

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



TERAPÊUTICA DA INFEÇÃO POR HIV / RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Ana Maira Semedo Cassamá

Relatório de estágio/Monografia orientado pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo
Pereira

Mestrado em Análises Clínicas

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



TERAPÊUTICA DA INFEÇÃO POR HIV / RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Ana Maira Semedo Cassamá

Relatório de estágio/Monografia orientado pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo
Pereira

Mestrado em Análises Clínicas

2019

Quando se tem um objetivo na vida é preciso ter foco, determinação e força para nunca desistir.

As dificuldades passam, as lutas sempre existirão, mas a vitória é certa para aqueles que não desistem!

Helenice Cunha

Resumo

O trabalho final do Mestrado em Análises Clínicas está dividido em duas partes. A primeira diz respeito ao Relatório do Estágio e a segunda parte relata a Terapêutica da Infecção por HIV.

O estágio teve lugar em dois hospitais do Centro Hospitalar de Lisboa Central (CHLC): O Hospital São José e o Hospital Dona Estefânia. Durante o mesmo, passei por diversas valências do Serviço de Patologia Clínica: Hematologia, Bioquímica, Imunologia, Microbiologia, por um período total de 6 meses. O relatório descreve as principais técnicas praticadas, os parâmetros estudados e os equipamentos utilizados em cada secção.

Relativamente à segunda parte do trabalho final, a monografia em Terapêutica da Infecção por HIV descreve com clareza os fármacos existentes, classificados em 5 categorias distintas que podem fazer parte dos regimes de tratamento nos pacientes infetados com o HIV/SIDA, dando a conhecer os seus benefícios e os potenciais efeitos colaterais.

Atualmente a SIDA ainda é considerada uma doença crónica, no relatório encontra-se narrada as potenciais novas direções do tratamento associado ao desenvolvimento de novos medicamentos, de modo a tornar o tratamento mais simplificado, eficaz e menos tóxico ao paciente. Concomitantemente a esses estudos, estão em desenvolvimento abordagens/estratégias para a cura do HIV/SIDA.

Palavras chave: Hematologia, Bioquímica, Microbiologia, Imunologia, HIV.

Abstract

The final work of master's degree in clinical analysis is divided into two parts. The first relates to the internship report and the second one reports HIV infection therapy.

The internship took place in two hospitals of the Central Hospital of Lisbon (CHLC): São José Hospital and Dona Estefânia Hospital. During the same, I went through several valences of the Clinical Pathology service: Hematology, Biochemistry, Immunology and microbiology, for a total period of 6 months. The report describes the main techniques that were practiced, the parameters studied, and the equipment used in each section.

In relation to the second part of the final work, the monograph in HIV infection therapy clearly describes the existing drugs, classified into 5 distinct categories that may be part of treatment regimens in HIV-infected patients/AIDS, making known its benefits and potential side effects. Currently AIDS is still considered a chronic disease, in the report is narrated the new directions of treatment associated with the development of new medicines, in order to make treatment more simplified, effective and less toxic to Patient. Concomitantly with these studies, approaches/strategies for the Cure of HIV/AIDS are being developed.

Key words: Hematology, Biochemistry, Microbiology, Immunology, HIV

Agradecimentos

Deixo aqui expressos a minha gratidão ao Dr. Carlos Flores, por me ter concedido a oportunidade de realizar o estágio nos Hospitais São José e Dona Estefânia de Lisboa; aos meus orientadores, Dr. José Azevedo Pereira e Dra. Maria do Céu Santos, por todo o apoio, atenção, exigência, disponibilidade e paciência que não faltou durante todo o percurso; assim como todas as pessoas das seções dos Serviços de Patologia Clínica.

Um especial obrigado ao Dr. Henrique de Oliveira, do Departamento de Cirurgia, à Dra. Margarida Guimarães, dos Serviços de Hematologia, e à Técnica Maria José Bacson, pelo incansável apoio que me deram ao longo do estágio.

Agradeço também à toda a minha família e aos amigos que me acompanharam durante este percurso.

Para terminar, dedico este trabalho à minha mãe batalhadora, por todo o apoio, atenção, carinho, paciência, motivação e por estar sempre presente em todas as fases da minha vida. Agradeço-te mãe, Angelina Semedo por sempre acreditar em mim!

Índices

Resumo.....	1
Abstract	2
Agradecimentos	3
Índices	5
Abreviaturas	9
Instalações do laboratório do Centro Hospitalar de Lisboa Central Hospital São José e Hospital Dona Estefânia.....	15
I. HEMATOLOGIA.....	16
I.1 Introdução	16
I.2 Parâmetros.....	16
I.2.1 Hemograma.....	16
I.2.2 Leucograma	20
I.2.3 Plaquetograma	24
I.2.4 Hemóstase.....	25
I.3 Métodos	29
I.3.1 Esfregaço de sangue.....	29
I.3.2 Coloração May Grunwald – Giemsa	29
I.3.3 Gota Espessa - Giemsa	30
I.3.4 Teste Malária Pf/Pan Ag 4 Espécies	30
I.4 Equipamentos.....	31
I.4.1 Beckman Coulter® LH 750 E 780 Analyzer.....	31
I.4.2 Aerospray Hematology®	32
I.4.3 Microscópio Óptico	32
I.4.4 Ves - Matic Cube 30®	33
I.4.5 ACL TOP 700®	33
II. BIOQUÍMICA.....	34
II.1 Introdução	34
II.2 Parâmetros	34
II.2.1 Exame Sumário de urina.....	34
II.2.2 Líquidos Orgânicos	50
II.3 Equipamentos.....	53
II.3.1 Família Architect.....	53
II.3.2 iRICELL	54
III. Imunologia.....	55

III.1 Introdução	55
III.1.1 Sistema Imunitário Inato	55
III.1.2 Sistema Imunitário Adaptativo ou Adquirido.....	56
III.1.3 Autoimunidade.....	58
III.2 Parâmetros	60
III.2.1 Anti-DNA.....	61
III.2.2 Anti-histona	61
III.2.3 Anti-nRNP/Sm.....	62
III.2.4 Anti-Sm	62
III.2.5 Anti-SS/A (Ro).....	63
III.2.6 Anti-SS/B (La).....	64
III.2.7 Anti-PCNA.....	64
III.2.8 Anti-A/PRib.....	65
III.2.9 Anti-Nucleossoma	65
III.3 Métodos	66
III.3.1 Pesquisa de Anticorpos Antinucleares – ANA	66
III.3.2 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática - ELISA	67
III.3.3 Imunoblot	67
III.3.4 Imunofenotipagem celular por citometria de fluxo	68
III.3.4 Carbono - RPR.....	69
III.3.5 Ensaio de hemaglutinação <i>Treponema pallidum</i> - TPHA	70
III.3.6 Rosa de Bengala	70
III.3.7 Imunodifusão Radial - IDR	70
III.4 Equipamentos.....	71
III.4.1 BD FACS Canto II®	71
III.4.2 Capillarys Sebia 2®	71
III.4.3 Hydrasys Focusing®	72
III.4.4 Dade Behring Nefelómetro BN II®	72
III.4.5 Triturus®	73
III.4.6 Architect i2000®	73
IV. Microbiologia	74
IV.1 Introdução.....	74
IV.2 Parâmetros.....	74
IV.2.1 Hemocultura	74
IV.2.2 Líquido cefalorraquidiano - LCR.....	75

