

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Relatório de Estágio:

Patogénese e Diagnóstico do Vírus de Epstein-Barr

Diana Rita Figueiredo Martins Rodrigues

Relatório orientado pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira

Mestrado em Análises Clínicas

2020

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Relatório de Estágio:

Patogénese e Diagnóstico do Vírus de Epstein-Barr

Diana Rita Figueiredo Martins Rodrigues

Relatório orientado pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira

Mestrado em Análises Clínicas

2020

Dedicatória

À minha querida avó Rosa, a minha melhor advogada de defesa.

Agradecimentos

Gostaria de iniciar este relatório agradecendo às pessoas que fizeram com que a sua execução fosse possível e a quem me acompanhou e apoiou nesta jornada.

Em primeiro lugar, agradeço a todos os docentes do Mestrado em Análises Clínicas, em destaque à Dra. Cristina Marques, pela experiência que foi este mestrado e que em nada ficou abaixo das minhas expectativas.

Agradeço ao Professor Doutor José Miguel Pereira, por ter aceitado orientar a minha monografia, tendo sido essencial na finalização deste projeto.

À Dra. Anabela Cunha, por ter supervisionado o meu estágio, pela sua orientação, sabedoria e cuidado, que me permitiram ter uma excelente experiência de estágio.

À Dra. Helena Cordeiro, por ter aceitado supervisionar o meu estágio de hematologia, pelas muitas horas que passou comigo, pela sua calma e simpatia e pelo muito que me ensinou.

Às equipas dos dois laboratórios onde passei, que me fizeram sentir integrada desde o primeiro momento, que me apoiaram, ensinaram e forneceram tudo o que precisei para terminar esta etapa com sucesso.

Aos meus pais, Lucília e Joaquim Rodrigues, sem os quais nada disto seria possível, porque sempre me deixaram seguir os meus sonhos e me apoiaram nos melhores e piores momentos.

À minha madrinha Lurdes e ao tio Carlos, pelas palavras de encorajamento e por sempre fazerem o melhor por mim.

Aos meus amigos pela paciência, carinho e suporte que me têm dado desde sempre.

E por último, não posso deixar de agradecer a todas as colegas do mestrado que me mostraram o que realmente é companheirismo, e de entre as quais tenho amigas para a vida.

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Relatório de Estágio

Diana Rita Figueiredo Martins Rodrigues

Estágio supervisionado pela Dra. Anabela Ribeiro Rodrigues Cunha

Mestrado em Análises Clínicas

2020

Resumo

O presente relatório de estágio descreve as atividades com que contactei no estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, que realizadas em dois laboratórios do grupo SynlabHealth II.

O relatório incide sobre as valências de Bioquímica e Hematologia e inclui a descrição dos equipamentos e métodos mais utilizados, fundamentos teóricos dos ensaios, tipo e conservação das amostras utilizadas, valores de referência, interpretação dos resultados e controlo interno e externo da qualidade.

Palavras-chave: Relatório de estágio; Mestrado em Análises Clínicas; Bioquímica; Hematologia.

Abstract

The present report describes the activities executed during the internship to complete the Clinical Analysis Master's degree that took place in two laboratories of the SynlabHealth II group.

The report focuses on the specialties of Biochemistry and Hematology and includes descriptions of the analyzers, theoretical principals for the essays used, types and conservations of samples, reference values, interpretation of results and internal and external quality control.

Key-words: Internship report; Clinical Analysis Master's degree; Biochemistry; Hematology.

Índice

Resumo.....	9
Abstract.....	9
Índice de figura.....	13
Índice de tabelas.....	15
Lista de abreviaturas.....	16
1 Introdução.....	19
2 Grupo SynlabHealth.....	20
3 Bioquímica.....	21
3.1 Atellica CH 930.....	21
3.2 Ensaios	22
3.2.1 Metabolismo glucídico.....	22
3.2.1.1 Glucose (GluH)	23
3.2.2 Metabolismos lipídico	24
3.2.2.1 Colesterol (Chol)	25
3.2.2.2 Lipoproteínas.....	25
3.2.2.3 Triglicéridos (TRIG)	28
3.2.3 Metabolismo do ferro	29
3.2.3.1 Ferro (Iron).....	29
3.2.3.2 Transferrina (Trf)	30
3.2.3.3 Ferritina (Frt).....	31
3.2.3.4 Capacidade Total de Fixação do Ferro (TIBC)	31
3.2.4 Metabolismo ósseo e mineral	32
3.2.4.1 Cálcio (Ca)	32
3.2.4.2 Magnésio (Mg).....	33
3.2.4.3 Fósforo inorgânico (IP)	34
3.2.5 Função Hepática e Biliar	35
3.2.5.1 Aminotransferases	36
3.2.5.2 Bilirrubinas.....	37
3.2.5.3 Gama-glutamil Transferase (GGT)	39
3.2.5.4 Fosfatase alcalina (ALP)	40
3.2.5.5 Proteínas totais (TP).....	41
3.2.6 Função Pancreática.....	41

Relatório de Estágio

3.2.6.1	Amilase (Amy)	42
3.2.6.2	Lipase (Lip)	42
3.2.7	Função renal e equilíbrio acido-base	43
3.2.7.1	Ureia Nitrogenada (UN)	43
3.2.7.2	Ácido úrico (UA)	44
3.2.7.3	Creatinina (Crea)	45
3.2.7.4	Microalbumina (μ ALB)	46
3.2.7.5	Ionograma	47
3.2.8	Função Muscular	48
3.2.8.1	Creatina-quinase (CKNAC)	48
3.2.8.2	Lactato desidrogenase (LDH)	49
3.3	Atellica IM 1600	50
3.3.1	Equilíbrio Hormonal	51
3.3.1.1	Hormona Paratiroideia (PTH)	51
3.3.1.2	Prolactina (PRL)	52
3.3.1.3	Hormona Luteínica e Hormona folículo-estimulante (LH e FSH)	52
3.3.1.4	Hormonas da tiroide	53
3.3.2	Marcadores Tumorais	54
3.3.2.1	Antigénio específico da próstata (PSA)	54
3.3.2.2	CEA	54
3.3.2.3	CA 19.9	55
3.3.2.4	CA 125	55
3.3.2.5	CA 15.3	55
3.4	Análise de desempenho do Atellica Solutions	56
3.5	Perfil proteico	58
3.6	Urina II	61
4	Hematologia	63
4.1	Amostras	63
4.2	Esfregaço de sangue periférico	63
4.2.1	Coloração	64
4.3	Sistema SYSMEX XN-1000	65
4.3.1	Deteção de corrente direta (DC)	66
4.3.2	Método SLS	67
4.3.3	Citometria de fluxo fluorescente	68
4.3.3.1	Canal WDF	69

Relatório de Estágio

4.3.3.2	Canal WNR	70
4.3.3.3	Canal RET	71
4.3.3.4	Canal PLT-F.....	71
4.3.4	Cálculo de parâmetros eritrocitários.....	72
4.4	Valores de Referência do Hemograma.....	72
4.5	Observação de lâminas ao microscópio ótico	74
4.6	Velocidade de sedimentação globular	78
4.6.1	Ves-Matic Cube 30.....	80
4.7	Estudo da Coagulação	80
4.7.1	BCS XP System	82
4.8	Pesquisa de <i>Plasmodium</i>	84
4.9	Eletroforese das hemoglobinas.....	86
4.9.1	Capillarys Hemoglobin (E)	87
4.10	Imunofenotipagem por Citometria de fluxo fluorescente	88
4.10.1	Citometro Navios EX.....	89
4.11	Casos clínicos.....	90
4.11.1	Anemia das células falciformes.....	90
4.11.2	Síndrome Mielodisplásico.....	93
4.11.3	Leucemia Mieloide Aguda	95
4.11.4	Mieloma Múltiplo	97
5	Avaliação Externa da Qualidade.....	103
6	Conclusão.....	104
	Referência Bibliográficas.....	103
	Monografia: Patogênese e Diagnóstico do Vírus de Epstein-Barr.....	109

Índice de figuras

Figura 1 Analisador Atellica CH 930	21
Figura 2 Distribuição normal das proteínas por electroforese.....	58
Figura 3 Analisador Clinitek Novus	61
Figura 4 Cassetes de urianalise Clinitek Novus	61
Figura 5 Exemplificação do procedimento do esfregaço de sangue periférico	64
Figura 6 Equipamento automático para realizar colorações Poly Stainer da NEUTec .	65
Figura 7 Sistema Sysmex XN-1000.	65
Figura 8 Câmara do detetor por método de impedância.....	66
Figura 9 Impulsos elétricos gerados pelas células quando passam entre os eléctrodos	67
Figura 10 Histogramas de distribuição do volume de plaquetas e de eritrócitos.	67
Figura 11 Reação de SLS com a hemoglobina	68
Figura 12 Câmara de deteção do complexo SLS-HBG	68
Figura 13 Esquema do método de citometria de fluxo utilizado pelo equipamento.....	69
Figura 14 Posicionamento dos grupos de células detetados pelo canal WDF.....	70
Figura 15 Posicionamento dos grupos de células diferenciados pelo canal WNR.....	70
Figura 16 exemplo de <i>scattergram</i> obtido pelo canal RET	71
Figura 17 exemplo de <i>scattergram</i> obtido pelo canal PLT-F.....	72
Figura 18 Equipamento Ves-Matic Cube 30.	80
Figura 19 Cascata da Coagulação	81
Figura 20 Teste rápido para deteção de infeções por malária BinaxNOW da Abott	85
Figura 21 Perfil eletroforético das hemoglobinas normal obtido pelo sistema Capillarys Hemoglobin (E).	88
Figura 22 Citometro Navios EX da Beckman Coulter	90
Figura 23 Resultados do hemograma da criança de 2 anos. Imagem obtida durante o estágio.....	91
Figura 24 Imagem de microscopia ótica do sangue da utente, objetiva 100x. Imagem obtida durante o estágio.....	91
Figura 25 Resultados da eletroforese das hemoglobinas. Imagem obtida durante o estágio.....	92
Figura 26 Hemograma do utente. Imagem obtida durante o estágio.	93
Figura 27 Hemograma e testes da coagulação da utente. Imagem obtida durante o estágio.....	96
Figura 28 Observação de esfregaço de sangue periférico da utente, objetiva de 100x. Imagem obtida durante o estágio.....	96
Figura 29 Hemograma da utente. Imagem obtida durante o estágio.	98
Figura 30 Observação do esfregaço de sangue periférico da paciente onde é possível ver a presença de rouleaux e um plasmócito. Imagens obtidas durante o estágio.....	98
Figura 31 Eletroforese das proteína séricas da utente. Imagem obtida durante o estágio.	99

Relatório de Estágio

Figura 32 Resultados da pesquisa de Imunoglobulinas e cadeias leves na urina da utente. Imagem obtida durante o estágio.	100
Figura 33 Imunofixação e doseamento de imunoglobulinas no soro. Imagem obtida durante o estágio.	100
Figura 34 Resultado do mielograma da utente. Imagem obtida durante o estágio.	101

Índice de tabelas

Tabela 1 interpretação clínica do Ionograma em plasma/soro e urina	47
Tabela 2 Ensaios realizados no analisador Atellica IM	51
Tabela 3 Análise de desempenho de Atellica Solution.....	57
Tabela 4 Interpretações clínicas dos principais perfis eletroforéticos.....	59
Tabela 5 Princípios dos métodos utilizados pelo equipamento CLINITK Novus	61
Tabela 6 Valores de referência do hemograma completo	72
Tabela 7 Classificação das anemias segundo o VGM.....	73
Tabela 8 Classificação das anemias segundo o CHGM.....	73
Tabela 9 Distúrbios na contagem de leucócitos.	74
Tabela 10 Principais significados clínicos dos achados na observação de esfregaços de sangue ao microscópio	75
Tabela 11 Fatores de coagulação, substâncias de ativação e suas funções.	81
Tabela 12 Observação ao microscópio de infecções por <i>Plasmodium</i> . Imagens recolhidas durante o estágio.	85
Tabela 13Imunofenótipos característicos de algumas linhagens de células e distúrbios linfoproliferativos.....	89
Tabela 14 Classificação de SMD segundo a OMS.....	94

Lista de abreviaturas

μALB	Microalbumina
4-AAP	4-aminofenazona
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
AFP	Alfa fetoproteína
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
AMP	2-amino-2-metil-1-propanol
Amy	Amilase
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Trifosfato de Adenosina
Ca	Cálcio
CEA	Antigénio Carcinoembrionário
CHGM	Concentração da hemoglobina globular média
Chol	Colesterol Total
CKNAC	Creatinina-quinase
Cl	Cloro
CQI	Controlo da qualidade interno~
Crea	Creatinina
D-Bil	Bilirrubina Direta
DC	Corrente Direta
DGGMR	Éster de 1,2-o-dilauril-rac-glicerol-3-ácido-glutárico-(6'-metilresorufina)
D-HDL	Colesterol HDL Direto
DLDL	Colesterol LDL Direto
Ed-G7PNP	p-nitrofenil-maltoheptósido bloqueado por etileno
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Egtazic acid
FAB	Franco-Americano-Britânica
FFC	<i>Fluorescent Flow Cytometry</i>
Frt	Ferritina
FSC	<i>Forward-scattered Light</i>
FSH	Hormona foliculoestimulante
G6P	Glicose-6-fosfato
G6PD	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
GGT	Gama-glutamyl Transferase

Relatório de Estágio

GluH	Glicose Hexoquinase
Hb	Hemoglobina
HBA	Hospital Beatriz Angelo
HDL	High Density Lipoprotein
HGM	Hemoglobina globular média
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HRPII	Proteína II rica em histidina
Ht	Hematócrito
Ig G Rub	Imunoglobulinas G Rubéola
IG	Granulócitos Imaturos
IgG Toxo	Imunoglobulinas G da Toxoplasmose
IgM Rub	Imunoglobulinas M Rubéola
IgM Toxo	Imunoglobulinas M Toxoplasmose
IMT	Tecnologia de multisensores integrada
INR	Índice internacional normalizado
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
IP	Fósforo inorgânico
Iron	Ferro
K	Potássio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LD	Lactato desidrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Hormona Luteínica
Lip	Lipase
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
Mg	Magnésio
MM	Mieloma Múltiplo
Na	Sódio
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzido
NEQAS	<i>United Kingdom External Quality Assessment Schems</i>
NRBC	Eritrócitos Nucleados
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDW	Disperção de volume de plaquetas
p-NP	p-nitrofenol
p-NPP	p-nitrofenilfosfato
PSA	Antigénio Específico da Próstata

Relatório de Estágio

PTH	Hormona paratiroideia
PTOG	Prova da tolerância oral à glicose
RDW	Disperção de volume de eritrócitos
RIQAS	<i>Randox International Quality Assessment Schems</i>
RLUs	Unidades de luz relativas
Rpm	Rotações por minuto
SEQC	Sociedade Espanhola de Bioquímica Clínica e Patologia Molecular
SFC	<i>Side Fluorescent Light</i>
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SLS	Laurel-sulfato de sódio
SMD	Síndrome Mielodisplásico
SSC	<i>Side-scattered Light</i>
T.A.	Temperatura Ambiente
T3	Triiodotironina
T3L	Triiodotironina Livre
T4	Tiroxina
T4L	Tiroxina Livre
TBG	Globulina ligadora da tiroxina
TBil	Bilirrubina Total
TIBC	Total Iron Binding Capacity (Capacidade Total de Fixação do Ferro)
TP	Proteínas totais
TP	Tempo de Protrombina
Trf	Transferrina
TRIG	Triglicéridos
TSH	Hormona tiroestimulante
UA	Ácido úrico
UN	Ureia nitrogenada
VGM	Volume globular médio
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VSG	Velocidade de Sedimentação Globular
vWF	Fator de von Willebrand

1 Introdução

O estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas foi realizado sob a supervisão da Dra. Anabela Cunha especialista em Análises Clínicas, em dois laboratórios do grupo SynlabHealth II.

O objetivo do estágio foi a minha integração nas equipas multidisciplinares de ambos os laboratórios e o acompanhamento das tarefas realizadas durante o dia-a-dia, aplicando os conhecimentos teóricos adquiridos na fase curricular do curso.

O estágio teve início no mês de Março de 2019 e terminou em Outubro do mesmo ano, sendo constituído por 1080 horas repartidas pelas valências de Bioquímica, Hematologia e Microbiologia. Os estágios de Bioquímica e Microbiologia decorreram no laboratório central de Lisboa e o de Hematologia teve lugar no laboratório do Hospital Beatriz Ângelo (HBA) em Loures e foi complementado com mais uma semana na secção de Hematologia do laboratório central.

No presente relatório são exploradas em mais detalhe as valências de Bioquímica e Hematologia, com especial atenção para descrição dos equipamentos usados, fundamentos teóricos dos ensaios e procedimentos mais utilizados, tipo e conservação das amostras, valores de referência dos parâmetros, interpretação dos resultados e controlo da qualidade interno e externo.

2 Grupo SynlabHealth

A história do grupo Synlab inicia-se com a criação de dois grupos de laboratórios, a Synlab em 1968 e a Labco em 2004. Ambas as marcas trabalhavam no mesmo ramo e partilhavam valores e estratégias similares, trabalhando arduamente para fornecer serviços de qualidade para diagnóstico médico. Em 2015 as duas empresas uniram-se formando o grupo Synlab atual.

A combinação das redes de localizações e da variedade de testes realizados pelas duas empresas permitiu a presença do grupo em 40 países espalhados por 4 continentes.

Em Portugal o grupo apresenta uma vasta rede de postos de colheitas por todo o país e duas grandes centrais, em Lisboa e no Porto. Está presente também em muitos hospitais privados com laboratórios periféricos localizados dentro dos mesmos.

O grupo Synlab mantém níveis de qualidade sustentados pelas normas ISO 9001, ISO 15189 e Manual de Boas Práticas Laboratoriais.¹

Os laboratórios do grupo utilizam o sistema informático Apollo desenvolvido pelo grupo Confidentia que permite armazenar toda a informação relacionada com o funcionamento dos laboratórios, desde a fase pré-analítica, analítica e pós-analítica, bem como os serviços de gestão e finanças. Na fase analítica o sistema está conectado a todos os equipamentos automáticos utilizados, enviando informação sobre os ensaios a realizar em cada amostra e recebendo os resultados. É também nele que são validados tecnicamente e biopatologicamente todos os resultados.

O Grupo SynlabHealth implementou o software Unity para monitorização do controlo da qualidade interno. Todos os sistemas automáticos enviam os resultados do controlo da qualidade para este sistema informático onde são analisados em gráficos de Levey-Jennings e segundo as regras de Westgard, quando há uma quebra nas regras o sistema permite deixar comentários sobre a ocorrência e o que foi feito para retificar a situação (ex.: repetir com nova alíquota de amostra controlo, calibração, etc.).

3 Bioquímica

3.1 Atellica CH 930

O analisador Atellica CH 930 da casa comercial Siemens é um analisador de química clínica com capacidade para realizar testes usando tecnologia de electrólitos (IMT) e fotometria.

Permite a realização de até 1800 testes por hora, sendo a sua capacidade de 1200 testes/hora em fotometria e 600 testes/hora no sistema IMT.



Figura 1 Analisador Atellica CH 930²

É capaz de processar amostras de diferentes líquidos biológicos: plasma, soro, líquido cefalorraquidiano, urina e sangue total (testes específicos).

O analisador controla a viabilidade da amostra introduzida para teste nomeadamente verificando a existência de coágulos, detecção de bolhas, amostra insuficiente, e medindo os índices de hemólise, icterícia e lipémia.

Para os ensaios de espectrofotometria são aspirados 50µl de amostra, que são diluídos com 200 µl de diluente CH, este volume permite produzir até 15 resultados. No sistema IMT são aspirados 25µl de amostra que é diluída de 1:10 para produzir os três resultados do ionograma.

O prato de diluição tem 115 cuvetes separadas em 5 segmentos de 23 cada. Após a diluição da amostra e a aspiração para o local de reação as cuvetes são lavadas extensivamente para diminuir o risco de *carry-over*.

O prato de reação tem 211 cuvetes reutilizáveis separadas em 13 segmentos de 17 cuvetes cada, que podem ser substituídas em bloco conforme as necessidades. As cuvetes de reação estão mergulhadas dentro de um banho quente a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,3$. O prato de reação roda de forma a colocar cada cuvette de reação na posição de leitura. A cuvette é então irradiada por uma lâmpada de halogénio de 50W suplementada por um LED de 340nm. A luz que atravessa a cuvette é detetada por um fotómetro com 11 comprimentos de onda fixos (340nm, 410nm, 451nm, 478nm, 505nm, 545nm, 571nm, 596nm, 658nm, 654nm, 805nm).

Os resultados são calculados segundo o tipo de ensaio utilizado podendo ser: reação a ponto final, taxa reacional, reação a dois pontos ou correlação com branco de reação.

O equipamento possui dois pratos de armazenamento de reagentes com 70 posições cada. Os reagentes são mantidos refrigerados. Cada ensaio tem um par de reagentes que funcionam em duplas (R1 e R2) que devem estar simultaneamente carregados no equipamento. No total podem estar 70 ensaios a bordo do analisador. Na entrada de reagentes existe um leitor de código de barras que permite ao sistema identificar o reagente antes de o armazenar. Automaticamente o sistema dá informação sobre o inventário de reagentes a bordo e notifica sobre a necessidade de calibração ou controlo dos ensaios.

No módulo de entrada e saída das amostras existe um compartimento refrigerado com capacidade para 60 tubos, onde se podem carregar amostras de controlo interno para que o analisador possa efetuar as suas funções de controlo e calibração automáticas. Antes da abertura do laboratório, por volta da 6 horas da manhã, o equipamento está programado para realizar as análises de controlo da qualidade, para que, quando os técnicos chegarem, possam ver os resultados e corrigir eventuais problemas. Os resultados de controlo da qualidade interno (CQI) são transmitidos para o sistema Unity onde são analisados em gráficos de Levey-Jennings e de acordo com as regras de Westgard.²

Ao início do dia são verificados os volumes dos reagentes que existem dentro dos módulos e carregam-se os reagentes necessários para o volume de testes que se prevê. Caso seja instalado a bordo um novo lote de reagente é necessário proceder à calibração do mesmo.

3.2 Ensaaios

3.2.1 Metabolismo glucídico

A glucose é a principal fonte de energia para os tecidos do corpo humano, sendo especialmente importante para o sistema nervoso, visto que é a única fonte de energia que consegue utilizar não sendo capaz de a armazenar.

Os níveis de glicose circulante são controlados principalmente pelo fígado e pelos músculos que a retiram de circulação. O aumento ou diminuição destes níveis é influenciado por diversas hormonas como: insulina, glucagina, cortisol e hormona do crescimento.

Quando atinge o limite de filtração glomerular (160-180 mg/dl) a glicose é filtrada do sangue pelos rins e excretada na urina, chamando-se a este acontecimento glicosúria.

O doseamento da glicémia conjuntamente com a determinação da hemoglobina A1c são ensaios importantes no diagnóstico e controlo dos distúrbios do metabolismo dos glúcidos, sendo estes: diabetes, tolerância diminuída à glucose e tolerância diminuída em jejum.

Para o diagnóstico da Tolerância diminuída à glucose procede-se à Prova da Tolerância à Glicose Oral (PTGO). A prova consiste na administração ao utente de uma sobrecarga de glucose (adultos: 75g, crianças: 1.75 g/Kg até 75g), inicialmente é colhida uma amostra em jejum que corresponde ao tempo 0, seguida de vários momentos de colheita dependendo da indicação médica. Durante a prova o utente deve manter-se sentado e o mais relaxado possível, não pode ingerir nenhum tipo de alimento ou bebida que não seja água.

A hiperglicemia é a anomalia mais frequente e pode ser provocada por vários factores, de entre eles:

- Dieta rica em hidratos de carbono;
- Consumo de cafeína, nicotina e álcool;
- Stress;
- Contraceptivos orais;
- Jejum incorreto;
- Doseamento insuficiente de insulina exógena.

A hipoglicémia é menos frequente e pode ser provocada por:

- Exercício físico violento;
- Terapêutica excessiva com insulina exógena;
- Alcoolismo.

3.2.1.1 Glucose (GluH)

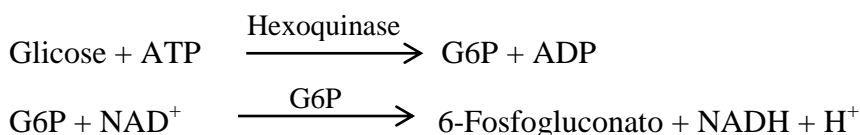
O ensaio Glucose Hexokinase (GluH) destina-se a ser utilizado no diagnóstico *in vitro* na determinação da concentração de glucose em amostras como soro, plasma, líquido cefalorraquidiano e urina.

Este ensaio baseia-se no ensaio de Slein e utiliza as enzimas hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase.

Durante este teste a glucose é fosforilada por trifosfato de adenosina (ATP) na presença de hexoquinase. A glicose-6-fosfato que se forma é oxidada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, esta reação provoca a redução do NAD (nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado) a NADH (nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzido).

A absorvância de NADH é medida numa reação a ponto final a 340/410 nm.

Equação de reação:



Conservação de amostras:

- Soro/plasma:
 - Até 8h à T.A.;

- Até 3 dias a 4°C;
- Urina:
 - Até 24h a 4°C;
- LCR:
 - Analisar de imediato se possível;
 - Até 24h a 4°C.

Valores de referência:

- Adulto: 74-106 mg/dl;
- Recém-nascido (1dia): 40-60 mg/dl;
- Recém-nascido (>1 dia): 50-80 mg/dl;
- Criança: 60-100 mg/dl;
- Urina: <0.5 mg/dl;
- Líquido cefalorraquidiano:
 - Adulto: 40-70 mg/dl;
 - Bebê/criança: 60-80 mg/dl;
- PTGO
 - Glicémia em jejum ≥ 126 mg/dl;
 - Glicémia ocasional ≥ 200 mg/dl;
 - Glicémia aos 120 min com 75g de glucose ≥ 200 mg/dl;
- Tolerância diminuída à glucose
 - Glicémia em jejum <126mg/dl;
 - Glicémia aos 120 min ≥ 140 e <200 mg/dl;
- Tolerância diminuída em jejum
 - Glicemia em jejum ≥ 110 e <126 mg/dl.³

3.2.2 Metabolismos lipídico

Os níveis de lípidos circulantes no sangue são associados ao risco do desenvolvimento de aterosclerose com consequências danosas para muitos vasos sanguíneos do corpo, com especial gravidade no caso dos vasos coronários. E, sendo assim, são uma importante ferramenta no controlo da saúde cardiovascular dos indivíduos.

O doseamento dos lípidos e lipoproteínas é reflexo de vários fatores e hábitos como: estilo de vida, características genéticas, obesidade, resistência à insulina e presença de co-morbilidades incluindo a *Diabetes Mellitus*.

3.2.2.1 Colesterol (Chol)

O colesterol é um lípido importante no corpo humano pois é constituinte das membranas celulares e regula a sua fluidez. Além disso é necessário para o metabolismo das vitaminas lipossolúveis incluindo A, D, E e K, e é o principal precursor da vitamina D e de várias hormonas, entre elas: cortisol, aldosterona, progesterona, estrogénio e testosterona.

Ainda que tenha uma vasta quantidade de funções no organismo a necessidade de ingestão de colesterol é diminuta pois a grande parte deste é sintetizado pelo próprio organismo, sendo que apenas 25% é de origem alimentar.

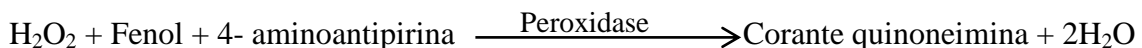
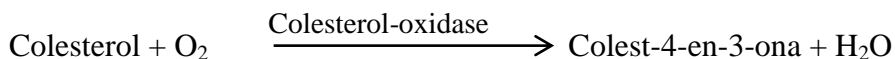
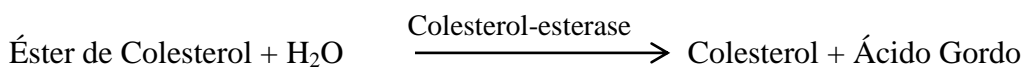
O aumento do nível de colesterol no sangue tem vindo a ser associado com o aumento do risco de doenças coronárias.

O ensaio Atellica CH Cholesterol destina-se ao doseamento *in vitro* da quantidade de colesterol em soro ou plasma (heparina lítio).

O ensaio baseia-se num método enzimático que utiliza a conversão do colesterol-esterase e colesterol-oxidase seguido de um ponto final de Trinder.

Durante este ensaio os ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima colesterol-esterase em colesterol e ácidos gordos livres. Em seguida ocorre a transformação do colesterol em colest-4-en-3-ona pela colesterol-oxidase na presença de oxigénio, dando origem ao peróxido de hidrogénio. A partir do peróxido de hidrogénio, da 4-aminoantipirina e fenol, forma-se um composto corado, catalisado pela peroxidase. A absorvância do composto é medida a 505/694 nm.

Equação de Reação:



Conservação de amostras:

- Até 8h à T.A.;
- Até 48h a 2-8°C;
- Períodos prolongados a -20°C;

Valores de Referência:

- Níveis de baixo risco (desejáveis): <200 mg/d;
- Níveis de risco moderado (limite): 200-239 mg/dl;
- Níveis de risco alto: ≥ 240 mg/dl.⁴

3.2.2.2 Lipoproteínas

As lipoproteínas são conjuntos de partículas com forma esférica cuja principal função é o transporte de partículas hidrofóbicas no sangue. Estes aglomerados são formados por uma membrana exterior, a qual é constituída por fosfolípidos, apolipoproteínas e colesterol livre. Estes orientam-se na membrana com a porção hidrofílica virada para o exterior e a parte lipossolúvel orientada para o interior. No interior estão os triglicéridos e o colesterol esterificado.

As lipoproteínas são categorizadas em função da sua densidade: as VLDL são a lipoproteínas de densidade muito baixa (*Very Low Density Lipoprotein*), as LDL (*Low Density Lipoprotein*) com uma densidade um pouco superior às VLDL e por último as com maior densidade são as HDL (*High Density Lipoprotein*)

As diferentes lipoproteínas interagem com as membranas das células, com proteínas, com enzimas e entre si, o que determina o seu ganho ou perda de triglicéridos e colesterol, influenciando a sua função.

Em geral as LDL estão a cargo de transportar colesterol para o fígado e para os tecidos periféricos. Sendo que um nível elevado de colesterol LDL corresponde a um risco maior de doença aterosclerótica.

A principal função das HDL é o transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado. Sendo este um mecanismo de proteção contra a acumulação de colesterol nos vasos sanguíneos e, assim, protetor contra as doenças coronárias. Um elevado nível de colesterol HDL está associado à diminuição do risco de doenças coronárias. No entanto, um elevado nível de HDL pode ser decorrente de doença genética, sendo que, neste caso, não aparenta ter um fator protetor contra a aterosclerose.

3.2.2.2.1 Colesterol LDL Direto (DLDL)

O ensaio Atellica Cholesterol Direct (DLDL) destina-se ao diagnóstico *in vitro* de amostras de soro ou plasma (heparina de lítio)

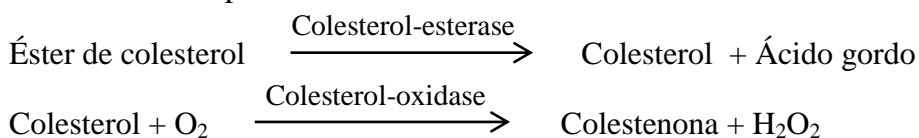
Deste ensaio fazem parte 2 passos distintos:

No primeiro a colesterol-esterase e a colesterol-oxidase eliminam o colesterol, excepto o das lipoproteínas de baixa densidade e a catalase elimina o peróxido produzido pela oxidase.

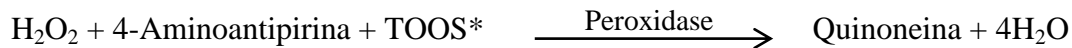
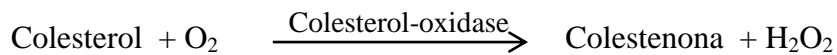
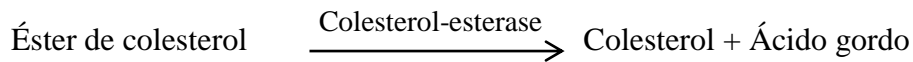
No segundo passo o detergente presente no segundo reagente liberta o colesterol das LDL. A catalase do primeiro passo é inibida por azidas de sódio também presentes no segundo reagente. Segue-se uma reação de Trinder. A intensidade da cor de quinoneimina medida a 596/694 nm é proporcional à concentração de colesterol.

Equação de Reação:

- Primeiro passo:



- Segundo passo:



*TOOS = N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metil-anilina

Conservação de amostras:

- Até 72h a 2-8°C;
- Várias semanas a -20°C;
- Tempo alargado a -70°C;

Valores de Referência:

- Ótimo: <100,0 mg/dl;
- Quase ótimo: 100,0 – 129,0 mg/dl;
- Limite alto: 130,0 – 159,0 mg/dl;
- Alto: 160,0 – 189,0 mg/dl;
- Muito alto: $\geq 190,0$.⁵

3.2.2.2 Colesterol HDL Direto (D-HDL)

Este ensaio é utilizado para determinar a concentração de colesterol HDL em amostras de soro ou plasma (heparina de lítio)

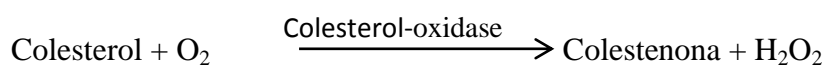
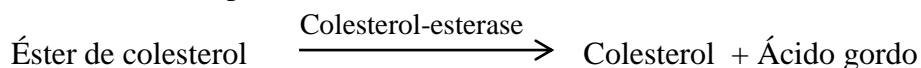
Tendo por base os procedimentos desenvolvidos por Izawa, Okada e Matsui. É constituído por dois passos distintos.

No primeiro passo, procede-se à eliminação dos quilomícrons, colesterol VLDL e LDL pelas enzimas colesterol-esterase e colesterol-oxidase. A catalase é responsável por eliminar o peróxido produzido neste passo.

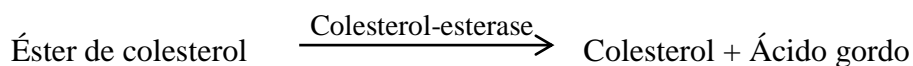
No segundo passo, utilizando um surfatante, é libertado o colesterol presente nas HDL. A catalase produzida no primeiro passo é eliminada por azida sódica. A intensidade do corante quimioneimina, quando lido a 596/694 nm, é proporcional à concentração de colesterol.

Equação de Reação:

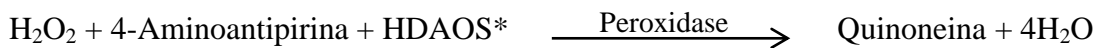
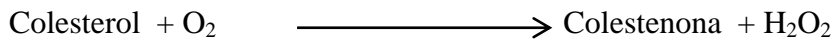
- Primeiro passo:



- Segundo passo:



Colesterol-oxidase



*HDAOS = N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina

Conservação de amostras:

- Até 7 dias a 2-8°C;
- Até 3 meses a -70°C;

Valores de Referência:

- Baixo (indesejável): <40,0 mg/dl;
- Alto (desejável): ≥60,0 mg/dl.⁶

3.2.2.3 Triglicéridos (TRIG)

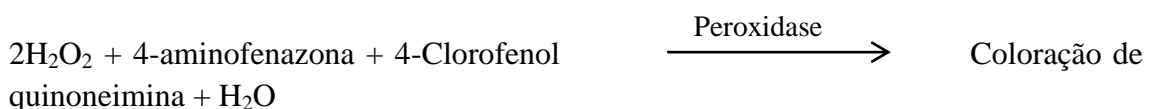
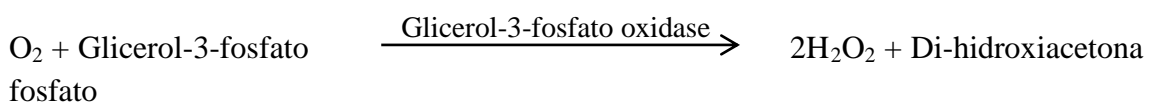
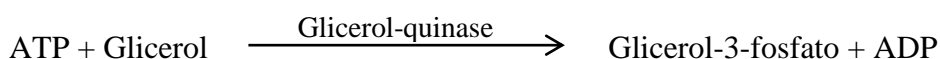
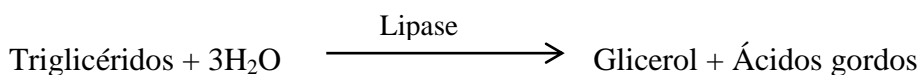
Os triglicéridos são um grupo de lípidos que pode ser adquirido da dieta ou sintetizado pelo próprio organismo. São fonte de energia para muitos tecidos, excluindo o sistema nervoso e os eritrócitos. São acumulados no tecido adiposo sob a forma de gordura, pelo que contribuem também para a manutenção da temperatura corporal e isolamento térmico.

A sua quantificação apresenta uma grande importância clínica no diagnóstico e tratamento das hiperlipidémias. Estando o aumento do nível de triglicéridos associado a maior risco de doença coronária.

Este ensaio pode ser utilizado para determinar a concentração de triglicéridos em amostras de soro ou plasma (EDTA potássio, Heparina de lítio)

O método de ensaio consiste em converter os triglicéridos em glicerol e ácidos gordos livres através da enzima lipase, em seguida, o glicerol é convertido em glicerol-3-fosfato pela glicerol-quinase, que posteriormente é convertida em peróxido de hidrogénio por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Finalmente, é formado um composto corado de peróxido de hidrogénio, 4-aminofenazona e 4-clorofenol, catalisado pela peroxidase. A absorvância deste complexo, quando medida a 505/694 nm é proporcional à concentração de Triglicéridos.

Equação de Reação:



Conservação de amostras:

- Até 8h à T.A.;
- Até 48h a 2-8°C;
- Superior a 2 dias a -20°C;

Valores de Referência:

- Normal: <150 mg/dl;
- Limite elevado: 150 a 199 mg/dl;
- Elevado: 200 a 499 mg/dl;
- Muito elevado: ≥ 500 mg/dl.⁷

3.2.3 Metabolismo do ferro

A homeostasia do ferro no organismo tem uma elevada importância uma vez que este composto é essencial para a manutenção do organismo mas pode tornar-se tóxico quando em quantidade elevada. Sendo assim, é importante a manutenção de uma concentração de ferro equilibrada para evitar a hemocromatose (excesso de ferro livre) ou a anemia ferropénica (deficiência em ferro)

O ferro proveniente da dieta apresenta-se na forma férrica (Fe^{3+}), após a ingestão é transformado em ferro ferroso (Fe^{2+}) para poder ser absorvido pelas células do duodeno e do jejuno. A reciclagem dos eritrócitos é também uma fonte importante de ferro.

Uma vez absorvido é de novo transformado em Fe^{3+} e liga-se à transferrina.

A transferrina é uma proteína sintetizada no fígado, que apresenta uma grande afinidade para o ião ferro, cuja função é o transporte do mesmo. A transferrina é capaz de transportar 12mg de ferro, no entanto esta capacidade raramente é utilizada na totalidade, em geral transporta 3mg de ferro, o que corresponde a cerca de 30% da capacidade total.

O organismo tem reservas de ferro na forma de ferritina e hemossiderina. Sendo a ferritina a forma de reserva mais rapidamente disponível para consumo, e cujo doseamento reflete o estado das reservas de ferro do organismo ainda que o ferro sérico possa estar em baixas concentrações.

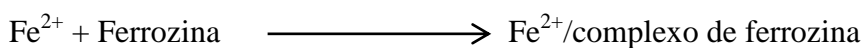
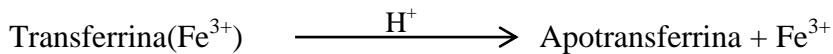
Para avaliar o estado do metabolismo do ferro, as suas reservas e diagnosticar doenças por depleção ou excesso são utilizados parâmetros como: ferro sérico, ferritina, transferrina e capacidade total de fixação do ferro.

3.2.3.1 Ferro (Iron)

Neste ensaio o ferro férrico é desagregado da proteína transportadora, a ferritina, num meio ácido e, simultaneamente, é transformado na sua forma ferrosa. Uma vez na forma Fe^{2+} é acoplado à ferrozina para produzir um composto colorido. A absorvância deste composto a 571/658 nm é proporcional à concentração de ferro.

Este procedimento mede o ferro diretamente e sem um passo de precipitação, o que permite eliminar a interferência do cobre.

Equação de reação:



Conservação de amostras:

- Até 4 dias a T.A.;
- Até 7 dias a 2-8°C;
- Até 60 dias a -20°C;

Valores de referência:

- Adultos, sexo feminino: 50-60 $\mu\text{g}/\text{dl}$;
- Adultos, sexo masculino: 65-175 $\mu\text{g}/\text{dl}$.⁸

3.2.3.2 *Transferrina (Trf)*

Proteína transportadora do ferro. Em conjunto com a capacidade total de fixação do ferro são importantes ferramentas no diagnóstico de problemas com o metabolismo do ferro.

Níveis reduzidos de transferrina estão associados a situações de inflamação aguda, doença hepática crónica e hemocromatose, enquanto níveis elevados estão relacionados com deficiências de ferro, utilização de contraceptivos orais, gravidez e hepatite.

Este ensaio pode ser realizado em amostras de soro ou plasma (heparina de lítio e EDTA potássio)

O ensaio Atellica CH Trf é um ensaio imunoturbidimétrico reforçado com polietilenoglicol. Uma amostra que contenha transferrina é adequadamente diluída, em seguida reage com um antissoro específico formando-se um precipitado. Este complexo precipitado pode, depois, ser medido por turbidimetria a 340/596 nm. A concentração de transferrina na amostra é obtida através da construção de uma curva de calibração através de valores de absorvância de padrões.

Conservação de amostras:

- Até 8h à T.A.;
- Até 7 dias a 2-8°C;
- Até 1 mês a -20°C;
- Até 1 ano a -70°C;

Valores de Referência:

- Sexo masculino: 215-365 mg/dl;
- Sexo feminino: 250-380 mg/dl.⁹

3.2.3.3 *Ferritina (Frt)*

A ferritina é uma macromolécula com um elevado peso molecular. É constituída por um exterior de apoferritina e um núcleo onde podem ser encontrados até 4000 átomos de ferro.

Representa aproximadamente 25% das reservas de ferro e está presente em todas as células, principalmente na medula óssea e tecido hepático. O ferro desta forma armazenado é facilmente mobilizado em caso de necessidade.

O doseamento desta macromolécula reflete o estado das reservas do organismo e é uma ferramenta importante no diagnóstico da anemia ferropénica e de doenças que resultam do excesso e acumulação de ferro como a hemocromatose.

