase chain reaction*), para fazer o diagnóstico [9].

### **Mutação G20210A do Gene da Protrombina**

O diagnóstico da presença do alelo para a mutação da protrombina G20210A assenta na análise de ADN [9].

### **Hiperhomocisteinémia**

A hiperhomocisteinémia pode ser diagnosticada pelo doseamento da homocisteína em jejum, por cromatografia gasosa ou por outro método bioquímico (ou por imunoensaios enzimáticos). A sobrecarga com metionina melhora a sensibilidade diagnóstica da técnica. Perante um diagnóstico de hiperhomocisteinémia ( $\geq 16 \mu\text{mol/L}$ ) é preciso excluir uma deficiência em vitaminas B6, B12 e ácido fólico, envolvidos na regulação e controlo do ciclo da metionina e dos níveis de homocisteína (hiperhomocisteinémia adquirida).

Por se tratar de uma mutação com elevada prevalência na população geral, mas com baixo risco trombótico, actualmente não está indicada a genotipagem para a variante da mutação da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR C677T) [9].

### **Aumento da Actividade do Factor VIII**

Um aumento de actividade do Factor VIII constitui um factor independente de risco trombótico no adulto e no período neonatal, estando associado ao tromboembolismo recorrente. Enquanto não surgem estudos que determinem a base molecular e genética

subjacente ao aumento da concentração plasmática do Factor VIII, associado a fenómenos tromboembólicos, é necessário excluir sempre uma “reação de fase aguda” através dos doseamentos do fibrinogénio, da proteína C reactiva e da velocidade de sedimentação [9].

### **Disfibrinogenémia**

Para o rastreio das disfibrinogenémias recomenda-se a realização de testes funcionais e imunológicos para o fibrinogénio bem como a determinação do tempo de trombina [9]. A disfibrinogenémia congénita associada a trombose deve-se suspeitar em indivíduos com tempo de trombina (TT) prolongado e redução leve a moderada da concentração plasmática de fibrinogénio [25].

### **Alterações da fibrinólise**

Para a detecção da deficiência em plasminogénio recomenda-se o uso de testes funcionais (utilização de substratos cromogénicos) que permitem a distinção entre alterações quantitativas e qualitativas. A actividade do tPA é medida por ensaios cromogénicos e a actividade antigénica por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). A actividade do PAI-1 é medida em plasma citratado através de um método de titulação por retorno. É preciso ter em conta que a actividade fibrinolítica exibe um ritmo diurno, ou seja, de manhã a fibrinólise está diminuída devido a picos nos níveis de PAI-1 e ao final do dia está aumentada em resultado de níveis baixos de PAI-1, pelo que as amostras de plasma devem ser obtidas num período padronizado [12].

### **Síndrome dos Anticorpos Antifosfolipídicos**

De forma a facilitar a consistência do diagnóstico de síndrome dos anticorpos antifosfolipídicos (SAAF), estão definidas recomendações consensuais relacionadas com os critérios clínicos (trombose vascular e morbilidade obstétrica) e com os critérios laboratoriais (anticorpos anticardiolipina e anticoagulante lúpico).

Deve estar presente pelo menos um critério clínico e um critério laboratorial para se efectuar o diagnóstico de SAAF [11,26]. Os testes serológicos devem ser consistentes e positivos, em pelo menos, duas ocasiões com seis semanas de diferença, de forma a excluir anticorpos transitórios, como os induzidos pela infecção, e que normalmente não têm tradução clínica. O anticoagulante lúpico apresenta uma maior correlação com a

trombose, relativamente aos anticorpos anticardiolipina. Em relação aos anticorpos anticardiolipina, as imunoglobulinas da classe IgG têm maior significado clínico do que as da classe IgM. Nenhum teste isolado atinge a máxima sensibilidade e especificidade, pelo que são sempre necessários múltiplos testes para uma correcta identificação de doentes com risco de doença vascular [11].

Na prática clínica são utilizados dois tipos de testes para identificar os anticorpos antifosfolípidos. O anticoagulante lúpico é detectado através de testes de coagulação e os anticorpos antifosfolípidos contra proteínas específicas (anticardiolipina e anti- $\beta_2$ -glicoproteína I) são determinados através de testes de ELISA. São necessários quatro critérios para comprovar a presença de anticoagulante lúpico, o prolongamento de um teste de rastreio dependente de fosfolípidos, a ausência de correcção após a adição de plasma normal, o encurtamento do tempo de coagulação após a adição de fosfolípidos e a exclusão de factores inibitórios específicos, tais como anticorpos dirigidos aos Factores VIII e V. Uma vez que os anticorpos antifosfolípidos podem ser transitórios e secundários a outras patologias, recomenda-se a sua repetição com pelo menos doze semanas de intervalo [9].

É ainda de referir que a avaliação laboratorial de um estado pré-trombótico, apesar não estar integrada no contexto da avaliação laboratorial dos factores de risco de trombose, é importante pois pode excluir um diagnóstico de trombose. Esta avaliação pode ser efectuada através da medição dos níveis de produtos de degradação da fibrina, Dímero-D, que se encontram geralmente aumentados na presença de trombose venosa. A ausência de níveis elevados de Dímero-D, em pacientes com suspeita de TVP ou TEP pode excluir o diagnóstico de trombose, pelo que este teste apresenta um bom valor preditivo negativo [12].