IV.2.3 Urina Assética.....	76
IV.2.4 Exsudado vaginal e uretral	77
IV.2.5 Expetoração	78
IV.2.6 Fezes.....	79
IV.2.7 Líquido Pleural.....	80
IV.2.8 Líquido Ascítico ou Peritoneal.....	81
IV.2.9 Líquido Sinovial	81
IV.2.10 Exsudado purulento	82
IV.3 Métodos	83
IV.3.1 Técnica de Coloração de Gram	83
IV.3.2 Coloração de Ziehl – Neelsen.....	84
IV.3.3 Exame Cultural	84
IV.3.4 Antibiograma.....	85
IV.4 Equipamentos	86
IV.4.1 BacT/ ALERT	86
IV.4.2 PREVI® Isola.....	87
IV.4.3 MINI Vidas®	87
IV.4.4 VITEK® 2	88
IV.4.5 VITEK® MS	88
V. Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ).....	89
V.1 Fase Pré - Analítica	89
V.2 Fase Analítica	90
V.3 Fase Pós-analítica	91
TERAPÊUTICA DA INFEÇÃO POR HI	
I. Introdução	94
I.1 História	94
I.2 Classificação e Diversidade.....	94
I.3 Estrutura.....	95
I.4 Transmissão	98
II. Ciclo de Replicação	98
II.1 Ligação.....	99
II.2 Entrada	99
II.3 Transcrição reversa	99
II.4 Integração.....	100
II.5 Transcrição	100

II.6 Tradução e Montagem	101
II.7 Libertação e Maturação	101
III. Sinais e Sintomas	102
IV. Diagnóstico	102
IV.1 Problemas no Diagnóstico da Infecção pelo HIV	105
V. Terapêutica.....	106
V.1 Classes de Fármacos para a Terapêutica Antirretroviral	108
V.2 Terapêutica Antirretroviral	114
V.3 Efeitos Colaterais do Tratamento da Infecção pelo HIV/SIDA.....	119
V.4 Dificuldade no Tratamento	121
VI. Prevenção e Profilaxia	123
VI.1 Profilaxia Pré-exposição Oral	124
VI.2 Profilaxia Pós-exposição Oral	126
VII. Novos Medicamentos e Novo Tratamento	127
VII.1 Novos Medicamentos	127
VII.2 Futuras direções de tratamento do HIV.....	128
VIII. Possibilidade da cura	129
VIII.1 Cura da erradicação	130
VIII.2 Cura funcional	130
VIII.3 Cura Híbrida	131
IX. Conclusão	132
Referências Bibliográficas	133

Abreviaturas

ACO - Anticoagulante Oral

AEQ - Avaliação Externa de Qualidade

ALT - Alanina Aminotransferase

ANA - Anticorpos Antinucleares

A-PRib - Proteínas-P ribossomais

ART - Terapia Antirretroviral

ARV - Antirretroviral

AST - Aspartato Aminotransferase

APTT - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

BHI - Brain Heart Infusion

bNAbs - Anticorpos Monoclonais Amplamente Neutralizantes

BRD4 - Domínio-Bromo que contém 4 proteínas

CA - Proteína da Cápside

cART - Terapia Antirretroviral Combinada

cDNA - Ácido Desoxirribonucleico Complementar

CID - Coagulação Intravascular Disseminada

CHGM - Concentração Hemoglobínica Globular Média

CHLC – Centro Hospitalar de Lisboa Central

CMI - Concentração Mínima Inibitória

CMIA – Método Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência

CO₂ - Dióxido de Carbono

CQE - Controlo de Qualidade Externo

CQI - Controlo de Qualidade Interno

DC-SIGN - Dendritic cell specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin

DMTC - Doença Mista do Tecido Conjuntivo

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dsDNA – Ácido Desoxirribonucleico de cadeia dupla
EC - Eletroforese Capilar
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EFV - Efavirenze
EIA - Imunoensaio Enzimático
EIAV - Vírus da Anemia Infeciosa Equina
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EP - Embolismo Pulmonar
FDA - Food and Drug Administration
FITC - Isotionato de Fluoresceína
FTC – Emtricitabina
GGT - Gama Glutamil Transferase
gp41 - Glicoproteínas Transmembranares
gp120 - Glicoproteínas da Superfície
GV - Eritrócitos ou Glóbulos Vermelhos
HAART - Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
Hb – Concentração de Hemoglobina
HDACi - Inibidores da Histona Desacetilase
HGM - Hemoglobina Globular Média
HIV – Vírus de Imunodeficiência Humana
Ht – Hematócrito
IDR - Imunodifusão Radial
IE - Inibidores de entrada
IFI - Imunofluorescência Indireta
IN – Integrase
INIs - Inibidores da Integrase
INNRT – Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa
INR - Razões Internacionais Normalizadas

IPs - Inibidores da Protease
ISI - Índice Internacional de Sensibilidade
LB - linfócitos B
LCR - Líquido Cefalorraquidiano
LDH - Desidrogenase Láctica
LES - Lúpus Eritematoso Sistêmico
LMC - leucemia mieloide crônica
LRAs - Agentes de Reversão de Latência
LT - linfócitos T
LTh – Linfócitos T auxiliar
MA - Proteínas da Matriz
MAC - Complexo de Ataque a Membrana
MALDI-TOF - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight
MAS - Agar de Chapman
MBL - Lectinas Ligadas a Manose
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
MPI - Percentagem Máxima de Inibição
mRNA - Ácido Ribonucleico mensageiro
NAAT - Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos
NAMs - Mutações Associadas a Nucleósidos / Nucleótidos
NC - Nucleocápside
Nef - Fator Regulador Negativo
NFAT - Fator nuclear de células T ativadas
NF-κB - Fator Nuclear *Kappa B*
NK - *Natural Killer*
NRTIs - Nucleosídeos Inibidores da Transcriptase Reversa
O₂ - Oxigênio
OMS - Organização Mundial de Saúde