É possível efetuar doseamento de ferritina em amostras de soro ou plasma (heparina de lítio ou EDTA potássio)

A amostra é, automaticamente, diluída com um tampão que contém partículas de látex revestidas com anticorpos dirigidos especificamente para a ferritina. A formação do complexo ferritina-anticorpo leva à turvação da solução, que é lida por absorvância a 658nm. A concentração de ferritina na amostra é determinada através da construção de uma curva de calibração com valores de absorvância de padrões.

Conservação de amostras:

- Até 8h à T.A.;
- Até 48h a 2-8°C ou -20°C;

Valores de referência:

- Sexo Masculino: 20-250 ng/ml;
- Sexo Feminino: 10-120 ng/ml.¹⁰

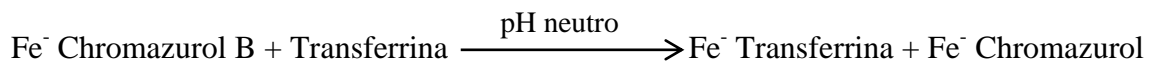
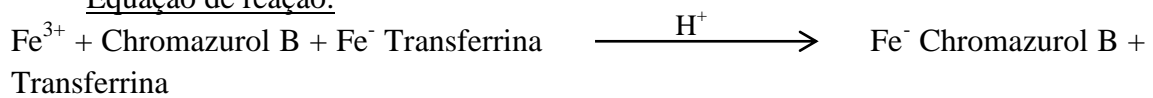
3.2.3.4 *Capacidade Total de Fixação do Ferro (TIBC)*

O objectivo da realização deste parâmetro laboratorial é avaliar a capacidade de ligação do ferro à ferritina, ou seja, é a medida da quantidade máxima de ferro que a ferritina é capaz de transportar.

É um importante aliado no diagnóstico de anemia por deficiência de ferro e da anemia da doença crônica, mas também noutras patologias. Uma vez que a ferritina é produzida pelo fígado a sua função pode ser alterada em doenças como cirrose, hepatite e insuficiência hepática.

O ensaio utilizado é composto por 2 fases. Na primeira é adicionado um reagente contendo um ácido com ferro e um corante fixador do ferro. O ferro fixado é libertado pelo ácido nesse reagente. Em seguida é adicionado o segundo reagente, neutro, e a variação do pH leva a que o ferro se ligue à ferritina, saturando-a. O processo é monitorizado por espectrofotometria e a redução da absorvância é diretamente proporcional à capacidade de ligação do ferro à ferritina.

Equação de reação:



Conservação de amostras:

- Até 4 dias à T.A.;
- Até 7 dias a 2-8°C;
- Até 2 meses a -20°C.

Valores de referência: 250 a 425 µg/dl ¹¹

3.2.4 Metabolismo ósseo e mineral

A homeostasia do cálcio tem uma importância especial uma vez que este ião participa em muitas funções do organismo. A sua regulação é importante para a sinalização de reações intracelulares, para a atividade neuronal, libertação de hormonas, atividade enzimática, estabilidade óssea e dental e desempenha, também, um papel fundamental na cascata da coagulação.

Os órgãos responsáveis pela homeostasia do cálcio são o intestino (absorção), os ossos (reabsorção) e os rins (reabsorção).

O fosfato e o magnésio estão intimamente ligados com o cálcio extracelular.

3.2.4.1 Cálcio (Ca)

O aumento do cálcio em circulação pode resultar de hiperparatiroidismo, doença óssea, neoplasia óssea e aumento da absorção intestinal. Os sintomas da hipercalcémia

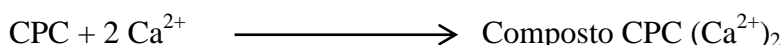
podem ser variados: letargia, fraqueza muscular, reflexos retardados, perda de apetite, obstipação, calcificações, fraturas, diminuição do intervalo QT.

Por outro lado, a diminuição da calcémia resulta, frequentemente, de síntese diminuída de vitamina D, esteatorreia, hipoparatiroidismo, pancreatite e insuficiência renal. Da lista de sintomas fazem parte: câibras, espasmos musculares, convulsões, sudorese, náuseas, vômitos e cólicas abdominais.

A concentração de cálcio tem ainda implicações sobre o funcionamento do músculo, interferindo na inversão do potencial de membrana das células do tecido muscular que permite a contração e o relaxamento.

O ensaio para o doseamento deste analito baseia-se na formação de um composto violeta com o-cresolftaleína-complexona num meio alcalino.

Equação de reação:



Conservação de amostras:

- Soro / plasma:
 - Até 8h à T.A.;
 - Até 48h a 2-8°C;
 - Até 6 meses a -20°C;
- Urina de 24h:
 - Deve ser adicionada de 10 ml de 6M HCl para evitar a precipitação do sal de cálcio;

Valores de referência:

- Soro/ plasma Adultos: 8,3-10,6 mg/dl;
- Urina Adultos: 100-300 mg/24h.¹²

3.2.4.2 *Magnésio (Mg)*

O magnésio é o quarto catião mais abundante do organismo. A maioria das suas reservas no organismo estão sequestradas nos ossos e não podem ser prontamente utilizadas, apenas 1% do total de magnésio se encontra no líquido extracelular.

A concentração ideal de magnésio é regulada em função da ingestão alimentar e da eficácia da conservação renal.

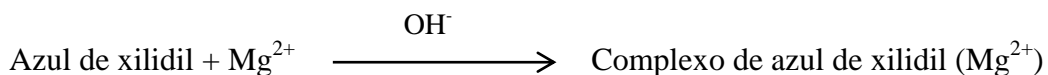
Muitas enzimas necessitam do magnésio como cofator para a sua ativação, nomeadamente em processos enzimáticos envolvendo ATP e ácidos nucleicos.

A hipermagnesemia é um acontecimento raro que pode ocorrer quando indivíduos com insuficiência renal recebem sais de magnésio ou tomam medicamentos contendo magnésio, como é o caso de alguns antiácidos ou laxantes. Os sintomas são fraqueza muscular, baixa pressão arterial, comprometimento dos movimentos respiratórios e, quando grave, paragem cardíaca.

Pelo contrário, quando existe um déficit de magnésio, este pode dever-se ao consumo de álcool (diminui a ingestão de alimentos e aumenta a excreção de magnésio), diarreias prolongadas, níveis elevados de aldosterona e vasopressina, hipertireoidismo, uso de diuréticos e amamentação (aumenta as necessidades de magnésio). Hipomagnesemia provoca: náuseas, vômitos e perda de apetite, fraqueza, alterações da personalidade, espasmos musculares, tremores e, quando grave, convulsões.

O procedimento para obter a concentração de magnésio pode ser realizado em amostras de soro ou plasma (heparina de lítio) e urina. Baseia-se na reação dos íons de magnésio com o azul de xilidil em meio alcalino, que dá origem a um composto roxo-avermelhado solúvel em água. O aumento da absorvância do azul de xilidil a 505/694 nm é proporcional à concentração de magnésio da amostra. Neste procedimento o cálcio presente é excluído da reação por agregação com EGTA.

Equação de reação:



Conservação de amostras:

- Soro/plasma:
 - Até 7 dias a 2-8°C;
 - Até 12 meses a -20°C;
- Urina:
 - Até 7 dias a 2-8°C.

Valores de referência:

- Soro/plasma (adultos): 1,60 a 2,60 mg/dl;
- Urina (adultos): 24 a 255 mg/24h.¹³

3.2.4.3 Fósforo inorgânico (IP)

Na sua maioria, as reservas de fósforo do organismo estão presentes na matriz óssea sob a forma de hidroxiapatite, as restantes apresentam-se sob a forma de fósforo inorgânico ou ésteres de fosfato.

Este composto apresenta uma relação de reciprocidade com o cálcio, isto é, quando há uma subida dos níveis de cálcio o mesmo acontece com o fósforo e vice-versa.

A hiperfosfatemia é um acontecimento raro que pode ser observado em indivíduos com disfunção renal, pois os rins não excretam eficientemente o fosfato. Menos comumente esta situação pode aparecer no hipoparatiroidismo, na cetoacidose diabética, na rabdomiólise, nas infecções sistémicas e quando existe uma administração oral de grandes quantidades de fosfato.

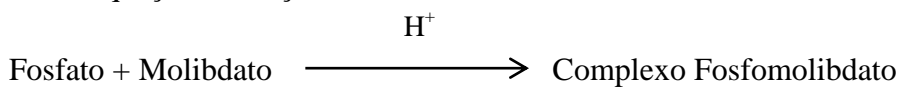
A hipofosfatemia caracteriza-se como uma concentração muito baixa de fosfato e pode advir de alcoolismo agudo, queimaduras graves, nutrição parentérica total, alcalose respiratória, hiperparatireoidismo, hipotireoidismo, deficiência de vitamina D, administração prolongada de diuréticos, entre outros.

Em geral, nenhuma das condições apresentadas anteriormente apresenta sintomas excepto em casos muito graves.

O doseamento de fosfato pode ser realizado em amostras de soro, plasma (heparina de lítio) e urina.

O fósforo inorgânico reage com o Molibdato de amónia na presença de ácido sulfúrico, formando um complexo, fosfomolibdato, não reduzido que pode ser medido numa reacção a ponto final a 340/658 nm.

Equação de reacção:



Conservação de amostras:

- Soro/plasma:
 - Até 8h à T.A.;
 - Até 48h a 2-8°C;
 - Após 2 dias a -20°C;
- Urina de 24h:
 - Até 4 dias a 2-8°C;
 - Até 1 mês a -20°C;
- Urina ocasional acidificada:
 - Até 6 meses a 1-8°C;

Valores de referência:

- Soro/plasma Adultos: 2,4 a 5,1 mg/dl;
- Urina: 0,4 a 1,3 g/24h.¹⁴

3.2.5 Função Hepática e Biliar

O fígado é um órgão que tem a seu cargo diversas funções de elevada importância para o organismo. É ele que produz e armazena aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas e sais minerais. Muitas proteínas plasmáticas e fatores de coagulação são aqui sintetizados.

Além de função de síntese e armazenamento ele é responsável por desintoxicar o organismo e metabolizar fármacos e toxinas. Realiza, ainda, o catabolismo de várias hormonas, contribuindo para a regulação dos níveis séricos das mesmas.

A bilirrubina é conjugada com o ácido glucorónico pelo fígado.

Produz sais biliares que são encaminhados pelos canais biliares e acumulados na vesícula biliar.

Um painel hepático típico inclui: gamaglutamiltransferase (GGT), Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (ALP) e Bilirrubinas, e permite o diagnóstico e caracterização da doença hepática ou distúrbios da função biliar, bem como a monitorização do tratamento das mesmas e do stress hepático causado por alguns medicamentos.

3.2.5.1 Aminotransferases

A alanina aminotransferase (ALT) e a Aspartato aminotransferase (AST) são libertadas para a circulação quando existe lise ou necrose dos hepatócitos, sendo que são bons indicadores de lesão hepática. Níveis elevados, geralmente, podem indicar: hepatite viral, tóxica, farmacológica ou isquemia.

Níveis exuberantes de aminotransferases têm, usualmente, as seguintes etiologias: agudização de hepatite auto-imune, hepatite B crónica, síndrome de Budd-Chiari agudo, esteatose, migração de um cálculo biliar.

Elevações moderadas são devidas a hepatites crónicas, hepatite alcoólica, cirrose, carcinoma hepatocelular, entre outras.

A elevação da ALT é mais específica da lesão hepática uma vez que AST está presente noutros tecidos, nomeadamente, no músculo cardíaco, no músculo esquelético, nos rins e no pâncreas.

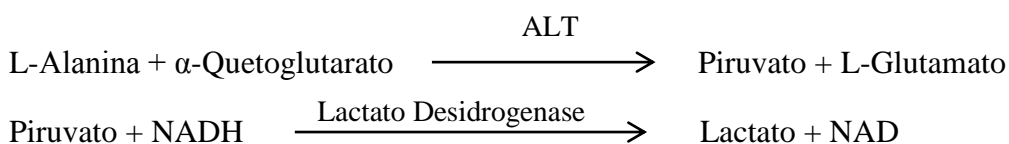
A razão AST/ALT tem relevância no diagnóstico da hepatite alcoólica, sendo que se for superior a 2 é indicativa de ingestão abusiva de álcool.

3.2.5.1.1 Alanina Aminotransferase (ALT)

Pode ser doseada em soro ou plasma (heparina de lítio)

A reação que permite a avaliação da atividade desta enzima é indicada pela adição de α -Quetoglutarato. A concentração de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NADH) reduzido é medida pela respetiva absorvância a 340/410 nm e a velocidade da redução da absorvância é proporcional à atividade da enzima.

Equação de reação:



Conservação de amostras:

- Até 7 dias a 2-8°C;
- Até 30 dias a -20°C.

Valores de referência:

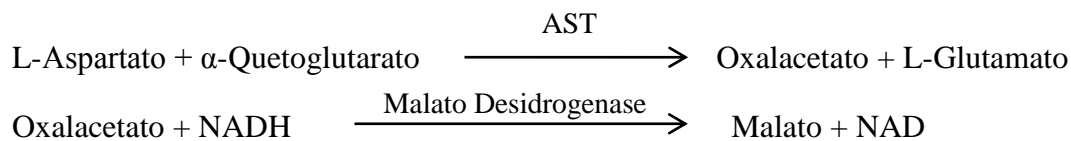
- Adultos: 10-48 U/l.¹⁵

3.2.5.1.2 Aspartato Aminotransferase (AST)

Este ensaio é indicado para a determinação da atividade da AST em amostras de soro ou plasma (heparina de lítio)

A concentração de NADH reduzido é medida por absorvância a 340/410 nm. A velocidade de redução da absorvância é proporcional à atividade na enzima. Esta reação é iniciada pela adição de α -Quetoglutarato.

Equação de reação:



Conservação de amostras:

- Até 3 dias a 20-25°C;
- Até 7 dias a 2-8°C;
- Até 30 dias a -20°C.

Valores de referência: < 34 U/L.¹⁶

3.2.5.2 Bilirrubinas

O metabolismo das bilirrubinas pode ser dividido em 4 fases sucessivas: captação, armazenamento, conjugação e secreção hepática. Em cada fase estão presentes enzimas específicas cujas atividades, quando alteradas, causam processos patogénicos.

A hemoglobina libertada aquando da rutura dos eritrócitos envelhecidos é captada pelo sistema reticulo-endotelial e desintegrada em biliverdina, monóxido de carbono e ferro pela hemeoxigenase. Em seguida a biliverdina-reductase converte a biliverdina em bilirrubina. Esta forma de bilirrubina livre é lipossolúvel e circula no plasma complexado com a albuina. A fracção bilirrubina ligada às proteínas plasmática é designada de bilirrubina não conjugada.

A bilirrubina não conjugada quando chega ao fígado é captada pelos hepatócitos e, por ação de enzimas microssomais liga-se a uma ou mais moléculas de ácido glucurónico. À fracção de bilirrubina complexada com o ácido glucurónico chamamos bilirrubina conjugada, que é excretada com a bÍlis, transformada por bactérias em urobilinogénio e eliminada nas fezes.

O conjunto destas duas fracções toma a designação de bilirrubina total.

Quando existem perturbação no metabolismo das bilirrubinas podemos estar perante um dos seguintes casos:

- Produção exacerbada de bilirrubina: anemias hemolíticas ou eritropoiese ineficaz.
- Redução na captação ou conjugação pelo hepatócito: interferência de medicamentos, síndrome de Gilbert, síndrome de Crigler-Najjar e doença hepatocelular difusa.
- Fluxo biliar reduzido: colestase.

Em que, nos primeiros 2 casos, ocorre hiperbilirrubinemia não conjugada, e no terceiro, predomina a bilirrubina conjugada.

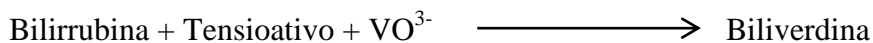
3.2.5.2.1 Bilirrubina total (TBil)

Este ensaio pode ser realizado em amostras de soro ou plasma (heparina de lítio).

Baseia-se num método de oxidação química em que a bilirrubina é oxidada pelo vanadato para produzir biliverdina. Tanto a bilirrubina conjugada como a não-conjugada são oxidadas neste passo. Esta reação de oxidação provoca a diminuição da intensidade da cor amarela da solução, uma vez que a cor é específica da bilirrubina. A redução da coloração é lida a 451/545 nm e é proporcional à concentração de bilirrubina na amostra.

Uma vez que é uma leitura dependente da cor da amostra o resultado pode sobre interferência de hemólise e lipémia que levam a uma subestimação e sobrestimação da concentração da bilirrubina, respetivamente.

Equação de reação:



Conservação de amostras:

- Até 5 dias a 5°C;
- Até 3 meses a -70°C;
- A bilirrubina é extremamente fotossensível, pelo que as amostras devem ser mantidas ao abrigo da luz tanto natural como fluorescente.

Valores de referência:

- Adultos: 0,3-1,2 mg/dl.¹⁷

3.2.5.2.2 Bilirrubina direta (D-Bil)

É possível realizar esta determinação em amostras de soro ou plasma (heparina de lítio).

Durante este ensaio a bilirrubina é oxidada pelo vanadato produzindo biliverdina. Na presença de tampão tartrato, a bilirrubina conjugada (direta) é transformada em

biliverdina. A concentração de bilirrubina na amostra é proporcional à redução da intensidade da cor amarela, medida numa reação a ponto final, a 451/545 nm.

Amostras lipêmicas sofrem uma sobrestimação da bilirrubina devido à turvação, e amostras hemolisadas são subestimadas devido ao aumento de absorvância do branco de amostra.

Equação de reação:



Conservação de amostras:

- Até 8h à T.A.;
- Até 1 semana a 2-8°C;
- Até 6 meses a -20°C;
- Amostras devem ser mantidas ao abrigo da luz;

Valores de referência:

- Adultos: < 0,3mg/dl.¹⁸

3.2.5.3 *Gama-glutamil Transferase (GGT)*

A γ -glutamiltransferase é uma enzima que se encontra nos microssomas dos hepatócitos e vias biliares. Embora exista em níveis elevados no tecido renal, a enzima presente no soro parece ter origem no tecido hepato-biliar. Sendo assim é um bom marcador para todas as formas de doença hepática.

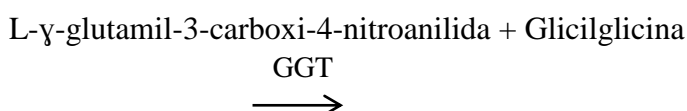
O aumento de GGT é identificado precocemente e é mais acentuado que os restantes marcadores no caso de obstrução das vias biliares.

Eleva-se em resposta a barbitúricos e consumo excessivo de álcool, sendo especialmente um bom analito para avaliar indivíduos alcoólicos pois a abstinência provoca uma diminuição dos valores.

Realiza-se o doseamento de GGT em amostras de soro e plasma (heparina de lítio)

O procedimento baseia-se na ação da GGT sobre um substrato sintético (L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida), que transfere o resíduo de γ -glutamil para um receptor (a glicilglicina). O produto desta reação (5-amino-2-nitrobenzoato) que tem uma absorção máxima perto de 400 nm. A taxa de formação do produto é medida por absorvância a 410/478 nm numa reação com cinética de ordem zero.

Equação de reação:



5-Amino-2Nitrobenzoato + L-γ-Glutamil-Glicilglicina

Conservação de amostras:

- Até 8h à T.A.;
- Até 48h a 2-8°C;
- Após 2 dias a -20°C;

Valores de referência:

- Sexo masculino: <73 U/l;
- Sexo feminino: <38 U/l.¹⁹

3.2.5.4 Fosfatase alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina é uma hidrólase que remove os grupos fosfato de um grande número de moléculas diferentes, atuando em ambiente alcalino.

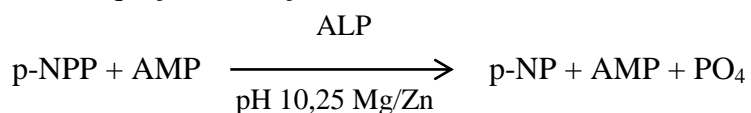
Tem uma ampla distribuição extra-hepática, nomeadamente na placenta, intestino delgado, leucócitos, rins e maioritariamente nos ossos, o que implica que a sua especificidade para o diagnóstico de perturbações hepáticas seja baixa por si só.

Níveis elevados desta enzima conjugados com alterações de outros marcadores hepáticos podem significar: hepatite, cirrose, carcinoma hepato-celular e doenças infiltrativas.

Aumento da concentração sérica desta enzima como acontecimento isolado acontece com alguns tumores ósseos malignos, carcinoma, linfoma de Hodgkin, nas crianças e jovens em fase de crescimento e na gestação.

As amostras em que é possível realizar este ensaio são: soro e plasma (heparina de lítio).

A fosfatase alcalina cataliza a transfosforilação do p-nitrofenilfosfato (p-NPP) para o p-nitrofenol (p-NP) na presença de tampão 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP). A presença dos iões magnésio e zinco permitem a manutenção de um ambiente alcalino para otimizar a ação da enzima. A variação da absorvância devida à formação do p-NP é diretamente proporcional à atividade da enzima. A variação é medida por uma técnica de velocidade biocromática.

Equação de reação:Conservação de amostras:

- Até 8h à T.A.;
- Até 7 dias a 2-8°C;
- Até 6 meses a -20°C;

Valores de referência:

- Adultos: 46-116 U/l.²⁰

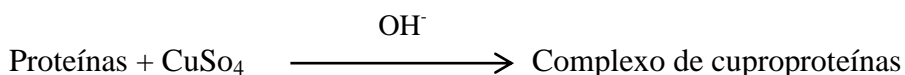
3.2.5.5 *Proteínas totais (TP)*

As proteínas plasmáticas desempenham funções múltiplas como a manutenção da pressão osmótica e da viscosidade do sangue, transporte de nutrientes, metabolitos, hormonas e produtos de excreção, regulam o pH sanguíneo e participam na cascata da coagulação.

A concentração de proteínas em circulação pode estar aumentada em situação de desidratação (hemoconcentração). No caso de esse valor estar diminuído, pode ter um conjunto de significados diferentes, de entre eles é de referir as falhas hepáticas, transtornos intestinais e renais, hemorragia e desnutrição. Este acontecimento leva a uma queda na osmolaridade do plasma e na saída de líquidos para os tecidos (edema).

O ensaio assenta na reação das proteínas com os iões de cobre que dá origem a um composto de cor roxa. A intensidade na cor é proporcional à concentração das proteínas quando medida a absorvância a 545 nm numa reação a ponto final.

Equação de reação:



Conservação de amostras:

- Até 8h à T.A.
- Até 3 dias a 2-8°C
- Até 120 dias a -20°C

Valores de referência:

- Adultos: 5,7-8,2 g/dl²¹

3.2.6 **Função Pancreática**

Para a avaliação da função pancreática é comum utilizarem-se os níveis séricos de lípase e amilase. A amilase é uma enzima catalisadora da hidrólise da amilopectina, da amilose e do glicogénio em maltose e dextrose. Encontra-se na saliva na sua forma α -amilase e no pâncreas denomina-se amilase pancreática. A lípase é mais específica para a função hepática, é uma enzima que atua sobre os lípidos quando é libertada pelo pâncreas no intestino delgado.

Ambas são largamente utilizadas como marcadores da inflamação pancreática, no entanto a sua elevação nem sempre é indicativa de doença pancreática. Podem aparecer aumentadas em situações como doenças do trato biliar, oclusão ou isquemia intestinal e apendicite aguda. A sua especificidade é, também, reduzida na insuficiência renal, doença hepática, alcoolismo, entre outras.

Segundo o *American College of Gastroenterology*, o diagnóstico da pancreatite aguda não pode assentar apenas no doseamento destas enzimas, e requer a presença de pelo menos duas das seguintes situações:

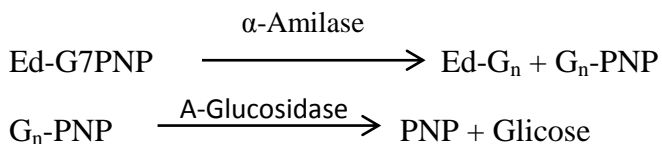
- Dor abdominal;
- Exames Imagiológicos sugestivos;
- Amilase e/ou lipase superior a três vezes o valor normal.

3.2.6.1 Amilase (*Amy*)

Este ensaio pode ser realizado em soro, plasma (heparina de lítio) e urina.

Utiliza p-nitrofenil-maltoheptósido bloqueado por etilideno (Ed-G7PNP) como substrato, e a enzima α -glucosidase para libertar o p-nitrofenol (PNP). O p-nitrofenol libertado é medido a 420/694 nm.

Equação de reação:



Conservação de amostras:

- Soro/plasma:
 - Até 7 dias à T.A.;
 - Após 7 dias a -20°C;
- Urina:
 - Ajustar o pH de 7,0 e conservar refrigerada;

Valores de referência:

- Soro/plasma Adultos: 30-118 U/l;
- Urina Adultos: ≤ 650 U/l.²²

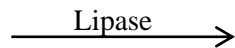
3.2.6.2 Lipase (*Lip*)

O doseamento de lipase pode ser realizado em amostras de soro ou plasmas (heparina de lítio).

Neste ensaio a lipase cliva o substrato DGGMR (éster de 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-ácido glutárico-(6'-metilresorufina)) para formar 1,2-o-dilauril-rac-glicerol e um intermediário instável, éster de ácido glutárico-(6'-metilresorufina). Este decompõe-se imediatamente, sob a influência do pH alcalino, em ácido glutárico e metilresorufina. A atividade da lipase na amostra é proporcional à formação de metilresorufina medida a 571/694 nm.

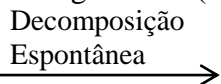
Equação de reação:

Éster de 1,2-o-dilauril-rac-glicerol-3-ácido glutárico-(6'-metilresorufina)



1,2-o-dilauril-rac-glicerol + éster de ácido glutárico-(6'-metilresorufina)

Éster de ácido glutárico-(6'-metilresorufina)



Metilresorufina + ácido glutárico

Conservação de amostras:

- Até 24h à T.A.;
- Até 7 dias a 2-8°C;
- Até 1 anos a -20°C;

Valores de referência:

- Adultos: 12-53 U/l.²³

3.2.7 Função renal e equilíbrio ácido-base

Os rins possuem diversos papéis na manutenção da homeostasia. A sua função é filtrar o sangue e retirar excedentes metabólicos enquanto, ao mesmo tempo que reabsorvem substâncias importantes ao organismo, como proteínas de baixo peso molecular, água e eletrólitos. As taxas de reabsorção e secreção destas substâncias respondem a distúrbios hídricos, eletrolíticos e ácido-básicos. Acumulam ainda uma função endócrina secretando hormonas que regulam a hematopoiese (eritropoietina) e a secreção de aldosterona pelo córtex adrenal (renina).

Para avaliar o estado da função renal e do equilíbrio ácido-base, bem como diagnosticar, monitorizar doenças deste foro são utilizados os seguintes testes laboratoriais: ureia nitrogenada, ácido úrico, creatinina, depuração da creatinina, microalbumina e ionograma.

3.2.7.1 Ureia Nitrogenada (UN)

A ureia é o principal metabolito nitrogenado que deriva da degradação das proteínas, na sua grande maioria é excretado pelo rim, sendo uma pequena percentagem eliminada pelo trato gastrointestinal e pela pele. É filtrada livremente pelo rim e não é reabsorvida ativamente, no entanto é um fraco preditor da filtração glomerular uma vez que uma grande percentagem volta para o plasma por difusão passiva, processo

dependente do fluxo urinário. Ou seja, a estase urinária leva a um aumento da difusão da ureia de volta ao plasma provocando uma subestimação da filtração glomerular.

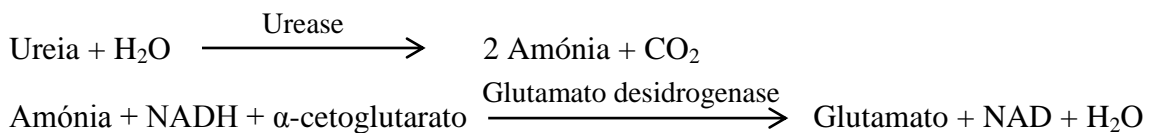
A Hiperuremia pode ser classificada em três tipos diferentes:

- Pré-renal: insuficiência cardíaca, desidratação, aumento do catabolismo das proteínas;
- Renal: glomerulonefrite, nefrite crónica, nefrose tubular;
- Pós-renal: obstrução.

O ensaio para determinação da concentração de ureia pode ser realizado em amostras de soro, plasma (heparina de lítio) ou urina.

É adicionado à amostra um reagente contendo a enzima urease que hidrolisa a ureia na presença de água produzindo amónia e dióxido de carbono. A amónia reage com 2-oxoglutarato na presença da glutamato desidrogenase e NADH. A oxidação do NADH a NAD é medida a 340/410 nm numa reação de taxa inversa.

Equação de Reação:



Conservação de amostras:

- Soro/plasma
 - 3 a 5 dias à T.A.;
 - Até 1 semana a 2-8°C;
- Urina
 - Até 4 dias a 2-8°C;

Valores de referência:

- Soro/plasma Adultos: 9 a 23 mg/dl;
- Urina: 12 a 20 g/24h.²⁴

3.2.7.2 *Ácido úrico (UA)*

O ácido úrico tem origem no metabolismo das purinas e é retirado da circulação pelos rins, sendo um componente normal da urina.

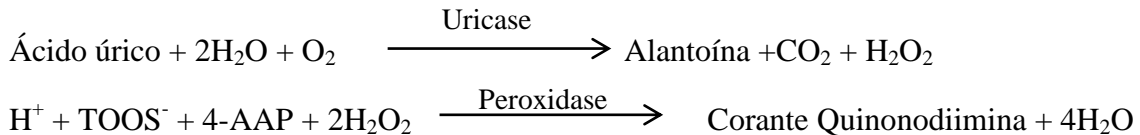
A sua acumulação no organismo é indicativa de problemas do foro renal e pode levar à acumulação dos cristais de urato nas articulações (gota) ou nos rins (cálculos renais).

O doseamento do UA no sangue permite avaliar se a inflamação nas articulações é devida a gota e monitorizar terapêuticas.

O ensaio laboratorial que permite o doseamento de UA destina-se a ser utilizado em amostras de soro, plasma (heparina de lítio) ou urina.

O ácido úrico é convertido pela uricase em alantoína e peróxido de hidrogénio. É formado um composto colorido a partir do peróxido de hidrogénio, 4-aminofenazona e TOOS (N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina) mediante a influência catalítica da peroxidase. A concentração do composto resultante, medida a 545/694 nm, é diretamente proporcional ao nível de ácido úrico na amostra.

Equação de reação:



Conservação de amostras:

- Soro/plasma
 - Até 3-5 dias 4°C;
 - Até 6 meses a -20°C;
- Urina alcalina
 - Até 3-4 dias à T.A.;

Valores de referência:

- Soro/plasma
 - Sexo masculino Adultos: 3,7-9,2 mg/dl;
 - Sexo feminino Adultos: 3,1-7,8 mg/dl;
- Urina
 - Adultos: 250-750 mg/24h.²⁵

3.2.7.3 Creatinina (Crea)

A creatinina plasmática é derivada, quase na totalidade, do catabolismo da creatina e fosfocreatina presentes no tecido muscular, que ocorre de forma constante.

A concentração plasmática deste metabolito é proporcional à massa muscular do individuo, pelo que, varia com a idade, sexo e etnia. Em situações de atrofia muscular e outras doenças relacionadas ocorre uma diminuição da creatinina no sangue, pelo contrário, esse valor está aumentado quando há a prática de exercício físico vigoroso e prolongado.

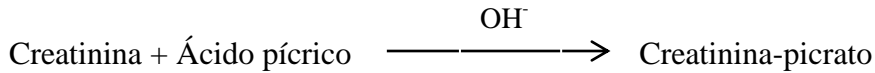
A excreção da creatinina é efetuada por via renal sem que sofra reabsorção ou metabolização, por este motivo é um bom indicador da taxa de filtração glomerular.

A determinação da creatinina no sangue e na urina é também útil para calcular a depuração da creatinina.

O doseamento laboratorial da creatinina é feito por um método que se baseia na reação de Jaffé, na qual a creatinina reage com o picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha-alaranjada. A velocidade de formação do complexo é medida a 505/571 nm e é proporcional à concentração de creatinina na amostra.

Este ensaio pode sofrer a interferência de bilirrubinas e da reação com proteínas não específicas no soro ou no plasma que provocam, respetivamente, a subestimação e a sobrestimação do resultado.

Equação de reação:



Conservação de amostras:

- Soro/plasma
 - Até 24h à T.A.;
 - Até 7 dias a 2-8°C;
 - Até 3 meses a -20°C;
- Urina (aleatória ou 24h)
 - Até 4 dias a 2-8°C;
 - Até 3 meses a -20°C;

Valores de referência:

- Soro/plasma Adultos
 - Sexo masculino: 0,70-1,30 mg/dl;
 - Sexo feminino: 0,55-1,02 mg/dl;
- Urina Adultos
 - Sexo masculino: 950-2490 mg/24h;
 - Sexo feminino: 600-1800 mg/24h.²⁶

3.2.7.4 *Microalbumina (μALB)*

Microalbuminúria define-se como presença de albumina na urina, que na população normal tem valores entre 1 mg/24h a 30 mg/24h. Os níveis de albumina na urina são um bom indicador de ocorrência de danos na capacidade de filtração glomerular. A progressão da doença renal na diabetes *mellitus* é caracterizada pela elevação da concentração da albumina na urina.

Esta determinação é realizada num ensaio de imunoturbidimetria reforçada com PEG. À amostra é adicionado um antissoro específico para a albumina. O complexo anticorpo-antigénio formado provoca a turvação da solução que é medida por turbidimetria a 340/596 nm. Através da construção de uma curva de padrões, determina-se a concentração de albumina na amostra.

Conservação de amostras:

- Urina
 - Até 14 dias 2-8°C;
 - 5 meses a -20°C;

Valores de referência:

- Adultos: até 30 mg/24h.²⁷

3.2.7.5 Ionograma

Os iões sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloro (Cl^-) participam na manutenção da pressão osmótica, hidratação de vários compartimentos de fluidos, manutenção do pH, regulação da contração dos tecidos muscular e cardíaco, estão envolvidos nas reações de oxidação-redução e interagem com diversas enzimas como cofactores.

O sistema A-LYTETM *Integrated Multisensor* (IMT Na K Cl) destina-se a ser utilizado na determinação quantitativa de sódio, potássio e cloreto em amostras de soro, plasma (heparina de lítio) ou urina. É um ensaio potenciométrico em que a amostra é colocada em contacto com eléctrodos seletivos para cada um dos iões. Os iões estabelecem um equilíbrio com a superfície do eléctrodo e gera-se um potencial. Esse potencial gerado pela amostra é comparado ao gerado por uma solução padrão sendo que a concentração dos iões é calculada pela equação de Nernst.

A interpretação dos resultados está resumida na tabela 1.²⁸

Tabela 1 interpretação clínica do Ionograma em plasma/soro e urina

		Soro/plasma	Urina
Sódio	∨	Perda de Na (vómitos, diarreias, sudorese excessiva, uso de diuréticos, hipoaldosteronismo, cetoacidose diabética, ou acidose tubular renal) Hipervolemia (insuficiência cardíaca, diabetes descontrolado, cirrose hepática, síndrome nefrótica e desnutrição) Distúrbios da hormona antidiurética	Baixa ingestão de Na na dieta, Hiperaldosteronismo Insuficiência cardíaca congestiva.
	↑	Desidratação, vómitos, diarreia. Aumento da ingestão de Na Síndrome de <i>Cushing</i> Diabetes <i>insipidus</i>	Uso de diuréticos, Síndrome de <i>Addison</i> , Nefrite, Hipoaldosteronismo.
Potássio	∨	Baixa ingestão (alcoolismo e anorexia) Vómitos, diarreias e fístulas intestinais Uso de diuréticos, hiperaldosteronismo, síndrome de <i>Cushing</i>	Ingestão insuficiente, doença renal com diminuição do fluxo urinário.
	↑	Insuficiência renal, acidose metabólica grave, cetoacidose diabética, desidratação, lesão tecidual, síndrome de <i>Addison</i>	Hiperaldosteronismo, dano renal, após administração de ACTH, cortisona ou hidrocortisona.

Cloreto	∨	Cetoacidose diabética, insuficiência renal, alcalose metabólica, acidose respiratória, síndrome de <i>Addison</i> , vômitos, sudorese excessiva e hiperaldosteronismo	Vômitos, aspiração gástrica, diarreias
	↑	Desidratação, acidose metabólica, alcalose respiratória e diabetes <i>insipidus</i>	Excesso de corticosteróides endógenos ou exógenos, Síndromas de <i>Cushing</i> , <i>Cohn e Bartter</i> .

Conservação de amostras:

- Soro/plasma e urina:
 - Até 7 dias a 2-8°C;
 - Até 30 dias a -20°C;
- Urina de 24h:
 - Colheita deve ser realizada sem adição de conservantes;
 - Mantida a 2-8°C durante o tempo de colheita;
 - Até 30 dias a -20°C;

Valores de referência:

- Soro:
 - Na: 136-145 mmol/l;
 - K: 3,5-5,1 mmol/l;
 - Cl: 98-107 mmol/l;
- Plasma:
 - Na: 136-145 mmol/l;
 - K: 3,4-4,5 mmol/l;
 - Cl: 98-107 mmol/l;
- Urina:
 - Na: 40-220 mmol/24h;
 - K: 25-125 mmol/24h;
 - Cl: 110-250 mmol/24h.²⁸

3.2.8 Função Muscular

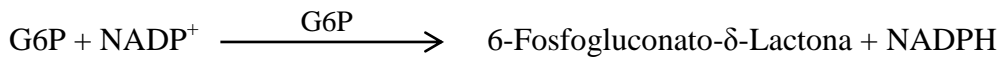
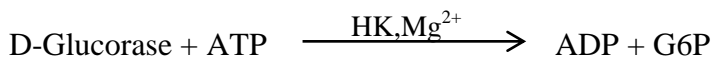
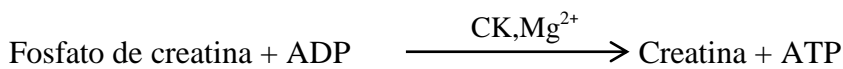
Para avaliar o estado da função muscular são comumente usados ensaios para testar a ação das enzimas Creatina-quinase e lactato desidrogenase.

3.2.8.1 Creatina-quinase (CKNAC)

A creatina-quinase, ou creatina-fosfoquinase é uma enzima presente em vários tecidos, cuja função é catalisar a conversão de creatina em fosfocreatina. Existe em tecidos como o cérebro, músculo esquelético, cardíaco e liso. É doseada no soro ou plasma (heparina de lítio) para avaliar a função muscular e a extensão de danos neste tecido como enfarte do miocárdio, distrofia de Duchenne progressiva, rabdomiólise, miosite e miocardite.

In vitro a CKNAC reage com fosfato de creatina e ADP, formando ATP e creatina. O ATP da reação anterior vai ser utilizado pela hexoquinase-G&PD para gerar nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH). A concentração de NADPH medida a 340/410 nm é proporcional à atividade da enzima.

Equação de reação:



Conservação de amostras:

- Soro/plasma:
 - Até 1 semana a 2-8°C;
 - Após 1 semana a -20°C;

Valores de referência:

- Sexo masculino: 32-294 U/l;
- Sexo Feminino: 33-211 U/l.²⁹

3.2.8.2 *Lactato desidrogenase (LDH)*

A LDH é uma enzima que participa do processo de transformação da glicose em energia. Está presente em vários tecidos do corpo como isoenzimas distintas nomeadas de LDH-1 a LDH-5 da seguinte forma:

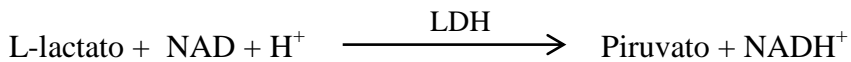
- LDH-1: Coração e eritrócitos;
- LDH-2: Leucócitos;
- LDH-3: Pulmões;
- LDH-4: Rins, placenta e pâncreas;
- LDH-5: Fígado e músculo esquelético.

Devido à sua distribuição o aumento desta enzima no sangue pode dever-se a enfarte do miocárdio, anemia hemolítica, abuso de álcool, uso de anestésicos, aspirina e fluoretos, exercício físico violento também leva ao aumento de LDH. Quando se apresenta em valores abaixo do normal podemos estar perante um caso de mutação genética, no entanto é um acontecimento raro.

Pode realizar-se esta determinação em amostras de soro ou plasma (heparina de lítio).

Neste ensaio a lactato-desidrogenase catalisa a conversão de L-lactato a piruvato na presença de NAD. A atividade enzimática da LDH é proporcional à velocidade de produção de NADH, medida pelo aumento de absorvância a 340/410 nm.

Equação de reação:



Conservação de amostras: Até 3 dias à T.A;

Valores de referência: para adultos 120 -246 U/L³⁰

3.3 Atellica IM 1600

O atellica IM 1600 da casa comercial Siemens é um analisador de imunoensaio com detecção por quimioluminescência que utiliza éster de acridinium como marcador.

O analisador é capaz de realizar até 440 testes por hora, e pode analisar amostras de vários líquidos biológicos como: soro, plasma, líquido amniótico, urina e sangue total.

Avalia as condições das amostras com detetores de nível, coágulos, bolhas e amostra insuficiente. Recebe informação do analisador de química quanto a lipémia, icterícia e hemólise.

O volume de aspiração da amostra varia entre 10µl e 100 µl dependendo do ensaio.

O prato de reação tem 89 posições no anel exterior e 71 no anel interior, com espaço total para 160 cuvetes descartáveis. A área de reação é mantida a 37°C.

O CQI é realizado automaticamente como no analisador de química.³¹

• Tipo de ensaios realizados:

a) Imunoensaio em *Sandwich*

Os ensaios do tipo Sandwich são compostos por duas fases. Na primeira um anticorpo marcado por éster de acridinium reage com o antígeno alvo da amostra, em seguida é adicionado um reagente contendo partículas magnéticas revestidas por anticorpos, essas partículas ligam-se ao complexo já formado. Quando a solução é sujeita a um campo magnético as partículas magnéticas ancoram o complexo à cuvette. Segue-se uma fase de lavagem que permite eliminar tudo o que não foi ligado pelos anticorpos. Em seguida o resultado é lido por quimioluminescência e as unidades de luz relativa (RLUs) presentes são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra.

b) Imunoensaio competitivo

Neste tipo de ensaio o antígeno alvo presente na amostra e um antígeno do reagente marcado por ester de acridinium competem pela ligação à partícula magnética revestida por anticorpos. Quando maior for a concentração do analito na amostra menor vai ser a ligação do antígeno marcado ao anticorpo. Assim o resultado em RLUs é inversamente proporcional à concentração do analito.

As determinações relacionadas com o equilíbrio hormonal e os marcadores tumorais são realizados neste equipamento e utilizam as metodologias descritas acima segundo a tabela 2.