## **6. CONCLUSÃO**

Os factores de risco para o desenvolvimento de trombose estão divididos em dois grupos fundamentais, os factores de risco adquiridos, nomeadamente a imobilização prolongada e a idade, e os que conduzem a um estado de hipercoagulabilidade, ou trombofilias, que podem ser hereditários ou adquiridos. A trombose é um exemplo de uma doença de natureza multicausal (ou complexa), onde os factores de risco, adquiridos e hereditários, desempenham um papel importante.

O rastreio das trombofilias tem como objectivo detectar as causas mais frequentes e bem definidas de tromboembolismo. O rastreio universal das trombofilias não está recomendado, pelo que a sua avaliação laboratorial só deve ser efectuada após minuciosa avaliação clínica.

Enquanto são aguardados mais estudos para uma correcta identificação dos factores de risco associados à trombose, de forma a evitar erros de interpretação e terapêuticas desnecessárias, é importante a existência de uma conduta que assente no bom senso clínico e na experiência dos especialistas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] – <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cardiovascular-diseases/cardiovascular-diseases2>
- [2] – Portugal Doenças Cérebro-Cardiovasculares em números – 2013. Programa Nacional para as Doenças Cérebro-Cardiovasculares. ISSN: 2183-0681. Setembro 2013. Direcção-Geral da Saúde. Portugal.
- [3] – <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>
- [4] – Pinto AM. Fisiopatologia fundamentos e aplicações. Lisboa: Lidel; 2007. 978-972-757-429-2.
- [5] – Marques MC. Apontamentos da cadeira de patologia geral e semiologia laboratorial, II Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2009.
- [6] – Reitsma PH, Franco RF. Genetic risk factors in thromboembolic disease. *Haematologica* (ed. esp.) 2003;87:239-242.
- [7] – Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. *Essential haematology*. 5ª ed. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2006. 978-1-4051-3649-5.
- [8] – Cooper JA, Miller GJ, Bauer KA, et al. Comparison of novel hemostatic factors and conventional risk factors for prediction of coronary heart disease. *Circulation* 2000;102:2816-22.
- [9] – Lima J, Borges A. Rastreo de trombofilias. *Boletim da Sociedade Portuguesa da Hemorreologia e Microcirculação* 2012;27(4):5-11.
- [10] – Amaral E. Coagulação e fibrinólise, XI Curso Pós-Graduação e Actualização em Hematologia Coagulopatias e Trombose da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2011.
- [11] – Lima J. Trombofilias e gravidez. *Boletim da Sociedade Portuguesa da Hemorreologia e Microcirculação* 2006;21(3):6-23.
- [12] – Greer JP, et al. *Wintrobe's clinical hematology*. 11ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. 0-7817-3650-1.
- [13] – Fontcuberta J. Nuevos aspectos en la patogénesis de la trombosis. *Haematologica* (ed. esp.) 2011;96(1):255-260.
- [14] – <http://labpath.blogspot.pt/2012/02/trombose.html>

- [15] – Carvalho CS. Trombofilias familiares e adquiridas, XI Curso Pós-Graduação e Atualização em Hematologia Coagulopatias e Trombose da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2011.
- [16] – Kotteke-Marchant K. The role of coagulation in arterial and venous thrombosis. In “Contemporary cardiology: antithrombotic drug therapy in cardiovascular disease”. New York; 2010. 978-1-60327-235-3-2.
- [17] – Lowe GDO. Common risk factors for both arterial and venous thrombosis. *British Journal of Haematology* 2008;140:488-495.
- [18] – Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM, Martinelli I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus* 2011;9:120-38.
- [19] – Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombotic disease. *Thrombosis and Haemostasis* 1999;82(2):610-619.
- [20] – Cushman M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Semin Hematol* 2007;44(2):62-69.
- [21] – Lijfering WM, Flinterman LE, Rosendaal FR, et al. Relationship between venous and arterial thrombosis: a review of the literature from a causal perspective. *Semin Thromb Hemost* 2011;37:885-896.
- [22] – Mota F, Gonçalves LR, Mansilha A. Rastreio de trombofilia hereditária no contexto de trombose venosa profunda. *Angiologia e Cirurgia Vascular* 2011;7(3):126-137.
- [23] – Rosendaal FR, Reitsma PH. Genetics of venous thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009;7(1):301-304.
- [24] – Mackie I, Cooper P, Lawrie A, et al. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *International Journal of Laboratory Hematology* 2013;35:1-13.
- [25] – Lewis SM, Bain BJ, Bates I. *Dacie and lewis practical haematology*. 10ª ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2006. 0-443-06660-4.
- [26] – Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statment on an update of the classification criteria for defenite antiphospholipid syndrome (aps). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006;4:295-306.
- [27] – Serrano F. Trombofilias hereditárias e adquiridas. *Boletim da Sociedade Portuguesa da Hemorreologia e Microcirculação* 2008;23(3):9-16.