PCNA - Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PEP - Profilaxia Pós-exposição
pH - *Hydrogen ion concentration*
PICs - Complexos de Pré-integração
PKC - Protein kinase C
PR - Protease
PrEP - Profilaxia Pré-exposição
Pt - Plaquetas
PT - Proteína Total
PTT - Purpura Trombocitopenia Trombótica
PVX - Gelose de Chocolate Polivitex
RDW - Red Cell Distribution Width
Rev - Regulador de *Splicing* de RNA
RNA - Ácido Ribonucleico
RNP – Ribonucleoproteínas
RPR - Carbono
RTCs - Complexos de Transcrição Reversa
RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa
SC - Sistema Complemento
SGQ - Sistema de Gestão de Qualidade
SI - Sistema Imunitário
SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIV - Vírus da Imunodeficiência Símia
Sm - antígeno Smith
SMAC – Agar de Sorbitol MacConkey
SN - Sistema Nervoso
SNC - Sistema Nervoso Central

SS-A - Substância Solúvel A
SS-B - Substância Solúvel B
ssRNA – cadeia simples de Ácido Ribonucleico
STRs - *Short Tandem Repeat*
TAM - Mutações Análogas da Timidina
Tat - Proteína Transativadora
TDF - Tenofovir
TEV - Tromboembolismo Venoso
TEP - Tromboembolismo Pulmonar
TMA - *Transcription-Mediated Amplification*
TP - Tempo de Protrombina
TPHA - Ensaio de Hemaglutinação *Treponema pallidum*
TR - Transcriptase Reversa
tRNA – Ácido Ribonucleico de transferência
TSA - Teste de Sensibilidade aos Antibióticos
TSH - Hormônio Estimulante da Tireoide
TT - Tempo de Trombina
TVP - Trombose Venosa Profunda
T3 - Tri-iodotironina
T4 - Tetra-iodotironina
VCS - Volume, Condutividade, Dispersão
VDRL - *Venereal Disease Research Laboratory*
VGM - Volume Globular Médio
Vif - Fator de Infetividade Viral
VMV - Visna Maedi Vírus
Vpr - Proteína Viral r
Vpu - Proteína Viral Única
Vpx - Proteína Viral x

VS - Velocidade de Sedimentação
WBC – Células brancas/Leucócitos
YER – Agar de *Yersinia*

Instalações do laboratório do Centro Hospitalar de Lisboa Central Hospital São José e Hospital Dona Estefânia

O Centro Hospitalar de Lisboa Central (CHLC) foi criado em 28 de fevereiro de 2007 e sendo constituído pelos seguintes hospitais: Hospital de São José, Hospital de Santo António dos Capuchos, Hospital de Santa Marta e Hospital de Dona Estefânia. Em fevereiro de 2012 deu-se a integração de mais dois hospitais, Hospital de Curry Cabral e da Maternidade Dr. Alfredo da Costa. Os laboratórios do Centro Hospitalar de Lisboa Central eram à data, da responsabilidade da Diretora Dra. Rosa Barros, sendo atualmente da responsabilidade do Dr. Carlos Fores. Estes laboratórios comportam várias valências tais como: Hematologia, Bioquímica, Imunologia, Microbiologia e Biologia Molecular.

O meu estágio curricular, realizado no âmbito da frequência do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, decorreu nos laboratórios do Hospital de São José e do Hospital de Dona Estefânia. Todos estes laboratórios dispõem de modernos equipamentos automatizados integrados, onde são realizados exames pelos técnicos de análises clínicas e patologistas. A temperatura de estabilização destes equipamentos geralmente é controlada.

é um ambiente de trabalho onde o uso do papel é eliminado ou substancialmente reduzido. Isso é feito através da conversão de documentos e outros papéis para o formato digital.

O Serviço recorre ao uso de paperless, que consiste na eliminação/redução de uso de papel através da conversão de documentos para formato digital denominada CliniData. Este programa é visto como uma ferramenta de trabalho indispensável para um desempenho laboratorial com uma elevada qualidade. Através deste programa, consegue-se monitorizar todas as etapas dos exames laboratoriais dos utentes, permitindo a organização e o controlo do fluxo de trabalho no sentido de minimizar gastos desnecessários por duplicação de pedidos e atrasos no tempo de resposta.

No sentido de garantir a qualidade dos resultados, são utilizados controlos de qualidade internos e externos.

I. HEMATOLOGIA

I.1 Introdução

A palavra hematologia vem de *Greek haima* (significa sangue), assim sendo, o estudo de hematologia é a ciência, ou estudo de sangue.

A secção de Hematologia engloba o estudo de células do sangue e coagulação. Os estudos feitos incluem análises de concentração, estrutura e função da célula no sangue. Também se estuda os seus precursores na medula óssea, constituintes químicos do plasma ou soro intimamente ligados às estruturas de células sanguíneas e por fim a função das plaquetas e proteínas envolvidos na coagulação sanguínea (1).

I.2 Parâmetros

I.2.1 Hemograma

O hemograma é o exame que avalia quantitativamente e qualitativamente os elementos celulares do sangue. É o exame complementar mais requerido nas consultas e faz parte de todas revisões de saúde [2].

Os parâmetros do hemograma e análise das plaquetas são analisadas no equipamento Beckman Coulter e a confirmação faz-se pelo exame microscópico.

Eritrócitos ou Glóbulos Vermelhos - GV

Os eritrócitos/glóbulos vermelhos (GV) são um dos elementos figurados do sangue com grande importância, do ponto de vista clínico. A massa de GV circulantes é responsável pelo transporte de oxigénio. A produção de energia é feita pelas trocas gasosas (O_2 e CO_2) que garantem atividades do organismo humano (1).

Os GV possuem cerca de $7\mu m$ a $8\mu m$ de diâmetro e têm a forma de disco bicôncavo. Devido a esta forma, no esfregaço de sangue periférico exibem os contornos mais coradas e o centro bem mais claro, e têm cerca de 120 dias de vida (1).

Na análise de hemograma, os GV são contados e se os valores aumentarem ou diminuírem, podem indicar-nos possíveis patologias hematológicas. Esta classificação é baseada em valores de

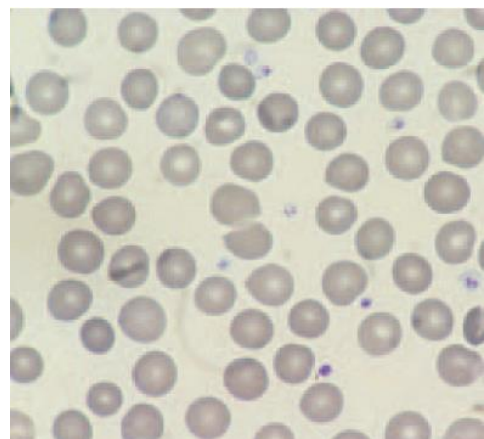


Figura1 – Morfologia normal de GV e algumas plaquetas normais no sangue periférico.

referência, sendo que, para homem os resultados variam entre $5.0 \pm 0.5 \times 10^{12}/L$ e para mulher, entre $4.3 \pm 0.5 \times 10^{12}/L$ (2).