Tabela 2 Ensaio realizados no analisador Atellica IM

Imunoensaio em <i>Sandwich</i>	Imunoensaio Competitivo
-PTH	-T3
-Prolactina	-T3L
-LH	-T4
-FSH	-T4L
-TSH	
-PSA	
-PSAL	
-CEA	
-CA19.9	
-CA15.3	
-CA125	

Todas estas determinações são realizadas em soro que pode ser conservado até 48h a 2-8°C e até 30 dias a -20°C.

3.3.1 Equilíbrio Hormonal

3.3.1.1 *Hormona Paratiroideia (PTH)*

A hormona paratiroideia (PTH) é secretada pelas células da paratiroide e está envolvida no metabolismo ósseo e na homeostasia do cálcio. É produzida e libertada em resposta a baixos níveis de cálcio no sangue.

A sua função é promover a absorção de cálcio pelo intestino (pela ativação da vitamina D), estimular os osteoclastos a destruir o tecido ósseo para libertar cálcio e reduzir a reabsorção de fosfatos no rim (uma vez que estes formam um complexo insolúvel com o cálcio diminuindo a sua disponibilidade).

O aumento dos níveis de PTH pode ser decorrente de produção exagerada da hormona pelas glândulas (hiperparatiroidismo primário) ou em resposta a hipocalcemia (hiperparatiroidismo secundário).

O hipoparatiroidismo ocorre por danos às glândulas ou remoção durante a cirurgia de ablação da tireoide.³²

Valores de referência: 12 – 16 pg/ml

3.3.1.2 *Prolactina (PRL)*

A prolactina é uma hormona secretada pela adeno-hipófise. A sua função prende-se com a estimulação da produção de leite pelas glândulas mamárias após o parto.

Apresenta um ciclo circadiano atingindo níveis máximos durante a noite.

A hiperprolactinemia ocorre principalmente em consequência do uso de medicamentos como contraceptivos orais e antipsicóticos e presença de adenomas da hipófise. As suas consequências na mulher são a alteração do ciclo menstrual e infertilidade; no homem provoca a diminuição na testosterona com consequente impotência sexual e hipogonadismo, e desenvolvimento do tecido mamário (condição designada ginecomastia).

Níveis demasiado baixos são raros e traduzem-se na ausência de lactação após o parto.³³

Valores de referência:

- Homens: 2,1 – 17,7 ng/ml;
- Mulher: 2,8 – 29,2 ng/ml;

3.3.1.3 *Hormona Luteínica e Hormona folículo-estimulante (LH e FSH)*

A LH e a FSH são ambas produzidas pela adeno-hipófise e atuam sinergicamente.

Nas mulheres o pico de LH desencadeia a ovulação e é responsável pela manutenção do corpo luteínico e pela produção de progesterona; a FSH é responsável pela maturação do folículo e produção de estrogénio na fase folicular.

Nos homens a LH estimula as células de Leydig do testículo a produzir testosterona; e a FSH suporta a espermogénese estimulando os espermatócitos a entrar em divisão.

Níveis elevados de LH e FSH estão associados a menopausa e hipogonadismo. Níveis baixos estão associados a distúrbios da hipófise ou do hipotálamo.^{34,35}

Valores de referência:

- LH:
 - Homens: 0,6 – 12,1 u/L;

- Mulheres:
 - Fase folicular: 1,8 – 11,8 U/L;
 - Ovulação: 7,6 – 89,1 u/L;
 - Fase luteínica: 0,6 – 14,0 u/L;
 - Menopausa: 5,2 – 62,5 u/L.
- FSH:
 - Homens: 1,4 – 13,8 u/L;
 - Mulheres:
 - Fase folicular: 3,4 – 21,6 mU/ml;
 - Ovulação: 5,0 – 20,6 mU/ml;
 - Fase luteínica: 1,1 – 14,0 mU/ml;
 - Menopausa: 23,0 – 150,5 mU/ml.

3.3.1.4 Hormonas da tiroide

As hormonas produzidas pela tiroide são a Triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4), são compostas por tirosina e iodo e controlam o metabolismo. A T4 tem maior velocidade de produção e maior tempo de semivida do que T3, sendo que a razão das concentrações em circulação é 14:1. Nos tecidos periféricos T4 é convertida em T3 (mais ativa) pelas deiodinases.

Uma grande percentagem destas hormonas existe na forma conjugada, acopladas a proteínas de ligação como TBG (globulina de ligação à tiroxina) e albumina. A pequena fração não conjugada (aprox. 0,3%) é a metabolicamente ativa.

A síntese de T3 e T4 pela tiroide é estimulada pela hormona tiroestimulante (TSH), que é sintetizada na hipófise anterior, regulada por um mecanismo de feedback negativo que responde aos níveis de T3 e T4 em circulação.

A avaliação destas hormonas é importante no diagnóstico de doenças da tiroide. T3 e T4 têm baixo poder de diagnóstico por si só pois a alteração dos seus valores pode depender da flutuação nas concentrações das proteínas de ligação.

A diminuição da produção das hormonas T3 e T4 é designada hipotiroidismo e pode ser primária (tiroidite autoimune) ou secundária com redução do estímulo da TSH na tiroide. Os sintomas são intolerância ao frio, ganho de peso, fadiga, depressão, obstipação, entre outros.

O hipertiroidismo é o aumento das concentrações de T3 e T4, geralmente com diminuição de TSH. Resulta principalmente da doença de Graves, adenoma tóxico e inflamação da tiroide. Os sintomas são variados e incluem: intolerância ao calor, perda de peso, irritabilidade, perturbações do sono, entre outros.^{36,37,38,39}

Valores de referência:

- T3: 80 – 180 ng/dl
- T3L: 2,5 – 4 pg/ml
- T4: 4,5 – 12,6 mg/dl
- T4L: 0,9 – 1,8 ng/dl

- TSH: 0,3 – 1,0 mU/l

3.3.2 Marcadores Tumorais

Os marcadores tumorais são biomarcadores encontrados no sangue, urina e tecidos que podem aparecer elevados na presença de tumores. São quantificados para ajudar no diagnóstico, prognóstico e monitorização dos tratamentos.

3.3.2.1 Antígeno específico da próstata (PSA)

O antígeno específico da próstata é produzido pelo tecido prostático normal e existe em circulação em duas formas: a livre e a conjugada. Pode estar aumentado na neoplasia da próstata mas não é suficiente para fazer diagnóstico pois é produzido pelo tecido normal e pode aparecer aumentado em condições benignas. É principalmente útil para monitorizar o tratamento e o aparecimento de metástases. De entre as causas de aumento da concentração sanguínea de PSA salienta-se: prostatite aguda e crónica, retenção urinária, biopsia, hiperplasia benigna, carcinoma e ejaculação.

A razão PSA livre/PSA total pode ser indicativo da gravidade da doença, sendo que uma razão <20% indica carcinoma prostático e >20% indica hiperplasia benigna.⁴⁰

Valores de referência:

- <40 anos: 0- 1,4 ng/ml;
- 40 – 49 anos: 0 – 2,0 ng/ml;
- 50 – 59 anos: 0 – 3,1 ng/ml;
- 60 – 69 anos: 0 – 4,1 ng/ml;
- 70 – 79 anos: 0 – 4,4 ng/ml.

3.3.2.2 CEA

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é uma proteína encontrada em muitos tipos de células associadas a tumores e no feto em desenvolvimento. Pode aparecer aumentado em condições benignas como tabagismo, infeções, doença inflamatória do intestino, pancreatite e cirrose. Mas nestes casos os valores tendem a manter-se abaixo de 10 ng/ml.

É utilizado principalmente no diagnóstico e monitorização do cancro de cólon e reto. Níveis acima de 20 ng/ml associam-se a cancro com metástases.⁴¹

Valores de referência:

- Não fumadores: <2,5 ng/ml;

- Fumadores: <5,0 ng/ml.

3.3.2.3 CA 19.9

O antígeno carboidrato 19.9 (CA 19.9) é um antígeno produzido pelas células cancerígenas do pâncreas. Não é eficaz no diagnóstico pois pode estar aumentado em condições benignas, mas é muito útil na monitorização do tratamento.⁴²

Valores de referência: 0 – 37 U/ml

3.3.2.4 CA 125

É um marcador tumoral associado ao cancro do ovário. Pode aparecer elevado em outros cancros e situações benignas como: cirrose, endometriose, hepatite, pancreatite, e quistos do ovário. É produzido por vários tecidos como o mesotélio, as trompas de Falópio e endocervix, e não é produzido pelo ovário normal.⁴³

Valores de referência: 35 U/ml

3.3.2.5 CA 15.3

É um antígeno produzido pelas células epiteliais glandulares e tem associação com o cancro da mama. O seu uso no diagnóstico é limitado uma vez que pode estar aumentado em outros tipos de cancro ou em situações benignas como: hepatite cónica, tuberculose, sarcoidose e lúpus eritematoso sistémico. É muito utilizado na monitorização do tratamento e do aparecimento de metástases.⁴⁴

Valores de referência: <25 U/ml

3.4 Análise de desempenho do Atellica Solutions

Os estudos de comparação de métodos analíticos são usados para determinar a relação entre dois métodos laboratoriais, com o intuito de avaliar a performance de um método novo no mercado.

O novo método deve ser comparado com o que está a ser usado correntemente para determinar se os resultados entre os dois são comparáveis. O método corrente é denominado “método de referência” e o novo é o “método de teste”.

Esta situação difere de uma calibração. Na calibração são usadas amostras do analito a determinar com um valor de resultado preciso e sabido. Em contraste, nestes testes, são usadas várias amostras com concentrações variáveis dos analitos que se pretendem avaliar, cada amostra é testada e ambos os equipamentos e os resultados são comparados.

Usando análise estatística determina-se a concordância entre os dois métodos. Os dados resultantes dos ensaios em cada equipamento são colocados num gráfico, sendo o eixo das abcissas um equipamento e o das ordenadas é o outro. Em métodos concordante os pontos devem alinhar-se numa reta que passa na origem e tem inclinação de 45° .⁴⁵

Uma vez que os equipamentos Atellica Solutions são novos no mercado, antes de serem implementados no laboratório procedeu-se a análises comparativas de 22 parâmetros do analisador de imunoquímica (IM) e 6 do analisador de química (CH). Foram testadas aproximadamente 30 amostras para cada parâmetro.

Os resultados foram comparados com os métodos de referência utilizados pelos laboratórios Dr. David Santos Pinto e Generalab.⁴⁶

A tabela 3 resume os testes feitos, os analisadores usados e o resultado.

Tabela 3 Análise de desempenho de Atellica Solution⁴⁶

Analisador Atellica Solutions	Parâmetro	Método de referência lab. Dr. David S. Pinto	Método de referência lab. Generalab	Resultado
IM	Ferritina	Cobas 8000	----	✓
	PTH	Cobas 8000	Cobas E411	✓
	Cortisol	Cobas 8000	ADVIA Centaur XP	✓
	T3	Cobas 8000	----	✓
	T3 livre	Cobas 8000	----	✓
	T4	Cobas 8000	----	✓
	T4 livre	Cobas 8000	----	✓
	TSH	Cobas 8000	----	✓
	Estradiol	Cobas 8000	ADVIA Centaur XP	✓
	Prolactina	Cobas 8000	ADVIA Centaur XP	✓
	Testosterona	Cobas 8000	Cobas E 411	✓
	Ca 19.9	Cobas 8000	ADVIA Centaur XP	✓
	CA 125	Cobas 8000	ADVIA Centaur XP	✓
	CA 15.3	Cobas 8000	ADVIA Centaur XP	✓
	PSA	Cobas 8000	ADVIA Centaur XP	✓
	PSA livre	Cobas 8000	----	✓
	HCV	Cobas 8000	ADVIA Centaur XP	✓
	IgG Toxo	Liaison XL	ADVIA Centaur XP	✓
	IgM Toxo	Liaison XL	ADVIA Centaur XP	✓
	IgG Rub	Liaison XL	ADVIA Centaur XP	✓
IgM Rub	Liaison XL	ADVIA Centaur XP	✓	
AFP	Cobas 8000	ADVIA Centaur XP	✓	
CH	Microalbumina	Cobas 8000	ADVIA 1800	✓
	LDH	Cobas 8000	ADVIA 1800	✓
	B2- microglobulina	Immunelite 2000	Liaison XL	✓
	Proteínas Totais	Cobas 8000	ADVIA 1800	✓
	Creatinina	Cobas 8000	----	✓
	HDL	Cobas 8000	----	✓

3.5 Perfil proteico

A separação de proteínas é realizada no CAPILARYS PROTEIN(E)6 da Sebia por electroforese capilar. Pode ser realizada em amostras de soro. O ensaio baseia-se na separação das proteínas do soro ou urina segundo a sua mobilidade electroforética e fluxo electrosmótico em capilares de sílica na presença de um tampão alcalino. As proteínas são detectadas durante a sua migração por absorção de raios UV (200nm).

Através deste método é possível observar 5 frações distintas, podendo, a cada uma, pertencer uma ou mais proteínas:

- Albumina: proteína mais abundante no soro, sintetizada pelo fígado, é fundamental na manutenção da pressão osmótica e transporte de substâncias;
- Alfa-1-globulinas: principal componente desta fração é a α_1 -antitripsina, mas fazem parte dela outras proteínas como: protrombina, transcortina, globulina ligadora de tiroxina (TBG) e alfa-fetoproteína;
- Alfa-2-globulinas: constituída maioritariamente pela haptoglobina e α_2 -macroglobulina, e em menor percentagem por ceruloplasmina, eritropoietina e colinesterase;
- Beta-globulinas: constituída pelo fator C3 do complemento, pelas beta-lipoproteínas e pela transferrina;
- Gama-globulinas: constituída pelas imunoglobulinas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Sendo que destas apenas a IgG migra por toda a fração gama. A IgA e IgM podem migrar entre as frações gama e beta.⁴⁷

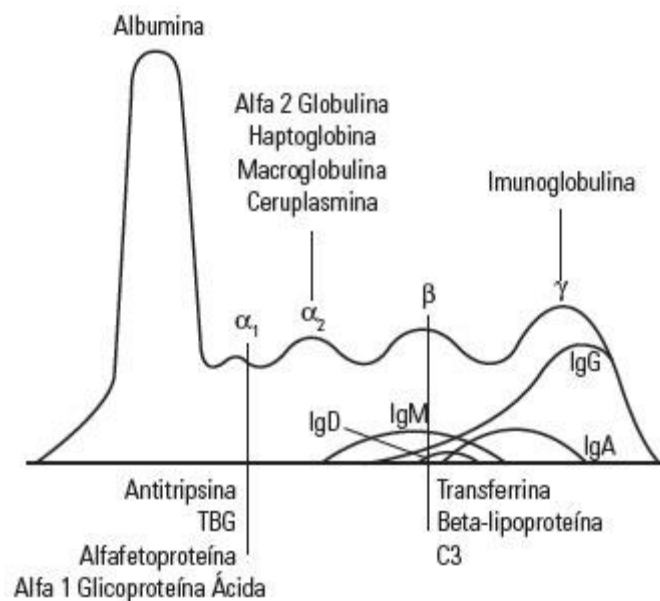


Figura 2 Distribuição normal das proteínas por electroforese⁴⁸

Amostras e conservação:

É recomendado o uso de amostras de soro recentes, podendo estas ser conservadas até 10 dias a temperatura entre 2°C e 8°C, para conservação por períodos mais prolongados a amostra deve ser congelada a -20°C até 8h após a colheita.

O uso de amostras antigas provoca erros no resultado principalmente na fração beta-2-globulinas devido à degradação do fator C3 do complemento.

Não devem ser usadas amostras de plasma pois o fibrinogénio presente leva a uma sobrestimação da fração beta-2-globulinas.

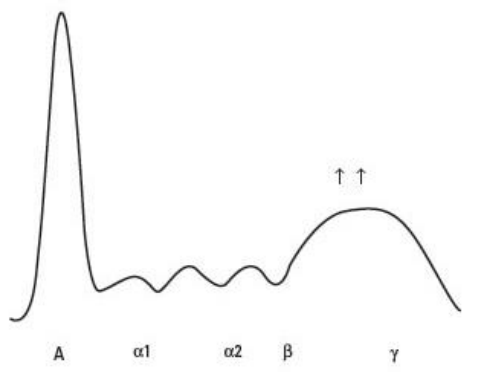
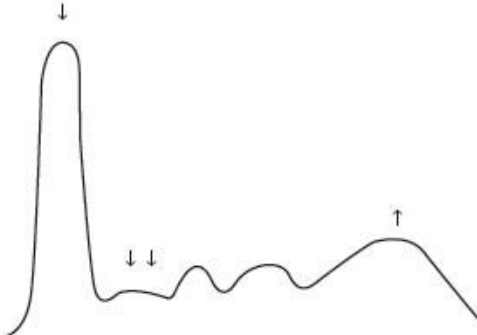
Amostras hemolisadas causam erros na determinação da fração alfa-2-globulinas.

Valores de referência:

- Albumina: 55,8 a 66,1%;
- Alfa-1-globulina: 2,9 a 4,9 %;
- Alfa-2-globulina: 7,1 a 11,8%;
- Beta-globulinas: 8,4 a 13,1 %:
 - Beta-1-globulina: 4,7 a 7,2 %;
 - Beta-2-globulina: 3,2 a 6,5%;
- Gama-blobulinas: 11,2 a 18,8%.

Interpretação clínica:

Tabela 4 Interpretações clínicas dos principais perfis eletroforéticos⁴⁹

Perfil	Descrição	Patologia
	Diminuição da albumina, aumento das frações beta e gama (ponte cirrótica).	Cirrose hepática.
	Diminuição da albumina e das alfa-1-globulinas, Aumento da fração gama.	Deficiência em alfa-1-antitripsina (doença genética), lesão hepática ou pulmonar.

	<p>Diminuição da albumina, aumento de alfa-1 e alfa-2. Proteínas de fase aguda.</p>	<p>Inflamação.</p>
	<p>Diminuição da albumina e das gama-globulinas, Aumento da fração alfa-2.</p>	<p>Síndrome nefrótico.</p>
	<p>Aumento das gama-globulinas, acompanhado frequentemente de diminuição da albumina.</p>	<p>Gamapatia policlonal.</p>
	<p>Pico na região gama.</p>	<p>Gamapatia monoclonal.</p>
	<p>Diminuição da fracção gama.</p>	<p>Imunodeficiência.</p>

3.6 Urina II

O analisador automático CLINITEK Novus destina-se a ler as cassetes CLINITEK Novus da Siemens Healthcare Diagnósticos assim como determinar o aspecto e densidade da urina.

Combinando princípios de espectroscopia de refletância, analisa a cor e intensidade da luz refletida nas áreas de teste das cassetes que tenham apresentado reação. Cada cassete apresenta zonas impregnadas com os diferentes reagentes necessários às medições qualitativas ou semi-quantitativas dos parâmetros apresentados na tabela 5.^{50,51}



Figura 3 Analisador Clinitek Novus⁴⁹



Figura 4 Cassetes de urianálise Clinitek Novus⁵⁰

Tabela 5 Princípios dos métodos utilizados pelo equipamento CLINITEK Novus⁵²

Teste	Princípios do método
Bilirrubinas	Baseia-se no acoplamento de bilirrubina com dicloroanilins diazotada num meio fortemente ácido.
Sangue	Baseia-se na atividade da enzima peroxidase da hemoglobina, que catalisa a reação di-hidroperóxido de di-isopropil-benzeno e 3,3',5,5'-tetrametilbrnzidina
Glicose	Baseia-se numa reação enzimática dupla. Uma enzima, a glicose oxidase, catalisa a formação de ácido glucorónico e peróxido de hidrogénio a partir da oxidação da glucose. Em seguida a peroxidase catalisa o acoplamento oxidativo de 4-aminoantipirina e 4- metilcatecol por peróxido de hidrogénio.
Corpos cetónicos	Baseia-se na reação de nitroprussiato com ácido acetoacético.
Leucócitos	Os leucócitos granulócitos contêm esterases que catalisam a hidrólise do éster do aminoácido de pirrolo derivado para libertar 3-hidroxi-5fenilpirrolo. Em seguida, este pirrolo reage com um sal de diazónio.
Nitritos	Com o pH ácido da área de teste, os nitritos na urina reagem com ácido p-arsanílico para formar um composto de diazónio. Este composto une-se a 1,2,3,4-tetrahidrobenzo(h)quinolina-3-ol.
pH	Baseia-se no princípio de duplo indicador que fornece uma

	grande quantidade de cores que cobre todo o intervalo de pH da urina.
Proteínas	Baseia-se na alteração de cor do indicador pelas proteínas a pH constante.
Urobilinogénio	Baseia-se na reação de Ehrlich em que p-dietilaminobenzaldeído juntamente com um intensificador de cor reage com urobilinogénio num meio fortemente ácido.
Cor	Este bloco em branco não reage, apenas absorve a amostra para detetar a cor da urina.

Os resultados destes testes podem ajudar no diagnóstico de algumas patologias relacionadas com o metabolismo dos hidratos de carbono, função renal, função hepática, distúrbios metabólicos e infeções do trato urinário.

4 Hematologia

4.1 Amostras

Na secção de hematologia do HBA são utilizadas amostras de sangue periférico colhidas em tubos com anticoagulantes: EDTA e citrato de sódio. Sendo as amostras colhidas em EDTA utilizadas para realizar hemogramas e esfregaços e as amostras com citrato para os testes de coagulação e contagem de plaquetas. Para entender a utilidade destes anticoagulantes é importante entender como se comportam quando entram em contacto com as amostras.

O EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) reage através dos seus dois radicais ácidos com o cálcio plasmático, formando um quelato insolúvel, ou seja, ele liga-se aos iões cálcio da amostra e interrompe a cascata da coagulação. Existem 4 tipos de EDTA: o dissódico (Na_2EDTA), o dipotássico (K_2EDTA) e o mais utilizado K_3EDTA (tripotássico).

É o anticoagulante utilizado para a realização de hemogramas e esfregaços porque preserva a morfologia das células, desde que esteja na proporção correta de 0,2ml de EDTA para 5ml de sangue. É capaz de preservar a morfologia das células até 2h à T.A. após a colheita embora, idealmente se deva realizar o esfregaço no momento da colheita. Ao quelar o cálcio impede a ativação das plaquetas e a formação de coágulos que seria ativada quando o sangue entra em contacto com a parede do tubo, se estiver em quantidade inferior à ideal pode ocorrer a formação de microcoágulos.

O Citrato de sódio é o anticoagulante de eleição para os testes da coagulação. Isto porque, a sua função é ligar-se aos iões de cálcio da amostra e impedir a cascata de coagulação, no entanto esta associação é facilmente reversível adicionando iões cálcio à amostra. Este anticoagulante não é capaz de preservar a morfologia dos eritrócitos para além de 1h após a colheita.

4.2 Esfregaço de sangue periférico

O esfregaço de sangue periférico, também conhecido como distensão sanguínea é utilizado para a observação microscópica da amostra de sangue. Consiste numa fina camada de sangue espalhado sobre uma lâmina de vidro que em seguida é corado com corantes específicos. Permite a observação de anomalias com as células, presença de parasitas ou inclusões celulares e a contagem diferencial dos leucócitos.

Apesar dos avanços tecnológicos e da crescente automação e uso de técnicas moleculares, este método simples ainda é indispensável para um correto diagnóstico. O primeiro passo para a obtenção de resultados fiáveis é a realização de um bom esfregaço.

Procedimento:

- 1- Identificar a lâmina com a informação do utente;
- 2- Apoiar a lâmina de vidro sobre uma superfície limpa e estável, certificando-se que é uma lâmina de boa qualidade e está limpa;
- 3- Colocar uma gota de sangue numa das extremidades da lâmina;
- 4- Com o auxílio de outra lâmina ou de uma lamela, colocar a extremidade desta em contacto com a gota de sangue. Para isso deve fazer-se um movimento para trás com a lâmina extensora deslizando-a, num ângulo de 45°, sobre a lâmina do esfregaço até tocar na gota de sangue;
- 5- O sangue espalhar-se-á ao longo da extremidade da lâmina extensora;
- 6- A lâmina extensora deve, então, deslizar suave e continuamente sobre a outra, o sangue será arrastado pela lâmina formando uma película fina;
- 7- Deixar o esfregaço a secar sem nenhuma interferência;
- 8- Assim que estiver seco o esfregaço pode seguir para coloração.

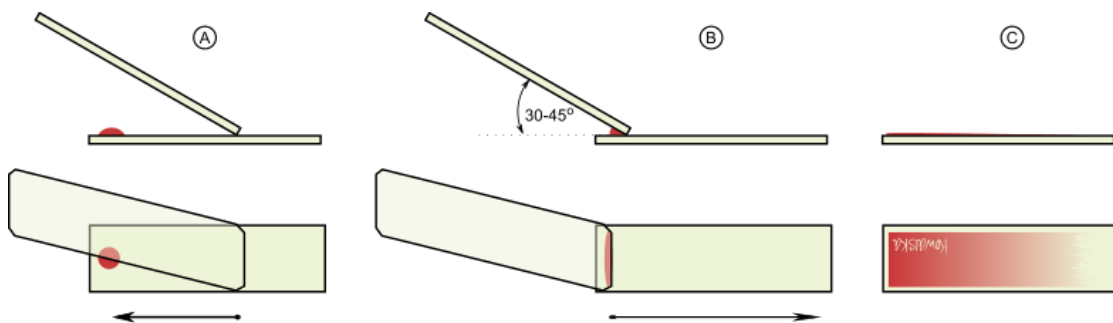


Figura 5 Exemplificação do procedimento do esfregaço de sangue periférico⁵³

4.2.1 Coloração

A coloração utilizada para as lâminas de hematologia é a Hemacolor Rapid da Merck. Esta coloração consiste num kit com 3 embalagem das soluções necessária para realizar a coloração: solução de fixação (metanol), solução de eosina e solução de azul de metileno. Inicia-se com a fixação do esfregaço com metanol para que nenhum material seja perdido durante o processo, em seguida a solução de eosina cora os componentes citoplasmáticos básicos de vermelho-alaranjado, o azul de metileno cora o núcleo e restantes componentes de azul-arroxeadado.⁵⁴

Este processo é todo realizado de forma automática pelo sistema de coloração Poly Stainer da NEUTec Group Inc. que consiste em 4 poços destinados aos diferentes corantes que devem ser colocados no equipamento na forma sequencial como devem ser utilizados, um local de lavagem e um local de secagem de lâminas.⁵⁵



Figura 6 Equipamento automático para realizar colorações Poly Stainer da NEUTec⁵⁵

4.3 Sistema SYSMEX XN-1000

No departamento de Hematologia do HBA existem dois equipamentos Sysmex XN-1000 iguais que avaliam os mesmos parâmetros. Um dos equipamentos é o de rotina e o outro é o de urgência. Durante o horário diurno ambos funcionam, durante o horário de urgência o equipamento usado é o de urgência ficando o outro de prevenção caso aconteça algum problema.

O analisador permite avaliar 37 parâmetros de diagnóstico, utiliza 88µL de amostra para realizar a análise, tem a capacidade de processar 100 amostras por hora, as racks têm capacidade para 10 tubos cada, sendo possível colocar 5 racks em cada corrida.



Figura 7 Sistema Sysmex XN-1000.⁵⁶

No início do dia o equipamento é controlado usando dois dos três níveis das amostras de CQI (o nível baixo e o nível alto), na mudança de turno o equipamento é novamente controlado usando o nível normal.

O equipamento Sysmex XN-1000 utiliza os métodos analíticos descritos em seguida para determinar os parâmetros do hemograma.⁵⁶

4.3.1 Detecção de corrente direta (DC)

É o método utilizado pelo canal RBC/PLT para fazer a contagem de eritrócitos e plaquetas.

Realiza medições volumétricas dos eritrócitos e das plaquetas pelo método de impedância em fluxo com foco hidrodinâmico.

Utiliza uma porção do sangue aspirado e dilui-a com um diluente específico segundo uma razão pré-estabelecida.

A solução resultante é depois encaminhada para a câmara de detecção e onde por uma pequena abertura. De cada lado desta abertura há elétrodos com corrente direta a passar entre eles. A resistência à corrente elétrica entre os elétrodos sofre alterações sempre que uma célula passa pela estreita abertura. Esta resistência provoca um impulso elétrico proporcional ao volume da célula.⁵⁷

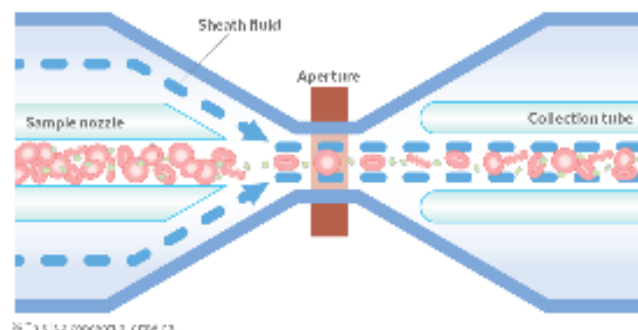


Figura 8 Câmara do detetor por método de impedância⁵⁷

A informação dos impulsos elétricos é convertida em gráficos de distribuição de volume ou histogramas.

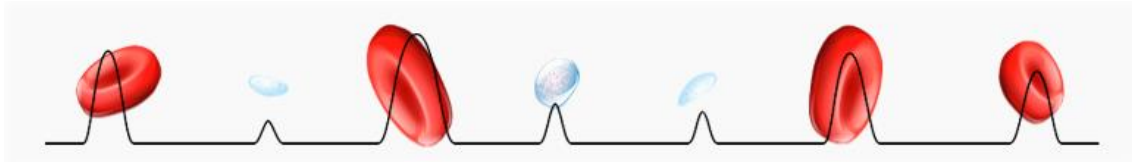


Figura 9 Impulsos elétricos gerados pelas células quando passam entre os eletrodos⁵⁷

Da informação recolhida por este método são construídos os histogramas de volume dos eritrócitos e das plaquetas, de onde são retiradas as informações necessárias para determinar o volume globular médio (VGM) e as dispersões eritrocitária e plaquetaria (RDW e PDW). A ilustração 10 mostra um exemplo de cada uma.

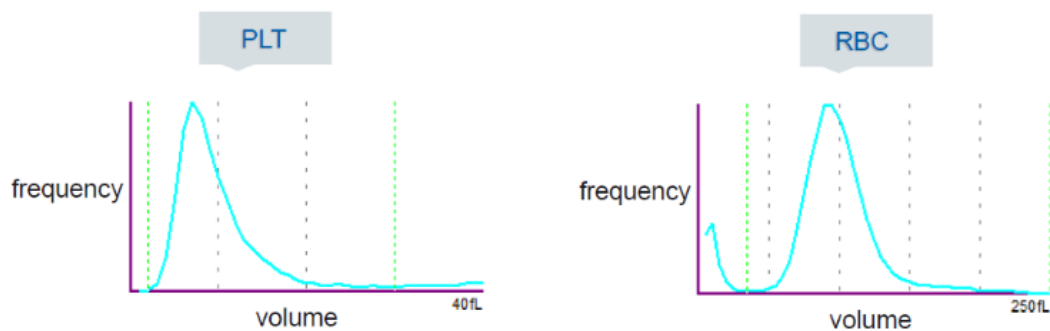


Figura 10 Histogramas de distribuição do volume de plaquetas e de eritrócitos.⁵⁷

4.3.2 Método SLS

Utilizado para determinar o valor da hemoglobina. O método usa um reagente de laurel-sulfato de sódio (SLS) sem cianeto. Em primeiro lugar o surfatante lisa os eritrócitos presentes na amostra. Em seguida a reação inicia-se alterando a hemoglobina e provocando a oxidação do grupo heme. Depois os grupos hidrófilos do SLS estabelecem uma ligação estável ao grupo heme dando origem a um complexo corado (SLS-HGB), o qual é medido por fotometria. O parâmetro da concentração de hemoglobina globular média (CHGM) é obtido neste canal.⁵⁸

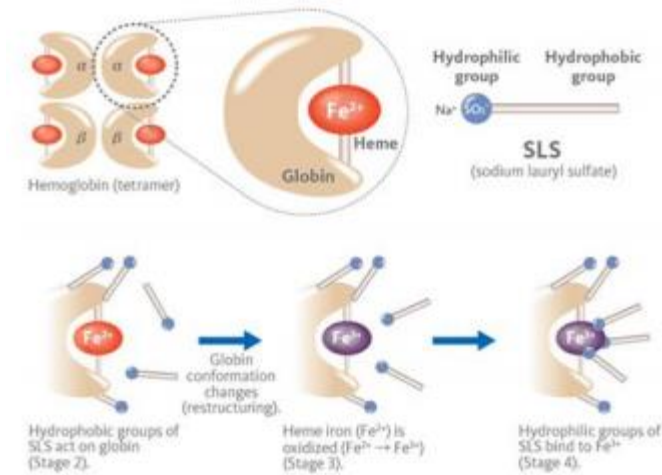


Figura 11 Reação de SLS com a hemoglobina⁵⁸

A luz monocromática emitida por um LED é absorvida pelos complexos SLS-HBG presentes na solução. A absorvância é medida por um foto-sensor e é proporcional à concentração da hemoglobina da amostra.

Este método sofre interferência da lipémia e leucócitose uma vez que estes acontecimentos aumentam a turvação da amostra e, conseqüentemente, interferem na absorvância.⁵⁸

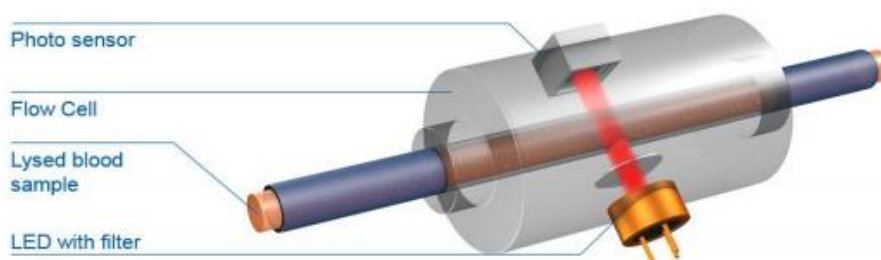


Figura 12 Câmara de detecção do complexo SLS-HBG⁵⁸

4.3.3 Citometria de fluxo fluorescente

FFC (*fluorescent flow cytometry*) é uma tecnologia usada para analisar as propriedades fisiológicas e químicas das células, fornecendo informação sobre o tamanho, estrutura e complexidade do interior da célula.

A amostra é aspirada e dividida em porções que são depois diluídas e marcadas com os marcadores fluorescentes apropriados.

Os reagentes de cada canal são constituídos por um par, um permite lisar as células e o outro tem marcadores específicos para o grupo de células que se pretende identificar.

O reagente de lise perfura a membrana celular mantendo a estrutura da célula intacta quase na totalidade. Os marcadores fluorescentes marcam os ácidos nucleicos intracelulares. Ambos estes passos foram criados de maneira a que a reação com as células seja mínima e a sua estrutura seja mantida, o máximo possível, sem alterações.

Em seguida as células são transportadas para o detetor. Aqui a amostra é irradiada por um foco de luz de 633 nm, e as células são separadas segundo a intensidade de 3 sinais diferentes medidos por detetores de díodos:

- FSC- *forward-scattered Light*;
- SSC- *side-scattered Light*;
- SFL- *side-fluorescence Light*.

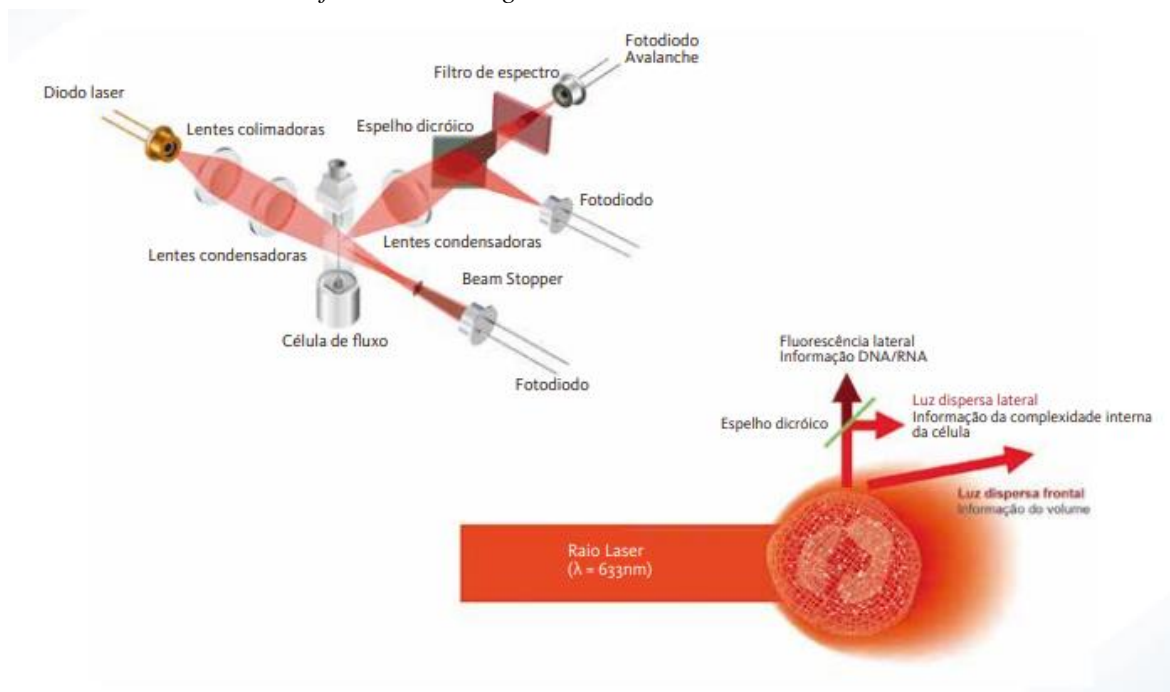


Figura 13 Esquema do método de citometria de fluxo utilizado pelo equipamento⁵⁸

A intensidade do sinal FSC indica o volume da célula. O SSC fornece informação quanto à estrutura interna da célula e o seu conteúdo, como complexidade do núcleo e presença de grânulos. O SFL indica a presença de ácidos nucleicos na célula.

Células com características físicas e químicas semelhantes vão aparecer agrupadas nos *scattergrams*.

4.3.3.1 Canal WDF

O canal WDF utiliza citometria de fluxo para analisar as células do sangue. O procedimento consiste numa reação citoquímica entre a membrana celular e um conjunto de reagentes, seguida de citometria de fluxo de fluorescência.

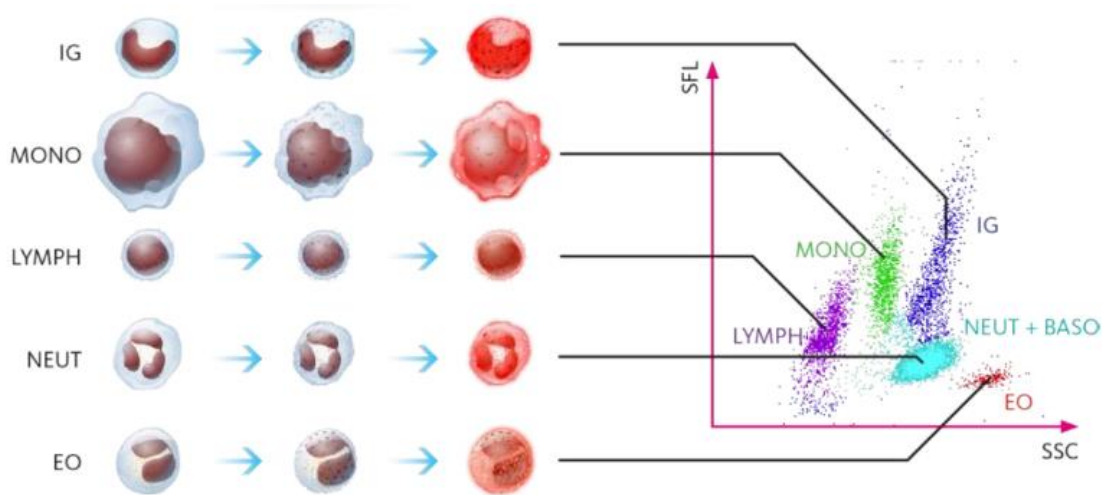


Figura 14 Posicionamento dos grupos de células detetados pelo canal WDF⁵⁹

Neste canal utiliza as intensidades dos sinais de fluorescência e de dispersão de luz lateral para realizar a contagem diferencial de todos os leucócitos exceto os basófilos que são contados noutra canal. É possível também obter a contagem dos granulócitos imaturos (IG), detecção de leucócitos atípicos ou anormais e blastos.⁵⁹

4.3.3.2 Canal WNR

Neste canal realiza-se a contagem total de leucócitos dos quais se diferenciam os Basófilos. Se existirem na amostra eritroblastos eles são, também, diferenciados por este canal. O procedimento consiste em duas fases, durante a primeira as membranas celulares dos leucócitos são perfuradas (mantendo quase na totalidade a integridade da célula), em seguida os ácidos nucleicos são marcados por um marcador específico. No caso dos eritrócitos nucleados (NRBC) as membranas são lisadas e apenas os núcleos são marcados. No gráfico as células são separadas por fluorescência e tamanho.⁶⁰

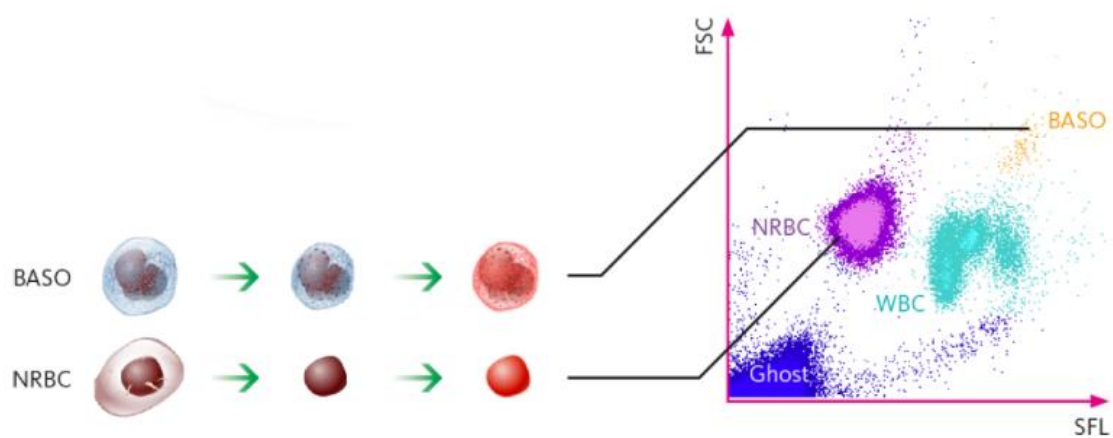


Figura 15 Posicionamento dos grupos de células diferenciados pelo canal WNR⁶⁰

4.3.3.3 Canal RET

Este canal utiliza um reagente com marcador de fluorescência específico e o resultado das intensidades medidas pelo FSC e SFL para contar reticulócitos. Os reticulócitos emitem mais fluorescência do que os eritrócitos maduros (uma vez que estes já não apresentam RNA), e apresentam menor intensidade de fluorescência do que os leucócitos. Este canal pode também ser usado para obter contagem de plaquetas em casos onde a contagem por impedância não seja confiável.⁶⁰

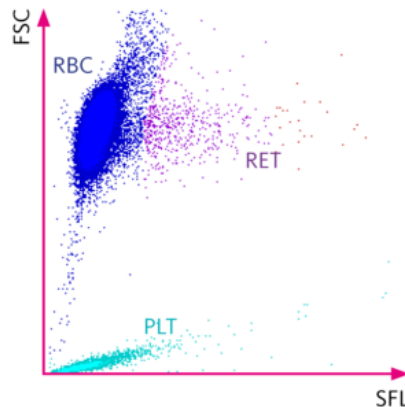


Figura 16 exemplo de *scattergram* obtido pelo canal RET⁶⁰

4.3.3.4 Canal PLT-F

O analisador utiliza, por regra, o canal de impedância para contar o número de plaquetas, mas quando a precisão desta contagem não pode ser garantida o equipamento possui o canal PLT-F (plaquetas por fluorescência) com resultados mais precisos.

Neste canal as plaquetas são identificadas e quantificadas por um corante fluorescente específico, a Oxazina, que cora as superfícies dos retículos endoplasmáticos rugosos e das mitocôndrias. Esta reação tem uma excelente correlação com a análise de CD41/CD61 e minimiza as interferências da presença de fragmentos eritrocitários, micrócitos e fragmentos de leucócitos.⁶⁰

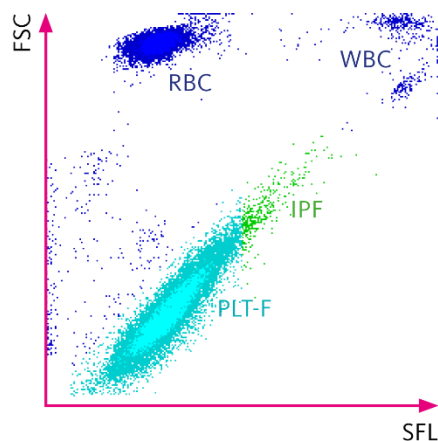


Figura 17 Exemplo de *scattergram* obtido pelo canal PLT-F⁶⁰

4.3.4 Cálculo de parâmetros eritrocitários

- O hematócrito (Ht) corresponde ao volume ocupado pelos eritrócitos no volume total de sangue:

$$Ht(L/L) = \frac{RBC \times VGM}{10}$$

- O peso médio da hemoglobina contida na quantidade de eritrócitos (MHC):

$$MHC(pg) = \frac{HG}{RBC} \times 10$$

- Concentração média de Hb por eritrócitos (CHGM):

$$CHGM(g/dl) = \frac{Hb}{Ht} \times 1000$$

4.4 Valores de Referência do Hemograma

Tabela 6 Valores de referência do hemograma completo

		Valores de referência	
Eritrograma	Eritrócitos ($\times 10^{12}/l$)	4,50 a 5,90	
	Hemoglobina (g/dl)	Homens: 13,5 a 17,5	Mulheres: 12 a 16
	Hematócrito (%)	41,0 a 53,0	
	Volume Globular Médio (fl)	80 a 100	
	Hemoglobina Globular Média (pg)	26 a 34	
	Concentração da Hemoglobina Globular Média (g/dl)	32 a 36	
	Índice de Distribuição Eritrocitária(RDW) (%)	11,6 a 14,0	
	Reticulócitos (%)	0,5 a 2,5	

Leucograma	Leucócitos ($\times 10^{12}/l$)	4,00 a 10,00
	Neutrófilos (%)	37,5 a 75
	Linfócitos (%)	10 a 50
	Monócitos (%)	2,5 a 8
	Eosinófilos (%)	<10
	Basófilos (%)	<2
Plaquetograma	Plaquetas ($\times 10^{12}/l$)	150 a 400
	Volume Plaquetar Médio (μm^3)	6,5 a 11
	Dispersão Plaquetar (%)	11,6 a 14,0

Interpretação dos resultados obtidos no hemograma:

- Eritrograma:

O distúrbio mais frequente e relevante da série vermelha é a anemia. Esta caracteriza-se por uma diminuição da quantidade de hemoglobina nos eritrócitos, diminuição do hematócrito e da contagem de eritrócitos. Pode ser classificada segundo os parâmetros VGM e CHGM conforme resumido nas seguintes tabelas.

Tabela 7 Classificação das anemias segundo o VGM

Anemia Microcítica VGM < 80 fL	Deficiência em ferro, anemia sideroblástica e anemia da doença crónica.
Anemia Normocítica 80 fL < VGM < 100 fL	Anemia hemolítica e insuficiência renal.
Anemia Macroscítica VGM > 100 fL	Doença hepática crónica, anemia megaloblástica, síndromas mielodisplásicos, consumo de drogas.

Tabela 8 Classificação das anemias segundo o CHGM

Anemia Hipocrómica CHGM < 32 g/dl	Deficiência em ferro, anemia da doença crónica.
Anemia Normocrómica 32 g/dl < CHGM < 36 g/dl	Anemia hemolítica.
Anemia Hipercrómica CHGM > 36 g/dl	Esferocitose hereditária.

Quando os valores da contagem de eritrócitos, do hematócrito e da hemoglobina estão acima dos valores normais estamos perante uma situação de poliglobulia. Geralmente esta situação é provocada pela diminuição do volume plasmático que pode ser resultante de síndrome de choque tóxico, excessiva permeabilidade capilar, febres hemorrágicas, distúrbios da medula óssea ou excesso de produção de eritropoietina.

O RDW é o índice de dispersão dos eritrócitos, quando aumentado indica a presença de anisocitose.

A contagem de reticulócitos pode aparecer aumentada (reticulocitose) em casos de encurtamento do tempo de vida dos eritrócitos, hemorragia recente, anemia em recuperação, hipoxia, entre outros. Quando a contagem destas células é demasiado baixa (reticulocitopenia) pode ser indicativo de deficiência de vitamina B12 e ácido fólico,

anemia da doença crónica, anemia aplástica, leucemia aguda e síndromas mielodisplásicos, entre outras.

- **Leucograma:**

Os distúrbios decorrentes de alterações nas contagens dos elementos da série branca são resumidos na tabela seguinte.

Tabela 9 Distúrbios na contagem de leucócitos.

Neutrófilos	Neutrofilia	Infeções bacterianas, leucemia mieloide cónica, tabagismo, reações de hipersensibilidade, síndrome do choque tóxico.
	Neutropelia	Resultante de medicação, anemia megaloblástica, leucemia mieloide aguda, lúpus eritematoso sistémico.
Eosinófilos	Eosinofilia	Doenças alérgicas, hipersensibilidade medicamentosa, infeções por parasitas, leucemia eosinofílica aguda.
	Eosinopenia	Stress agudo (trauma, cirurgia, queimaduras, convulsões, etc), administração de fármacos, hemodiálise.
Basófilos	Basofilia	Leucemia a basófilos, policitemia vera, reações de hipersensibilidade.
	Basopenia	Infeções, hemorragias, hipertiroidismo, administração de medicamentos.
Monócitos	Monocitose	Infeções crónicas incluindo tuberculose, sífilis, febre tifoide e leishmaniose; malária e babesiose; estados inflamatórios crónicos.
	Monocitopenia	Administração de corticoides, leucemia de células pilosas.
Linfócitos	Linfocitose	Infeções virais, infeções bacterianas, malária, reações alérgicas a medicamentos, leucemia linfocítica crónica.
	Linfopenia	Trauma, cirurgia, queimaduras, infeções agudas, insuficiência hepática fulminante, insuficiência renal, carcinoma, infeção por HIV e SIDA.

- **Plaquetograma:**

O aumento da contagem de plaquetas (trombocitose) pode ter causas genéticas como na trombocitose familiar, ou adquiridas como na trombocitose essencial, leucemia mieloide crónica, síndromas mielodisplásicos, infeções, cirurgia e trauma, entre outros.

A diminuição da contagem de plaquetas (trombopenia) pode ser resultado de numerosas situações com 2 mecanismos principais: diminuição da produção ou aumento do consumo, destruição ou remoção de plaquetas.

4.5 Observação de lâminas ao microscópio ótico

A observação de lâminas ao microscópio ótico, devidamente preparadas e coradas é um método de elevada importância no diagnóstico de algumas patologias mas também como informação relevante para encaminhar o processo de análise.

O método utiliza sangue total anticoagulado por EDTA e estendido e corado de acordo com os métodos referidos anteriormente.

Assim um esfregaço bem preparado é constituído por três partes:

- A cabeça da lâmina: região que se encontra imediatamente após o local onde foi depositada a gota de sangue, muito espessa e com grande número de leucócitos, principalmente linfócitos;
- O corpo da lâmina: região intermediária entre a cabeça e a cauda da lâmina, é o local onde os eritrócitos e leucócitos estão distribuídos mais uniformemente, por isso é a zona de eleição para a análise qualitativa e quantitativa do esfregaço.
- A cauda da lâmina: zona final, mais fina. Nesta região podem ser encontrados esferócitos, e há elevação de monócitos e granulócitos.

A contagem diferencial de leucócitos deve ser efetuada na zona do corpo da lâmina e somar pelo menos 100 células, sendo 50% contadas nas bordas laterais da lâmina e as restantes 50% na zona central.

Este método permite a visualização de anomalias morfológicas e quantitativas das três séries de células, bem como presença de parasitas ou bactérias, sendo que estas anomalias podem ser sugestivas de certas patologias.

Na seguinte tabela estão sumarizados os mais importantes achados na observação de lâminas com a respetiva descrição e significados clínicos relevantes.

Tabela 10 Principais significados clínicos dos achados na observação de esfregaços de sangue ao microscópio⁶¹

Achado	Descrição	Significado clínico
Anisocitose	Aumento da variabilidade do tamanho dos RBC medida pelo RDW	Não tem significado específico, mas é comumente encontrado em distúrbios hematológicos
Microcitose	Diminuição do volume dos eritrócitos	Talassémias, hemoglobinopatia H, deficiência de ferro, anemia das doenças crónicas
Macrocitose	Diminuição do tamanho dos eritrócitos	Deficiência de vitamina B ₁₂ ou ácido fólico, anemia aplástica, tabagismo, alcoolismo.
Hipocromia	RBC com halos centrais que ocupam mais de 1/3 do seu diâmetro	Deficiência de ferro
Hipercromia	RBC mais corados que o normal	É pouco usual e normalmente acontece por alteração da forma da célula (esferócitos e eritrócitos irregularmente contraídos)
Anisocromia	Variabilidade excessiva no grau de coloração dos RBC	Anemia em progressão ou a responder a tratamento
Dimorfismo	São identificados 2 populações de RBC diferentes	Após transfusão sanguínea ou anemia a responder a tratamento
Policromatofilia (reticulocitose)	Eritrócitos com coloração rosa-azulada devido à presença de RNA ribossômico	Situações de stress hematopoietico em que há altos níveis de eritropoietina
Pecilocitose	Elevado número de eritrócitos com formato anormal	Mielofibrose, anemias deseritropoieticas congénitas, doença da hemoglobina H

Esféricitos	RBC com formato esférico (sem halo central)	Esferocitose hereditária
Eliptócitos e ovalócitos	Eliptócito- RBC cujo eixo maior é superior ao dobro do eixo menor Ovalócitos- RBC cujo eixo maior é inferior ao dobro do eixo menor	Eliptocitose hereditária
Dacriócitos	Eritrócitos em forma de gota ou lágrima	Anemia megaloblástica, talassémia major e mielofibrose
Equinócitos	RBC cobertos de 10-30 espículas	Pode ser um artefacto quando o sangue para o esfregaço não é recente; Insuficiência renal e hepática
Acantócitos	RBC apresentam 2-20 espículas de comprimentos variados e distribuídas irregularmente	Associada a condições hereditária, Pós esplenectomia ou hipoesplenismo
Queratócitos	Eritrócitos que apresentam pares de espículas, fazendo lembrar cornos.	São formados quando há dano traumático aos eritrócitos
Esquisócitos	Fragmentos de eritrócitos.	Dano mecânico ou tóxico
Eritrócitos em alvo (<i>Target cells</i>)	Apresentam uma área mais densa no meio do halo central	Associado a anemia das células falciformes
Estomatócitos	Apresentam uma fenda linear central	Alcoolismo e hepatopatia alcoólica
Células falciformes (drepanócitos)	RBC em formato de crescente ou foice com extremidade pontiagudas	Anemia das células falciformes
Corpos de Howel-Jolly	Inclusões eritrocitárias arredondadas de tamanho médio, constituídas por DNA	Após esplenectomia ou em estados hipoesplênicos
Pontilhado basófilo	Grande número de pequenas partículas basófilas constituídas por RNA	Talassemia minor e major, anemias hemolíticas e estados diseritropoiéticos em geral, hepatopatias, intoxicação por metais pesados, deficiência em pirimidina 5'-nucleotidase
Corpúsculos de Pappenheimer	Inclusões irregulares contendo ferro	Após esplenectomia
Aneis de Cabot	Remanescentes de microtúbulos que constituíram o fuso mitótico. Apresentam forma circular ou em 8.	Alterações na eritropoese e em algumas anemias hemolíticas
Eritroblastos circulantes	Eritrócitos nucleados	Ligeiro aumento no período neonatal de prematuros, bebês que sofreram hipoxia e bebês com síndrome de Down. Indicam eritropoese hiperplásica e infiltração da medula.

Rouleaux	Empilhamento dos eritrócitos	Ocorre em situações que elevam as proteínas plasmáticas: gravidez, inflamação, neoplasias como mieloma múltiplo. Pode ser artefactual quando a gota de sangue permanece muito tempo na lâmina antes de ser espalhada.
Rosetas	Agregação dos eritrócitos em redor dos neutrófilos	Fenómeno raro provavelmente causado por um mecanismo imunológico. Pode ser artefactual dependente das condições do EDTA.
Desvio à esquerda	Neutrófilos hiposegmentados	Processos infecciosos, anomalia de Pelger-Huet, gravidez
Desvio à direita	Hipersegmentação dos neutrófilos	Anemia megaloblástica, tratamento com tóxicos que interferem na síntese do DNA, corticoesteroides, anemia ferropénica, infecções crónicas
<i>Drumstick</i>	Apêndice nuclear em forma de baqueta de tambor.	Normal em mulheres
Núcleo em anel	Núcleo em forma de anel	Leucemia mieloide crónica e aguda, leucemia neutrofilica, anemia megaloblástica
Granulação reduzida		Síndromas mielodisplásicos e leucemia mieloide aguda. Pode ser resultado de algumas doenças congénitas.
Granulação aumentada		Granulação tóxica: gravidez, infeção, inflamação. Anemia aplástica e anomalia de Alder-Reilly
Bastões de Auer	Bastões citoplasmáticos resultantes da fusão de grânulos primários.	Leucemia Mieloide Aguda.
Vacuolização	Presença de vários vacuolos no citoplasma do neutrófilo.	Indicativo de alcoolismo crónico. Pode indicar algumas doenças congénitas.
Linfócitos atípicos	Linfócitos grandes, com uma razão núcleo/citoplasma reduzida, que parecem ser indentados pelas células circundantes	Mononucleose Infecciosa
Agregação de linfócitos		Indicativo de distúrbios linfoproliferativos, ou artefacto.
Sombras de Gumprecht	Linfócitos lisados que aparecem como manchas disformes	Associadas a leucemia linfocítica crónica
<i>Plasmodium</i>	Parasitas dentro dos eritrócitos	Indicção infeção por <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Plasmodium ovale</i> , <i>Plasmodium malarie</i> ou <i>Plasmodium vivax</i> . Os parasitas podem ser encontrados em diversos estadios do seu ciclo de vida: trofozoito, esquizonte ou gametócitos.
<i>Trypanosoma</i>	Parasitas pequenos extracelulares com um flagelo	Indicação de infeção por: <i>Trypanosoma rhodesiense</i> , <i>Trypanosoma gambiense</i> ou <i>Trypanosoma cruzi</i> .
Microfilárias	Parasitas tubulares extracelulares.	Infeção por: <i>Wuchereria bancrofti</i> , <i>Brugia malayi</i> , <i>Loa loa</i> , <i>Mansonella perstans</i> e <i>Mansonella ozzardi</i> .

4.6 Velocidade de sedimentação globular

A VSG é um teste simples e de baixo custo, pedido habitualmente em clínica. Define-se como VSG a velocidade a que os eritrócitos do sangue anticoagulado sedimentam num tubo standardizado durante o período de uma hora.

No entanto a utilidade deste teste tem vindo a decrescer com o aparecimento de métodos de diagnóstico mais específicos. Ainda assim, a VSG continua a ser útil no diagnóstico e monitorização da terapêutica em algumas doenças como a artrite reumatoide.

O seu uso como ferramenta de diagnóstico é desaconselhado, mas pode ser útil em alguns contextos como no rastreio de pacientes aparentemente saudáveis ou para suportar um diagnóstico de infeção aguda.

O cuidado no manuseamento do material e da amostra são de elevada importância pois erros técnicos podem provocar uma falsa alteração do resultado, como nos casos de amostras diluídas, homogeneização insuficiente, amostras coaguladas ou vibrações no decorrer do teste.

- Valores de referência:

- Abaixo dos 50 anos de idade:
 - Homens: 10 mm na 1ª hora;
 - Mulheres: 13 mm na 1ª hora;
- Acima dos 50 anos de idade:
 - Homens: 13 mm na 1ª hora;
 - Mulheres: 20 mm na 1ª hora.

- Condições de elevam a VSG:

- Gravidez e período menstrual;
- Diabetes mellitus;
- Falência renal;
- Doença coronária;
- Mielomas;
- Neoplasias em geral;
- Anemias;
- Macrocitose;
- Hemólise;
- Doenças reumáticas;
- Infeções agudas ou crónicas.

- Condições que diminuem a VSG:

- Poliglobulias;
- Policitémias;
- Hipergamaglobulinemias;
- Hipofibrinogenemias;

- Hiperviscosidade.

Pode ser realizado por:

- Método de Westergren
- Analisadores automáticos.

O método de Westergren é o método tradicional e de referência no qual se fundamentam os métodos automáticos. Utiliza uma pipeta específica, a pipeta de Westergren, de vidro, com 30 cm de comprimento e diâmetro de 2,5 mm, apresenta uma escala graduada em que o ponto 0 mm está no topo da pipeta. A técnica exige que o tubo seja colocado perfeitamente na vertical e que durante o tempo de teste a amostra não seja sujeita a vibrações e esteja resguardada da luz solar direta.

O método de Westergren pode ser utilizado para confirmar os resultados do analisador automático. Neste método é colocado 1 mL de sangue com EDTA num tubo de citrato.

• Procedimento:

1. Homogeneizar bem o sangue e encher a pipeta, perfurando a tampa do tubo, até à marca de 0 mm;
2. Colocar a pipeta na vertical;
3. Deixar repousar por 60 min ou 120 min, sem perturbações, vibrações e protegido da exposição à luz solar direta;
4. Ler a coluna de plasma acima da coluna de células sedimentadas pela escala graduada e reportar o valor em mm.

Os analisadores automáticos da VSG são uma variação do método tradicional de Westergren. Os parâmetros fundamentais são os mesmos e utilizam o mesmo anticoagulante, na mesma razão sangue/anticoagulante. A análise é realizada nos tubos em que o sangue é colhido, eliminando o risco de manipulação da amostra. Os tubos são colocados nas racks do equipamento automático, sendo que a maioria consegue analisar uma elevada quantidade de amostras em cada corrida. Em geral, o instrumento automático utiliza uma câmara e um cartão eletrónico. A câmara recolhe imagens dos tubos em intervalos de tempo regulares. Essas imagens são transferidas para o microprocessador que analisa as imagens. O sistema calcula, automaticamente, a distância entre o nível do sangue no momento 0 com os momentos seguintes recolhidos durante a sedimentação do sangue. Matematicamente o equipamento calcula o valor equivalente ao método de Westergren através da informação que obteve.

• Vantagens do processo automatizado:

- Não é necessária a manipulação de amostras;
- É rápido, estando os resultados prontos em 20 min;
- Permite manter a informação referente a amostras anteriores;
- Permite a análise de várias amostras ao mesmo tempo.

4.6.1 Ves-Matic Cube 30

O Ves-Matic Cube 30 da A. Menarini Diagnostics é um analisador automático de bancada desenhado e programado para determinar a VSG em sangue total com EDTA como anticoagulante. A determinação é realizada sem o consumo de amostra, sem adicionar reagentes e sem produzir resíduos. Como o teste é realizado no tubo de colheita não há exposição à amostra, eliminando os riscos de manipulação.

Este método automático permite obter resultado precisos e comparáveis com o método de Westergren.

O equipamento permite carregar 30 amostras em cada corrida, fazendo um total de 60 testes por hora. Tem um leitor de códigos de barras para facilitar a identificação dos pacientes, homogeneiza as amostras, faz a determinação do resultado por leitura ótica, e a transmissão dos resultados para o sistema informático do laboratório.

O controlo de qualidade interno é realizado de manhã e na mudança do turno. São carregados dois tubos de controlo bem homogeneizados para confirmar que o equipamento está em condições de funcionamento.⁶²



Figura 18 Equipamento Ves-Matic Cube 30.⁶²

4.7 Estudo da Coagulação

A hemostase é o mecanismo que permite manter o sangue a circular dentro dos vasos sanguíneos no estado líquido. O processo de hemóstase envolve a interação entre muitos fatores tecidulares, plaquetas, fatores de coagulação e fatores de fibrinólise.

A hemóstase é dividida em três fases:

- Hemostase primária: quando ocorre um dano no vaso sanguíneo é produzido um espasmo que leva à vasoconstrição e diminuição do fluxo de sangue naquele local. O tecido subendotelial exposto é rico em colagénio e fator de von Willbrand (vWF) que ativa as plaquetas. Estas sofrem uma modificação na sua estrutura, projetando pseudopodes, e libertam o conteúdo dos seus grânulos. A agregação das plaquetas forma um coágulo provisório no local da lesão.

- Hemostase secundária: é o processo que permite o reforço do coágulo temporário criado na hemóstase primária. Consiste numa cascata de ativação de

fatores que culmina com a conversão do fibrinogénio em fibrina. Esta cascata é dividida em três vias:

- A via intrínseca que é ativada pela exposição do tecido subendotelial à corrente sanguínea;
- A via intrínseca que responde ao traumatismo tecidual;
- Estas duas vias culminam na ativação do fator X e no desencadeamento da via comum cujo objetivo é converter a protrombina em trombinha.

• Hemóstase terciária ou fibrinólise: tem como objetivo a degradação da fibrina formada.

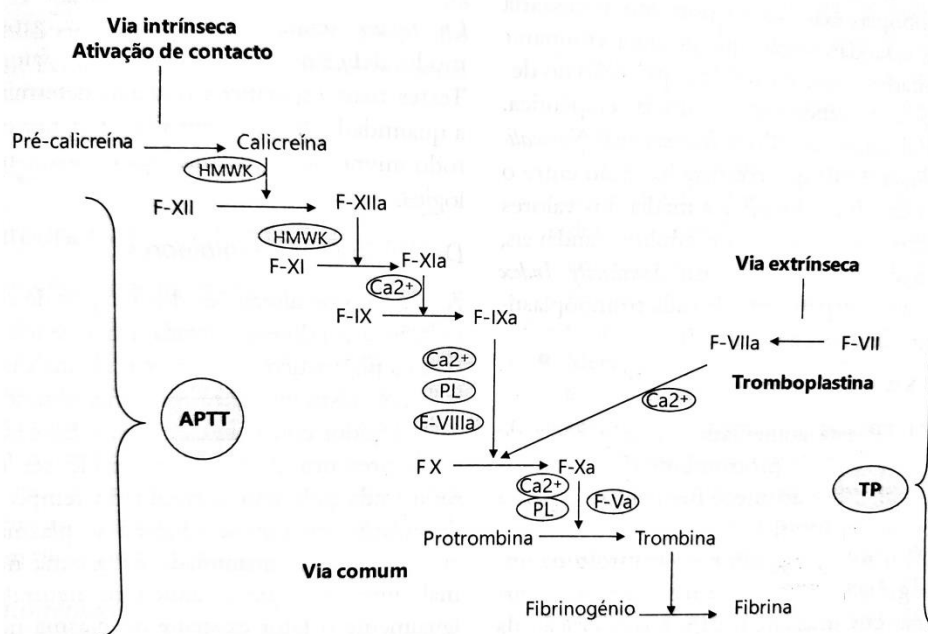


Figura 19 Cascata da Coagulação⁶³

Tabela 11 Fatores de coagulação, substâncias de ativação e suas funções.⁶⁴

Fator	Função
Fibrinogénio (I)	Precursor da fibrina na formação do coágulo.
Protrombina (II)	Ativa os fatores I, V, VIII, XIII, proteína C e plaquetas.
Fator tecidual (III)	Presente na membrana de alguns tipos de células, quando entra em contacto com o fator VII dá início à coagulação.
Cálcio (IV)	É um cofator necessário para que os fatores de coagulação se liguem aos fosfolípidos.
Pró-acelerina (V)	Faz parte dos grânulos α das plaquetas. É um cofator do X com o qual forma o complexo protrombinase.
Pró-convertina (VII)	Ativa os fatores IX e X
Fator anti-hemofílico (VIII)	Cofator do IX com o qual forma o complexo tenase.
Fator de Christmas (IX)	Ativa o fator X e forma o complexo tenase

	com o VII.
Fator de Stuart-Power (X)	Ativa o fator II e forma o complexo protrombinase com o V.
Precursor da Tromboplastina Plasmática (XI)	Ativa o XII, IX e pré-caliceína
Fator de Hageman (XII)	Ativa a pré-caliceína e o fator XI.
Fator estabilizante de Fibrina (XIII)	Formação de ligações peptídicas cruzadas entre a fibrina.
Fator de von Willebrand	Liga-se ao fator VIII e intervém na adesão plaquetária.
Pré-caliceína	Ativa o XII e a pré-caliceína. Cliva o clininogênio de alto peso molecular.
Clininogênio de alto peso molecular (HMWK)	Cofator na ativação de XII, XI e pré-caliceína.
Fibronectina	Adesão celular.
Antitrombina III	Inibe o fator IIa, Xa e outras proteases.
Cofator II da heparina	Inibe o fator IIa, cofator da heparina.
Proteína C	Inativa o Va e o VIIa.
Proteína S	Cofator para ativação da proteína C
Plasminogénio	Precursor da plasmina que tem como função lisar a fibrina e outras proteínas.
Alfa 2- antiplasmina	Inibe a plasmina.
Uroquinase	Ativa o plasminogénio.

4.7.1 BCS XP System

No sector de hematologia do HBA existem dois equipamentos BCS XP System iguais para realizar as provas da coagulação, ambos realizam o mesmo tipo de testes. Um é o equipamento de rotina usado durante o período diurno para as amostras de internamento e exteriores, o outro é o equipamento de urgência menos utilizado durante o horário diurno e usado quase exclusivamente no horário de urgência.

O BCS XP system pertence à casa comercial Siemens Healthinears e realiza provas de avaliação da coagulação. Ele possui um local refrigerado com espaço para 4 racks de 5 posições cada uma, que servem para colocar os reagentes que necessitam ser refrigerados. Tem mais 10 posições para racks não refrigeradas que são destinadas às amostras de CQI e às amostras a testar. Os ensaios são realizados em rotores com 20 cuvetes de reação cada. O interior do equipamento onde as amostras são processadas encontra-se a 37°C.

Todos os ensaios realizados pelos dois equipamentos são controlados com amostras de CQI ao início do dia e quando acontece a mudança de turno, a calibração dos ensaios é realizada quando se instala a bordo um novo lote de reagente.

O analisador utiliza três métodos para realizar os ensaios:

- Medição do tempo de coagulação: neste método é medido o tempo desde a mistura dos reagentes até à formação do coágulo. O coágulo é detetado por turbidimetria. (utilizado para TP, aPTT e Fibrinogénio)
- Reações cromogénias: um reagente cromogénio é adicionado às amostras, a reação com o analito alvo provoca a formação de cor, que é lida por

fotometria a um comprimento de onda de 405nm. Em seguida o equipamento utiliza uma curva de calibração para determinar a concentração do analito em função da absorvância medida. (o analisador possui esta técnica para realizar ensaios como proteína C e Antitrombina III, no entanto nenhum destes ensaios é realizado no HBA);

- Método imunoquímico: os reagentes utilizados nesta técnica contêm anticorpos específicos ligados a esferas de látex. A formação do complexo anticorpo-alvo provoca a turvação da amostra. A turvação é detetada por turbidimetria. (Este método é utilizado para a determinação do dímero-D)

Uma vez que todas as determinações realizadas por este equipamento têm como base medições feitas por turbidimetria ou fotometria, todos os ensaios sofrem interferência de lipémia, hemólise e icterícia, nomeadamente baixando os valores do resultado por elevação do valor do branco de amostra.⁶⁵

Ensaio realizado no HBA:

- Tempo de protrombina (TP) e índice internacional normalizado (INR): o tempo de Protrombina é o tempo (medido em segundos) que demora para a formação do coágulo após a adição de cálcio e tromboplastina tecidual. É utilizado para analisar o estado da via extrínseca (fator XI) da cascata da coagulação. O INR é um valor normalizado que deriva do valor de TP criado para uniformizar o resultado independentemente da técnica utilizada pelo laboratório. É utilizado para monitorizar utentes a realizar terapia de anticoagulação.

$$INR = \left(\frac{PT \text{ utente}}{PT \text{ médio dos controlos normais}} \right)^{\text{Índice de sensibilidade internacional (varia entre 1,0 e 1,4)}}$$

Valores de referência:

- PT: 9,8 a 12,1 segundos;
- INR: 1 a 1,2.

O TP pode vir aumentado em casos de deficiência nos fatores de coagulação, insuficiência hepática, deficiência de vitamina K e terapia anticoagulante. A sua diminuição pode dever-se ao uso de contraceptivos orais ou suplementação com vitamina K.

- Tempo de tromboplastina parcial ativada: é usado para testar as vias intrínseca e comum da cascata da coagulação (fatores I, II, V, X, IX, XI, XII e XIII). É medido o tempo de coagulação após adição de cálcio, do fosfolípido cefalina e de um ativador da coagulação.

Valores de referência:

- aPTT: 23 a 32 segundos.

O valor de aPTT pode estar aumentado por uso de anticoagulantes, deficiências nos fatores testados, septicemia, doença hepática, coagulação

intravascular disseminada. Valores baixos podem ser indicativos de hipercoaguabilidade.

- Fibrinogénio derivado e Fibrinogénio de Clauss: No método derivado do TP deduz-se o teor de fibrinogénio através do tempo de coagulação após incubação com tromboplastina. No método do fibrinogénio de Clauss é adicionado ao plasma uma quantidade excessiva de trombinha e medido o tempo até à formação de coágulo. Depois o analisador utiliza uma curva de calibração para determinar o teor de fibrinogénio na amostra.

Valores de referência: 180 a 350 mg/dl.

Valores elevados de Fibrinogénio associam-se a maior risco de eventos vasculares, podendo acontecer devido ao uso de contraceptivos orais e durante a fase aguda. Níveis baixos podem advir de doença hepática, coagulopatia e disfibrinogenémias congénitas ou adquiridas.

- Dímero-D: o dímero-D é um produto da degradação da fibrina, é uma pequena proteína que circula no sangue após o coágulo de fibrina ser degradado por fibrinólise. O seu valor preditivo negativo é muito elevado e ajuda na exclusão de diagnósticos de distúrbios trombóticos. No entanto, quando positivo pode indicar uma quantidade elevada de situações diferentes. É muito utilizado no diagnóstico de trombose venosa profunda, embolismo pulmonar e coagulação intravascular disseminada.

Valor de referência: <500 µg/L⁶⁵

4.8 Pesquisa de *Plasmodium*

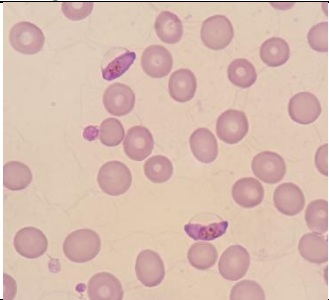

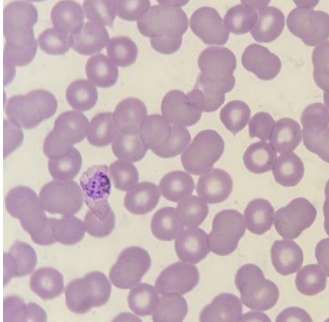
No HBA há um volume elevado de pedidos de pesquisa de infeções por Malária. No departamento de hematologia há um teste rápido que permite a triagem inicial.


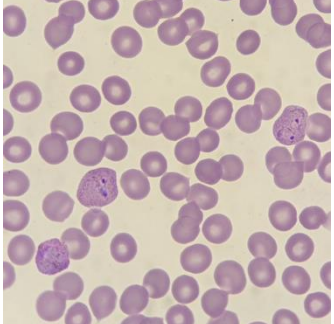
O BinaxNOW da casa comercial Abbott é um teste rápido qualitativo para a detecção de antígenos circulantes em sangue venoso ou capilar anticoagulado com EDTA. O teste tem como alvo o antígeno para a proteína II rica em histidina (HRPII) de *P. falciparum*, e um antígeno comum a todos os parasitas da malária capazes de infetar os humanos. Ou seja, apenas permite a diferenciação entre a infeção por *P. falciparum* e as outras espécies menos virulentas. Os resultados devem ser confirmados por microscopia, no caso positivo em que possa ser qualquer um dos parasitas para se verificar qual deles está presente, no caso negativo é sempre necessário verificar por esfregaço de gota fina ou grossa.⁶⁶



Figura 20 Teste rápido para detecção de infecções por malária BinaxNOW da Abbott⁶⁶

Tabela 12 Observação ao microscópio de infecções por *Plasmodium*. Imagens recolhidas durante o estágio.

Imagem	Legenda
	Imagem de campo de lâmina de sangue periférico, esfregaço de gota fina. Observam-se dois eritrócitos parasitados com <i>Plasmodium falciparum</i> . O formato em foicinha ou crescente que deforma o eritrócito, citoplasma azul com núcleo compacto central e pigmento agregado em redor são característicos do macrogametócito.
	Observação de esfregaço de gota fina. Neste campo observa-se um trofozoíto jovem de <i>Plasmodium ovale</i> .
	Observação de esfregaço de gota fina. Neste campo observa-se um esquizonte de <i>Plasmodium ovale</i> .

	<p>Observação de esfregaço de gota fina. Neste campo observa-se um esquizonte tardio de <i>Plasmodium ovale</i>.</p>
	<p>Observação de esfregaço de gota fina. Neste campo pode ver-se três eritrócitos parasitados por <i>Plasmodium ovale</i>. A observação de vários eritrócitos parasitados no mesmo campo é indicativo de parasitemia elevada. O eritrócito mais à direita apresenta dois trofozoitos.</p>

4.9 Eletroforese das hemoglobinas

A hemoglobina é uma metaloproteína presente no eritrócito que permite o transporte de oxigênio. É composta por 4 cadeias polipeptídicas de estrutura terciária ligadas a quatro grupos heme que contêm ferro.

Existem diferentes tipos de hemoglobinas normais presentes nos diferentes estádios do desenvolvimento, desde embrião até indivíduo adulto, que diferem na constituição das cadeias polipeptídicas.

- Hemoglobinas normais e sua constituição:
 - Fase embrionária:
 - Gower 1 ($\xi 2 \epsilon 2$);
 - Gower 2 ($\alpha 2 \epsilon 2$);
 - Portland ($\zeta 2 \gamma 2$).
 - Fase fetal e bebês até 6 meses:
 - Hb F ($\alpha 2 \gamma 2$).
 - Crianças >6 meses e adultos:
 - Hb A ($\alpha 2 \beta 2$): 96 – 98%;
 - Hb A2 ($\alpha 2 \delta 2$): 1,5 – 3,2%;
 - Hb F ($\alpha 2 \gamma 2$): 0,5 – 0,8%.

Mutações nas cadeias peptídicas com substituição de aminoácidos leva à formação de variantes da hemoglobina que resultam em hemoglobinopatias qualitativas. A diminuição ou ausência de expressão de uma das cadeias em relação à outra traduz-se numa talassémia ou hemoglobinopatia quantitativa.

- Variantes da hemoglobina:
 - Hb C: resulta da substituição de um ácido glutâmico por uma lisina na sexta posição da cadeia da β -globina;
 - Hb E: resulta de uma mutação pontual na posição 26 da cadeia β , em que há troca de um ácido glutâmico por uma lisina;
 - Hb S: deve-se à substituição de um ácido glutâmico por uma valina na cadeia β ;
 - Hb D: causada por uma substituição de um ácido glutâmico por uma glutamina na cadeia β ;
 - Hb de Bart: consiste num tetramero de cadeias γ . É insolúvel e acumula-se nos eritrócitos; a sua alta afinidade para o oxigénio resulta na deficiente oxigenação dos tecidos;
 - Hb J: resulta de uma mutação na posição 120 da cadeia α , em que há substituição de uma alanina por um ácido glutâmico;
 - Hb H: composta por quatro cadeias β ;
 - Hb O-Arab: resulta da substituição de um ácido glutâmico por uma lisina na posição 121 da cadeia β ;
 - Hb G-Filadelfia: deve-se à substituição de uma asparagina por uma lisina na cadeia α ;
 - Hb Hope: deve-se à substituição de uma glicina por um ácido aspártico na cadeia β , possui menor afinidade para o oxigénio;
 - Hb N-Baltimore: variante da cadeia β que apresenta substituição de uma lisina por um ácido glutâmico na posição 95.⁶⁷

4.9.1 Capillarys Hemoglobin (E)

O equipamento Capillarys Hemoglobin (E) da casa comercial Sebia baseia-se no princípio da eletroforese capilar para determinar o perfil eletroforético das hemoglobinas.

As porções da hemoglobina são separadas em capilares de sílica dependendo da sua mobilidade eletroforética e do fluxo eletrosmótico a alta voltagem num tampão alcalino (pH=9,4). As frações da hemoglobina são detetadas por absorção específica a 415 nm. O padrão é dividido em 15 zonas nas quais podem migrar varias variantes da hemoglobina.

As amostras utilizadas são de sangue total em EDTA, que são submetidas a uma centrifugação a 5000 rpm durante 5 minutos, após a qual é removida, quase na totalidade, a coluna de plasma. A restante papa de glóbulos é agitada no vortex durante 5 segundos.

As hemoglobinas são detetadas na seguinte ordem: Hb C, Hb A2 e O-Arab, Hb E, Hb S, Hb D, Hb G-Filadelfia, Hb F, Hb A, Hb hope, Hb Bart, Hb J, Hb N-Baltimore e Hb H.⁶⁸

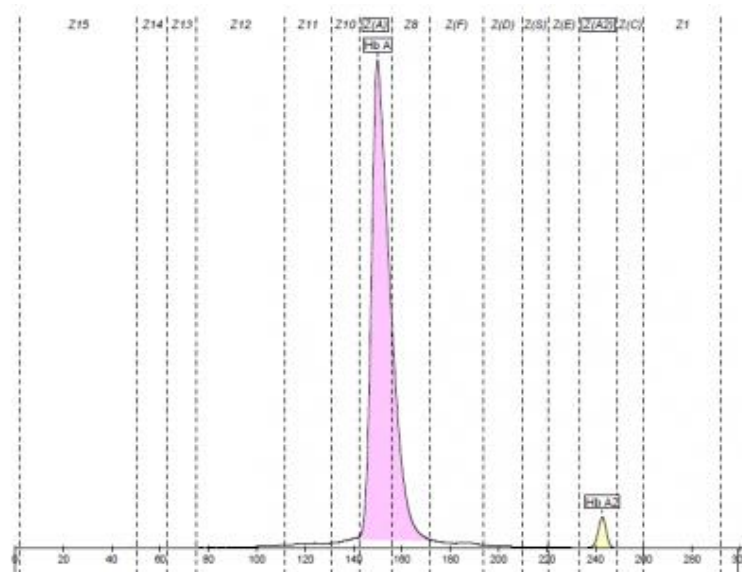


Figura 21 Perfil eletroforético das hemoglobinas normal obtido pelo sistema Capillarys Hemoglobin (E).⁶⁹

4.10 Imunofenotipagem por Citometria de fluxo fluorescente

A citometria de fluxo mede as características óticas e de fluorescência da célula. Características físicas como tamanho (medido pela dispersão frontal da luz) e a complexidade interna (medida pela dispersão lateral da luz) permitem distinguir alguns grupos de células. Os corantes fluorescentes podem ligar-se ou intercalar-se com diferentes componentes celulares como DNA ou RNA. Adicionalmente, anticorpos conjugados com fluorocromos ligam-se a proteínas específicas na membrana celular ou no interior da célula.

Quando uma célula marcada passa por uma fonte de luz, as moléculas fluorescentes são excitadas e passam a um nível superior de energia. Quando retornam ao estado inicial, os fluorocromos emitem luz a comprimentos de onda mais elevados. O uso de múltiplos fluorocromos que são excitados pelo mesmo comprimento de onda mas emitem em comprimentos de onda diferentes permite testar várias propriedades das células em simultâneo.

Dentro do citometro, as células são envolvidas num fluido isotónico que cria um fluxo laminar e permite que as células passem individualmente pelo foco de luz. Nesse momento o foco de luz monocromática intersesta a célula. A luz emitida pelos marcadores fluorescente é direcionada por espelhos e os comprimentos de onda são isolados por filtros. Os sinais de luz são detetados por fotomultiplicadores que convertem o sinal luminoso em sinal digital para ser apresentado no ecrã do computador. A informação é, usualmente, apresentada em histogramas ou gráficos de pontos bidimensionais.

Os eixos dos gráficos são nomeados de acordo com o fluorocromo e o antígeno ligado a ele, as células positivas para ambos os marcadores apresentam-se no quadrante superior direito, enquanto as negativas para ambos os marcadores estão no quadrante inferior esquerdo.

A análise dos resultados realiza-se por “janelas”, ou seja, definem-se populações de células especificamente ligadas por anticorpos (por exemplo, CD3 para células T, CD19 para células B e CD56 para a população NK), em seguida define-se esse conjunto de células quanto à linhagem celular, maturação ou anomalias e quanto à expressão anormal de antígenos.

A citometria de fluxo pode ter muitas aplicações. No caso do laboratório central da SynlabHealth é usada na monitorização de pacientes com HIV e na imunofenotipagem de leucemias e linfomas.