O aumento de GV é denominado de eritrocitose, quando acompanhado de aumento de hemoglobina e hematócrito, é chamado de policitemia *vera*, conhecida como uma das neoplasias mieloproliferativas. A eritrocitose, pode ser provocada pelo aumento da eritropoiese, ou secundária a uma redução do volume plasmático.

A diminuição dos GV tem como consequência a anemia (3).

Para além da alteração da concentração eritrocitária, em certas patologias pode-se encontrar formas diferentes de GV denominados esferócitos, eliptócitos, ovalócitos, dracócitos, equinócitos, acantócitos, queratócitos, estomatócitos, drepanócitos.

Por vezes, não há predomínio de nenhum dos tipos de GV, nesses casos dá-se o nome de poiquilocitose (4).

Concentração de Hemoglobina – Hb

A hemoglobina (Hb) é uma proteína que integra os eritrócitos e é constituída por 4 moléculas heme, 4 globinas e um ião ferro. As principais funções são a absorção, o transporte e a libertação do oxigénio nos tecidos. A Hb que se encontra nos GV desempenha uma função muito importante no transporte de O_2 do ar inspirado através dos pulmões para os tecidos e do CO_2 recolhido dos capilares teciduais para o ar expirado através dos pulmões (1).

Este parâmetro é um marcador muito importante, pois é um indicador de anemia, em caso de concentrações baixas. Para esta avaliação, considera-se os seguintes valores de referência: para homem, a variação é de $150 \pm 20g/L$ e para mulher, de $135 \pm 15g/L$ (2).

Algumas doenças são caracterizadas pela existência de baixa concentração de Hb nos eritrócitos, tais como, anemia ferropénica, talassemia, drepanocitose entre outros (3).

Hematócrito – Ht

O hematócrito (Ht) é a percentagem de volume ocupada pelos GV contida numa certa quantidade de sangue total (5).

Este parâmetro tem significado clínico, juntamente com o valor de GV e Hb, pois ajuda-nos a esclarecer se estamos perante casos verdadeiros de anemia ou não, e na análise das causas possíveis, e juntamente com a viscosidade sanguínea também auxilia na avaliação das alterações de volemia (5).

A avaliação da concentração é baseada nos seguintes valores de referência: para homem, o intervalo é de $0.45 \pm 0.05 L/L$ e para mulher, o intervalo é de $0.41 \pm 0.05 L/L$ (2).

Algumas situações fisiológicas podem levar a falsos resultados, como é o caso de hemoconcentração, que resulta num falso aumento de hematócrito, e hemodiluição que leva a uma falsa diminuição do hematócrito (5).

Volume Globular Médio – VGM

O volume globular médio (VGM) corresponde ao tamanho médio da célula e permite-nos visualizar numericamente se este tamanho é normal, maior ou menor.

Para esta avaliação, consideram-se os valores de referência.

Estes não diferem com o sexo, os valores variam entre 92 ± 9 fL, sendo na infância a fase da vida em que há maior variação.

Os glóbulos vermelhos que se encontram dentro desses valores são chamados normocíticos. Se o valor for (VGM < 83



Figura 3 – GV macrocíticos presentes no sangue periférico em pacientes com doença hepática.

fL), os glóbulos vermelhos são denominados de microcíticos e se o volume for maior (VGM > 101 fL) estes são classificados como glóbulos macrocíticos (5) (2).

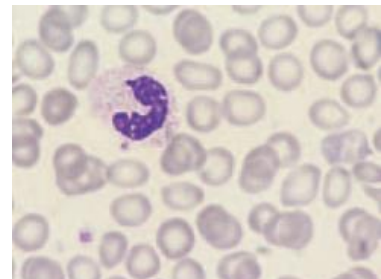


Figura 2 – GV microcíticos presentes no sangue periférico em pacientes com β talassemia.

Algumas situações podem levar a falsos resultados como é o caso de crioaglutinação, má conservação de sangue *in vitro*, excesso de EDTA, em relação ao volume de sangue

colhido e a hiperosmolaridade do sangue (5).

O VGM é obtido pela divisão do hematócrito (Ht) multiplicado por 10 e o total é dividido pelo número de eritrócitos presentes nesse volume de sangue. A representação desta fórmula é a seguinte:

$$\text{VGM (fL)} = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{Eritrócitos}}$$

Hemoglobina Globular Média – HGM

A hemoglobina globular média (HGM) expressa a quantidade média de hemoglobina que existe por eritrócito. O valor da HGM é diretamente proporcional ao VGM, isto é, quando os GV são macrocíticos, a quantidade de hemoglobina normalmente também será maior e vice-versa (5). A classificação é baseada nos valores de referência indicados e não apresenta diferenças entre os géneros (29.5 ± 2.5 pg). Ao aumento de concentração de HGM (HGM > 32pg) dá-se o nome de hiper Cromia e a sua diminuição (HCM < 27pg) chama-se hipocromia (2) (5).

O cálculo deste parâmetro é obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{HGM (pg)} = \frac{\text{Hemoglobina} \times 10}{\text{Eritrócitos}}$$

Concentração Hemoglobínica Globular Média – CHGM

A concentração hemoglobínica globular média é a relação entre os valores de hemoglobina presente num certo volume de sangue e o volume globular (hematócrito), sendo expressa em percentagem (%).

Os resultados são obtidos por cálculo matemático. Os valores de CHGM, por norma, variam, entre 31% e 36%. Se o resultado obtido estiver dentro desses valores, é considerada uma situação normocrômica. Se a CHGM for > 36%, os glóbulos vermelhos serão denominados hiperocrômicas, que ocorre na

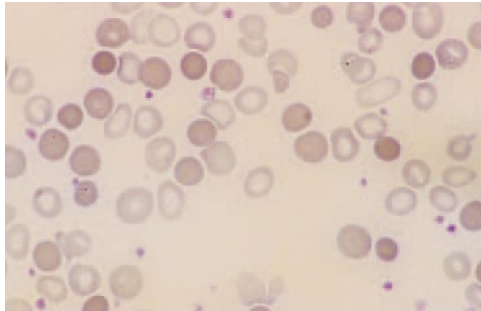


Figura 5 – Hiperocrômia de alguns GV em paciente com anemia de deficiência de ferro, que recebeu transfusão de sangue tardio.

esferocitose e por vezes no coma hiperosmolar, devido a perda de água nos eritrócitos; também pode ocorrer nas

hemoglobinopatias. O caso oposto ao anterior (CHGM < 31%) é designado por hipocromia, que ocorre na anemia ferropénica (2)(5).