Tabela 13 Imunofenótipos característicos de algumas linhagens de células e distúrbios linfoproliferativos.⁷⁰

Condição	Imunofenotipagem	
Linhagem B	Expressão de CD19, CD22, CD24, CD79a e CD45; expressão variável de CD34, CD10, CD20 e CD79b.	
Linhagem T	Expressão de CD7, CD45 e CD3; expressão variável de CD1a, CD2, CD3 na membrana, CD5, CD4, CD8, CD10.	
Leucemia Linfocítica Crónica	Expressão de CD5 e CD23; ausência ou expressão fraca de CD20, CD22 e CD79b; CD35 e FMC7 negativos; CD200 forte.	
Leucemia prolinfocítica B	CD23 negativo, FMC7, CD20, CD22, CD35 E CD79B positivos; expressão variável de CD5 e CD10.	
Leucemia de <i>Hairy cells</i>		CD11c, CD25, CD103, CD123 positivos; CD22 e CD200 fortes.
Linfoma Folicular		CD10 geralmente expresso
Linfoma das células do manto		CD5 positivo e CD200 fraco
Linfoma de grandes células B		Expressão variável de CD5 e CD10
Leucemia plasmocítica	Expressão de imunoglobulina plasmática monoclonal; CD38 e CD138 positivos.	
Leucemia Prolinfocítica T	Expressão variável de CD2, CD3, CD5 e CD7; CD1 negativo.	CD4 e CD7 geralmente expressos.
Linfoma/ leucemia de células T do adulto		CD4 e CD25 geralmente expressos; CD38 expresso em 1/3 dos doentes.
Leucemia de linfócitos grandes e granulares (células NK)	CD3 negativo, CD1a negativo; expressão variável de CD2 e CD8; CD4 geralmente não expresso; CD11b, CD16 e CD56 positivos; CD57 pode ser positivo; CD158 negativo.	

4.10.1 Citometro Navios EX

No departamento de hematologia do Laboratório central existe o citometro Navios EX da casa comercial Beckman Coulter. O equipamento possui três lasers diodo (azul 488nm, vermelho 638 nm e violeta 405 nm) que permitem a análise de 10 cores: 5 canais de fluorescência com o laser azul, 3 com o vermelho e 2 com o violeta. O carrossel de amostras possui 32 espaços para tubos, o que permite uma velocidade de análise de 82 amostras por hora. Os sinais enviados ao computador são apresentados e examinados no programa específico Infinicyt.⁷¹



Figura 22 Citometro Navios EX da Beckman Coulter

As amostras de CQI são testadas quando se inicia o equipamento para garantir que este está nas condições ideais de funcionamento.

4.11 Casos clínicos

Uma parte importante do trabalho num laboratório de análises clínicas é a interpretação de resultados, especialmente a interpretação de valores resultantes de diferentes ensaios para estabelecer um diagnóstico, ou a análise de sinais importantes para encaminhar o processo até chegar ao diagnóstico.

Durante o estágio de hematologia no HBA tive contacto com alguns casos clínicos de patologias importantes que me permitiram integrar os conhecimentos obtidos até aqui.

Em seguida apresento 4 casos que considere relevantes.

4.11.1 Anemia das células falciformes

Criança do sexo feminino, com dois anos de idade, afrodescendente. Apresenta-se nas urgências com um quadro de febre, gemido e palidez.

O hemograma inicial (ilustração 23) apresenta uma anemia acentuada com 6,6 g/dl de hemoglobina, hematócrito, VGM, HGM e CHGM diminuídos; contagem de reticulócitos aumentada e é possível verificar também uma leucocitose com neutrofilia acentuada.

Hemograma		31-08-2017		01-08-2017	
Eritrograma					
Eritrócitos		3.93 x10 ¹² /L	4.00 - 5.20	3.44	5.37
Hemoglobina		6.6 g/dL	11.5 - 13.5	10.1	17.9
Hematócrito		22.4 %	34.0 - 40.0	32.4	56.7
Vol. Glob. Médio (VGM)		57 fL	75 - 87	94	106
Hgb. Glob. Média (HGM)		17 pg	24 - 30	29	33
Conc. Hgb. Glob. Média (CHGM)		29 g/dL	32 - 36	31	32
RDW (índice distrib. eritrocit.)		24.8 %	11.6 - 14.0	18.5	17.2
Leucograma					
Leucócitos		27.70 x10 ⁹ / L	5.00 - 15.00	9.44	5.82
-Neutrófilos	77.1 %	21.36 x10 ⁹ / L	1.50 - 8.00	2.45	1.51
-Eosinófilos	0.2 %	0.06 x10 ⁹ / L	0.10 - 1.00	0.32	0.20
-Basófilos	0.2 %	0.06 x10 ⁹ / L	< 0.10	0.05	0.03
-Linfócitos	17.6 %	4.88 x10 ⁹ / L	1.50 - 8.00	5.67	3.34
-Monócitos	4.9 %	1.36 x10 ⁹ / L	0.20 - 1.00	0.95	0.75
Plaquetas		230 x10 ⁹ / L	200 - 450	182	160
Estudo morfológico do sangue periférico		Microcitose e hipocromia acentuadas. Anisocitose acentuada. Observam-se muitos drepanócitos e "target cells".			
Mét. Microscopia óptica (Amostra: Sangue Total)					
Reticulócitos (%)		11.1 %		0.2 - 2.8	
Mét. Citometria de Fluxo (CF) Amostra: Sangue Total					
Valor Absoluto:		436 x10 ⁹ / L			
Cont. Hgb. Reticulocitária (CHR)		22 pg		26 - 32	

Figura 23 Resultados do hemograma da criança de 2 anos. Imagem obtida durante o estágio.

Na observação do esfregaço de sangue periférico são observados numerosos drepanócitos e células em alvo, característicos da anemia das células falciformes. É possível verificar também microcitose e hipocromia acentuadas. A ilustração 24 é uma fotografia da observação ao microscópio do sangue desta utente.

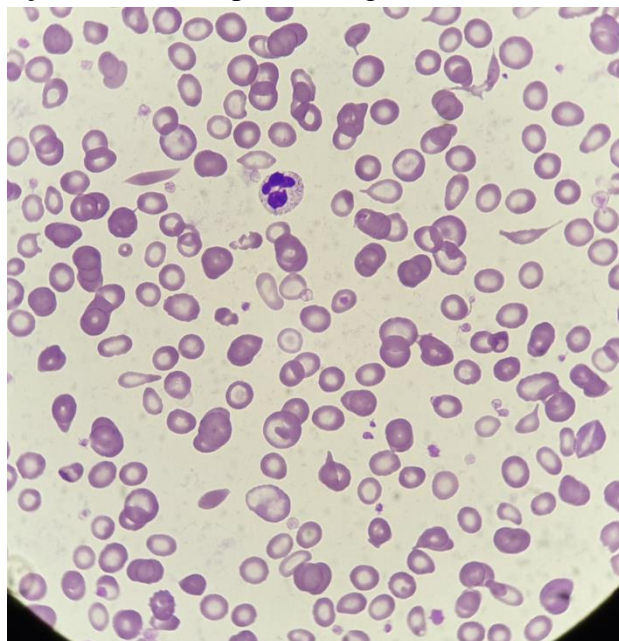


Figura 24 Imagem de microscopia ótica do sangue da utente, objetiva 100x. Imagem obtida durante o estágio.

Conforme os achados foi estabelecido o diagnóstico de anemia das células falciformes e foi pedida uma eletroforese das hemoglobinas, realizada no laboratório central. Os resultados, apresentados na ilustração 25, permitiram diagnosticar uma anemia compatível com homozigotia SS.

HEMATOLOGIA		
Electroforese das Hemoglobinas		
Mét.: Electroforese Capilar Amostra: Sangue Total		
- Hemoglobina A	0.0 %	95.9 - 97.9
- Hemoglobina F	17.6 %	0.0 - 1.6
- Hemoglobina S	79.2 %	< 0.1
- Hemoglobina A2	3.2 %	2.2 - 3.2
Relatório:	A electroforese das hemoglobinas revelou ausência de HbA e uma banda com migração na zona da HbS CONCLUSÃO: Compatível com anemia de células falciformes (homozigotia SS).	
Nota: os valores de referência foram alterados em Abril de 2019.		

Figura 25 Resultados da eletroforese das hemoglobinas. Imagem obtida durante o estágio.

- **Anemia das células falciformes:**

A anemia das células falciformes é uma doença causada pela homozigotia para uma variante da cadeia β da hemoglobina, a hemoglobina S (do inglês *sickle*= foice).

A hemoglobina S polimeriza em condições de baixa tensão de oxigênio, levando o eritrócito a assumir o formato de foice que diminui a sua flexibilidade. A diminuição da flexibilidade da membrana da célula está na origem da característica clínica mais comum desta doença, as crises dolorosas recorrentes nos dedos das mãos e dos pés (em crianças pequenas), no tórax, no abdômen e nos membros. Outra das características clínicas frequentes é a anemia, causada pela diminuição do tempo de vida dos eritrócitos.

O gene β^s responsável por esta doença é muito frequente em indivíduos de etnia africana, o que justifica a elevada prevalência da doença neste grupo étnico.

Os achados no hemograma característicos desta doença são: anemia com hemoglobina na ordem de 4-11 g/dl; hematócrito, VGM, HGM e CHGM diminuídos; e RDW aumentado. Durante as crises dolorosas há leucocitose com predominância de neutrófilos, queda acentuada da hemoglobina, aumento da policromatofilia e da contagem de eritroblastos e reticulócitos.

Logo após o nascimento, quando a quantidade de hemoglobina S é ainda pequena, os índices hematimétricos e as contagens celulares podem ser normais. As anormalidades começam a aparecer durante o primeiro ano de vida.

Indivíduos com percentagens de hemoglobina fetal invulgarmente aumentadas tendem a apresentar sintomas mais discretos.

O diagnóstico não pode ser estabelecido apenas pelo hemograma sendo necessários testes adicionais como a eletroforese da hemoglobina e o teste de solubilidade da hemoglobina S.

Tratamento:

-Profilaxia: evitar fatores conhecidos que podem provocar as crises dolorosa como: desidratação, anoxia, infeções, estase da circulação e frio.

-Ácido fólico.

-Boas condições de higiene e nutrição.

-Vacinação contra pneumococos e meningococos, e penicilina oral para diminuir a frequência de infeção por estes agentes.

-Durante as crises é aconselhado permanecer em repouso, aquecer as zonas afetadas, hidratação, antibióticos para eventuais infeções e aplicação de analgésicos conforme as necessidades.

-Transfusões podem ser necessárias em pacientes com crises frequentes, em grávidas ou antes de anestesia para pequenas cirurgias.

-Hidroxicarbamida aumenta a quantidade de hemoglobina F por um mecanismo não conhecido, aliviando os sintomas da doença em crianças e adultos.

-Transplante de células tronco é o único tratamento que leva à cura em 80% dos casos, no entanto é apenas indicada em casos de doença muito grave em que a qualidade e expectativa de vida do indivíduo sejam muito baixas.⁷²

4.11.2 Síndrome Mielodisplásico

Indivíduo do sexo masculino com 58 anos de idade, com diagnóstico estabelecido de Síndrome Mielodisplásico.

Na ilustração 26 pode ver-se o hemograma do utente onde se nota uma pancitopénia acentuada. Há também alteração dos testes da coagulação com aumento do TP e do aPTT.

HEMATOLOGIA							
Hemograma		28-07-2019			18-07-2019		
Amostra: Sangue Total							
Eritrograma							
Eritrócitos	2.28 x10 ¹² /L	4.50 - 5.90	3.27	3.08			
Hemoglobina	7.1 g/dL	13.5 - 17.5	10.1	9.5			
Hematócrito	20.9 %	41.0 - 53.0	30.1	27.3			
Vol. Glob. Médio (VGM)	92 fL	80 - 100	92	89			
Hgb. Glob. Média (HGM)	31 pg	26 - 34	31	31			
Conc. Hgb. Glob. Média (CHGM)	34 g/dL	32 - 36	33	35			
RDW (índice distrib. eritrocit.)	16.6 %	11.6 - 14.0	16.6	15.5			
Leucograma							
Leucócitos	2.53 x10 ⁹ / L	4.00 - 10.00	4.02	2.73			
-Neutrófilos	79.9 %	2.02 x10 ⁹ / L	1.80 - 7.00	3.34	1.65		
-Eosinófilos	0.3 %	0.01 x10 ⁹ / L	< 0.50	0.01	0.08		
-Basófilos	0.1 %	0.00 x10 ⁹ / L	< 0.10	0.01	0.01		
-Linfócitos	6.4 %	0.16 x10 ⁹ / L	1.00 - 4.00	0.38	0.65		
-Monócitos	13.3 %	0.34 x10 ⁹ / L	0.20 - 1.00	0.30	0.34		
Plaquetas	28 x10 ⁹ / L	150 - 400	44	41			
Tempo de protrombina							
Mét.: Coagulometria Amostra: Plasma	38.5 seg.	10.6 - 13.5	28-07-2019	18-07-2019			
- INR	4.19	(variável com patologia)	31.1	20.5			
INR: resultado a valorizar apenas se a fazer anticoagulante oral.							
Tempo Tromb. Parcial activada (aPTT)							
Mét.: Coagulometria Amostra: Plasma	64.2 seg.	21.4 - 31.2	28-07-2019	18-07-2019			
					48.7	39.9	

Figura 26 Hemograma do utente. Imagem obtida durante o estágio.

A anemia, trombocitopenia e leucopenia com predominância de neutrófilos foram verificadas por observação do esfregaço de sangue periférico do paciente.

O diagnóstico da SMD não pode ser definido apenas pelos achados no hemograma e pela observação da lâmina, embora estes sejam bons indícios que podem

encaminhar para exames complementares. Na ficha de utente do laboratório do HBA não estavam os restantes exames realizados uma vez que o indivíduo foi diagnosticado noutra centro hospitalar.

- **Síndromas mielodisplásicos:**

Os SMD constituem um grupo heterogéneo de condições decorrentes da proliferação de um clone de células hematopoiéticas. A hematopoiese é funcionalmente ineficaz e morfológicamente displásica. Os SMD podem ser potencialmente pré-leucémicas embora muitos pacientes morram por complicações das citopenias antes de desenvolver leucemia.

Os SMD podem ser primários ou secundários a exposição a agentes mutagénicos como radiação ionizante, benzeno e medicamentos antiléucémicos.

Os SMD são classificados segundo a OMS nas categorias apresentadas na tabela 14.

Tabela 14 Classificação de SMD segundo a OMS⁷⁰

Classificação	Achados no sangue periférico	Achados na medula óssea
SMD associada a deleção 5q	Anemia, contagem de plaquetas normal ou elevada, blastos <1%.	Megacariócitos em número normal ou aumentado, mas com núcleo hipolobulado. blastos <5%, sem bastões de Auer.
Citopenia refratária com displasia de uma linhagem	Citopenia afetando uma ou duas linhagens, blastos raramente vistos, monócitos <1x10 ⁹ /L.	Displasia confinada a uma linhagem, blastos <5%, sideroblastos em anel <15%.
Anemia refratária com sideroblastos em anel	Anemia, sem blastos, monócitos <1x10 ⁹ /L.	Displasia apenas da linhagem eritroide, blastos <5%, sideroblastos em anel ≥15%
Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens	Bicitopenia ou pancitopenia, blastos <1%, sem bastões de Auer, monócitos <1x10 ⁹ /L.	displasia em ≥10% das células de duas ou mais linhagens mieloides, blastos <5%, sem bastões de Auer, sideroblastos em anel podem estar presentes.
Anemia refratária com excesso de blastos 1	Citopenias, blastos <5%, sem bastões Auer, monócitos <1x10 ⁹ /L.	Displasia de uma ou múltiplas linhagens, blastos 5-9%, sem bastões de Auer.
Anemia refratária com excesso de blastos 2	Citopenias, blastos 5-9%, podem estar presentes bastões de Auer. Monócitos <1x10 ⁹ /L.	Displasia de uma ou múltiplas linhagens, blastos 10-19%, podem estar presentes bastões de Auer.
SMD inclassificável	Não apresenta pancitopenia, blastos <1%, sem bastões de Auer.	Citopenia com displasia em <10% das células de uma linhagem, com anormalidade

		citogenética definida, blastos<5%, sem bastões de Auer.
--	--	---

Os achados típicos no hemograma de SMD são: anemia com eritrócitos normocrômicos, normocíticos ou macrocíticos; anisocromia; pode estar presente leve leucocitose, número normal de leucócitos ou leucopenia, no entanto, por definição, o número de leucócitos tem de ser inferior a $13 \times 10^9/L$, caso contrário é classificada como neoplasia mielodisplásica / mieloproliferativa; pode existir monocitose mas é sempre inferior a $1 \times 10^9/L$; neutrofilia é rara; quase nunca há aumento de basófilos ou eosinófilos; podem ser vistos blastos, promielócitos, mielócitos e eritroblastos; as plaquetas podem apresentar contagem baixa e serem grandes e hipogranulares.

Para estabelecer o diagnóstico e classificar a SMD é necessário mielograma e análise citogenética.

O tratamento dos SMD é sintomático sendo que a única possibilidade de cura é o transplante de células tronco. Para aliviar as citopenias pode proceder-se a transfusões de eritrócitos, leucócitos ou plaquetas consoante as necessidades do doente. Transfusões sanguíneas sucessivas podem levar à acumulação de ferro nos tecidos e órgãos, nesta situação podem ser usadas substância quelantes como Deferoxamine ou Deferasirox.

Na tentativa de melhorar as citopénias podem, também, ser administrados fatores de crescimento. Para a linhagem eritroide pode ser usado um homólogo sintético da eritropoietina (Epoietina) ou a versão de longa ação Darbepoietina alfa. Para estimular a produção de leucócitos podem ser usados os fatores estimuladores de colónias de granulócitos ou de granulócitos- mascrófagos. Para combater a trombocitopenia podem ser usados agonistas do receptor da trombopoietina como Romiplostim e Eltrombopag.

Medicamentos hipometilantes como Azacidine e Decitabine são usados para melhorar as contagens celulares evitando transfusões sucessivas. Quimioterapia é usada em doentes cujo risco de evolução para LMA é muito elevado. A lenalidomida é um medicamento imunomodulador eficaz no tratamento de SMD com deleção de parte do cromossoma 5.⁷⁰

4.11.3 Leucemia Mieloide Aguda

Utente do sexo feminino, com 67 anos de idade e diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda a fazer quimioterapia.

O hemograma e os resultados do TP e aPTT da utente são apresentados na ilustração 27. É possível verificar a presença de uma anemia normocítica e normocrômica e anisocitose; neutropénica acentuada e presença de 70% de blastos. As provas da coagulação apresentam resultados dentro da normalidade.

HEMATOLOGIA			
Hemograma Amostra: Sangue Total			
Eritrograma			
Eritrócitos		3.11 $\times 10^{12}/L$	4.00 - 5.20
Hemoglobina		9.7 g/dL	12.0 - 16.0
Hematócrito		29.8 %	36.0 - 46.0
Vol. Glob. Médio (VGM)		96 fL	80 - 100
Hgb. Glob. Média (HGM)		31 pg	26 - 34
Conc. Hgb. Glob. Média (CHGM)		33 g/dL	32 - 36
RDW (índice distrib. eritrocit.)		20.7 %	11.6 - 14.0
Leucograma			
Leucócitos		10.24 $\times 10^9 / L$	4.00 - 10.00
-Neutrófilos	4.0 %	0.41 $\times 10^9 / L$	1.80 - 7.00
-Eosinófilos	0.0 %	0.00 $\times 10^9 / L$	< 0.50
-Basófilos	0.0 %	0.00 $\times 10^9 / L$	< 0.10
-Linfócitos	17.0 %	1.74 $\times 10^9 / L$	1.00 - 4.00
-Monócitos	9.0 %	0.92 $\times 10^9 / L$	0.20 - 1.00
-Blastos	70.0 %	7.17 $\times 10^9 / L$	
Plaquetas		10 $\times 10^9 / L$	150 - 400
Tempo de protrombina		11.0 seg.	10.6 - 13.5
Mét.: Coagulometria Amostra: Plasma			
- INR		0.98	(variável com patologia)
INR: resultado a valorizar apenas se a fazer anticoagulante oral.			
Tempo Tromb. Parcial activada (aPTT)		21.4 seg.	21.4 - 31.2
Mét.: Coagulometria Amostra: Plasma			

Figura 27 Hemograma e testes da coagulação da utente. Imagem obtida durante o estágio.

A observação do esfregaço de sangue periférico da utente permitiu verificar a presença de numerosos mieloblastos.

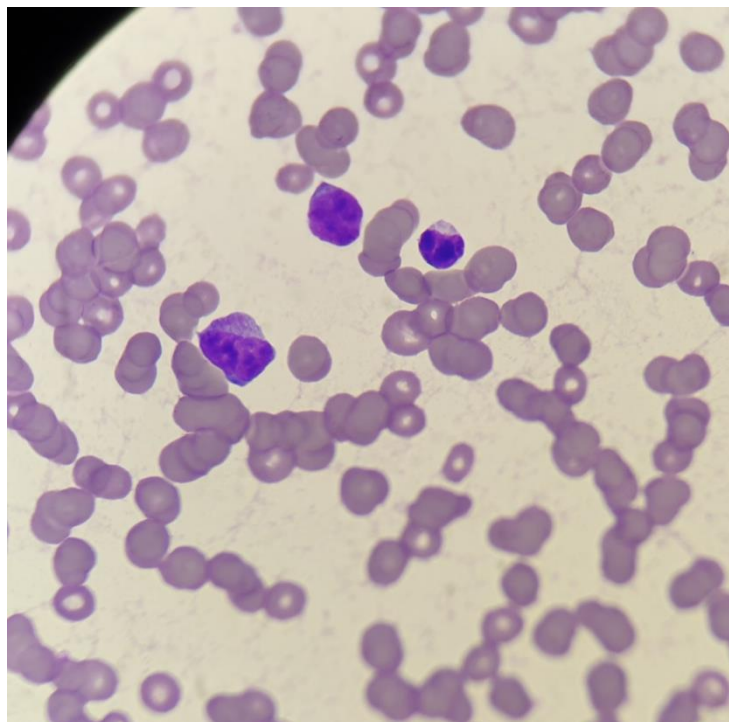


Figura 28 Observação de esfregaço de sangue periférico da utente. Imagem obtida durante o estágio.

Uma vez que a utente não estava a ser acompanhada no HBA e apenas se deslocou às urgências do mesmo, na ficha de utente não constavam os exames

complementares que levaram ao diagnóstico, não era especificada a classificação OMS da leucemia nem a terapia a que estava sujeita.

- **Leucemia Mieloide Aguda**

A LMA é uma doença que resulta da proliferação descontrolada de um clone de células mieloides indiferenciadas que apresentam maturação deficiente ou ausente. A doença é classificada com base em aspectos do sangue periférico e da medula óssea. Durante várias décadas a classificação mais aceite era a Franco-Americano-Britânica (FAB), que foi substituída mais recentemente pela classificação da OMS. No entanto, como a classificação da OMS requer a pesquisa de alterações genéticas e biologia molecular que podem ser demoradas, uma classificação inicial com base na morfologia é ainda apropriada. Uma das grandes diferenças a ter em conta entre as duas classificações é que, na FAB, só se considera LMA a partir de 30% de blastos na medula óssea, enquanto na classificação da OMS, considera-se LMA com a presença de 20% ou mais de blastos na medula ou no sangue periférico.

Os achados mais usuais no hemograma de doentes com LMA são: presença de numerosos blastos que podem ser mieloblastos, monoblastos, megacarioblastos, eritroblastos ou uma população mista; neutropenia está muitas vezes presente, embora possa haver maturação do clone leucémico e conseqüente neutrofilia, eosinofilia ou basofilia (muito rara); anemia normocítica e normocrômica; trombocitopenia é muito comum.

Na suspeita de LMA é pedida aspiração da medula para realizar mielograma e para análises citogenéticas. A microscopia é seguida de imunofenotipagem para identificar a linhagem das células leucémicas.

O tratamento da doença pode ser de suporte para a insuficiência da medula, na tentativa de manter a contagem de plaquetas acima de $10 \times 10^9/L$ e a hemoglobina acima de 8g/dl.

O tratamento específico a aplicar depende da idade e condição do doente, mas também das alterações genéticas presentes. Em pacientes mais jovens o tratamento consiste em quimioterapia intensiva feita em quatro blocos de 1 semana cada. Os fármacos mais utilizados são citarabina e daunorrubicina, que são mielotóxicos com pouca seletividade entre célula malignas e células normais, levando a insuficiência grave da medula que exige terapia de suporte intensiva.

Transplante de células-tronco é considerado em casos de mau prognóstico ou em pacientes com recidiva.⁷³

4.11.4 Mieloma Múltiplo

Mulher de 87 anos de idade.

O hemograma da utente, que se pode ver na ilustração 29, mostra uma anemia normocítica e normocrômica sem anisocitose e trombocitopenia ligeira. Verificou-se ainda que a VSG estava muito aumentada.

HEMATOLOGIA			
Hemograma Amostra: Sangue Total			23-08-2019
Eritrograma			
Eritrócitos		2.70 x10 ¹² /L	4.50 - 5.90
Hemoglobina		8.7 g/dL	13.5 - 17.5
Hematócrito		26.0 %	41.0 - 53.0
Vol. Glob. Médio (VGM)		96 fL	80 - 100
Hgb. Glob. Média (HGM)		32 pg	26 - 34
Conc. Hgb. Glob. Média (CHGM)		34 g/dL	32 - 36
RDW (índice distrib. eritrocit.)		12.1 %	11.6 - 14.0
Leucograma			
Leucócitos		6.06 x10 ⁹ / L	4.00 - 10.00
-Neutrófilos	68.2 %	4.13 x10 ⁹ / L	1.80 - 7.00
-Eosinófilos	2.1 %	0.13 x10 ⁹ / L	< 0.50
-Basófilos	0.3 %	0.02 x10 ⁹ / L	< 0.10
-Linfócitos	23.6 %	1.43 x10 ⁹ / L	1.00 - 4.00
-Monócitos	5.8 %	0.35 x10 ⁹ / L	0.20 - 1.00
Plaquetas		124 x10 ⁹ / L	150 - 400
Tempo de protrombina			23-08-2019
Mét: Coagulometria Amostra: Plasma		14.6 seg.	10.6 - 13.5
- INR		1.29	(variável com patologia)
INR: resultado a valorizar apenas se a fazer anticoagulante oral.			
Tempo Tromb. Parcial activada (aPTT)			23-08-2019
Mét: Coagulometria Amostra: Plasma		20.6 seg.	21.4 - 31.2

Figura 29 Hemograma da utente. Imagem obtida durante o estágio.

Na observação do esfregaço de sangue periférico foi possível verificar a intensa formação do rouleaux e alguns plasmócitos circulantes.

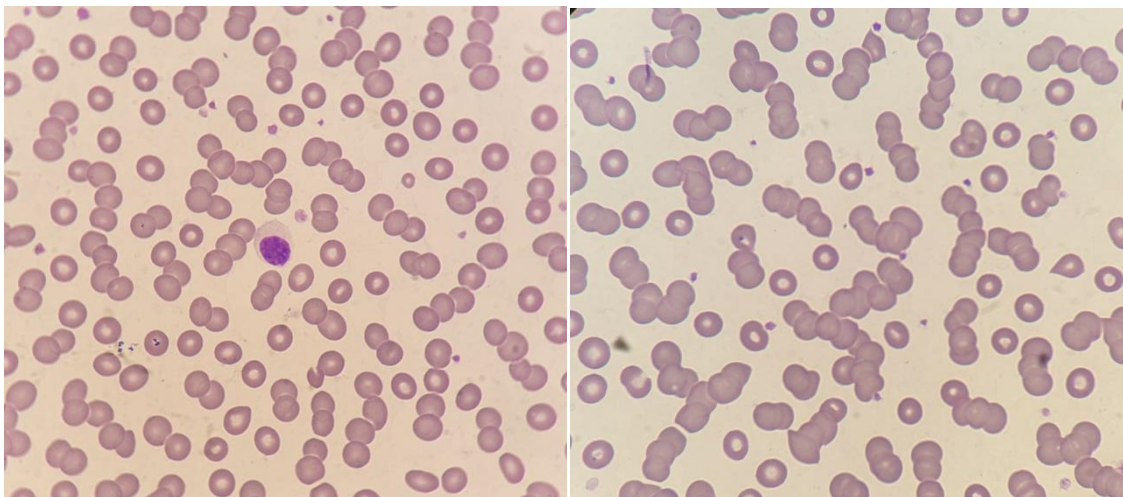


Figura 30 Observação do esfregaço de sangue periférico da paciente onde é possível ver a presença de rouleaux e um plasmócito. Imagens obtidas durante o estágio.

Pela suspeita de mieloma múltiplo foi pedida a eletroforese das hemoglobinas (resultados na ilustração 31).

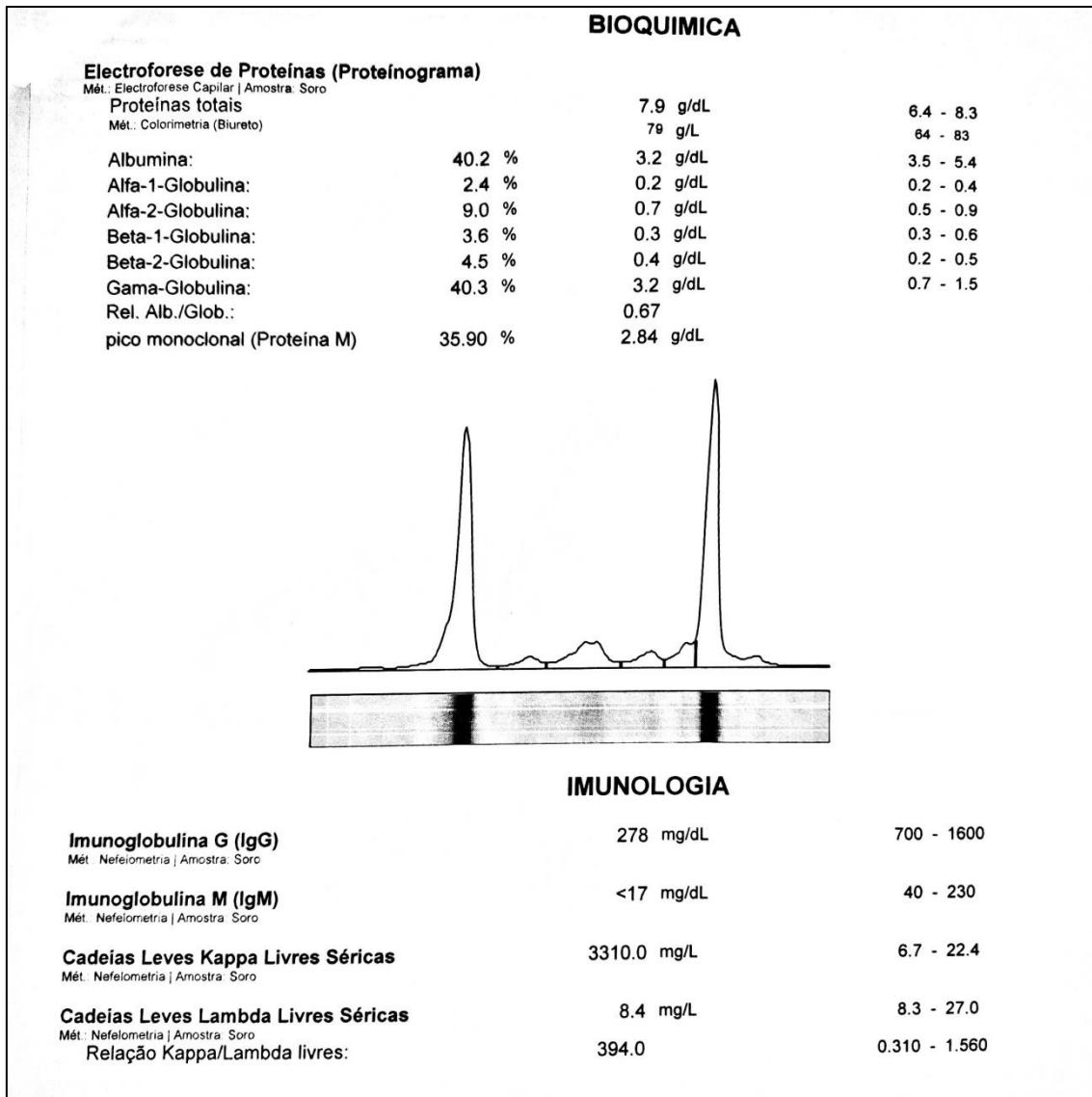


Figura 31 Eletroforese das proteínas séricas da utente. Imagem obtida durante o estágio.

A eletroforese demonstrou um pico monoclonal na zona das gama-globulinas e uma ligeira diminuição da albumina, também foi possível verificar diminuição da IgG e da IgM e uma elevação muito acentuada das cadeias Kappa livres.

Na urina de 24h foram também detetadas cadeias leves kappa, como se pode ver na ilustração 32.

IMUNOLOGIA		
Imunoglobulina G (IgG), Urina 24h Mét.: Nefelometria Amostra: Urina	0.72 mg/dL	< 0.96
Imunoglobulina A (IgA), Urina 24h Mét.: Nefelometria Amostra: Urina	1.64 mg/dL	< 5.00
Imunoglobulina M (IgM), Urina 24h Mét.: Nefelometria Amostra: Urina	1.48 mg/dL	< 5.00
Imunoglobulina D (IgD), Urina 24h Mét.: Imunodifusão radial (IDR) Amostra: Urina	<1.30 mg/dL	< 1.30
Nota: os valores de referência foram alterados em Julho de 2016.		
Cadeias Leves Kappa, Urina 24h Mét.: Nefelometria Amostra: Urina	326.0 mg/dL	< 1.0
Cadeias Leves Lambda, Urina 24h Mét.: Nefelometria Amostra: Urina	<0.7 mg/dL	< 1.0
URINA E DOSEAMENTOS URINÁRIOS		
Dados de Colheita da amostra de Urina		
Amostra: Urina		
Tempo de Colheita:	24 horas	
Volume:	1200 mL	

Figura 32 Resultados da pesquisa de Imunoglobulinas e cadeias leves na urina da utente. Imagem obtida durante o estágio.

A imunofixação revelou duas frações correspondentes a IgA e cadeias leves Kappa e o doseamento de IgA no soro estava muito aumentado.

IMUNOLOGIA		
Imunofixação Sérica Mét.: Imunofixação em gel de agarose Amostra: Soro	Identificaram-se duas fracções respetivamente IgA K e cadeias leves K.	
Imunoglobulina A (IgA) Mét.: Nefelometria Amostra: Soro	2840 mg/dL	70 - 400
Imunoglobulina D (IgD) Mét.: Nefelometria Amostra: Soro	<24.0 KU/L	< 100.0

Figura 33 Imunofixação e doseamento de imunoglobulinas no soro. Imagem obtida durante o estágio.

Por fim foi pedida a aspiração da medula para proceder ao mielograma que revelou infiltração por 72% de plasmócitos maduros.

HEMATOLOGIA	
Mielograma	
Amostra: Medula Óssea	
Local de punção:	
Esfregaços de medula óssea colhida no Hospital Beatriz Ângelo.	
Série Eritroide	2 %
Série Mieloide	21 %
- Mielócitos:	3 %
- Metamielócitos:	5 %
- Bastonetes e Segmentados:	12 %
- Monócitos:	1 %
Série Linfoplasmocitária	77 %
- Linfócitos:	5 %
- Plasmócitos:	72 %
Exame Citológico	
Medula hiper celular, infiltrada por 72% de plasmócitos maduros, raros binucleados.	
Elementos das restantes série hematopoiéticas completam a celularidade.	
Não se observaram outras células estranhas à hemopoiese.	
Coloração de Perls	
Os depósitos extra-eritroblásticos de hemossiderina estão muito aumentados (+++++), não se observam sideroblastos.	
Conclusão	
Quadro morfológico compatível com mieloma múltiplo	
Realizado e Validado por:	Doutor José Cortez

Figura 34 Resultado do mielograma da utente. Imagem obtida durante o estágio.

Após a recolha de todos estes elementos foi estabelecido o diagnóstico de Mieloma Múltiplo e a utente foi transferida para uma unidade de oncologia para iniciar tratamento e ser acompanhada, sendo que no HBA não havia informação quanto ao protocolo terapêutico aplicado.

• Mieloma Múltiplo

O Mieloma Múltiplo, ou mieloma plasmocítico, é uma doença neoplásica decorrente da proliferação de plasmócitos anormais na medula óssea e pela secreção de imunoglobulinas ou cadeias leves monoclonais, referidas como paraproteínas.

O diagnóstico de Mieloma Múltiplo é estabelecido na presença de: proteína monoclonal no soro ou urina; aumento clonal de plasmócitos na medula óssea podendo estar aparecer no sangue periférico; dano decorrente a tecidos e órgãos (hipercalcémia, insuficiência renal, anemia e lesões osseas).

O hemograma revela, geralmente, uma anemia normocrômica, normocítica ou levemente macrocítica; na doença avançada pode estar presente neutropenia e trombocitopenia.

Na observação do esfregaço de sangue periférico verifica-se a existência de rouleaux e, em alguns casos, podem estar presentes plasmócitos.

A eletroforese das proteínas revela a presença de uma paraproteína que pode ser identificada por imunofixação.

Há elevação típica de uma das cadeias leves da imunoglobulina que pode ser doseada no soro ou na urina (proteínas de Bence-Jones).

A VSG está, em geral, muito acelerada.

Na medula óssea há infiltração de plasmócitos com pelo menos 20% de formas anormais.

A terapia do Mieloma Múltiplo pode seguir dois cursos sendo que a decisão entre os dois depende da idade e do estado do doente. A terapia intensiva envolve 4 a 6 cursos de quimioterapia seguida de colheita de células-tronco e transplante autólogo. Na terapia não intensiva podem ser usados diversos fármacos combinados que são aplicados em protocolos mensais num total de 12 a 18 meses e cuja intensão é fazer baixar o nível de paraproteína, melhorar as lesões ósseas e os parâmetros do hemograma. Durante todo o processo é necessária terapia de suporte para colmatar os danos provocados pela doença.⁷⁴

5 Avaliação Externa da Qualidade

A norma ISO 15189 indica que o laboratório de análises clínicas deve participar em grupos interlaboratoriais de avaliação externa da qualidade (AEQ).

A AEQ implica a inserção num programa e num grupo de laboratórios que recebem periodicamente amostras cujos resultados não são conhecidos. Essas amostras devem ser tratadas e testadas da mesma forma que as restantes amostras do laboratório. Os resultados obtidos para os analitos em questão são enviados à empresa responsável até uma data limite pré-estabelecida. A empresa analisa os resultados obtidos pelo grupo de laboratórios e compara-os entre si e com o valor 'real'.

Em seguida é enviado ao laboratório um relatório com informação sobre o resultado apresentado e a sua comparação com os resultados gerais e o resultado real. Este relatório deve ser interpretado com cuidado para determinar a necessidade de intervenções corretivas.

Este processo é repetido em ciclo de forma a manter um controlo permanente sobre a precisão e rastreabilidade dos resultados do laboratório.

O objetivo da participação em AEQ é fornecer ao laboratório um meio de avaliar a exatidão e comparabilidade dos seus resultados com os dos outros laboratórios, independentemente do método e procedimento utilizados.

A participação em AEQ permite ao laboratório fazer uma avaliação retrospectiva, validar métodos e procedimentos, calcular erro total e incerteza de medição, avaliar a qualificação dos colaboradores, avaliar as necessidades de formação e promover a confiança dos clientes no laboratório.

O grupo SynlabHealth participa em vários grupos de AEQ:

- INSA: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge;
- RIQAS: *Randox International Quality Assessment Schems* (Irlanda e Reino Unido);
- NEQAS: *United Kingdom External Quality Assessment Schems*;
- SEQC: Sociedade Espanhola de Bioquímica Clínica e Patologia Molecular.

6 Conclusão

A realização do estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas permitiu-me pôr em prática os conhecimentos teóricos adquiridos na fase curricular do curso, aplica-los num ambiente profissional e real de forma a solidificar esses conhecimentos.

Foi crucial para entender as competências necessárias ao bom desempenho de funções de um técnico de Análises Clínicas e a importância do rigor e controlo da qualidade que permitem a obtenção de resultados fiáveis.

Foi, sem dúvida, uma excelente experiência da qual guardo muitos ensinamentos tanto a nível profissional como pessoal e que, certamente, aplicarei ao longo da minha carreira.

Referências Bibliográficas

1. Líder em Análises Clínicas e Diagnósticos Médicos | SYNLAB Portugal. <https://www.synlab.pt/institucional/quem-somos.aspx>. Accessed February 17, 2020.
2. *Atellica CH 930 Analyzer. Technical Specifications.*; 2018.
3. *SIEMENS Healthineers. Glicose Hexoquinase_3 (GluH_3).*; 2017.
4. *SIEMENS Healthineers. Colesterol_2 (Chol_2).*; 2017.
5. *SIEMENS Healthineers. Colesterol LDL Direto (DLDL).*; 2017.
6. *SIEMENS Healthineers. Colesterol HDL Direto (D-HDL).*; 2017.
7. *SIEMENS Healthineers. Triglicéridos (Trig).*; 2017.
8. SIEMENS Healthineers. Ferro (Iron). 2017:1-14.
9. *SIEMENS Healthineers. Transferrina (Trf).*; 2017.
10. *SIEMENS Healthineers. Ferritina (Frt).*; 2017.
11. *SIEMENS Healthineers. Capacidade Total de Ligação Do Ferro (TIBC).*; 2017.
12. *SIEMENS Healthineers. Cálcio (CA).*; 2017.
13. *SIEMENS Healthineers. Magnésio (Mg).*; 2017.
14. *SIEMENS Healthineers. Fósforo Inorgânico (IP).*; 2017.
15. *SIEMENS Healthineers. Alanina Aminotransferase (ALT).*; 2017.
16. *SIEMENS Healthineers. Aspartato Aminotransferase (AST).*; 2017.
17. *SIEMENS Healthineers. Bilirrubina Total_2 (TBil_2).*; 2017.
18. *SIEMENS Healthineers. Bilirrubina Direta (D-Bil).*; 2017.
19. *SIEMENS Healthineers. Gama-Glutamil Transferase (GGT).*; 2017.
20. *SIEMENS Healthineers. Fosfatase Alcalina, Concentrada (ALP_2c).*; 2017.
21. *SIEMENS Healthineers. Proteínas Totais (TP).*; 2017.
22. *SIEMENS Healthineers. Amilase (Amylas).*; 2017.
23. *SIEMENS Healthineers. Lipase (Lip).*; 2017.
24. *SIEMENS Healthineers. Ureia Nitrogenada (UN).*; 2017.
25. *SIEMENS Healthineers. Ácido Úrico (UA).*; 2017.
26. *SIEMENS Healthineers. Creatinina_2 (Crea_2).*; 2017.

27. *SIEMENS Healthineers. Microalbumina_2 (MALB).*; 2017.
28. *SIEMENS Healthineers. Multissensor Integrado A.LYTE (IMT Na K Cl).*; 2017.
29. *SIEMENS Healthineers. Creatinina Quinase (CKNAC).*; 2017.
30. *SIEMENS Healthineers. Lactato Desidrogenase L-P (LDLP).*; 2017.
31. *Atellica IM 1600 Analyzer. Technical Specifications.*; 2018.
32. *SIEMENS Healthineers. Hormona Paratiroideia (PTH).*; 2017.
33. *SIEMENS Healthineers. Prolactina (Prl).*; 2017.
34. *NoSIEMENS Healthineers. Hormona Foliculoestimulante (FSH).*; 2017.
35. *SIEMENS Healthineers. Hormona Luteínica.*; 2017.
36. *SIEMENS Healthineers. Triiodotironina (T3).*; 2017.
37. *SIEMENS Healthineers. Triiodotironina Livre (FT3).*; 2017.
38. *SIEMENS Healthineers. Tiroxina (T4).*; 2017.
39. *SIEMENS Healthineers. Tiroxina Livre (FT4).*; 2017.
40. *SIEMENS Healthineers. Antígeno Específico Da Próstata (PSA).*; 2017.
41. *SIEMENS Healthineers. CEA.*; 2017.
42. *SIEMENS Healthineers. CA 19.9.*; 2017.
43. *SIEMENS Healthineers. CA125.*; 2017.
44. *SIEMENS Healthineers. CA 15.3.*; 2017.
45. T. Magari R. *Statistics for Laboratory Method Comparison Studies.*; 2002. http://files.alfresco.mjh.group/alfresco_images/pharma//2014/08/22/fc6cdb11-0339-480a-bb9d-48c5782bce9d/article-7276.pdf.
46. Oliveira N. *Avaliação de Desempenho Atellica Solution_ Synlab HUB.*; 2018.
47. Capillarys Protein(E) 6 | Sebia. <https://www.sebia.com/en-US/produits/capillarys-proteine-6>. Accessed November 22, 2019.
48. CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) | Sebia en-EN. <https://www.sebia.com/en-EN/produits/capillarys-hemoglobine>. Accessed February 15, 2020.
49. Silva <p>Roberta Oliveira de Paula e, Lopes A de F, Faria</p> RMD de. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Rev Med Minas Gerais*. 18(2):116-122.
50. CLINITEK Novus® Automated Urine Chemistry Analyzer.
51. CLINITEK Novus - Siemens Healthineers USA. <https://www.siemens-healthineers.com/en-us/urinalysis/systems/clinitek-novus>. Accessed November

- 22, 2019.
52. *SIEMENS CLINITEK Novus. Cassete de Análise à Urina.*; 2015.
 53. Hematologia: Como é realizada a técnica de esfregaço de sangue? - Kasvi. <https://kasvi.com.br/esfregaco-de-sangue-hematologia/>. Accessed November 23, 2019.
 54. Hemacolor® Rapid staining of blood smear | 111957. http://www.merckmillipore.com/PT/en/product/Hemacolor-Rapid-staining-of-blood-smear,MDA_CHEM-111957?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F. Accessed November 23, 2019.
 55. Slide Stainers: Automatic Slide Staining - The Poly Stainer. <https://www.neutecgroup.com/products/slide-stainers/automatic-slide-staining-the-poly-stainer-detail>. Accessed November 23, 2019.
 56. XN-1000S-Hematology-Analyzer. <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Hematology/XNSeries/Pages/XN-1000S-Hematology-Analyzer.aspx>. Accessed February 11, 2020.
 57. Sysmex corporation. *Tecnologia e Parâmetros Clínicos Avançados. Analisadores Hematológicos Série-XN.*; 2012. <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-Tecnologia-Português.pdf>.
 58. SLS detection method - Sysmex Europe GmbH. <https://www.sysmex-europe.com/nl-en/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/sls-detection-method.html>. Accessed November 23, 2019.
 59. WBC differential channel - Sysmex Europe GmbH. <https://www.sysmex-europe.com/nl-en/academy/clinic-laboratory/analyser-channels/wbc-differential-channel.html>. Accessed November 23, 2019.
 60. Measurement technology and scattergram - Sysmex Europe GmbH. <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/calendar-2014/measurement-technology-and-scattergram.html>. Accessed March 4, 2020.
 61. J. Bain B. *Células Sanguíneas: Um Guia Prático*. 5ª edição. artmed; 2016.
 62. Ves-Matic CUBE 30 - Instruments - Diesse Diagnostica Senese Spa. <https://www.diesse.it/en/Instruments/id:48/>. Accessed February 11, 2020.
 63. Silva Ribeiro I. Alterações da Hemostase. In: *Hematologia: Da Prática Clínica à Teoria.* ; :355.
 64. Cagnolati D, Kumar Sankarankutty A, Plínio Souza Rocha J, Beer A, Castro Silva O. *HEMOSTASIA E DISTÚRBIOS DA COAGULAÇÃO*.
 65. BCS XP System - Siemens Healthineers Portugal. <https://www.siemens-healthineers.com/pt/hemostasis/systems/bcs-xp-system>. Accessed February 4, 2020.

66. BinaxNOW Malaria - Alere is now Abbott. <https://www.alere.com/en/home/product-details/binaxnow-malaria.html>. Accessed February 9, 2020.
67. Hoffbrand AV, Moss PAH. Capítulo 7: Distúrbios genéticos da hemoglobina. In: *Fundamentos Em Hematologia de Hoffbrand.* ; 2017:83-85.
68. CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) | Sebia en-EN. <https://www.sebia.com/en-EN/produits/capillarys-hemoglobine>. Accessed February 12, 2020.
69. *ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA*. [http://www.biolider.com.br/media/images/00001856_ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA.pdf](http://www.biolider.com.br/media/images/00001856_ELETROFORESE_DE_HEMOGLOBINA.pdf). Accessed December 4, 2017.
70. J. Bain B. Distúrbios dos leucócitos. In: *Células Sanguíneas: Um Guia Prático.* ; 2016:443-446.
71. Navios EX Flow Cytometer - Beckman Coulter. <https://www.beckman.com/flow-cytometry/instruments/navios-ex>. Accessed February 21, 2020.
72. J. Bain B. Distúrbios dos eritrócitos e da hemoglobina. In: *Células Sanguíneas: Um Guia Prático.* ; 2016:312-316.
73. Hoffbrand AV, Moss PAH. Capítulo 13: Leucemia mieloide aguda. In: *Fundamentos Em Hematologia de Hoffbrand.* ; 2017:147-155.
74. Hoffbrand AV, Moss PAH. Mieloma Múltiplo e distúrbios relacionados. In: *Fundamentos Em Hematologia de Hoffbrand.* ; 2017:229-240.

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Patogénese e Diagnóstico do Vírus de Epstein-Barr

Diana Rita Figueiredo Martins Rodrigues

Monografia orientada pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira

Mestrado em Análises Clínicas

2020

Resumo

O vírus de Epstein-Barr é um tipo de herpesvírus, designado herpesvírus humano 4. É um vírus de DNA, cujo genoma é uma molécula linear de dupla cadeia. Da sua estrutura fazem parte: o involucro com glicoproteínas na superfície; o tegumento; a nucleocapside e o genoma. Como outros herpesvírus ele apresenta tropismo para os linfócitos.

O vírus é transmitido através do contacto com a saliva de um indivíduo infetado.

A infeção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) é muito comum e disseminada por todos os locais do planeta. Estima-se que 50% das crianças até aos 5 anos e 95% dos adultos jovens apresentem anticorpos.

Em crianças a infeção tende a ser silenciosa, em adolescentes e adultos jovens manifesta-se no síndrome da Mononucleose Infeciosa.

Os sintomas da mononucleose infecciosa variam, mas os mais comuns são: cefaleias, dores musculares, febre, mal-estar generalizado, cansaço, garganta inflamada e nódulos linfáticos aumentados.

O diagnóstico é usualmente feito por serologia, bastando 3 parâmetros (IgG VCA, IgM VCA e IgG EBNA1) para distinguir entre infeções recentes de infeções passadas. Em caso de imunossupressão pode recorrer-se à biologia molecular.

Usualmente o curso da doença é benigno e não necessita de internamento hospitalar nem medicação específica. Os sintomas são tratados com anti-inflamatórios não esteroides ou, em casos mais graves pode aplicar-se corticoides para debelar a inflamação exacerbada.

Não existem antivirais eficazes para o tratamento da doença, nem foi ainda possível desenvolver uma vacina eficaz.

Após o fim da fase aguda da doença o vírus permanece no hospedeiro durante toda a vida de forma assintomática, sendo reativado periodicamente para libertação de novos vírus para a saliva e transmissão a novos hospedeiros.

A infeção latente por EBV está associada ao desenvolvimento de alguns cancros de linfócitos e células epiteliais. Os padrões de distribuição geográfica destes tumores apontam para a importância de fatores ambientais e genéticos no seu desenvolvimento.

Palavras-chave: Vírus de Epstein-Barr, Herpesvírus humano 4, Mononucleose infecciosa.

Abstract

The Epstein-Barr virus is a type of herpes virus named Human Herpes Virus 4. It's a DNA virus with a double strand linear DNA. Its structure is composed of: an envelope with surface glycoproteins, a tegument, the viral capsid and the DNA. As happens with other herpes viruses EBV has tropism for lymphocytes.

The virus is transmitted through direct contact with the saliva of an infected individual.

The infection is extremely common and equally disseminated around the world. It's estimated that about 5% of the children younger than 5 years of age and about 95% of the adults carry the virus.

Children are usually asymptomatic, teens and young adults manifest the acute disease called Infectious Mononucleosis.

The symptoms vary but the most common are: headaches, sore muscles, fatigue, malaise, fever, sore throat and enlarged lymph nodes.

The diagnostics is usually established by testing the blood for antibodies against EBV. Usually only three parameters are needed to differentiate past from recent infection (VCA IgG, VCA IgM and EBNA1 IgG). In cases of immunocompromised patients molecular biology techniques may be useful.

In general, the prognosis is good and there's no need to hospitalize or isolate patients. The disease is treated symptomatically with non-specific drugs. In complicated cases corticoids may be used to reduce excessive inflammation.

There are no effective antiviral drugs against EBV, and the efforts made in creating a vaccine haven't been successful.

After the acute disease the virus stays in the host's lymphocytes where it establishes a life-long infection. Periodically the virus reactivates to release new viruses into the saliva to infect a new target.

The latent infection of EBV is associated with some types of cancer, developing specially in lymphocytes and epithelial cells. The geographic patterns observed in these cancers suggest that environmental or genetic factors play an important role in the development of the tumors.

Keywords: Epstein - Barr virus, Human Herpes Virus 4, Infectious Mononucleosis.

Índice

Resumo.....	111
Abstract.....	112
Índice de figuras.....	115
Índice de tabelas.....	115
Lista de Abreviaturas.....	116
Introdução.....	118
Capítulo I: Características Gerais do EBV.....	119
a. Taxonomia.....	119
b. Tipo de Hospedeiros.....	120
c. Tropismo celular	120
d. Estrutura do Vírus	120
e. Estrutura do genoma viral	121
Capítulo II: Ciclo de replicação viral.....	124
a. Adesão e fusão do EBV com as células do hospedeiro.....	124
b. Acontecimentos pós-fusão	127
c. Mudança de Tropismo Celular.....	128
d. Fase de Latência e Ciclo Lítico	128
e. Programas de Transcrição	131
f. Expressão do EBV em Latência.....	132
g. Transmissão do Vírus.....	134
Capítulo III: Resposta imunitária à infecção por EBV.....	135
a. Imunidade inata.....	135
b. Imunidade adquirida.....	136
c. Evasão ao sistema imunitário	137
Capítulo IV: Mononucleose infecciosa.....	138
a. Epidemiologia	138
b. Sinais e sintomas	138
c. Exame físico.....	139
d. Diagnóstico diferencial	141
e. Diagnóstico laboratorial	141

f. Tratamento	146
g. Medicação	146
h. Prevenção	148
i. Prognóstico.....	148
j. Caso clínico.....	149
Capítulo V: Infecção por EBV e Oncogénese.....	153
a. Doença Linfoproliferativa Pós-transplante	153
b. Linfoma de Burkitt.....	154
c. Neoplasias associadas a SIDA	154
d. Carcinoma Nasofaríngeo.....	155
e. Linfoma de Hodgkin	156
f. Leucoplasia pilosa oral.....	156
Conclusão.....	158
Referências Bibliográficas.....	159

Índice de figuras

Figura 1 Taxonomia da família Herpesviridae	119
Figura 2 Diagrama da estrutura do EBV	121
Figura 3 Diagrama demonstrativo do posicionamento dos genes latentes e seus transcritos no epissoma viral.....	122
Figura 4 Ciclo infeccioso geral do vírus.	124
Figura 5 Esquema dos modelos de adesão e fusão do EBV às células B e epiteliais.....	127
Figura 6 Esquema exemplificativo do ciclo de replicação viral	131
Figura 7 Resumo esquemático dos sintomas de MI.	139
Figura 8 Exemplo de faringite e amigdalite com presença de petéquias.	140
Figura 9 Exemplo de linfadenopatia cervical.	140
Figura 10 Exemplo de erupção cutânea característica de MI.	141
Figura 11 Exemplo de Kit do teste Monospot da ThermoFisher.	143
Figura 12 Perfil de diagnóstico da infecção por EBV.....	144
Figura 13 Esfregaço de sangue de Doente com MI com três linfócitos atípicos.	146

Índice de tabelas

Tabela 1 Genes virais, proteínas e sua função.....	123
Tabela 2 Programas de latência, produtos de genes expressos, células infectadas e suas funções.....	132
Tabela 3 Hemograma.....	150
Tabela 4 Parâmetros Bioquímicos	151
Tabela 5 Outros resultados analíticos.....	151

Lista de Abreviaturas

ACV- Aciclovir

AST- Aspartato Aminotransferase

BamHI – *Bacillus amyloliquefaciens H*

BCL- Receptor das células B do inglês “*B cell receptor*”

CDV- Cidofovir

CLIAS- Ensaio de quimioluminescência do inglês “*Chemiluminescence immunoassays*”

CMV- Citomegalovírus

CNF- Carcinoma nasofaríngeo

DNA- Acido Desoxirribonucleico

EA- Antígenos precoces do inglês “*Early Antigens*”

EBERs- RNAs codificados pelo EBV do inglês “*EBV encoded RNAs*”

EBNA- Antígeno nuclear do vírus de Epstein-Barr

EBV- *Epstein-Barr Virus*

ELISAs- Ensaio de imunoabsorção enzimática do inglês “*Enzyme-linked Immunosorbent assays*”

EUA- Estados Unidos da América

GCS- “*Glasgow Coma Score*”

GGT- Gamma-glutamilttransferase

Gp- Glicoproteína

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

HLA- Antígeno leucocitário humano (do inglês *Human Leukocyte Antigen*)

IEA- Antígenos precoces imediatos do inglês “*Imidiante Early Antiens*”

IFAs- Ensaio de imunofluorescência do inglês “*Immunofluorescence assays*”

IgA- Imunoglobulina A

IgG- Imunoglobulina G

IgM- Imunoglobulina M

IL- Interleucina

INF- Interferão

iNK T- células T NK invariáveis

JaK – STAT- *Janus Kinase- signal transducer and activator of transcription programs*

LA- Antígenos tardios do inglês “*Late Antigens*”

LB- Linfoma de Burkitt

LDH- Desidrogenase Láctica

LH- Linfoma de Hodgkin

LMP- Proteína membranar de latência

LPO- Leucoplasia pilosa oral

LPT- Linfoma pós-transplante

MFIs- Imunoensaios fluorimétricos multiplex do inglês “*Multiplex Flow immunoassays*”

MHC- Complexo Major de Histocompatibilidade (do inglês *Major Histocompatibility Complex*)

MI- Mononucleose Infeciosa

miRNA- Micro RNA

MVB- Maribavir

NK- “*Natural Killer*”

OMS- Organização Mundial de Saúde

ORFs- Quadros de leitura aberta do inglês *Open-reading Frames*

RNA- Ácido Ribonucleico

RS- Reed-Sternberg

SIDA- Síndrome da imunodeficiência adquirida

SNC- Sistema nervoso central

TNF- Fator de necrose tumoral

VCA- Antígeno da cápside viral

Introdução

O vírus de Epstein-Barr (EBV) recebeu o seu nome por homenagem a Michael Anthony Epstein, professor da Universidade de Bristol e a sua doutoranda Yvonne Barr, que em 1964 descobriram e documentaram a existência deste vírus.

Tudo começou quando, em 1961, o jovem patologista e especialista em microscopia eletrónica Epstein assistiu a uma palestra do cirurgião Denis Parsons Burkitt. O cirurgião, que exercia no Uganda, descreveu na sua palestra a forma pediátrica da doença que atualmente tem o seu nome.

Em 1963 foi enviada uma amostra do Uganda para o Hospital de Middlesex. Após cultivo das células enviadas, foram nelas descobertas partículas virais, e os resultados foram publicados na revista *“The Lancet”*.

Algumas das células cultivadas foram, depois, enviadas a Werner e Gertrude Henle do hospital pediátrico de Philadelphia, para que fossem desenvolvidos marcadores serológicos. Em 1967 uma das técnicas que trabalhava no laboratório contraiu mononucleose infecciosa e a comparação de soro dessa técnica com soros armazenados permitiu a verificação da formação de anticorpos contra o EBV.

Em 1972, cientistas franceses criaram um estudo com 42,000 crianças do Uganda, das quais colheram amostras de sangue quando começaram a apresentar sintomas de infeção. Nos anos que se seguiram algumas dessas crianças desenvolveram Linfoma de Burkitt, todas elas apresentavam sinais de infeção pelo vírus, com títulos de anticorpos extremamente elevados, muito antes do aparecimento do tumor.

O trabalho de Werner e Gertrude Henle permitiu que se fizessem os primeiros estudos epidemiológicos do EBV, observando-se, nestes estudos, que a infeção ocorria em praticamente todas as zonas do mundo, incluindo nas regiões mais remotas e em populações extremamente isoladas. Observou-se ainda um padrão de distribuição dos anticorpos por grupos etários que dependia do padrão de higiene e o nível socioeconómico da região e população em estudo. Nas populações de baixo nível socioeconómico grande maioria das crianças apresentava anticorpos contra o EBV nos primeiros 5 anos de vida, enquanto, num contexto socioeconómico mais elevado, o aparecimento de anticorpos acontecia mais tardiamente, na adolescência ou na vida adulta.¹

Capítulo I: Características Gerais do EBV

a. Taxonomia

O Vírus de Epstein-Barr é um herpesvírus humano que pertence à subfamília *Gammaherpesvirus* e ao género *Lymphocryptovirus*. A sua designação formal é Herpesvirus Humano 4 (HHV-4) de acordo com a designação sistemática dos vírus pertencentes a esta família que está representada na figura 1.²

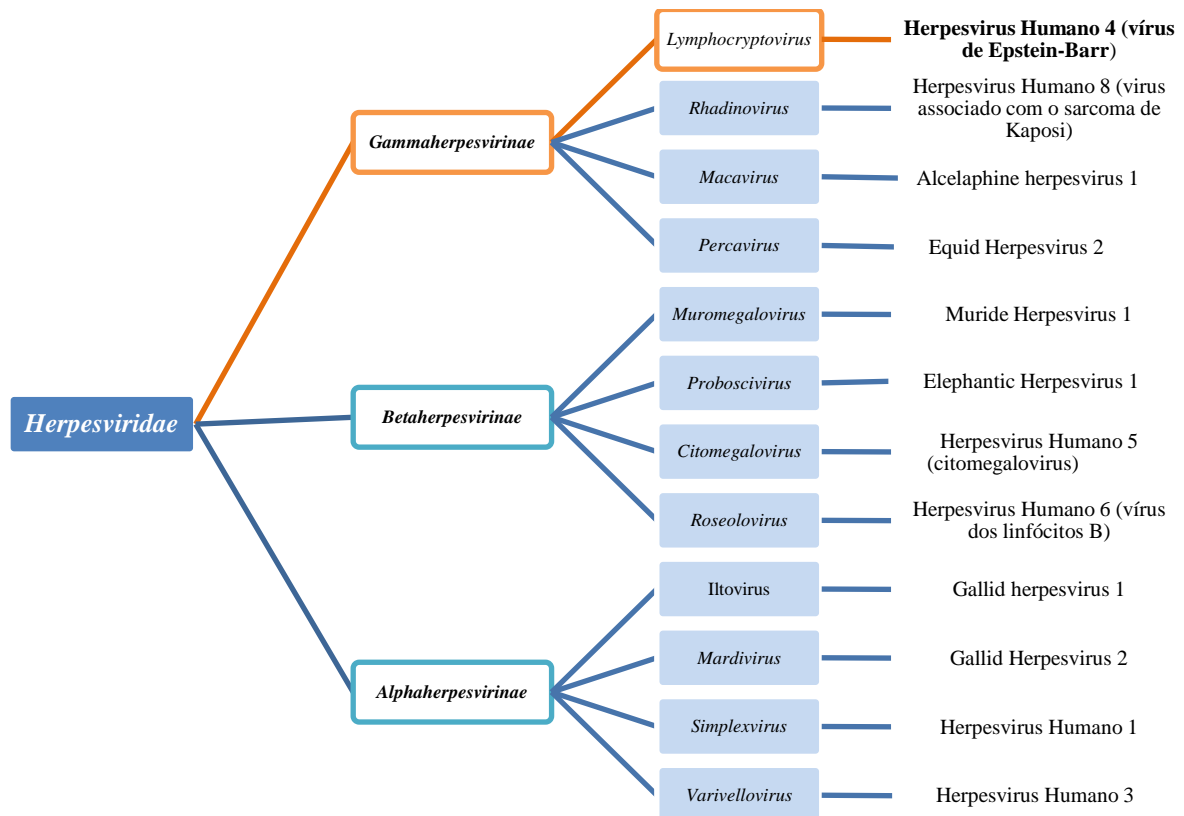


Figura 1 Taxonomia da família *Herpesviridae*²

Existem dois grandes tipos de EBV denominados EBV-1 e EBV-2 (também podem ser designados de A e B). As diferenças entre estes dois grupos estão nos genes que codificam os antígenos nucleares EBNA-2, EBNA-3A/3, EBNA-3B/4 e EBNA-3C/6. A divergência entre as sequências de EBNA-2 pode estar na origem da maior eficiência apresentada por EBV-1 na imortalização das células B *in vitro* e a menor variabilidade de linhagem de células linfoblastoides que EBV-2 é capaz de infetar em comparação com EBV-1.³

Ademais, é possível verificar heterogeneidade nas sequências de DNA do vírus quando comparadas amostras recolhidas de diferentes regiões geográficas. Estes polimorfismos definem diferentes estirpes dentro de cada tipo.

Embora os genes expressos durante a infecção latente apresentem algumas diferenças entre os dois tipos de EBV a fase aguda da doença parece ser igual em ambos.

As 2 estirpes estão espalhadas por todo o mundo e podem infectar a mesma pessoa simultaneamente.

b. Tipo de Hospedeiros

Embora esteja disseminado na natureza, o único hospedeiro do EBV é o Homem. Sendo que a maioria dos primatas mais próximos dos humanos apresentam o seu tipo específico de vírus semelhantes ao EBV. A pesquisa de anticorpos contra EBV no sangue destes primatas pode ser positivo devido a reações cruzadas com anticorpos contra homólogos do vírus próprio da espécie.⁴

c. Tropismo celular

Tal como outros *Gammaherpesvirus*, o EBV estabelece infecção latente em linfócitos e é capaz de induzir proliferação das células infectadas.

O vírus infeta linfócitos B através da interação entre a glicoproteína gp350/220 do involucro viral e o recetor celular do componente do complemento C3d, denominado CR2 ou CD21. Após adesão e endocitose da partícula viral, o involucro viral funde com a membrana da célula hospedeira através de um mecanismo que envolve 3 outras glicoproteínas: gp85, gp25 e gp42. Esta última glicoproteína pode também interagir com o Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) classe II.

Tem sido demonstrado que o EBV tem a capacidade de infectar células através de um mecanismo não dependente do CD21, embora este mecanismo seja menos eficaz que o anteriormente descrito. Este processo permite a infecção de células que não expressam CD21, como é o caso das células epiteliais. Adicionalmente verifica-se que os vírus que não apresentam gp350 também são infecciosos.

Nos indivíduos saudáveis cronicamente infectados, o vírus está, em grande parte, restringido aos linfócitos B, sendo em algumas situações encontrado nas células epiteliais. O papel mais provável das células epiteliais na infecção é o de local de replicação e não de infecção latente, embora exista alguma controvérsia junto da comunidade científica quanto a esta afirmação.⁵

d. Estrutura do Vírus

O vírus de Epstein-Barr possui uma estrutura semelhante aos restantes herpesvírus. É um vírus de DNA de dupla cadeia que se encontra enrolado numa

proteína com forma toroidal. Esta estrutura de DNA e proteínas está englobada por uma nucleocapside com forma icosaédrica formada por 162 capsômeros. A camada seguinte é o tegumento viral que ocupa o espaço entre a nucleocapside e a camada mais exterior, o involucro, do qual fazem parte várias glicoproteínas em forma de espícula. ⁶

Na ilustração 2 está um exemplo esquemático da constituição do EBV. ⁷

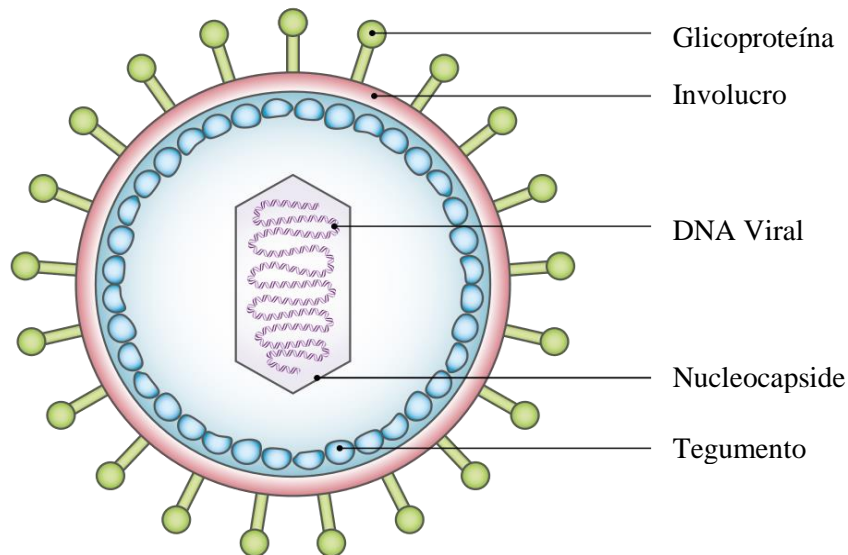


Figura 2 Diagrama da estrutura do EBV⁷

e. Estrutura do genoma viral

O genoma do EBV é uma molécula linear de DNA de dupla cadeia com aproximadamente 170 Kpb de comprimento que possui mais de 85 genes codificados.

O genoma foi dividido em porções, com base na posição que ocupam no mapa de restrição da endonuclease BamHI (*Bacillus amyloliquefaciens* HI), e nomeados de acordo com o tamanho do fragmento de A a Z. A título de exemplo: o quadro de leitura de BARF1 está localizado no fragmento A e estende-se para o lado direito (R do inglês *Right*).

Os vários quadros de leitura aberta do EBV estão divididos entre genes de latência e genes líticos, sendo estes últimos ainda subdivididos em precoces imediatos, precoces e tardios. A grande maioria destes genes traduz-se em proteínas, cujas funções serão listadas na tabela 1. Além destes, o genoma viral tem codificados 22 micro-RNAs que integram 2 clusters.

É de notar a presença de séries de repetições de 0,5 kpb terminais em ambas as pontas, e sequências de repetição inseridas no interior do genoma que servem para dividir o mesmo em domínios únicos com capacidade codificante. Estes fragmentos de repetição terminal são importantes para identificar se as células infetadas pelo EBV têm o mesmo progenitor, isto porque, quando as células são infetadas o DNA viral torna-se

circular e persiste nesta forma, como epissoma, com um número característico de repetições terminais que depende do número presente no genoma da célula mãe. Sendo assim é possível verificar se a infecção está em fase latente ou lítica, pois na infecção latente os epissomas apresentam um número idêntico de repetições terminais.⁵

O OriP (“*origin of plasmid replication*”) é um fragmento de DNA com comprimento de aproximadamente 1.7 Kpb onde se inicia a replicação do plasmídeo na presença da proteína EBNA1.⁸

Devido a estímulos que ainda não são completamente conhecidos o EBV pode entrar num ciclo lítico. Nesta situação, o primeiro gene a ser transcrito é o BZLF1 (*BamHI Z left-ward open Reading frame 1*), que produz a proteína ZEBRA. Esta proteína age como ativador da transcrição, que, por sua vez, levará à expressão de BHRF1 (*BamHI H right-ward open-reading frame*), BCRF1(*BamHI C right-ward open-reading frame 1*) e da DNA polimerase viral.

Por outro lado, numa fase de latência, verifica-se a expressão de alguns genes virais que codificam: seis antígenos nucleares do EBV (EBNA-1, 2, 3A, 3B/4, 3C e LP ou EBNA-5); três proteínas latentes de membrana (LMP-1, LMP-2A e LMP-2B); duas moléculas de RNA não-poliadeniladas (EBER-1 e 2); alguns transcritos com múltiplos splices, pertencentes à região BamHI A do genoma (BARF0 e BARF1).⁹

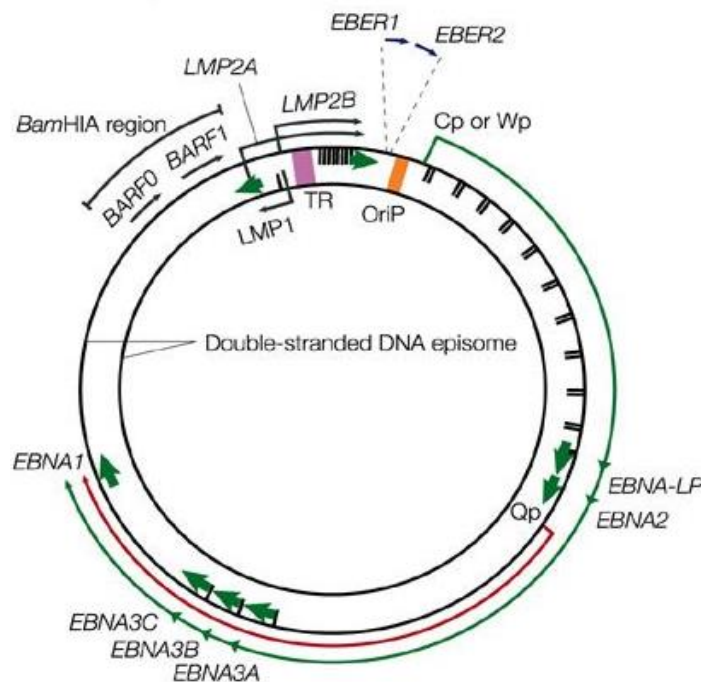


Figura 3 Diagrama demonstrativo do posicionamento dos genes latentes e seus transcritos no epissoma viral.

A origem da replicação do plasmídeo (OriP) está representada a laranja. As setas verdes mais largas representam exões que codificam cada uma das proteínas de latência, a direção da seta representa a direção em que ocorre a transcrição. São elas: Antígenos Nucleares (EBNAs 1,2,3A, 3B, 3C e EBNA-LP) e três proteínas de latência (LMPs 1, 2A e 2B). As proteínas LMP2A e LMP2B são compostas por múltiplos exões que se encontram em ambos os lados da zona de repetição terminal (TR). As setas azuis no topo da imagem representam uma zona de RNAs não poliadenilados (EBER1 e EBER2). A seta verde exterior e mais longa representa a transcrição que ocorre no tipo de latência III, na qual a transcrição se inicia num dos promotores Cp ou Wp. A seta mais interior e de cor vermelha representa a transcrição de EBNA1, que tem origem na zona promotora Qp e ocorre durante as latências do tipo I e II. Durante a infecção latente é possível detetar transcritos da zona BamHI A, no entanto ainda não foi possível fazer uma identificação fiável destas proteínas. Na zona BamHI A estão localizadas as zonas que codificam BARF0 e BARF1.⁵

Tabela 15 Genes virais, proteínas e sua função.^{9 10}

Quadro de leitura aberta	Proteína		Função principal
	Nome comum	Nome alternativo	
Genes latentes			
BKRF1	EBNA-1		Manutenção do plasmídeo, replicação do DNA, regulação da transcrição
BYRF1	EBNA-2		<i>Trans</i> -ativação
BERF1	EBNA-3A	EBNA-3	Regulação da transcrição
BERF2	EBNA-3B	EBNA-4	Desconhecida
BERF3/4	EBNA-3C	EBNA-6	Regulação da transcrição
BWRF1	EBNA-LP	EBNA-5	<i>Trans</i> -ativação
BNLF1	LMP-1		Sobrevivência das células B, anti-apoptose
BARF0			Função desconhecida
BARF1/BNRF1	LMP-2A		Mimetiza BCR, modulação da apoptose e transformação celular
BNRF1	LMP-2B		Potencia a ação de LMP-2A
EBER1/2			Não traduzido, regulação da imunidade inata
Genes Líticos			
Precoces imediatos			
BZLF1	ZEBRA		<i>Trans</i> -ativação, iniciação do ciclo lítico
BRLF1	Rta		<i>Trans</i> -ativação, iniciação do ciclo lítico
BILF4			<i>Trans</i> -ativação, iniciação do ciclo lítico
BMRF1	Antigénio precoce difuso		
BSLF1			Primase
BBLF4			DNA helicase
Genes precoces			
BALF2			Proteína de ligação ao DNA
BALF5			Polimerase de DNA
BORF2			Subunidade da ribonucleótido redutase
BARF1			Subunidade da ribonucleótido redutase
BXLF1			Timidina quinase
BGLF5			Exonuclease alcalina
BKRF3			Uracil DNA glicosilase
BLLF1	Gp350/220		Principal proteína do involucro
BXLF2	Gp85 (gH)		Fusão do involucro com a célula
BXLF1			Timidina quinase
BKRF2	Gp25 (gL)		Fusão do involucro com a célula
BZLF2	Gp42		Fusão do involucro com a célula, ligação com complexo MHC classe II
Genes Tardios			
BALF4	Gp110 (gB)		Desconhecida
BNRF1	P143		Proteína do tegumento
BDLF3	Gp100-150		Desconhecida
BILF2	Gp55-78		Desconhecida
BCLF1	VCAP55		Antigénio da cápside viral
BDRF1	VCAP40		Antigénio da cápside viral
BFRF3	VCAP18		Antigénio da cápside viral
BCRF1			Interleucina viral 10
BHRF1			Análogo viral de bcl-2

Capítulo II: Ciclo de replicação viral

O EBV dissemina-se através da saliva de um indivíduo infetado, entra no epitélio do novo alvo no anel de Waldeyer da amígdala onde, provavelmente, inicia uma infeção lítica. Em seguida infeta o tecido linfoide que se encontra por baixo deste epitélio. Os linfócitos B infetados migram para outros tecidos linfoides.

A diferenciação periódica de células B em plasmócitos permite a infeção das células epiteliais e excreção de novos vírus para a saliva, de forma a infetar um novo hospedeiro.

De forma a evitar o reconhecimento pelas células T citotóxicas, as células B infetadas expressam uma quantidade limitada de proteínas virais, efetivando assim uma infeção que dura toda a vida do hospedeiro.

Para entender como se processa o ciclo replicativo do vírus é importante entender os processos que dele fazem parte.

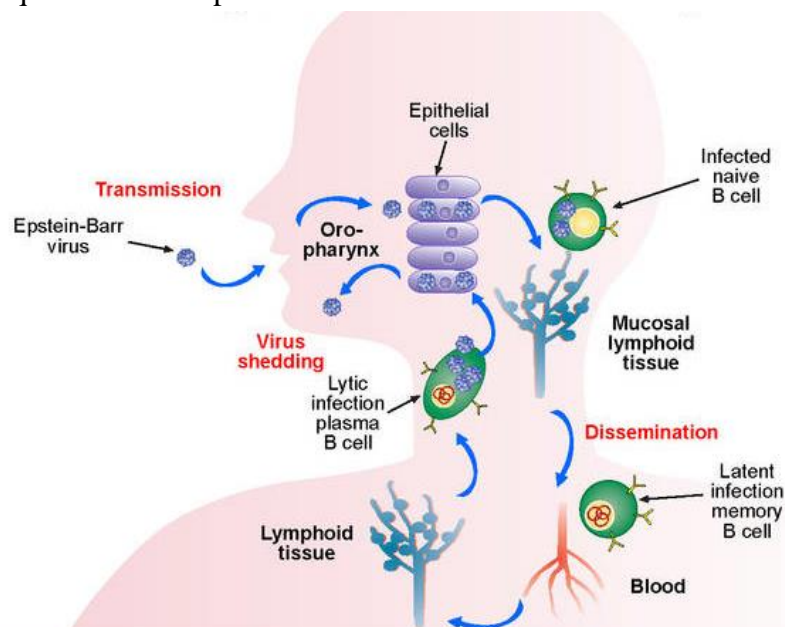


Figura 4 Ciclo infeccioso geral do vírus.¹¹

a. Adesão e fusão do EBV com as células do hospedeiro

Embora tenha a capacidade de infetar células B e células epiteliais, o vírus estabelece ligação e entra nestes dois tipos de células de formas distintas. Nas células epiteliais o EBV entra por fusão direta com a membrana plasmática. Enquanto nas células B esta entrada dá-se por endocitose e posterior fusão com a membrana da vesícula endocítica.

• Adesão

A primeira interação entre o vírus e as células B, e que determina o seu tropismo para esta linhagem celular, é mediado pela glicoproteína do involucro gp350, que estabelece uma ligação de elevada afinidade com o recetor do complemento 2 específico das células B (também denominado CR2 ou CD21). Vírus que não apresentem esta glicoproteína na sua superfície têm uma baixa capacidade de infeção. Recentemente foi descoberto um segundo recetor de ligação a gp350, o CR1 ou CD35, que permite que células que não apresentem o marcador CD21 sejam também suscetíveis a infeção por EBV.

No que toca às células epiteliais, o processo de adesão à sua membrana ainda não está completamente esclarecido. Pensa-se que as células epiteliais da amígdala podem expressar, em baixas quantidades, o marcador CD21 ou que o vírus quando recoberto por anticorpos IgA específicos para a gp350, pode ligar-se ao recetor IgA das células epiteliais. Mais recentemente foram reportadas integrinas presentes na superfície das células epiteliais que podem estar envolvidas no processo de entrada do vírus. O complexo gH/gL viral tem um motivo KGD com capacidade de ligação às integrinas de superfície $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ e $\alpha\beta 8$. Além disso, o EBV também expressa BMRF2, que pode interagir com as integrinas $\alpha 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$ presentes nas células do epitélio oral.¹²

• **Fusão**

Embora tenha um papel fundamental na adesão do vírus às células B o complexo gp350-CD21 não participa no processo de fusão do vírus com a membrana da vesícula endocítica. A fusão é desencadeada pela interação da glicoproteína gp42 e o antigénio leucocitário humano de classe II (HLA classe II). A gp42 existe em duas formas distintas no involucro do vírus, a forma clivada e a não clivada. A clivagem ocorre num local que é adjacente ao domínio transmembranar, produzindo uma proteína solúvel com capacidade de desencadear o processo de fusão. Se ocorrer uma mutação no ponto de clivagem a fusão do vírus com a célula é inibida, demonstrando que a clivagem é um acontecimento fundamental para o desencadear do processo de fusão.

Além de sofrer clivagem, a gp42 passa ainda por transformações conformacionais.

Ainda que a formação do complexo gp42-HLA classe II seja o momento que desencadeia todo o mecanismo de fusão, este não é, por si só, suficiente para que a fusão aconteça. O vírus utiliza três outras proteínas gH/gL e gB, que são conservadas em todos os herpesvírus, e funcionam como a maquinaria principal do procedimento de fusão. No EBV estas proteínas tomam a designação de gp85/gp25 e Gp110, respetivamente.

Vírus que apresentem depleção do complexo gH/gL são incapazes de infetar células, sendo, por isso, possível inferir que estas proteínas têm um papel fundamental durante a fusão. O conjunto gH/gL interage com gp42 formando um complexo estável. gL é uma proteína adjuvante cujo papel é auxiliar na correta aquisição de forma, bem como no transporte de gH para a superfície da célula.

Estudos recentes indicam que o complexo gH/gL promove a fusão, no entanto a sua função não está completamente esclarecida. Pensa-se que terá um poder regulador do processo e não um papel central.

No tecido epitelial o processo é diferente do visto acima.

O complexo gH/gL contém o motivo KGD com capacidade de ligação a integrinas que se encontram na superfície da célula, nomeadamente $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ e $\alpha\beta 8$, o que lhe confere tropismo para essas células. Esta interação sinaliza o desencadear de modificações conformacionais no complexo gH/gL levando ao sucesso da fusão do EBV com a célula epitelial.

Nas células B a fusão requer o complexo gp42-gH/gL, como visto anteriormente, sendo que gp42 é capaz de se ligar ao complexo KGD, impedindo, assim, que o vírus interaja com as células epiteliais. À luz destas evidências é possível concluir que a glicoproteína gp42 tem um papel importante na mudança de tropismo celular do vírus.

Por último é importante falar da glicoproteína gB. Esta proteína é necessária no processo de fusão com as células epiteliais e com as células B, é a mais conservada em todos os herpesvírus e é a principal molécula mediadora da fusão entre o involucro do vírus e a membrana celular.

O domínio funcional de gB apresenta alças hidrofóbicas que se pensa inserirem-se na membrana celular através de uma modificação pouco conhecida da sua forma, provavelmente desencadeada pela ligação do complexo gH/gL.

Em conclusão, com base no conhecimento atual, são propostos os seguintes modelos de entrada do vírus nas células:

-Nas células B, a glicoproteína gp350 liga-se ao recetor celular CD21 e a glicoproteína gp42 conecta-se ao complexo HLA classe II. A ligação a estes recetores induz a endocitose e desencadeia a fusão. Em seguida ocorre uma modificação de conformação do complexo gp42-gH/gL que resulta na ativação e recrutamento de gB que medeia a fusão pela inserção das suas alças hidrofóbicas na membrana da célula.