As causas mais comuns de falsos resultados são a presença de crioaglutininas, erros na dosagem de Hb e na determinação do VGM e hemólise.

A fórmula para o cálculo do CHGM é a seguinte:

$$\text{CHGM (\%)} = \frac{\text{Hemoglobina}}{\text{Hematócrito}} \times 100$$

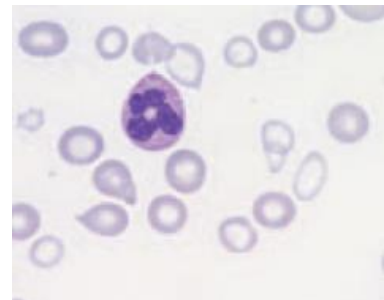


Figura 4 – Hipocromia das GVs em pacientes com anemia por deficiência de ferro. Também mostra anisocromia dos GVs.

Anisocitose – RDW (Red Cell Distribution Width)

A anisocitose (*Red Cell Distribution Width* - RDW) indica a variação de volume eritrocitário. Este índice é muito importante na análise da diversidade de volume dos eritrócitos, e pode ter grande significado clínico.

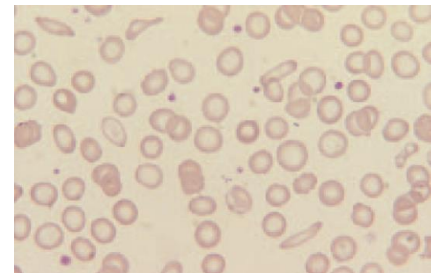


Figura 6 – paciente com deficiência de ferro com anisocitose acompanhada com poiquilocitose, hipocromia e microcitose.

Os valores de referência do RDW situam-se entre 11.5 e 14.5 %. Se este valor for inferior a 11.5% indica que são populações mais homogêneas, e resultados maiores de 14.5% indicam a existência de heterogeneidade volumétrica da população eritroide. Este último caso, também conhecido como anisocitose pode ser confirmado ao microscópio, podendo ter anisocitose mais ou menos acentuada, consoante a gravidade da doença (5).

O parâmetro RDW é fundamental no diagnóstico diferencial entre as anemias por deficiência de ferro e as anemias por deficiência de síntese da hemoglobina. Na doença talassemia, pode-se encontrar uma população homogênea microcítica devido a anomalia genética da síntese da globina. Nesses casos, normalmente o RDW é baixo (5).

Reticulócitos

Os reticulócitos possuem um diâmetro um pouco maior que o dos glóbulos vermelhos, (8µm), não dispõem de núcleo, e têm citoplasma acidófilo. Os reticulócitos encontram-se no sangue, representando uma proporção de entre 0.5 e 2.5% do total dos eritrócitos, e são células precursoras dos eritrócitos recém-lançadas na circulação sanguínea. São produzidos na medula óssea, de onde passam para a corrente sanguínea e coram de azul acinzentado, e a sua presença traduz-se no esfregaço de sangue periférico, por policromatofilia (5)(3).

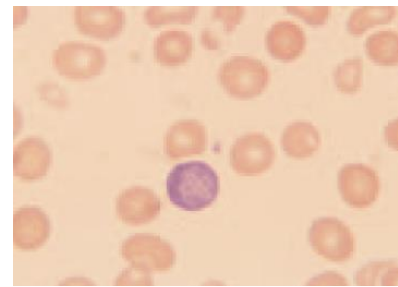


Figura 7 – Presença de reticulócito no sangue periférico., também ilustra poiquilocitose.

A contagem dos reticulócitos tem uma importância clínica significativa, pois pode diferenciar entre anemias regenerativas ou arregenerativas, por conseguinte, fornece-nos a informação do funcionamento da médula óssea (5).

Quando o valor destes é < 0.5%, esta situação é designada de reticulocitopenia, e, se for > 2.5%, esta situação é denominada reticulocitose (policromatofilia).

I.2.2 Leucograma

Glóbulos brancos/Leucócitos – WBC

Os leucócitos/glóbulos brancos (*White Blood Cell* – WBC) são glóbulos brancos que fazem parte do sistema imunitário do organismo. Têm, portanto, como função o combate e a eliminação dos microrganismos e estruturas químicas estranhas ao organismo, por meio de captura ou da produção de anticorpos.

No sangue periférico normal, estas células são divididas em duas classes, os WBC mononucleares e polimorfonucleares. Fazem parte dos WBC mononucleares os monócitos e os linfócitos. Geralmente as células desta categoria não contêm grânulos, mas em certas situações podem apresenta-los, sendo que nos monócitos são mais impercetíveis em

comparação aos linfócitos. Os WBC polimorfonucleares também são conhecidos como granulócitos polimorfonucleares, por todos apresentarem grânulos e núcleos lobulados. Neste grupo encontram-se três WBC distintos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos (4).

A contagem e a verificação de WBC anormais podem indicar certos estados de doença. São denominadas, leucocitose ou leucopénia, respetivamente as situações em que há aumento ou diminuição dos elementos, tendo em conta o intervalo de referência de $4.0-10.0 \times 10^9/L$ (5)(2). Algumas situações pré-analíticas podem levar a resultados incorretos como aglutinação de neutrófilos, aglutinação linfocítica, presença de agregados plaquetários, crioglobulinas, presença de eritroblastos, eritrócitos resistentes à lise pelo solvente (5). Leucocitose e leucopénia, isoladamente não são suficientes para interpretação. Por isso, há necessidade da fórmula leucocitária.

Os analisadores hematológicos, nomeadamente o da Coulter Beckman distinguem os 5 diferentes WBC (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos), com um bom grau de exatidão.

Neutrófilos

Os neutrófilos correspondem à linhagem mieloide. O maduro/segmentado tem de diâmetro 12-15 μm . O citoplasma é acidófilo e com fina granulação, e os núcleos têm entre dois a cinco lóbulos distintos, com cromatina agregada (4). Contudo, podem-se observar formas anormais em muitas patologias.

A contagem e observação dos neutrófilos é um dos parâmetros imprescindíveis no leucograma. A sua variação, tanto numérica, como morfológica, pode dar-nos informações de algumas doenças. Com base nos valores de referência $2.0 - 7.0 \times 10^9/L$ (40-80%), podemos estar perante situações de neutrofilia ou neutropénia, isto é, aumento ou diminuição do valor absoluto dos neutrófilos no sangue periférico, respetivamente e devem ser confirmadas ao microscópio (2). Neutrofilia pode fazer-se presente em algumas situações patológicas tais como: doenças infecciosas, doenças inflamatórias ou proliferativas.