-Nas células epiteliais a adesão e fusão são diretamente desencadeadas pela interação do complexo gH/gL com integrinas de superfície da membrana celular. Esta interação induz modificações conformacionais de gH/gL ligando-se a gB que induz a fusão direta com a membrana citoplasmática.¹²

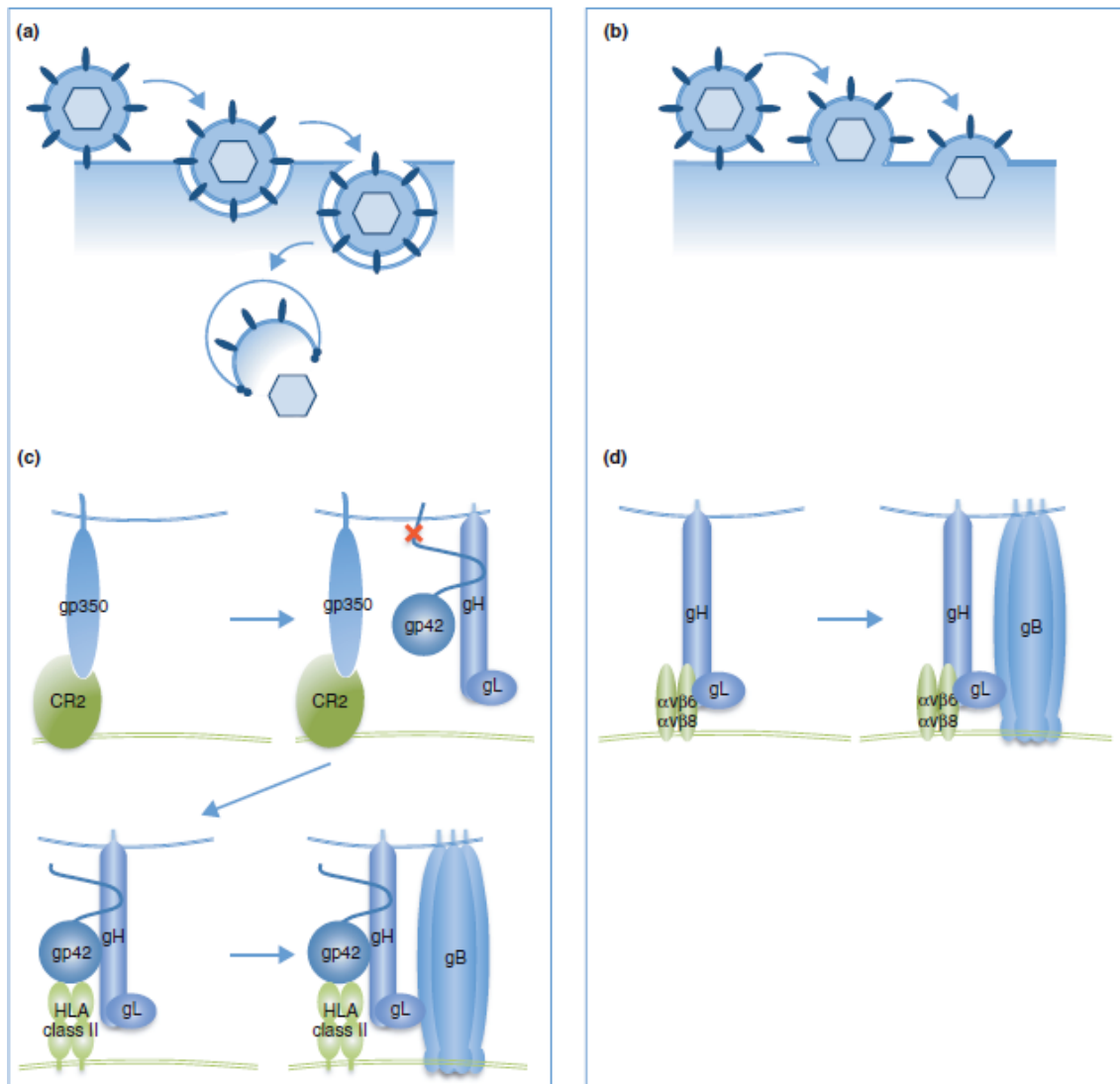


Figura 5 Esquema dos modelos de adesão e fusão do EBV às células B e epiteliais

a) Modelo de adesão do vírus à membrana das células B; c) modelo de fusão do involucro viral com a membrana da vesícula endocítica; b) e d) modelo de adesão e fusão direta com a célula epitelial.¹²

b. Acontecimentos pós-fusão

Pouco se sabe sobre os acontecimentos que se seguem após a entrada do vírus na célula. A ligação do vírus ao recetor CD21 promove a ligação ao complexo CD21, CD19 e CD81, moléculas da superfamília das imunoglobulinas, tetraspaninas e integrinas. Adicionalmente, a ligação gp350-CD21 induz a ativação de NF- κ B (fator nuclear *kappa* B que desempenha funções de ativação transcricional) que, por sua vez, induz a produção de interleucina-6. Estes eventos podem ter consequências na infecção, no entanto, não parecem ter nenhum papel na entrada do vírus nas células. Nenhum dos

acontecimentos decorrentes da adesão e fusão à célula têm influência no desencadear de um ciclo lítico tanto nas células B como nas epiteliais, sendo o processo que leva ao despoletar de um ciclo lítico *in vivo* ainda desconhecido.¹²

Após fusão do vírus com a membrana da célula ou da vesícula endocítica, a nucleocapside é libertada para o citoplasma. Em seguida, a nucleocapside desagrega-se, libertando o genoma viral que é transportado para o núcleo da célula. Aí o genoma linear torna-se circular formando um epissoma. A célula procede depois a um ciclo lítico com libertação de novos vírus ou infecção latente dos linfócitos B.

c. Mudança de Tropismo Celular

O EBV retém a capacidade de mudar o seu tropismo celular, fazendo-o através da modificação das glicoproteínas presentes no involucro. Isto é possível pela alteração do tipo de linhagem da célula onde se replica. Nas células B, gp42 interagem com o sistema de HLA classe II e de seguida uma porção é degradada. Sendo assim a proporção de gp42-gH/gL no involucro dos vírus produzidos nesta célula é inferior comparativamente à quantidade de gH/gL. Por esta razão, os vírus com origem nestas células têm maior afinidade para as células epiteliais.

Por outro lado, nas células epiteliais, que não apresentam HLA classe II, a gp42 não é marcada para degradação. Neste caso, os vírus apresentam uma proporção superior de gp42-gH/gL e por isso têm maior afinidade para células B.¹²

d. Fase de Latência e Ciclo Lítico

Existem várias teorias de como o EBV é capaz de produzir uma infecção prolongada, que se estende por toda a vida do hospedeiro, no entanto a mais aceite na comunidade científica é o modelo do centro germinativo.

Diversos artigos de revisão descrevem a forma como o EBV utiliza a fisiologia das células B normais, valendo-se de diferentes combinações de expressão dos genes de latência para conseguir persistir a longo termo dentro do reservatório de células B de memória no hospedeiro imunocompetente.

O EBV dissemina-se através da saliva de um indivíduo infetado, entrando no novo alvo pelo epitélio do anel de *Waldeyer* da amígdala, localizada na orofaringe. Após entrada no epitélio, provavelmente, o vírus inicia uma infecção lítica que leva à sua amplificação, replicação viral e lise celular, associada com a libertação do vírus e infecção de tecidos contíguos como as glândulas salivares e o tecido linfóide da orofaringe. Este ciclo lítico leva ao estabelecimento de virémia, o que permite ao EBV infetar o sistema linforeticular incluindo o fígado, baço e linfócitos B do sangue periférico.

- **Fase de latência**

O vírus infeta as células B *naive* que se encontram imediatamente por baixo do epitélio. Utilizando o programa transcricional de crescimento (latência III), o vírus estimula as células a tornarem-se linfoblastos ativados. As proteínas participantes no programa de crescimento regulam negativamente o programa de crescimento da célula. Isto permite que a célula infetada migre para o folículo e inicie uma reação de centro germinativo, estabelecendo o programa de transcrição padrão (latência II). Este programa padrão fornece sinais de resgate e sobrevivência que permitem que a célula saia do centro germinativo como célula B de memória.⁵

Como dito anteriormente, o EBV utiliza os mecanismos da célula B normal modulando-os a seu favor. Sendo assim é importante conhecer o mecanismo normal de ativação das células B.

A ativação das células B normais ocorre nos folículos linfáticos de órgãos linfoides secundários, onde os linfócitos B contactam com antígenos expostos na membrana das células dendríticas foliculares. O reconhecimento desses antígenos pelo recetor da célula B (BCL) resulta na endocitose do complexo antígeno-recetor, seguida de processamento e apresentação pelas moléculas do HLA classe II. Em seguida a célula migra para a periferia do folículo onde contacta com células T CD4⁺ efetoras que fornecem sinais de ativação. A célula B ativada migra de volta para o centro do folículo e prolifera. Aí as células T CD4⁺ auxiliaadoras promovem a sua maturação e transformação.¹¹

O EBV utiliza este processo de forma a criar células B de memória onde possa estabelecer infecção prolongada. Após a entrada do vírus na célula ele começa a expressar um conjunto de genes que codificam as proteínas de latência. Duas delas, LMP1 e LMP2A, têm um papel fulcral em todo o processo de modelação da célula B. LMP1 é um homólogo de CD40 que permite ativação das células B sem ser necessário interação com os linfócitos T CD4⁺. LMP2A mimetiza a sinalização do BCL e, em conjunto com LMP1, induz maturação, transformação e diferenciação em células B de memória.¹¹

Em seguida inicia-se o programa de latência (latência 0) em que toda a expressão de proteínas virais é inibida. Estas células são mantidas pela homeostasia normal das células B de memória. Quando, ocasionalmente, se dividem expressam o programa EBNA-1- apenas (latência I). Eventualmente as células B de memória infetadas retornam à amígdala, onde se podem diferenciar em plasmócitos, o que desencadeia a replicação viral.

- **Ciclo Lítico**

O ciclo lítico, presente durante a primoinfecção e na reativação, caracteriza-se pela expressão de todos os quadros de leitura aberta do genoma viral. Durante esta fase o material genético viral é transportado para o núcleo da célula e inicia replicação graças à DNA polimerase viral.

A reativação do vírus no ciclo lítico divide-se em três fases: a fase precoce imediata em que são expressos os fatores de transcrição que iniciam a replicação viral; a fase precoce em que as proteínas implicadas na replicação do DNA são produzidas; e a fase tardia em que o DNA e as proteínas estruturais são montadas para formar novos vírus. Este processo resulta na libertação de vírus com poder infeccioso que podem ser excretados para a saliva para infetar um novo indivíduo ou infetar mais células B do próprio indivíduo que os produziu.¹³

Os genes imediatos BZLF1 e BRLF2 são os responsáveis pela mudança da fase de latência para o ciclo lítico. Além disso eles também têm função transactivadora dos genes precoces e tardios.

BZLF1 codifica a proteína ZEBRA que, em conjunto com a proteína Rta (codificada por BRLF1) promove a transcrição a partir de BRLF1. Zebra também é capaz de se unir a moléculas sinalizadores localizadas na origem da transcrição lítica (OriLyt).¹⁰

Por outro lado, ZEBRA possui um domínio com capacidade para modular a sinalização de NF- κ B inibindo as vias da apoptose. Rta suprime a ativação de IFN- β ao inibir os seus fatores reguladores.¹⁰

Em conjunto BZLF1 e BRLF1 conseguem alterar morfológica e funcionalmente as mitocôndrias da célula, de forma a obterem a energia necessária para o processo lítico.

Na fase precoce, uma proteína, codificada por BHRF1, é um homólogo do oncogene humano bcl-2. Esta proteína atua como sinal de sobrevivência prolongando o tempo disponível para a produção dos novos vírus. Uma outra proteína importante é codificada por BCRF1, que é um homólogo da IL-10 e que tem capacidade de inibir a resposta imunitária celular.¹⁰

Os genes tardios, na sua maioria, codificam proteínas estruturais da cápside, do tegumento e do involucro.

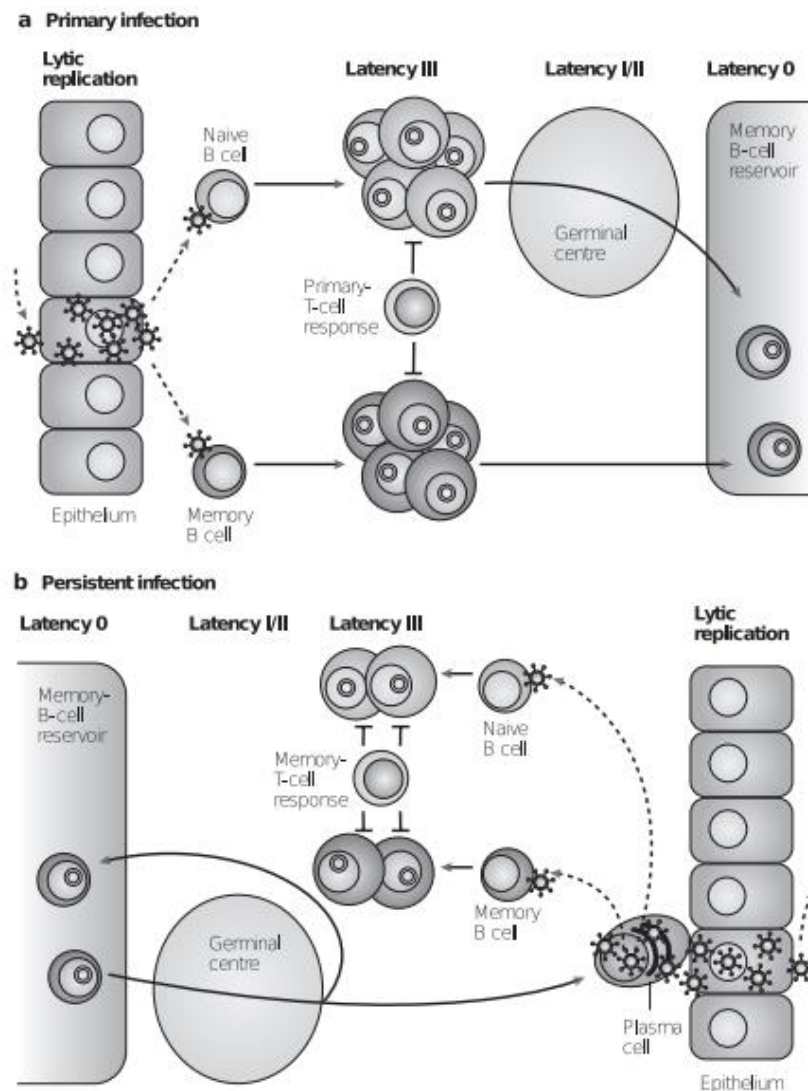


Figura 6 Esquema exemplificativo do ciclo de replicação viral ⁵

e. Programas de Transcrição

A expressão dos genes virais difere entre as células, dependendo do seu tipo, diferenciação e estado de ativação. A tabela 2 resume os programas de transcrição que podem ser apresentados, bem como as proteínas expressas, as células em que se encontram e a função das proteínas produzidas.

O programa de crescimento baseia-se na expressão de seis proteínas nucleares e três proteínas de membrana, que são essenciais no efeito ativador e estimulador da proliferação que o vírus apresenta. EBNA-1 é essencial para a manutenção dos episossomas.

Em todas as formas de latência são expressos pequenos RNAs não codificantes (EBERs). Nas latências II e III são expressos os micro-RNAs.^{14,15}

Tabela 16 Programas de latência, produtos de genes expressos, células infectadas e suas funções. ⁵

Programa	Produtos de genes expressos	Células B infectadas	Função
Crescimento (latência III)	EBNA-1, -2 -3A, -3B, -3C, -LP, LMP-1, LMP-2A e LMP-2B, EBERs, miRNA	<i>Naive</i>	Ativar as células B
Padrão (latência II)	EBNA-1, LMP-1, LMP-2A e LMP-2B, EBERs, miRNA	Centro germinativo	Diferenciar células B ativadas em células B de memória
Latência (latência 0)	EBERs	Células B de memória periféricas	Permitir infecção persistente
EBNA-1 apenas (latência I)	EBNA-1, EBERs	Células periféricas de memória em divisão	Permite a divisão de vírus em células fase de latência
Lítico	Todos os genes líticos	Plasmócitos	Replicação do vírus em plasmócitos

f. Expressão do EBV em Latência

• Proteínas EBNA

A proteína EBNA1 é essencial para a manutenção e replicação do epissoma viral pela polimerase de DNA da célula hospedeira durante a fase de latência. Tem também a função de se ligar aos cromossomos celulares e mediar a divisão equitativa do genoma viral para as células filhas. Esta proteína é expressa por todas as células infectadas que se encontrem em divisão, no entanto não é alvo para os linfócitos T citotóxicos, ou seja, permite que as células infectadas sobrevivam na presença de um sistema imunitário competente. Isto acontece porque EBNA1 possui uma cadeia repetitiva de glicina e alanina, que lhe permite escapar da degradação por proteossomas e da consequente apresentação por parte das moléculas do MHC.¹⁶

A proteína EBNA2 é também essencial na transformação dos linfócitos, adicionando a isso a função de transativação da transcrição. Regula a transcrição das sequências codificantes das proteínas de membrana PML1 e PML2, do marcador de ativação das células B, CD23 e do recetor CD21. Existem dois tipos de EBNA2 (A e B) que são codificados por sequências diferentes. O tipo de EBNA2 presente faz a distinção entre os dois tipos de EBV.¹⁶

Proteínas EBNA3 são também codificadas por sequências que diferem entre os dois tipos de EBV, podendo concluir-se que as sequências para EBNA2 e EBNA3 definem o tipo de EBV.

As proteínas EBNA2 e 3 são os principais alvos para a resposta imunitária.

•Proteína membrana de latência 1 (LMP1)

A proteína LMP1 é considerada uma oncoproteína do EBV por ser fulcral para a transformação das células B. Esta proteína tem funções importantes na modificação da expressão genética da célula, podendo induzir a expressão de múltiplas moléculas de adesão, função anti apoptose, fatores de crescimento e recetores de fatores de crescimento. A capacidade de ativar fatores de transcrição de NF- κ B e interagir com moléculas mediadoras do TNF (fator de necrose tumoral) são as características bioquímicas que lhe permite modular a expressão celular. Estas moléculas mediadoras são designadas TRAFs (fatores associados ao recetor de TNF)¹⁷, que estimulam NF- κ B que, por sua vez, induz a proliferação celular e inibe a apoptose.¹⁶

A sua constituição inclui uma porção curta amino terminal, seis domínios transmembranares e uma porção terminal carboxilo com funções de sinalização. Esta porção terminal carboxilo tem 2 regiões de ativação, a região C-terminal 1 (CTAR1) e a região C-terminal 2 (CTAR2). A primeira liga-se aos TRAFs 1,2,3,4 e 5, enquanto que a segunda interage com o domínio indutor de morte celular do recetor do TNF. Todos esses sinais estimulam NF- κ B que permite a modulação do crescimento e morte celular.¹⁸

•Proteínas membranares de latência 2 A e B (LMP2 A e B)

As proteínas LMP2 A e B são proteínas constituídas por 12 domínios transmembranares e uma cauda carboxilo terminal, LMP2A tem uma sequência amino terminal citosólica adicional.¹⁰

LMP2A é um homólogo funcional do recetor BCR. A cauda terminal citoplasmática tem locais de ligação compatíveis com as moléculas adaptadores (Lyn e Syc) do recetor BCR. A ativação dessas moléculas por LMP2A tem o mesmo efeito que a estimulação do recetor por antígenos.¹⁶

A sinalização combinada de LMP1 e LMP2A contorna a necessidade de contacto com as células T CD4+ para ativação das células B.

LMP2A tem também a função de bloquear a sinalização do estímulo do recetor BCR por antígenos, uma vez que isto pode induzir a célula a entrar num ciclo lítico ficando assim exposta ao sistema imunitário.¹¹

Finalmente, LMP2B potencia a ação de PMP2A.

•RNAs codificados por EBV (EBERs)

EBER 1 e 2 são pequenas moléculas de RNA não codificante com 167 e 172 nucleótidos de comprimento respetivamente¹⁶, são transcritos a partir da polimerase III do hospedeiro e são altamente expressos nas células de latência. Têm uma estrutura secundária muito bem definida que implica a formação de ligações intermoleculares de bases e a formação de arcos. Os EBERs têm capacidade de interagir com muitas moléculas do hospedeiro que lhe conferem capacidade de modular o crescimento e proliferação celular. Há relatos de que estes RNAs conferem resistência à apoptose, indução de citocinas e modulação do sistema imunitário inato.¹⁰

g. Transmissão do Vírus

O modelo atual de transmissão do vírus propõe que as células B infetadas se diferenciam em plasmócitos, que entram em ciclo lítico libertando novos vírus. Estes vírus, com tropismo para células epiteliais, infetam células epiteliais da cavidade oral, induzindo, dentro destas, um ciclo lítico que leva à formação de novos vírus e à sua posterior libertação para a saliva do indivíduo infetado. Estes novos vírus, com origem em células epiteliais têm, por isso, tropismo para células B.

Analisando a saliva de indivíduos infetados é possível verificar que os vírus aí presentes são oriundos de células HLA classe II negativas. Ou seja, em teoria, estes vírus têm uma maior afinidade para células B, o que implica que, para que ocorra infeção de um indivíduo saudável, os vírus tenham acesso direto a células B deste.

Mesmo sendo os vírus produzidos por células B mais infecciosos para células epiteliais, evidências retiradas de estudos *in vitro* indicam que estas células são muito difíceis de infetar. Para conseguir infetar com eficiência células epiteliais o vírus teve de evoluir criando mecanismos para ultrapassar esta dificuldade. Em primeiro lugar, a eficácia da infeção aumenta exponencialmente quando há contacto direto entre a célula B a sofrer ciclo lítico e a célula epitelial. Por outro lado, a ligação do vírus ao CD21 na superfície da célula B induz a concentração das moléculas de adesão do vírus e da célula num polo da mesma, estabelecendo-se uma forte ligação entre as células e uma consequente transferência do vírus. É possível que a interação entre a gp350 e DC21 seja o acontecimento que recruta as glicoproteínas necessárias à interação com as células epiteliais.

Supondo que os vírus secretados para a saliva de um indivíduo infetado têm origem em células epiteliais, pode-se inferir, a partir do exposto acima, que a transmissão para um novo hospedeiro envolve a infeção direta das células B sem necessitar de infeção prévia de células epiteliais. Isto é possível porque o epitélio das criptas da amígdala é, muitas vezes, descontínuo e está sujeito a lesão por parte do ambiente externo que pode despoletar uma reação inflamatória, permitindo o acesso direto ao tecido linfoide subjacente.

Por fim, estudos de microscopia eletrónica permitiram considerar a possibilidade de o vírus apenas passar pelas células epiteliais (num processo denominado de transcitose) para infetar as células B. Sendo que no sentido apical-basolateral ele é transportado por macropinocitose e no sentido contrário é transportado via endossomas.¹²

Capítulo III: Resposta imunitária à infecção por EBV

A resposta imunitária do hospedeiro contra o vírus tem, claramente, uma elevada importância no controlo do EBV, sendo esta importância evidenciada quando se comprara a infecção num indivíduo imunocompetente com casos de imunodeficiência primária afetando as células “*Natural Killer*” NK ou os linfócitos T, ou a indivíduos sob terapia de imunossupressão.

O estudo e compreensão dos acontecimentos imunológicos no início da infecção por EBV são, em grande parte, limitados pela sua natureza assintomática. Além disso, a grande maioria dos estudos existentes sobre esta temática são realizados na imunidade da circulação periférica, descartando outros tecidos relevantes, que podem apresentar realidades contrastantes.

O modelo animal do rato humanizado tem vindo a permitir alguns avanços na descoberta da função de diversos agentes imunitários na reação à infecção pelo EBV.

a. Imunidade inata

Uma das primeiras células do sistema imunitário a interagir com as células infetadas pelo vírus são, possivelmente, as células NK. Esta população de células caracteriza-se pela presença de recetores ativadores ou inibidores na sua membrana, que utilizam para inspecionar os ligandos na superfície das células, o equilíbrio entre estes sinais pode desencadear uma resposta imunitária.

Ao analisar sangue periférico de indivíduos em fase inicial não sintomática da infecção, verifica-se que não há uma elevação da quantidade de células NK, o que só acontece aquando do estabelecimento de infecção sintomática. No entanto, o facto de a concentração destas células no sangue periférico não estar aumentada não exclui a possibilidade de elas participarem no controlo da infecção na fase inicial. Em estudos *in vitro* verificou-se que as células NK CD56^{forte} NKG2A+, presentes na amígdala, parecem ter um efeito de controlo da expansão de células B infetadas pelo vírus. Mais evidências desta possibilidade derivam do estudo com ratos humanizados que, após depleção das células NK e exposição ao EBV, desenvolvem sintomatologia semelhante à mononucleose infecciosa em humanos. Devido à perda da função de controlo das células B em fase lítica e da ativação de células T mediada por NK, estes ratos desenvolvem sintomatologia caracterizada por um grande aumento das células T CD8+, virémias muito elevadas e concentrações exacerbadas de citocinas inflamatórias. Em indivíduos com mononucleose infecciosa verificou-se o aumento de células NK com fenótipo semelhante ao das células mencionadas acima, verificando-se ainda que a quantidade destas células tende a diminuir com a idade, permitindo inferir que, quando jovem, o indivíduo é capaz de combater a infecção, no entanto, com o avançar da idade, vai perdendo essa capacidade e desenvolve sintomas.

Outro subgrupo de células NK que vale a pena mencionar são as T NK invariáveis (iNK T), que têm a função de reconhecer antígenos lipídicos quando estes são apresentados pela molécula apresentadora de antígenos CD1d. Verificou-se que indivíduos com deficiência nestas células são extremamente vulneráveis ao EBV. Embora seja um forte indicador da importância destas células, isto não constitui prova só por si uma vez que, indivíduos nesta condição, usualmente apresentam problemas em outras linhagens de células imunitárias. Posto isto, o papel das células iNK T ainda não está completamente esclarecido, embora exista evidência *in vitro* de que elas têm a capacidade de limitar a transformação das células B infetadas.¹⁹

Durante a infecção aguda, expressão de genes virais latentes e líticos induz uma vigorosa resposta da imunidade mediada por células, que leva à produção de grandes quantidades de citocinas pro-inflamatórias. Níveis elevados de INF γ e TNF α podem induzir ativação excessiva de monócitos e macrófagos. Em indivíduos predispostos geneticamente, esta ativação dos macrófagos pode levar à destruição de células hematopoiéticas e consequente citopénia. A ativação dos macrófagos também induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 1 e 6 e o TNF α , que causam febre, erupções cutâneas e infiltração de vários órgãos pelas células imunitárias.^{11 20}

b. Imunidade adquirida

A produção de anticorpos contra o EBV inicia-se aproximadamente 8 dias antes do desenvolvimento de sintomas, com o aparecimento de imunoglobulinas M contra o antígeno viral da cápside (VCA). IgG contra este mesmo antígeno apenas aparece na fase aguda (segunda ou terceira semana), na fase de convalescença o título destes anticorpos desce, mas mantêm-se presentes pelo resto da vida do indivíduo.

IgG contra antígenos precoces estão presentes durante a fase aguda da doença devendo virtualmente desaparecer até após 2 anos da fase aguda.

Anticorpos contra EBNA-1 não estão presentes no início na infecção, demorando alguns meses até aparecerem em circulação. Embora anticorpos contra EBNA-2 possam ser detetados precocemente. Isto pode dever-se ao menor acesso ao MHC de classe I que EBNA-1 apresenta.²¹

A resposta imunitária durante a fase sintomática da mononucleose infecciosa caracteriza-se pela elevada expansão de células T CD8+ que é extensamente ineficaz na eliminação da infecção. Com a resolução da mononucleose infecciosa estabelece-se a resposta de células T CD4+ e CD8+ que regula a homeostase entre o vírus e o hospedeiro.²²

A importância da vigilância das células T para prevenir patologias linfoproliferativas no hospedeiro é evidenciada quando se compara a infecção num indivíduo imunocompetente com um doente a fazer imunossupressão, sendo que o problema pode ser revertido com infusão de células T específicas contra o EBV.

Esta vigilância das células T acaba por ser uma vantagem para o vírus porque, embora não seja capaz de o eliminar totalmente, mantém a infeção controlada e silenciosa permitindo ao vírus perdurar por toda a vida do hospedeiro sem provocar infeção exacerbada que leve à morte deste.

c. Evasão ao sistema imunitário

A maioria dos vírus evoluiu de forma a ter estratégias de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro, de forma a estabelecer com sucesso replicação dentro das células deste. O facto de que o EBV estabelece infeção prolongada por toda a vida do hospedeiro em mais de 95% da população adulta indica que este vírus desenvolveu técnicas muito eficientes para eludir o sistema imunitário do hospedeiro.

Embora seja de elevada importância que se entenda como o vírus é capaz de escapar às vias do sistema imunitário, ainda muito pouco é sabido sobre este tema. À luz de avanços recentes as estratégias que o vírus aplica para este propósito parecem assentar nestes 3 princípios: manipulação de interferão do tipo I e II que ativa a via de sinalização *JaK – STAT* (*Janus Kinase- signal transducer and activator of transcription programs*, cascata de sinalização com influência na imunidade, divisão celular, morte celular e formação de tumores); modulação de fatores reguladores de interferão; e repressão das vias sinalizadores da apoptose.²³

O EBV codifica citocinas e recetores de citocinas (denominados virocinas e viroreceptores, respetivamente) que podem ser importantes no mecanismo de modulação da resposta imunológica. A proteína codificada por BCRF1 partilha 70% da sua sequência de aminoácidos com a IL-10, mimetizando a sua função esta proteína consegue inibir a síntese de IFN γ pelas células mononucleares da circulação periférica.²⁴

A proteína BARF1 funciona como recetor do *colony stimulating factor 1*. Este fator, normalmente, atua aumentando a expressão de IFN α pelos monócitos. A proteína BARF1 pode funcionar como recetor falso deste fator impedindo a estimulação das células imunitárias.

Além disso, o EBV produz pelo menos duas proteínas capazes de inibir a apoptose: BHRF1 que funciona como homóloga de bcl-2 e LMP1.²⁴

Durante a fase de latência acontece uma limitação no número de proteínas virais expressas e uma redução da quantidade de cada uma delas, que, provavelmente, constituem duas estratégias principais de fuga ao sistema imunitário. Sendo que, no programa de latência III apenas são expressas 9 proteínas e nos restantes programas de latência a expressão proteica é ainda mais limitada. Está demonstrado que EBNA-1 e EBNA-3c são capazes de limitar a sua própria expressão. De forma a conseguir executar funções normais na fase de latência com um número limitado de proteínas o vírus possui pequenas porções de RNAs não traduzidos que não são detetados pelas células T.²² Além disso, o local mais provável de estabelecimento de infeção prolongada são as células B de memória, onde o vírus está resguardado do sistema imunitário.

Capítulo IV: Mononucleose infecciosa

O síndrome de Mononucleose Infecciosa (MI) foi descrito pela primeira vez no século IX como febre glandular aguda em adolescentes e adultos jovens, cujos sintomas eram linfadenopatia, febre, hepatoesplenomegalia, mal-estar generalizado, e desconforto abdominal. O nome Mononucleose Infecciosa foi utilizado em 1920 por Sprunt e associados para descrever casos de leucemias autolimitadas associadas a células semelhantes a blastos. A morfologia destas células atípicas foi descrita em 1923 por Downey. E em 1932, Paul e Bunnell, descobriram que soro de paciente com MI provoca aglutinação de eritrócitos de diferentes espécies animais pois possui anticorpos heterofilos, permitindo maior precisão no diagnóstico de MI.²³

a. Epidemiologia

A infecção por EBV não é de declaração obrigatório, sendo assim, o número de infecções primárias sintomáticas não é conhecido. Estima-se que nos países desenvolvidos 90% da população seja infetada até aos 25 anos, sendo que 50% das crianças até aos 5 anos apresentam a infecção. A facha etária de maior incidência da infecção é a dos 15-24 anos.

Nos países em desenvolvimento e em populações com estatuto socioeconómico mais baixo a infecção é transmitida durante a infância, o que se deve, provavelmente, à falta de condições de higiene e à prática de pré-mastigar a comida das crianças que é vulgar em alguns países. Como a infecção é adquirida precocemente o síndrome de mononucleose infecciosa é invulgar nestas zonas.

Em África o vírus associa-se com ao linfoma de Burkitt em coinfeções por *Plasmodium falciparum*.

O vírus não parece ter predileção por nenhuma etnia, embora, o haplotipo HLA-A2 muito comum na população chinesa pareça conferir maior risco de desenvolvimento de carcinoma nasofaríngeo.

Quanto ao género, o vírus afeta de igual forma tanto o sexo feminino como o masculino.²⁵

b. Sinais e sintomas

A MI apresenta-se, usualmente, com um histórico de 1 a 2 semanas de fadiga e mal-estar generalizado, no entanto o início de sintomatologia pode ser abrupto.

O período de incubação do vírus em adolescentes localiza-se entre 30 a 50 dias, sendo mais curto em crianças.²⁶

Os sinais e sintomas incluem:

- Garganta dorida e inflamada: é o sintoma mais frequente, inicia-se na primeira semana e vai-se agravando durante a mesma;
- Febre de 38-40°C;
- Dores musculares;
- Cefaleias: usualmente retro orbitais, ocorrendo na primeira semana;
- Dor no quadrante superior esquerdo: pode ser devido a esplenomegalia, pode ser sugestiva de ruptura do baço;
- Erupção cutânea maculopapular;
- Os sintomas persistem por 2 a 3 semanas, mas a fadiga pode permanecer por mais tempo;
- Bebés e crianças pequenas com infecção primária são, em geral, assintomáticos.

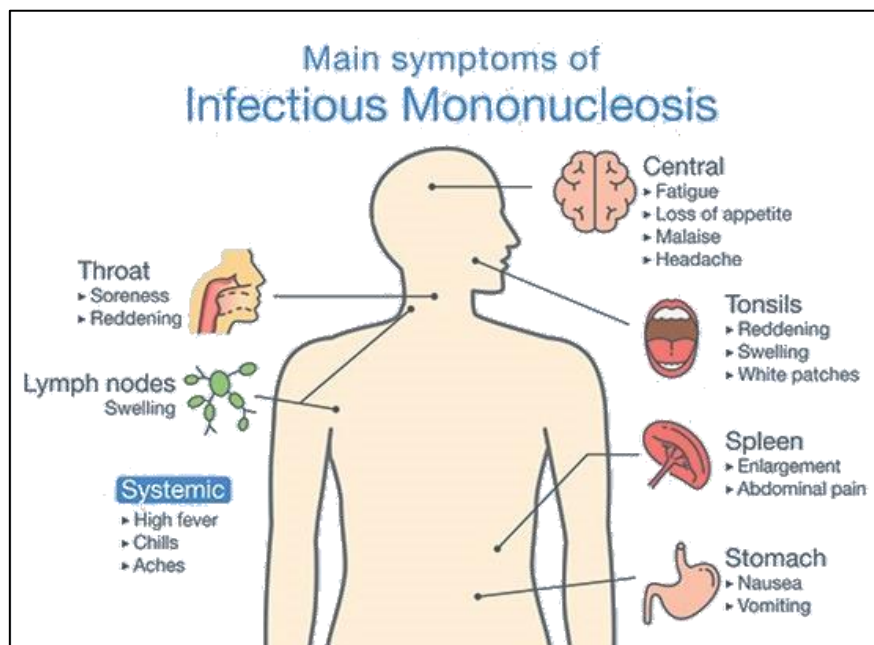


Figura 7 Resumo esquemático dos sintomas de MI.²⁷

c. Exame físico

A MI é caracterizada por faringite, linfadenopatias generalizadas e hepatoesplenomegalia. A maioria dos sintomas é provocada por uma proliferação exagerada de células T que infiltram os órgãos.²⁵

- Faringite: é o achado mais comum na MI, é exsudativa e pode provocar petequias na junção entre o palato mole e o palato duro. O aumento das amígdalas pode ser tão exacerbado que leve ao bloqueio das vias respiratórias. Normalmente está associado a desidratação pela dificuldade na deglutição.



Figura 8 Exemplo de faringite e amigdalite com presença de petéquias.²⁸

- Linfadenopatias: afeta principalmente os gânglios linfáticos cervicais posteriores, podendo também envolver os cervicais anteriores e submandibulares. Em certos casos há envolvimento dos gânglios axilares e inguinais. O aumento é simétrico e os nódulos apresentam-se macios e móveis à palpação.



Figura 9 Exemplo de linfadenopatia cervical.²⁹

- Hepatomegália: embora seja um sinal comum é raro o desenvolvimento de icterícia.

- Esplenomegália: é um sinal muito comum na MI, o baço aumenta de volume durante a primeira semana e decresce de volume gradualmente durante os 7 a 10 dias seguintes. Pode haver rompimento do baço por trauma ligeiro ou mesmo rutura espontânea.

- Febre: a maioria dos doentes apresenta febre com picos entre 38-39°C podendo chegar aos 40°C, mais severa durante o período da tarde.

- Erupção cutânea maculopapular: caracterizada por pequenas manchas avermelhadas ou arroxeadas lisas espalhadas por todo o corpo³⁰, ocorre em cerca de 3-15% dos pacientes e é mais comum em crianças. Associada a tratamento com amoxicilina ou ampicilina quando os sintomas iniciais de MI são confundidos com infecção estreptocócica.



Figura 10 Exemplo de erupção cutânea característica de MI.²⁸

- Edema das pálpebras: pode estar presente durante a primeira semana.

d. Diagnóstico diferencial

A etiologia da MI é, em 90% dos casos, o vírus de Epstein-Barr, no entanto existem outras causas que podem estar na origem deste síndrome. O Citomegalovírus (CMV) é a principal causa de MI EBV negativa. Outros vírus podem causar doença aguda semelhante a MI, como é o caso dos adenovírus, hepatite A, B ou C, herpes simplex 1 ou 2, herpesvírus humano 6, rubéola e infecção primária de HIV em adolescentes e adultos jovens.²⁵

Durante o diagnóstico diferencial é importante ter em conta causas não virais que podem provocar sintomatologia semelhante como: reação adversa a medicamentos, linfoma, leucemia mielomonocítica aguda e leucemia linfoblástica.²⁸

e. Diagnóstico laboratorial

Os três critérios clássicos para o diagnóstico laboratorial de MI incluem:

- Presença de linfocitose;
- Presença de pelo menos 10% de linfócitos atípicos no esfregaço de sangue periférico;
- Serologia positiva para EBV.

•Contagem diferencial

- Leucocitose com contagem de leucócitos de $10-20 \times 10^9/L$ é encontrada em cerca de 40-70% dos doentes podendo, em alguns casos, chegar a $25 \times 10^9/L$ na segunda semana;

- Aproximadamente 80-90% dos pacientes apresentam linfocitose de 50% sendo mais severa durante a terceira semana e que perdura por 2-6 semanas;

- A maioria dos indivíduos apresenta 20-40% de linfócitos atípicos;

- Os linfócitos atípicos caracterizam-se por terem um volume aumentado, razão núcleo/citoplasma baixa e núcleo menos denso que os linfócitos normais. A maioria são células T CD8+ citotóxicas embora possam aparecer também células NK;
- Pode estar presente uma trombocitopenia ligeira.²⁵

• **Função hepática**

- A maioria dos pacientes apresenta resultados de função hepática alterados;
- Fosfatase alcalina, Aspartato aminotransferase (AST) e bilirrubinas têm os seus picos entre os 4 e os 15 dias após início dos sintomas; gamma-glutamiltransferase (GGT) entre a 1ª e 3ª semanas.
- É comum verificar-se aumento da desidrogenase láctica (LDH);
- A maioria dos testes da função hepática normalizam após 3 meses, no entanto a GGT pode permanecer ligeiramente aumentada até 12 meses após a resolução da MI.²⁵

• **Anticorpos heterofilos**

O vírus de Epstein-Barr estimula as células B infetadas a produzirem anticorpos heterofilos. Estes anticorpos têm a capacidade de aglutinar células provenientes de seres de outras espécies e não são dirigidos contra o vírus. Existem dois testes diferentes para a pesquisa de anticorpos heterofilos no soro: o teste de Paul-Bunnell e o Monospot.

O teste de Paul-Bunnell baseia-se no facto de que soro obtido de um indivíduo infetado por EBV ter anticorpos capazes de produzir aglutinação dos eritrócitos de ovelha, enquanto o soro de um indivíduo saudável tem pouca ou nenhuma capacidade de aglutinação nas mesmas circunstâncias. No entanto, é necessário ter em conta que anticorpos produzidos durante outras patologias podem produzir o mesmo efeito. Como é o caso dos anticorpos produzidos na doença do soro, reações medicamentosas ou os anticorpos contra o antigénio de Forssman. Sendo assim é necessário realizar o processo de absorção diferencial. Este processo baseia-se no facto de eritrócitos de bovinos terem a capacidade de absorver anticorpos heterofilos de EBV, e células renais de porquinhos-da-Índia absorvem anticorpos de Forssman, ambos conseguem absorver anticorpos produzidos na doença do soro. Sendo assim, o soro de um indivíduo infetado deve aglutinar eritrócitos de ovelha após absorção com células de porquinho-da-índia e não aglutinar após absorção com eritrócitos bovinos.³¹

O teste Monospot utiliza eritrócitos de cavalo ou de vaca. Os eritrócitos de cavalo são mais sensíveis do que os de ovelha ou vaca, no entanto os de vaca são específicos para anticorpos de MI e não requerem absorção diferencial prévia.³²



Figura 11 Exemplo de Kit do teste Monospot da ThermoFisher.³²

•Serologia

A resposta imunitária humoral inclui anticorpos contra o ciclo lítico e a fase de latência, no entanto apenas alguns estão amplamente estudados e são utilizados para diagnóstico.

Os anticorpos IgG anti-EA refletem dois padrões diferentes, o difuso (D) e o restrito (R), estes foram observados pela primeira vez por imunofluorescência e distinguidos segundo a sua distribuição dentro da célula e diferente padrão de desnaturação por enzimas proteolíticas. Embora nem sempre estejam presentes, em geral as IgG EA (D) tendem a aumentar durante as primeiras 3 a 4 semanas e deixam de ser detetadas após 3 a 4 meses, sendo que em certos casos é possível que sejam detetadas anos após o período sintomático. Indivíduos que desenvolveram carcinoma nasofaríngeo geralmente apresentam um título elevado destes anticorpos, o mesmo acontece em caso de reativação do vírus. No caso da IgG EA (R), pode ser detetado até 2 anos após o desaparecimento de IgG EA (D). Títulos baixos deste anticorpo são encontrados em crianças com idade inferior a 2 anos com infecção silenciosa, em indivíduos com linfoma de Burkitt e em infecções passadas. Níveis elevados estão presentes durante a reativação do vírus e em indivíduos imunocomprometidos.³³

Anticorpos contra os antígenos de membrana (anti-MA) geralmente não são utilizados para diagnóstico. Têm particular importância em limitar a disseminação da infecção e prevenir reinfeções.

Os anticorpos IgG contra a cápside viral (IgG VCA) aparecem aquando do início dos sintomas e permanecem positivos durante toda a vida do indivíduo. Por outro lado, os anticorpos IgM VCA aparecem ao mesmo tempo que os IgG, no entanto deixam de ser detetados dentro de poucas semanas. Crianças e adultos com infecção primária são positivos para IgM VCA.³³

Anticorpos contra EBNA-1 geralmente não estão presentes durante as primeiras 3 a 4 semanas após o aparecimento dos sintomas e, por isso, são um indicador de infecção passada.