Certas patologias como leucemia de *hairy cell*, lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatoide com esplenomegalia, entre outras podem causar neutropenia (5).

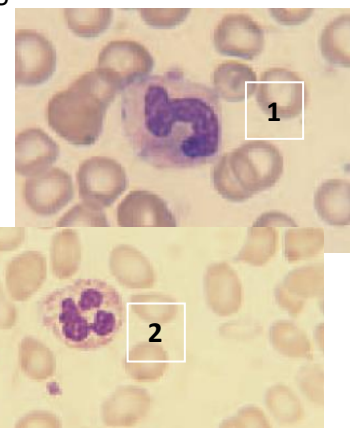


Figura 8 – Neutrófilo em banda (1) e neutrófilo com três lóbulos (2).

Eosinófilos

Os eosinófilos são células mieloides que seguem o mesmo caminho de desenvolvimento que os neutrófilos, com diâmetro entre 12 a 17 μm . Estas células têm o núcleo bilobulado e por vezes trilobulado, com grânulos secundários grandes, de cor vermelha alaranjada (4). Formas anormais podem se fazer presentes em muitas patologias.

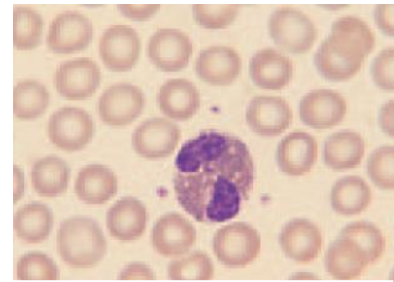


Figura 9 – Eosinófilo normal no sangue periférico.

A concentração do eosinófilo no sangue periférico é muito baixa, com valores de referência dentro do intervalo de $0.02-0.5 \times 10^9/\text{L}$ (1-6 %). Quando o aumento do valor absoluto de eosinófilos ultrapassa o limite de referência denomina-se eosinofilia e deve ser confirmado microscopicamente. A eosinofilia não tem significado clínico (2).

Ocorre eosinofilia em casos de infecções por parasitas, com *nematódeos* intestinais e teciduais, *cestódeos* intestinais e teciduais e *trematódeos* intestinais e teciduais (Fascíola hepática). Além dos parasitas, existem outras causas de eosinofilia, como as doenças alérgicas e da pele [asma, rinite alérgica, urticária, eczema, dermatite granulomatosa com eosinofilia (Doença de Well) e fascite eosinofílica (Doença de Schulman)], radioterapia, síndrome hipereosinofílica, eosinofilias em leucemias, entre outros (5).

Basófilos

Os basófilos são células granulocíticas de diâmetro compreendido entre 10 a 14 μm , de núcleo normalmente bilobulado, e o citoplasma carregado de grânulos roxos. Nestas células geralmente a granulação distribui-se por toda a célula (4)(6). Porém, pode-se se observar formas anormais em certas patologias.

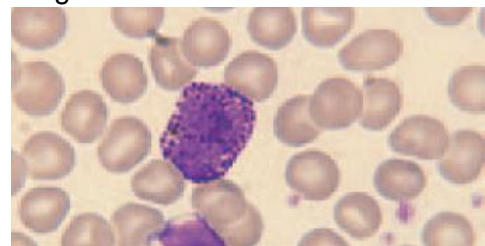


Figura 10 – Basófilo normal no sangue periférico.

O basófilo é o menos comum dos WBC no sangue periférico, tendo as concentrações de $0.02-0.1 \times 10^9/\text{L}$ (<1-2%) como valores de referência (2).

Na contagem deste leucócito, se ocorrer aumento do valor absoluto, a situação é denominada basofilia e exige a confirmação microscópica. Pode ser identificada em casos de reações de hipersensibilidade aguda, que acontece, às vezes, durante uma infecção viral, também pode ser associada a leucemia mieloide crônica (LMC). A basopénia não tem significado clínico (5).

Linfócitos

Os linfócitos são células mononucleadas de tamanho variável, é o segundo tipo de WBC mais abundante encontrado no sangue periférico. Estas células estão divididas em três principais linfócitos: linfócitos T, linfócitos B e linfócitos *Natural Killer* (NK). Em maior percentagem na corrente sanguínea encontram-se os linfócitos T, seguindo-se os B e NK, respetivamente (5)(6).

Numa observação ao microscópio, é possível notar vários tipos de linfócitos: linfócitos pequenos (típicos), ativados, granulares e grandes linfócitos. Os linfócitos ativados e os plasmócitos (células plasmáticas) apresentam-se em situações de respostas imunológicas, essencialmente nas infeções virais. Por esta razão, a contagem e a morfologia são muito importantes na interpretação dos resultados, pois podem fornecer informações que auxiliam na validação dos resultados (5). Além dessas formas, em certas patologias pode-se formar anormais.

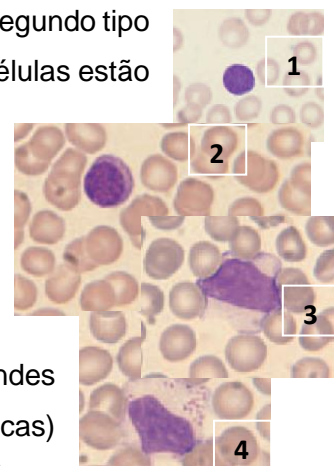


Figura 11 – Linfócitos pequenos (1), linfócito ativado (2), grandes linfócitos (3), grande linfócito granular (4).

Após a contagem, se o valor absoluto deste leucócito for maior ou menor do que o normal, as situações designam-se linfocitose e linfopenia, respetivamente, sabendo que o intervalo de referência está compreendido entre $1.0-3.0 \times 10^9/L$ (20-40 %) (2).

Em pessoas de raça negra a fórmula leucocitária pode estar invertida, ou seja, ter maior percentagem de linfócitos do que neutrófilos, esta alteração é inerente a esta raça.

Apontam-se como algumas causas de linfocitose as seguintes situações: esplenectomia, descarga de adrenalina, numerosas causas virais, resposta imunológica, e linfocitose clonal nas neoplasias linfoides.

Por outro lado, também algumas situações podem provocar linfopenia, como doenças inflamatórias, patologias infecciosas graves, radioterapia, tratamento das drogas imunossupressoras, doença de Hodgkin, lúpus eritematoso sistémico, vírus de imunodeficiência humana (HIV), entre outros (5).

Monócitos

Os monócitos comparativamente a todas as WBC, é a maior célula no sangue periférico normal, de diâmetro compreendido entre 12 a 20 μm , de núcleo irregular, por vezes apresenta-se lobulado e tem citoplasma azul-acinzentado que contém grânulos finos azurófilos (4). Todavia, em certas patologias pode-se observar formas anormais.

Os monócitos circulam brevemente na corrente sanguínea, e exercem suas funções nos tecidos, onde se localizam, duradouramente, como macrófagos fixos.

Na contagem leucocitária considera-se o seguinte intervalo de referência, $0.2-1.0 \times 10^9/L$. Quando há aumento de monócitos, a condição é chamada monocitose, e quando se verifica o contrário, o fenômeno é denominado monocitopenia (2).

A monocitose acompanha a neutrofilia nos processos inflamatórios. Verifica-se monocitose em patologias como, brucelose, infarto do miocárdio, depressão. Geralmente as crianças com menos de 2 anos de idade defendem-se das

infecções com a monocitose precoce. A monocitopénia normalmente é uma condição incomum, mas observa-se na anemia aplásica e na leucemia *hairy cell* (5).

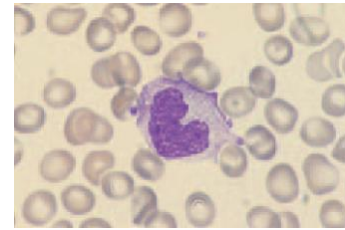


Figura 12 – Monócito normal no sangue periférico observado ao microscópio óptico.

I.2.3 Plaquetograma

Plaquetas – Pt

As plaquetas (Pt) são fragmentos pequenos presentes na corrente sanguínea, derivados de megacariócitos. Em média, têm 1.5-3 μm de diâmetro, embora possam ser maiores em certas condições. Estes fragmentos contêm grânulos azurófilos que podem estar distribuídos por todo o citoplasma ou agrupados no centro e não apresentam núcleo (4).

As principais funções das Pts são adesão e ativação, com mudança de forma e posterior agregação, que leva à formação do coágulo primário do mecanismo de coagulação. A coagulação é o processo que evita a perda de sangue (hemorragia) num vaso sanguíneo danificado e que ajuda a reparar o tecido afetado.

O analisador hematológico conta e mede as Pts, no mesmo canal onde se dá a contagem de eritrócitos, diferenciando-as por limites de volume. Para a contagem considera-se o seguinte intervalo de referência, $130 \pm 280 \times 10^9/L$.

Se a contagem das Pts for maior que o limite de intervalo de referência a situação é denominada de trombocitose, se ocorrer o contrário a condição fisiológica é chamada de trombocitopenia (2).

Trombocitose é o aumento de Pts na corrente sanguínea, considerada uma manifestação reacional, em que isoladamente não indica uma doença hematológica. Porém, algumas

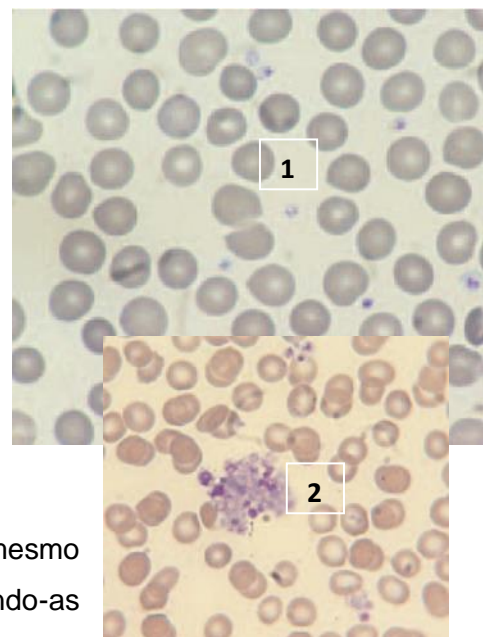


Figura 13 – Plaquetas normais (1) e agregado plaquetário.

situações patológicas podem ser acompanhadas de trombocitose, como anemia ferropénica, doenças inflamatórias crónicas, infeções e neoplasias mieloproliferativas, entre outras (5).

Trombocitopenia é uma condição onde se regista diminuição das Pts nos vasos sanguíneos. Este fenómeno é relativamente frequente e tem significado clínico. Em situações que a trombocitopenia não é explícita, esta não deve ser validada pelo laboratório antes de uma observação microscópica para analisar a existência ou não de agregados, e também recomenda-se fazer o exame de aspiração de sangue com ajuda de uma fina pipeta de *Pasteur* para averiguar possível existência de coágulo na amostra. Em último caso, deve-se solicitar uma nova colheita em situações de presença de coágulo ou agregação *in vitro* (5).

Esta manifestação pode ser observada em algumas situações, como nas grandes hemorragias tratadas com transfusões, infeções virais febris, mononucleose, púrpura trombocitopenia trombótica (PTT), síndrome hemolítico-urémico, doenças da medula óssea, nas doenças infecciosas graves, entre outras (5).

Existem certas situações que podem dar resultados falsos, como aspiração lenta do sangue ou quando a colheita é traumática. Nestes casos, as Pts sofrem agregação e desgranulação resultando na pseudotrombocitopenia. A demora na mistura com o EDTA da amostra, por falta ou atraso na agitação apropriada, ativa a coagulação e pode causar trombocitopenia.

I.2.4 Hemóstase

Tempo de Protrombina – TP

O Tempo de protrombina (TP) é provavelmente o teste de coagulação mais amplamente solicitado. O TP é um teste de triagem que avalia a via extrínseca e comum da coagulação, e monitoriza a Terapêutica Anticoagulante Oral (ACO). O kit utilizado *Recombiplastin 2G* analisa a integridade dos fatores, II, V, VII, X e fibrinogénio. O TP é mais sensível à deficiência do fator VII e tem menor sensibilidade aos fatores da via comum e à deficiência de fibrinogénio (7)(8).

Este teste é feito com um reagente de elevada sensibilidade, cujo nome é tromboplastina. A tromboplastina reconstitui-se com fator recombinante de tecido humano, numa mistura de fosfolípido sintético, composto por cloreto de cálcio, tampão e um conservante. Este reagente de elevada sensibilidade deteta défices de fator X, VII, V e II. O método do ensaio é baseado no princípio do aparelho ACL TOP 700 (8). Mas, normalmente faz-se a reconstituição do reagente, antes de se começar o teste.

Para avaliar o tempo de coagulação, o intervalo de referência está compreendido entre 9.1 à 12.1s (8). Pode-se verificar TP prolongado nas mais diversificadas situações, como nas doenças hereditárias, especialmente do fator VII ou doenças adquiridas, como deficiência de vitamina K, doença hepática, coagulação intravascular disseminada, administração de

fármacos, trauma ou cirurgia (7) (9). A presença de anticoagulantes lúpicos podem afetar o TP em alguns casos.