É possível distinguir casos de infecção aguda e infecção passada usando apenas 3 parâmetros (IgG VCA, IgM VCA e IgG EBNA-1). A presença de IgG VCA e IgM VCA com ausência de IgG EBNA-1 indica infecção aguda; a presença de IgG VCA e IgG EBNA-1 com ausência de IgM VCA indica infecção passada.

Podem existir casos com perfis serológicos diferentes dos acima mencionados que suscitem dúvidas quanto ao seu significado, como é o caso de presença de IgG VCA com ausência de IgM VCA e IgG EBNA-1; presença simultânea dos três parâmetros; ou presença de IgG EBNA-1 com ausência dos outros dois parâmetros. Nestes casos é necessário manter o indivíduo sob observação e realizar outros testes laboratoriais.³⁴

Os padrões dos parâmetros de diagnóstico e sua interpretação estão resumidos na tabela apresentada na figura 12.

A determinação dos anticorpos tem uma utilidade reduzida no diagnóstico de indivíduos imunocomprometidos uma vez que o tipo e manutenção dos anticorpos dependem da dinâmica da doença em causa.

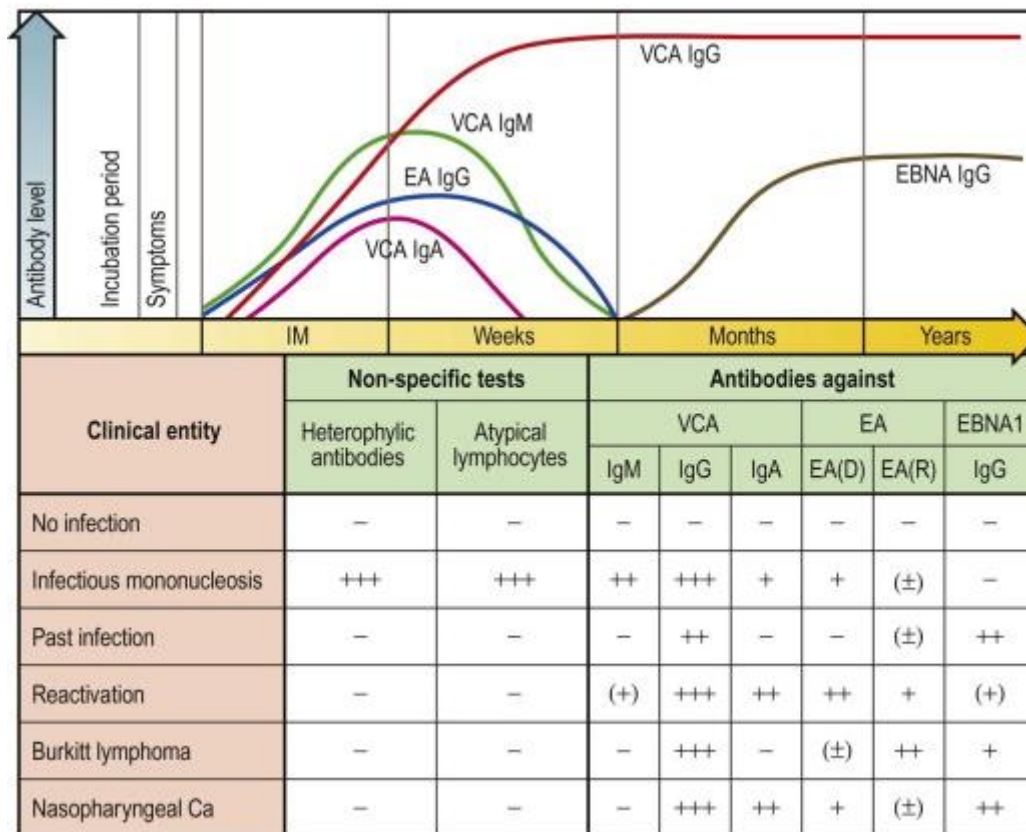


Figura 12 Perfil de diagnóstico da infecção por EBV³⁵

Os testes específicos para a determinação da presença de anticorpos anti-EBV utilizam diferentes substratos e tecnologias variadas. Os métodos laboratoriais mais rotineiramente utilizados são: ensaios de imunofluorescência (IFAs); ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISAs); ensaios de quimioluminescência (CLIAs); e uma

versão mais moderna de imunoenaios fluorimétricos multiplex (MFI), que utilizam microsferas magnéticas para determinar simultaneamente vários analitos.

Pode ser útil a determinação da avidéz dos anticorpos IgG para a diferenciação entre os estadios da infecção. Os testes de avidéz avaliam a maturação dos anticorpos IgG. No início da infecção a avidéz é reduzida, aumentando durante o tempo com a maturação da resposta imunitária. Pode ser medida através de EIA, IFA ou imunobloting. O procedimento implica a avaliação paralela de 2 alíquotas da mesma amostra, sendo que a uma delas são adicionadas substâncias dissociadoras do complexo anticorpo-antigénio (usualmente ureia). A razão entre o resultado obtido nas 2 alíquotas reflete o grau de avidéz do anticorpo.

A avidéz depende da cinética específica de cada anticorpo e varia entre eles. Por exemplo, durante as primeiras 12 semanas de infecção a avidéz de IgG VCA é baixa, começando depois a aumentar, no entanto a IgG EA mantém-se baixa além dessas 12 semanas.

Os testes de avidéz não podem ser realizados em recém-nascidos devido à interferência dos anticorpos maternos.

• **Biologia Molecular**

Podem ser aplicados muitos métodos, técnicas e protocolos na pesquisa de DNA viral, tais como: *Dot blotting*, *Southern Blotting*, PCR e hibridização *in situ*. Podendo estas ser aplicadas em diferentes tipos de amostras como sangue total, plasmas, soro ou células monucleares periféricas. Estas variantes levam a que os resultados destes testes tenham de ser analisados e comparados cuidadosamente, uma vez que variam entre laboratórios.³⁶

A pesquisa de DNA viral por PCR é mais sensível do que a serologia nos estadios iniciais da infecção, havendo evidências de que se correlaciona melhor com a infecção aguda do que a avidéz das IgG. No entanto, em indivíduos imunocompetentes, a serologia é, em geral, suficiente para o diagnóstico, excepto nos casos dúbios citados anteriormente.

Sendo assim, a pesquisa de DNA viral toma especial importância no diagnóstico de indivíduos imunocomprometidos cuja resposta humoral é incompleta.

A hibridização *in situ* pode ser utilizada para a detecção de EBERs e, como tal, usada para diagnóstico de doenças malignas associadas com EBV. No entanto nem todas as células expressam EBERs, dependendo do ciclo em que estão, por isso a inexistência de EBERs na amostra colhida não implica que não haja infecção.

• **Achados histológicos**

No sangue: são encontrados linfócitos atípicos. Estes linfócitos são células T não infetadas recrutadas para destruir as células B infetadas. São linfócitos maiores com uma razão núcleo/citoplasmas diminuída, apresentam nucléolos no núcleo e o citoplasma parece ser “indentado” pelas células vizinhas.³⁷

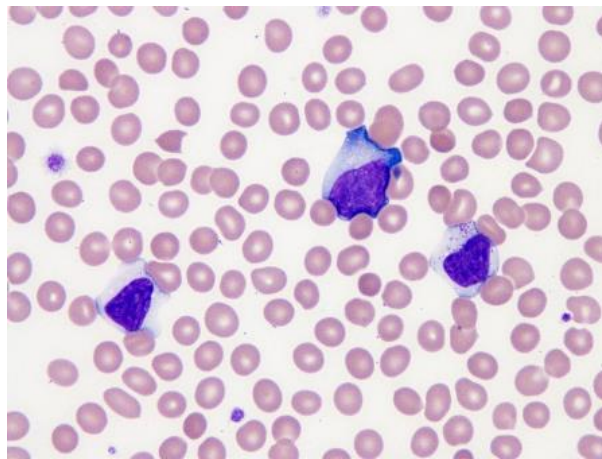


Figura 13 Esfregaço de sangue de Doente com MI com três linfócitos atípicos.³⁷

Nos gânglios linfáticos: apresentam-se aumentados com centros germinativos e folículos linfáticos grandes. As áreas periféricas foliculares apresentam muitos linfócitos B infetados.

No baço: apresenta-se aumentado sendo possível observar infiltração linfocítica da cápsula e trabéculas. Estão presentes células blásticas pleomórficas na polpa vermelha. A congestão vascular leva ao aparecimento de hemorragias subcapsulares.

No fígado: as modificações são ligeiras podendo haver inflamação dos hepatócitos e dos canais biliares.

No SNC: podem ser observados danos degenerativos nos neurónios do SNC em infeções complicadas.

f. Tratamento

A mononucleose infecciosa é uma doença autolimitada que, geralmente, não necessita de terapia específica. Uma vez que apresenta baixo risco de transmissão não é necessário isolar os doentes.

A maioria dos indivíduos pode recuperar em casa, podendo haver situações em que é necessária hospitalização, como no caso de haver rutura do baço, compromisso das vias respiratórias, desidratação, trombocitopenia significativa, anemia hemolítica, complicações neurológicas, entre outras.

Não há necessidade de alterações na dieta.

O nível de atividade física depende da intensidade da doença aguda, a fadiga extrema sentida nas primeiras semanas pode obrigar a que o indivíduo permaneça na cama. Nos 2 a 3 meses seguintes ainda existe algum mal-estar sendo que a atividade física pode ser aumentada ligeiramente conforme o tolerado. Durante a progressão da MI os indivíduos devem abster-se de praticar desportos de contacto ou levantamento de pesos pois facilmente podem resultar em rutura do baço.²⁵

g. Medicação

A mononucleose infecciosa aguda é tratada sintomaticamente, utilizando medicamentos não específicos como soluções salinas para a garganta, anti-inflamatórios não esteroides para a inflamação, febre e dores musculares.

Em casos mais extremos, em que haja um compromisso das vias respiratórias por causa da inflamação dos gânglios linfáticos e das amígdalas, podem ser usados corticoides. Os corticoides são apenas usados para aliviar os sintomas da MI, sendo que não alteram de forma significativa o curso da doença. Devem apenas ser utilizados em casos extremos e não são recomendados para o tratamento de MI não complicada.

• **Antivirais**

Embora tenham sido desenvolvidos muitos antivirais capazes de interromper a replicação do EBV *in vitro*, nenhum deles demonstrou efeitos clínicos relevantes. Este facto deve-se, em grande parte, à dificuldade em diagnosticar a infeção. Primeiramente por ter uma fase assintomática alargada e, quando apresenta sintomas, estes não são específicos. Consequentemente, os antivirais administrados tardiamente têm um efeito limitado.

O antiviral Aciclovir (ACV) demonstrou ser capaz de impedir a replicação do vírus apresentando toxicidade mínima, porque consegue impedir a replicação viral sem interferir na divisão celular. O seu poder antiviral resulta da interação do ACV-trifosfato com a polimerase de DNA do vírus. O ACV-trifosfato é incorporado no DNA viral formando uma ligação forte e irreversível que impede o alongamento da cadeia de DNA. É muito utilizado no tratamento de infeções por herpesvírus como o herpes simplex 1 e o varicela-zoster que apresentam sintomas exuberantes e específicos precocemente, em contraste com o que acontece com EBV. O Aciclovir ainda não foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) nem pela Agência Europeia do Medicamento para o tratamento da infeção por EBV, porque, em ensaios clínicos, apenas foi observada uma diminuição da quantidade de vírus excretados na saliva durante a MI sem qualquer interferência na duração dos sintomas em indivíduos imunocompetentes. O Aciclovir pode ter um papel mais importante no controlo da doença em indivíduos imunocomprometidos.^{38,39}

Cidofovir (CDV) é um nucleótido de purina análogo da citosina. É convertido por enzimas celulares em cidofovir difosfato que interfere com a síntese de DNA viral e inibe a replicação do vírus. Estudos têm vindo a demonstrar que o antiviral injetado diretamente no tumor nasofaríngeo inibe a sua proliferação e que quando a sua ação é combinada com hidroxureia e didox (ácido 3,4-dihidroxibenzohidroxâmico) a apoptose induzida por CDV é potenciada.⁴⁰

Maribavir é um antiviral que se encontra em investigação e que apresenta ação contra o CMV e o EBV, mas sem eficácia nos restantes herpesvirus. Contra o EBV tem a dupla funcionalidade de inibir a replicação do DNA viral e da transcrição, atividades que resultam da inibição da fosforilação do DNA viral pelo fator de polimerase BMRF1 e inibição dos RNAs.⁴⁰

• **Imunoglobulinas**

Imunoglobulinas endovenosas têm sido usadas para modular a resposta imunitária na presença de auto anticorpos. Tem-se demonstrado eficaz no tratamento de trombocitopenia associada a MI. Tem poder neutralizante dos anticorpos contra a mielina, diminui a estimulação de citocinas pró-inflamatórias incluindo IFN γ , bloqueia a ação dos macrófagos, suprime o recrutamento de células T e B, bloqueia a cascata do complemento e promove formação de mielina.²⁵

• **Vacinas**

Estão a ser desenvolvidos estudos na tentativa de encontrar uma vacina que previna a infecção por EBV. No entanto, por agora ainda, não foi conseguida uma resposta.

Um estudo recente demonstrou que uma vacina contendo uma subunidade da glicoproteína gp350 tendia a proteger os indivíduos vacinados contra o aparecimento de sintomas de MI, embora não evitasse a aquisição do vírus.⁴¹

h. Prevenção

Não é necessário proceder ao isolamento de indivíduos infetados pois o risco de transmissão é relativamente baixo.

O vírus é encontrado na saliva de indivíduos com MI e também em 10-20% dos indivíduos adultos saudáveis. É transmitido pelo contacto com saliva de um indivíduo que esteja a excretar o vírus, sendo que em crianças acontece principalmente pelo comportamento de colocar as mãos na boca e pela partilha de brinquedos e chupetas. Em adolescentes acontece através do beijo.

Sendo assim é importante evitar beijar crianças nas áreas em redor da boca e nariz, manter condições de higiene principalmente em locais com muitas crianças pequenas e evitar que estas partilhem brinquedos ou chupetas.

O EBV pode ser transmitido através de transfusões sanguíneas ou transplantes de medula óssea, mas, uma vez que é um vírus comum, não há protocolos em ação para evitar este tipo de transmissões.

Não existem ainda vacinas contra a infecção por EBV.

i. Prognóstico e complicações

Em 25% a 30% dos casos de MI observam-se complicações hematológicas geralmente ligeiras e que incluem: anemia hemolítica, purpura trombocitopénica trombótica, anemia aplástica, síndrome hemolítico-urémico e coagulação intravascular disseminada.⁴²

Complicações neurológicas são raras e incluem: síndrome de Guillian-Barré (destruição da bainha mielina, com formigamento das extremidades e fraquesa

motora⁴³), paralisia facial, meningoencefalite, meningite asséptica, mielite transversa, cerebelite e neurite ótica.⁴¹

Outras complicações possivelmente fatais são a rutura do baço e obstrução da via respiratória.

A MI pode ainda provocar linfohistiocitose hemofagocítica secundária, uma doença caracterizada por febre, hepatoesplenomegalia, linfadenopatias e erupção cutânea⁴⁴. Envolve um defeito na apoptose e no controlo inibitório das células NK e T, resultando numa produção excessiva de citocinas e na acumulação de linfócitos e macrófagos em vários órgãos⁴⁵.

Indivíduos do sexo masculino com doença linfoproliferativa ligada ao cromossoma X (síndrome XLP) apresentam sintomas de MI muito severos e, por vezes, fatais. A mutação genética associada à doença impede a normal ativação dos linfócitos T CD8+, resultando numa proliferação descontrolada.⁴²

Em indivíduos imunocompetentes a infeção aguda tem um bom prognóstico, com recuperação total após alguns meses. Os sintomas neurológicos tendem a não deixar sequelas em crianças, em adultos podem causar alguns déficits. Todos os indivíduos desenvolvem infeção latente que se mantém por toda a vida e é, geralmente, assintomática.

j. Caso clínico

• Apresentação do doente

Indivíduo do sexo masculino com 22 anos de idade, apresenta queixas de febre, dor e inflamação da garganta, mal-estar geral e dores no pescoço que se vinham a agravar nas últimas 24 horas.¹¹

• Anamnese

Antes do aparecimento destes sintomas o doente relata sentir-se bem e não recordar ter entrado em contacto com alguém com sintomas semelhantes.

Recentemente viajou para o sul de África tendo realizado profilaxia contra malária. O paciente relata ter sofrido de algumas picadas de mosquito e encontrado carraças nas pernas em duas ocasiões.⁴⁶

• Histórico

Aos 11 anos recebeu tratamento para linfoma de Hodgkin, tendo permanecido em remissão desde o fim do tratamento.

Sem histórico de cirurgias.

Sem alergias conhecidas.

Sem histórico familiar relevante.

Não está a tomar nenhuma medicação presentemente.

Não fuma, não bebe bebidas alcoólicas e não consome substâncias ilegais.

• Diagnóstico diferencial

Devido aos sintomas apresentados e aos relatos feito pelo paciente é estabelecido o seguinte quadro de diagnóstico diferencial⁴⁶:

- Infecção por Rickettsia;
- Sarampo;
- Hepatite viral;
- Malária;
- EBV;
- CMV;
- Febre do vale do Rift;
- Febre tifoide;
- Febre hemorrágica Crimeia-Congo.

• **Exame físico**

- Aparência:
 - Pálido e febril;
 - Alerta e cooperativo;
 - Sem encefalopatia;
 - *Glasgow Coma Score (GCS) 15/15.*
- Sinais vitais:
 - Febre de 38,5°C;
 - Pressão arterial 124/76 mmHg;
 - Ritmo cardíaco de 100 batimentos por minuto.
- Geral:
 - Apresenta icterícia;
 - Petéquias na orofaringe;
 - Amígdalas aumentadas;
 - Inflamação da faringe sem exsudado;
 - Ligeira hepatoesplenomegália;
 - Erupção cutânea maculopapular ligeira e generalizada.

O paciente foi admitido e mantido num cubículo de isolamento enquanto aguardava os resultados das análises laboratoriais⁴⁶.

• **Diagnóstico laboratorial**

- Hemograma⁴⁶:

Tabela 17 Hemograma

Parâmetro	Resultado
Leucócitos	19,01 x10 ⁹ /L
Neutrófilos	4,47 x10 ⁹ /L
Linfócitos	14,26 x10 ⁹ /L
Monócitos	0,38 x10 ⁹ /L
Eosinófilos	0
Basófilos	0
Hemoglobina	12 g/L

Plaquetas	138 x10 ⁹ /L
------------------	-------------------------

- Bioquímica⁴⁶:

Tabela 18 Parâmetros Bioquímicos

Parâmetro	Resultado
Na	132 mmol/L
K	4,59 mmol/L
Cl	94 µmol/L
CO2	22 mmol/L
Ureia	9,4 mmol/L
Creatinina	152 mmol/L
Bilirrubina Total	127 µmol/L
Bilirrubina Conjugada	81 µmol/L
Fosfatase Alcalina	383 u/L
GGT	285 u/L
ALT	407 u/L
AST	682 u/L
Proteínas totais	57 g/L
Abumina	23 g/L

- Outros resultados analíticos⁴⁶:

Tabela 19 Outros resultados analíticos

Parâmetro	Resultado
IgM Hepatite A	Negativo
IgG hepatite A	Negativo
Hepatite B anticorpo s	Negativo
Hepatite B antígeno s	Negativo
Hepatite B anticorpo c	Negativo
Malária gota fina	Negativo
Malária gota espeça	Negativo
Antígenos <i>P. falciparum</i>	Negativo
IgM Sarampo	Negativo
Serologia <i>R. conorii</i>	Negativo
PCR e serologia Crimeia-Congo	Negativo
IgM VCA EBV	Positivo
IgG VCA EBV	Positivo
IgG EBNA	Negativo
Virémia EBV	6,3 Cópias /ml

• **Tratamento**

Iniciou-se o tratamento com corticoides para diminuir a inflamação das amígdalas e do baço para evitar rutura.

Devido à persistência dos sintomas iniciou-se um protocolo de corticoides e ciclosporina aconselhado nos casos de doença fulminante, no entanto o paciente não respondeu aos medicamentos.

Adicionalmente foi administrado imunoglobulinas endovenosas e o paciente foi inscrito num ensaio clínico usando Rituximab⁴⁶.

• **Conclusão**

Todas as medicações aplicadas falharam e o paciente desenvolveu falência multiorgânica uma semana após admissão.

Embora não se tenha realizado nenhum teste genético, especula-se que o indivíduo sofria de doença linfoproliferativa ligada ao cromossoma X. Esta doença é uma imunodeficiência que resulta em defeitos na ativação e resposta das células T e NK. Estes defeitos tornam os indivíduos mais vulneráveis ao EBV.⁴⁷

Capítulo V: Infecção por EBV e Oncogénese

O EBV é considerado fator etiológico de muitos tipos de cancro que envolvem principalmente os linfócitos e as células epiteliais. Incluindo cancros que se desenvolvem em indivíduos imunocomprometidos, como os associados com a SIDA e o linfoma pós-transplante, e alguns cancros raros nos indivíduos imunocompetentes. Estas neoplasias desenvolvem-se com um determinado padrão geográfico específico a cada uma, indicando que fatores do próprio hospedeiro, como a eficiência do sistema imunológico, doenças genéticas, questões comportamentais ou ambientais e contacto com outros agentes infecciosos, podem explicar o facto de EBV apenas causar neoplasias em alguns indivíduos infetados.⁴⁸

A correlação entre a infecção por EBV e o aparecimento de cancro foi determinada quando se descobriu que todas as células associadas aos tumores apresentavam DNA, RNA e proteínas virais. Outro critério para definir esta relação foi a deteção de genoma viral clonal. A clonalidade viral é definida através da análise por enzimas de restrição dos fragmentos terminais repetitivos do genoma linear. Isto permitiu verificar que todos os genomas virais dentro das células do tumor são idênticos, podendo inferir-se que as células são também clonais.⁴⁸

As neoplasias associadas ao EBV são classificadas conforme a expressão génica que apresentam em tipos I, II e III. O tipo de latência I está associado com linfoma de Burkitt, o tipo II relaciona-se com linfoma de Hodgkin e o tipo III apenas provoca neoplasias em situações de imunossupressão.

Nos indivíduos imunocompetentes um fator que contribui para a formação de tumores é a limitada expressão de proteínas virais. Com expressão das LMP 1 e 2 necessária para a transformação das células, na ausência da produção de proteínas EBNA que são os principais alvos do sistema imunitário. Nestes casos os micro RNAs virais e os EBERs podem assumir um papel oncogénico importante.⁴⁹

Em seguida estão expostas algumas das doenças neoplásicas mais comumente associadas com o EBV.

a. Doença Linfoproliferativa Pós-transplante

A capacidade do EBV para causar cancro é claramente evidenciada pelo desenvolvimento de doença linfoproliferativa das células B em indivíduos cuja imunidade mediada por linfócitos T esteja deprimida, após transplante de medula óssea ou de órgãos sólidos. A maioria dos linfomas pós-transplante (LPT) é EBV positivo.

A frequência com que LPT ocorre depende do regime de imunossupressão aplicado, sendo que ocorre em cerca de 5% a 15% dos transplantes cardíacos, 10% dos pulmonares, 1% a 3% dos renais e 1% a 2% dos transplantes de medula óssea.

A infecção por EBV no LPT é um exemplo de latência do tipo III com expressão dos alvos para as células T citotóxicas, EBNA2 e EBNA3. Em alguns casos a doença pode regredir após a redução da terapia imunossupressora, indicando que as células permanecem suscetíveis aos linfócitos T citotóxicos.⁴⁸ Terapia profilática, nomeadamente usando aciclovir, tem demonstrado capacidade de reduzir a incidência desta doença linfoproliferativa em ensaios clínicos.³⁸

b. Linfoma de Burkitt

O linfoma de Burkitt (LB) é uma neoplasia de linfócitos B maduros, altamente agressiva, sendo endêmica nas regiões centrais de África. Em África a idade média de diagnóstico é de 4 a 7 anos enquanto, no resto do mundo, é na facha etária dos 55 anos.

Acredita-se que existem duas formas distintas da doença: uma associada ao EBV, que ocorre principalmente em crianças na zona central de África onde é endêmica; e uma de ocorrência rara, não associada ao vírus, com igual incidência em todo o mundo.⁵⁰

O LB foi um dos primeiros cancros em que se demonstrou que a existência de uma translocação cromossomal estaria na origem da desregulação da proliferação celular. Esta translocação localiza-se no gene *c-myc* e envolve o *loci* que codifica as cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas.

As duas formas de LB (endêmica e esporádica) apresentam pontos de quebra diferentes no mesmo cromossoma. O ponto de quebra na LB endêmica localiza-se a muitos Kbs de distância de *c-myc* enquanto que o ponto de quebra da doença esporádica se localiza do primeiro exão ou intrão. Esta diferença pode ser evidência do efeito de EBV no desenvolvimento da neoplasia.

Tem sido postulado que a causa de LB nos países onde é endêmico seria uma infecção combinada pelo EBV e pelo *Plasmodium falciparum*. A malária pode deprimir o controlo imunológico através da ativação de linfócitos T supressores. Além disso, há evidências de que o vírus, agindo em conjunto com o plasmódio estimula a proliferação de linfócitos B infetados. O estado hiperproliferativo que daí advém favorece o aparecimento de anormalidades nas células.⁵⁰

Ainda que se verifiquem níveis elevados de antígenos contra o EBV em doentes com LB, a expressão génica do vírus está bastante restringida. A maioria das células expressa apenas EBNA1 e EBERs, padrão correspondente à latência do tipo I.⁴⁸

c. Neoplasias associadas a SIDA

Nos pacientes imunodeprimidos, especialmente naqueles com SIDA, as infeções provocadas por herpesvírus constituem uma causa importante de morbidade e mortalidade. Essas doenças ocorrem com mais frequência e com um decurso mais grave

e prolongado. Devido à grande carga viral nestas situações é também comum o desenvolvimento de resistência aos antivirais.

Uma vez que as infecções por herpesvírus são controladas pelo sistema imunitário, elas tornam-se mais prevalentes após a eclosão da SIDA.

Na infecção por HIV ocorrem linfomas extra-nodulares agressivos, principalmente do SNC, devido à proliferação de linfócitos B infetados por EBV. Tem sido reportada a associação de EBV a tumores do músculo liso em pacientes com SIDA, havendo relatos de leiomiossarcomas e leiomiomas nas glândulas adrenais, fígado, cólon e membrana epidural. O linfoma testicular parece também ter associação com o EBV nestes doentes.⁵⁰

d. Carcinoma Nasofaríngeo

Tal como acontece com o LB, o carcinoma nasofaríngeo (CNF) é caracterizado por marcadas diferenças na incidência em tipos de populações e localização geográfica. O sul da China e o sudeste Asiático são zonas de elevada incidência onde o CNF representa cerca de 20% do total de neoplasias. É também frequente nas populações de esquimós e na África mediterrânea. Na população caucasiana é raro.

Contrariamente a LB, virtualmente todos os casos de CNF são EBV positivos, o que indica que o vírus é um importante cofator para o desenvolvimento da neoplasia.

Em indivíduos com CNF verifica-se a existência de títulos irregularmente aumentados de IgA contra os antigénios VCA e EA, títulos esses que precedem o desenvolvimento do tumor em vários anos.⁵⁰

O tumor pode apresentar-se com vários graus de diferenciação que estão na base da classificação em três categorias da OMS (Organização Mundial de Saúde)⁵¹:

- Categoria 1: carcinoma das células escamosas;
- Categoria 2: carcinoma não diferenciado queratinizante;
- Categoria 3: carcinoma não diferenciado não queratinizante.

As células tumorais expressam EBNA1 e LMP1 e 2, padrão característico da latência do tipo II.

O processo pelo qual o EBV induz proliferação nas células epiteliais ainda não foi totalmente esclarecido, no entanto os padrões de incidência apontam para a existência de cofatores ambientais e genéticos que possam contribuir para o desenvolvimento do tumor.

e. Adenocarcinoma Gástrico

Desde o início da década de 1990 que a infecção por EBV tem sido apontada como um fator de risco para o desenvolvimento de Adenocarcinoma Gástrico (AG). Uma vez que em alguns dos doentes o vírus pode ser isolado das células do tumor e não das

células epiteliais em redor e a clonalidade do vírus foi demonstrada apenas nas células do tumor.⁵²

Estima-se que existam mais de 50 mil casos de AG EBV positivo por ano em todo o mundo. Os países com maior frequência deste cancro são o Japão, a Alemanha e os EUA. Essa diferença de distribuição geográfica sugere a intervenção de fatores ambientais e, possivelmente, da origem étnica.⁵³

Dada a complexidade deste cancro ainda existe pouco consenso sobre os processos EBV dependentes que possam estar na sua origem.

f. Linfoma de Hodgkin

O linfoma de Hodgkin (LH) é relativamente mais frequente em zonas com condições socioeconómicas mais elevadas das populações ocidentais. Existem dois picos de incidência: um por volta dos 25-30 anos de idade e outros após os 45. Acredita-se de o EBV possa desempenhar um papel direto ou indireto na patogénese de alguns casos de LH.⁵⁰

Este linfoma é caracterizado por uma perda da estrutura arquitectónica normal do nódulo linfático acompanhada de infiltração de células maioritariamente não malignas. As células malignas presentes são características desta doença e designam-se células de Reed-Sternberg (RS). Dependendo da razão de células RS e do tipo de infiltrado pode-se distribuir os linfomas de Hodgkin em 4 tipos: predominância de linfócitos, esclerose nodular, celularidade mista e depressão linfocitária.⁵⁴ O EBV está presente nas células da totalidade dos LH de depleção linfocitária, em 70% dos de celularidade mista, 10% a 40% dos de esclerose nodular e nunca nos de predomínio linfocitário.

As células do LH expressam muitos genes que se sabe serem estimulados pela proteína LMP1, além disso verifica-se a ativação de NF-kB nestas células. O que aponta que a ativação de NF-kB por LMP1 seja um dos mecanismos que permitem ao EBV estar na origem dos LH.

A presença nas células do linfoma de EBNA1, LMP1 e EBERs determina que esta neoplasia seja um exemplo de latência do tipo II.⁵⁰

g. Leucoplasia pilosa oral

A leucoplasia pilosa oral (LPO) manifesta-se clinicamente como uma placa branca, não removível por raspagem, localizada nas bordas laterais da língua podendo ser uni ou bilateral. A superfície da lesão pode apresentar-se lisa, rugosa ou pilosa.⁵⁵

Os indivíduos infetados com HIV ou imunossuprimidos constituem dois grupos de predileção para o aparecimento da doença.

Em indivíduos EBV positivos a imunossupressão resulta na replicação viral exacerbada e consequente expansão dos linfócitos B infetados.

Um achado importante nesta doença e que, possivelmente, terá influência na sua patogênese é a coinfeção dos dois tipos de EBV e de diferentes estirpes de cada tipo. Esta infecção combinada permite a recombinação de sequências de genes entre as diferentes estirpes.⁵⁰

Do diagnóstico diferencial da LPO fazem parte situações como colonização por *Candida albicans* e lesões mecânicas que provocam manifestações clínicas semelhantes. O diagnóstico é estabelecido após confirmação da presença de DNA viral nas células colhidas das lesões.⁵⁰

Conclusão

O vírus de Epstein-Barr é um dos parasitas mais bem sucedidos conhecidos até hoje. Conseguindo infetar mais de 90% da população global mantendo os indivíduos aparentemente saudáveis.

Os seus mecanismos de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro, ainda pouco conhecidos, permitem-lhe manter-se dentro dos linfócitos B de memória sem ser detetado, e continuar o seu ciclo replicativo sem provocar doença exacerbada.

Os sintomas da Mononucleose infecciosa, embora desconfortáveis, não apresentam um risco muito grande para a vida do doente. Sendo que, na maioria das vezes, os indivíduos recuperam sem quaisquer sequelas. Por esse motivo e porque é uma infeção tão comum em todo o mundo, não existem protocolos definidos para impedir a transmissão do vírus.

Embora a MI não seja uma ameaça para a vida do hospedeiro imunocompetente, a infeção latente por EBV tem vindo a ser associada a muitas doenças malignas.

O conhecimento dos mecanismos patológicos envolvidos na entrada e permanência do vírus no corpo humano toma uma elevada importância para que se possam desenvolver antivirais eficazes e vacinas que previnam a aquisição da infeção por este.

Referências Bibliográficas

1. 50 years of Epstein-Barr virus - Cancer Research UK - Science blog. <https://scienceblog.cancerresearchuk.org/2014/03/26/50-years-of-epstein-barr-virus/>. Accessed January 13, 2020.
2. Herpesviridae - dsDNA Viruses - dsDNA Viruses (2011) - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae. Accessed March 2, 2020.
3. Buisson M, Morand P, Genoulaz O, Bourgeat MJ, Micoud M, Seigneurin JM. Changes in the dominant Epstein-Barr virus type during human immunodeficiency virus infection. *J Gen Virol*. 1994;75(2):431-437. doi:10.1099/0022-1317-75-2-431.
4. Mühe J, Wang F. Host Range Restriction of Epstein-Barr Virus and Related Lymphocryptoviruses. *J Virol*. 2015;89(17):9133-9136. doi:10.1128/JVI.01235-15.
5. EPSTEIN-BARR VIRUS - Biological Agents - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304353/>. Accessed February 1, 2020.
6. Epstein-Barr virus structure and infection of cells. Epstein-Barr virus... | Download Scientific Diagram. https://www.researchgate.net/figure/Epstein-Barr-virus-structure-and-infection-of-cells-Epstein-Barr-virus-EBV-is_fig1_256985763. Accessed February 1, 2020.
7. Le virus Epstein-Barr : un mécanisme oncogène nouveau et puissant dévoilé – Medisquare. <https://www.medisquare.be/index.php/2017/02/13/le-virus-epstein-barr-un-mecanisme-oncogene-nouveau-et-puissant-devoile/>. Accessed March 1, 2020.
8. Hammerschmidt W, Sugden B. Replication of Epstein-Barr. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
9. EPSTEIN-BARR VIRUS - Biological Agents - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304353/>. Accessed January 10, 2020.
10. M Plata S L, F Oviedo J, Rincón-Orozco B. Revisión sistemática: estrategias virales para la inducción de cáncer “virus de Epstein-Barr: latencia y mecanismos asociados a la oncogénesis viral.” *Rev la Univ Ind Santander*. 2018;vol.50(nº3).
11. Epstein Barr virus (EBV) | Immunopaedia. <https://www.immunopaedia.org.za/immunology/archive/cellular-immune-responses/cd8-t-and-b-cell-immunity/cytokine-storm/epstein-barr-virus-ebv/>. Accessed February 1, 2020.
12. Shannon-Lowe C, Rowe M. Epstein Barr virus entry; Kissing and conjugation. *Curr Opin Virol*. 2014;4:78-84. doi:10.1016/j.coviro.2013.12.001.
13. Hammerschmidt W. The epigenetic life cycle of epstein–barr virus. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol 390. Springer Verlag; 2015:103-117. doi:10.1007/978-3-319-22822-8_6.
14. Young LS, Arrand JR, Murray PG. *EBV Gene Expression and Regulation*. Cambridge University Press; 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21348114>. Accessed February 1, 2020.
15. Thorley-Lawson DA, Hawkins JB, Tracy SI, Shapiro M. The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Curr Opin Virol*. 2013;3(3):227-232.

doi:10.1016/j.coviro.2013.04.005.

16. Young LS, Dawson CW, Eliopoulos AG. The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *J Clin Pathol - Mol Pathol*. 2000;53(5):238-247. doi:10.1136/mp.53.5.238.
17. Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene*. 2001;20(44 REV. ISS. 5):6482-6491. doi:10.1038/sj.onc.1204788.
18. LMP1 - Latent membrane protein 1 - Epstein-Barr virus (strain B95-8) (HHV-4) - LMP1 gene & protein. <https://www.uniprot.org/uniprot/P03230>. Accessed January 28, 2020.
19. Hislop AD. ScienceDirect Early virological and immunological events in Epstein – Barr virus infection. (Im).
20. Ning S. Innate immune modulation in EBV infection. *Herpesviridae*. 2011;2(1):1. doi:10.1186/2042-4280-2-1.
21. Evans AS, Gutensohn NM. A population based case control study of EBV and other viral antibodies among persons with Hodgkin’s disease and their siblings. *Int J Cancer*. 1984;34(2):149-157. doi:10.1002/ijc.2910340203.
22. Rowe M, Zuo J. Immune responses to Epstein-Barr virus: molecular interactions in the virus evasion of CD8+ T cell immunity. *Microbes Infect*. 2010;12(3):173-181. doi:10.1016/j.micinf.2009.12.001.
23. Rensing ME, Gram AM, Gram AM, Hooykaas MJG, Piersma SJ, Wiertz EJHJ. Immune evasion by Epstein-Barr virus. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol 391. Springer Verlag; 2015:355-381. doi:10.1007/978-3-319-22834-1_12.
24. Cohen JI. Review Article: Epstein-Barr Virus Infection. *N Engl J Med*. 2000.
25. Bennett NJ, Physician S, Domachowske J, Rothschild BM, Northeastern T. Mononucleosis and Epstein-Barr Virus Infection. 2008.
26. Grotto I, Mimouni D, Huerta M, et al. Clinical and laboratory presentation of EBV positive infectious mononucleosis in young adults. *Epidemiol Infect*. 2003;131(1):683-689. doi:10.1017/S0950268803008550.
27. How You Know You Have Mononucleosis | Everyday Health. <https://www.everydayhealth.com/mononucleosis/symptoms/>. Accessed February 1, 2020.
28. Infectious Mononucleosis - Infections - MSD Manual Consumer Version. <https://www.msdmanuals.com/home/infections/herpesvirus-infections/infectious-mononucleosis>. Accessed February 1, 2020.
29. Linfadenopatia cervical: o que é, causas e origem. <https://linfadenopatia.com/linfadenopatia-cervical>. Accessed February 1, 2020.
30. Mono: Causes, Symptoms, and Diagnosis. <https://www.healthline.com/health/mononucleosis#symptoms>. Accessed February 1, 2020.
31. Seitanidis B. *A Comparison of the Monospot with the Paul-Bunnell Test in Infectious Mononucleosis and Other Diseases*. Vol 22.; 1969.
32. Infectious Mononucleosis Test using Latex Agglutination.

- <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DR0780M>. Accessed January 18, 2020.
33. Ji MF, Wang DK, Yu YL, et al. Sustained elevation of Epstein-Barr virus antibody levels preceding clinical onset of nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer*. 2007;96(4):623-630. doi:10.1038/sj.bjc.6603609.
 34. De Paschale M. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J Virol*. 2012;1(1):31. doi:10.5501/wjv.v1.i1.31.
 35. Epstein Barr Virus - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/epstein-barr-virus>. Accessed February 1, 2020.
 36. Chan KH, Ng MH, Seto WH, Peiris JSM. Epstein-Barr Virus (EBV) DNA in sera of patients with primary EBV infection. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):4152-4154. doi:10.1128/JCM.39.11.4152-4154;2001.
 37. Epstein-barr | Mononucleosis | Laboratory Testing | Mono | CDC. <https://www.cdc.gov/epstein-barr/laboratory-testing.html>. Accessed January 25, 2020.
 38. Pagano JS, Whitehurst CB, Andrei G. Antiviral drugs for EBV. *Cancers (Basel)*. 2018;10(6). doi:10.3390/cancers10060197.
 39. Aciclovir: Bula original, extraída manualmente da Anvisa | CR. <https://consultaremedios.com.br/aciclovir/bula>. Accessed January 27, 2020.
 40. Andrei G, Trompet E, Snoek R. Novel Therapeutics for Epstein-Barr Virus. *MDPI*. 2019.
 41. Karcheva M, Gecheva S, Slavcheva V, Veleva G. Infectious Mononucleosis–Diagnostic. *J IMAB*. 2008;1:9-13.
 42. Luzuriaga K, L. Sullivan J. Clinical practice: Infectious Mononucleosis. *N Engl J Med*. 2010.
 43. Guillain-Barré syndrome - Symptoms and causes - Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/guillain-barre-syndrome/symptoms-causes/syc-20362793>. Accessed January 18, 2020.
 44. Lymphohistiocytosis (Hemophagocytic Lymphohistiocytosis): Background, Pathophysiology, Epidemiology. <https://emedicine.medscape.com/article/986458-overview>. Accessed February 1, 2020.
 45. Linfocitose hemofagocítica (LHF) - Hematologia e oncologia - Manuais MSD edição para profissionais. <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/hematologia-e-oncologia/síndromes-histiocíticas/linfocitose-hemofagocítica-lhf>. Accessed February 1, 2020.
 46. Epstein-Barr Virus Case Study | Immunopaedia. <https://www.immunopaedia.org.za/clinical-cases/infectious-diseases/an-unusual-cause-of-fulminant-hepatitis/>. Accessed February 3, 2020.
 47. Síndrome linfoproliferativa ligada ao cromossomo X - Doenças imunológicas - Manual MSD Versão Saúde para a Família. <https://www.msmanuals.com/pt/casa/doenças-imunológicas/doenças-decorrentes-de-imunodeficiência/síndrome-linfoproliferativa-ligada-ao-cromossomo-x>. Accessed January 31, 2020.

48. Raab-Traub N. *EBV-Induced Oncogenesis.*; 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21348113>. Accessed January 27, 2020.
49. Raab-Traub N. Novel mechanisms of EBV-induced oncogenesis. *Curr Opin Virol.* 2012;2(4):453-458. doi:10.1016/j.coviro.2012.07.001.
50. Macedo AV de, Rocha MO da C. Infecção pelo vírus Epstein-Barr e oncogénese. *Rev Med Minas Gerais.* 13(4):262-272.
51. Control U for IC. Nasopharyngeal Carcinoma: Review of Cancer Medicines on the WHO List of Essential Medicines. 2014.
52. Sousa H, Pinto-Correia AL, Medeiros R, Dinis-Ribeiro M. Epstein-Barr virus is associated with gastric carcinoma: The question is what is the significance? *World J Gastroenterol.* 2008;14(27):4347-4351. doi:10.3748/wjg.14.4347.
53. Pereira De Lima MA, Valéria M, Ferreira P, et al. *Detecção Do Vírus Epstein-Barr (EBV) Em Adenocarcinomas Gástricos Procedentes Dos Estados Do Ceará e de São Paulo Epstein-Barr Virus (EBV) Detection in Gastric Carcinomas from Ceará and São Paulo States, in Brazil.*; 2011.
54. What Is Hodgkin Lymphoma? - American Cancer Society. <https://www.cancer.org/cancer/hodgkin-lymphoma/about/what-is-hodgkin-disease.html>. Published 2018. Accessed March 2, 2020.
55. Dias EP, Spyrides KS, Silva Júnior AS, Rocha ML, da Fonseca EC. Oral hairy leukoplakia: histopathologic features of subclinical stage. *Pesqui Odontol Bras.* 2001;15(2):104-111. doi:10.1590/S1517-74912001000200005.