Se o TP for prolongado deve fazer-se o teste de mistura (*pool* de plasma normal com plasma de amostra em teste) para saber, se o prolongamento do tempo se deve a déficit de fatores ou presença de inibidores. Ao fazer-se o teste de mistura, se ocorrer correção do TP, indica que o problema era devido ao déficit de fatores, assim sendo, deve-se fazer os respetivos estudos, analisando inicialmente o fator VII e posteriormente os restantes. Se não ocorrer a correção do TP, o resulta indica que o problema deve-se à presença de inibidores e estes devem ser pesquisados (7).

Com foco a padronização mundial, a Organização Mundial de Saúde (OMS) desenvolveu uma ideia com base no Índice Internacional de Sensibilidade (ISI) do reagente de tromboplastina para criar Razões Internacionais Normalizadas (INR).

Apesar do ISI fornecer correções significativas nos resultados do TP entre os sistemas de análise que recorrem a combinações de tromboplastina/coagulómetro, frequentemente ainda se verifica diferença persistente do INR entre resultados com sistemas de análise diferentes. Portanto, a calibração do ISI no sistema local é imprescindível (10).

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada – APTT

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT) é um teste de triagem que analisa a via intrínseca e comum do processo de coagulação e a monitorização de pacientes em tratamento com heparina. O exame de APTT identifica a deficiência de fatores XII, XI, X, IX, VIII, V, II, fibrinogénio. Alguns reagentes de APTT permitem o rastreio do anticoagulante lúpico. A sensibilidade deste teste, varia consoante o fator, pode ter mais sensibilidade aos fatores VIII e IX do que os fatores XI, XII e os restantes que participam na via comum (7)(11).

O reagente APTT *synthasil* usado no Serviço de Patologia Clínica do CHLC é um reagente fosfolipídico sintético para determinar *in vitro* APTT em plasma humano citratado. O APTT *synthasil* é sensível à diminuição de concentração de fatores da via intrínseca e comum da cascata de coagulação, aos efeitos anticoagulantes da heparina e à existência de inibidores, tais como, o anticoagulante lúpico (11).

O teste passa pela adição do reagente fosfolipídico, um ativador e um tampão. Durante a incubação desencadeia-se a ativação da cascata de coagulação da via intrínseca. A seguir a a incubação de 37 °C, o cloreto de cálcio que é adicionado provoca o mecanismo de coagulação, e de seguida, mede-se o tempo necessário para a formação do coágulo. Os valores de referência do tempo de formação do coágulo estão compreendidos entre 25,4 e 38,4s (11).

As situações com altos níveis de fator VIII na corrente sanguínea podem encurtar o APTT.

Um APTT prolongado pode indicar déficit de fator XII, XI, X, IX, VIII, V, II ou fibrinogénio, presença de heparina, anticoagulante lúpico ou outros inibidores, como alguns inibidores diretos da trombina (12).

Nestes casos deve-se fazer o teste mistura de 1:1 (junção de *pool* plasma normal com plasma da amostra em teste), para identificar se há deficiência de fatores ou presença de inibidores. Assim sendo, se houver correção do APTT do plasma de amostra em teste para o plasma da mistura, este resultado indica deficiência de fator, caso contrário, indicaria presença de inibidor, nomeadamente anticoagulante lúpico ou inibidor transitório inespecífico associado a infecção / inflamação (7).

Fibrinogénio

Fibrinogénio ou fator I é um fator que participa na cascata de coagulação, também conhecido como fator I. A atividade do fibrinogénio ocorre quase na fase final da cascata, onde a protrombina é convertida em trombina, e este por sua vez, induz a conversão do fibrinogénio em fibrina, formando o coágulo.

O teste de Fibrinogénio-C é um exame utilizado para quantificar o fibrinogénio em plasma humano citratado nos sistemas de coagulação.

Para a realização do teste, o kit de *Fibrinogen-C* utiliza uma abundante quantidade de trombina, que resulta na clivagem de fibrinogénio formando fibrina no plasma diluído. Num ambiente rico em trombina e pobre em fibrinogénio, a velocidade de reação será curta, enquanto que, num ambiente com elevada concentração de trombina e fibrinogénio, a velocidade de reação será mais longa, com isso, pode-se dizer que a concentração do fibrinogénio é diretamente proporcional à velocidade da reação [13].

Na interpretação dos resultados obtidos pelo equipamento ACL TOP® Family recorre-se aos valores de referência compreendidos entre 238 - 498 mg/dL [13].

Casos de concentrações altas do fibrinogénio podem ser observados em mulheres grávidas, indivíduos que administram anticoncepcionais orais ou em pessoas com potencial risco de desenvolver patologias cardiovasculares, etc. Níveis baixos de fibrinogénio podem ocorrer no tratamento trombolítico [13].

O fibrinogénio também é utilizado para monitorizar diversas patologias, como a coagulação intravascular disseminada, as disfunções hepáticas e os quadros inflamatórios e neoplasias malignas [13].

Tempo de Trombina – TT

Tempo de Trombina (TT) determina o tempo de coagulação do plasma humano citratado no sistema de coagulação. Este exame, basicamente avalia a conversão de fibrinogénio (fator I) em fibrina, na presença de trombina [7] [14].

No processo da cascata de coagulação, nas últimas fases, depois da ativação da protrombina pelo fator Xa, a protrombina é convertida em trombina, A trombina por sua vez, cliva o fibrinogénio em fibrina, resultando na formação de coágulo com a participação de alguns fatores de coagulação V, VIII e XIII.

A determinação da concentração de fibrinogénio ou fator I, baseia-se no princípio desenvolvido pelo Clauss. O princípio consiste na adição em excesso da concentração de trombina no plasma previamente diluído, posteriormente determina-se o tempo de coagulação. Neste caso, o tempo da formação do coágulo é inversamente proporcional a concentração do fator I [14].

A concentração é determinada através da comparação entre a concentração do fator I presentes nas amostras plasmáticas do paciente com a curva de referência previamente padronizada. Os valores de referência deste parâmetro estão compreendidos entre 200 - 393 mg/dL [14].

O TT prolongada pode encontrar-se em situações, com terapia com heparina, déficit congénito, hipofibrinogenemia, disfibrinogenemia, hipoalbuminemia, paraproteinemia. Enquanto que, a diminuição do TT pode se fazer presente nos casos de hiperfibrinogenemia [4].

D-Dímero

Como o nome indica, o teste de D-Dímero é para quantificar a concentração do D-Dímero. Para efetuar o teste, adiciona-se partículas de látex com o fragmento F(ab) que provem de um anticorpo monoclonal altamente específico contra o domínio D-Dímero presente nos derivados solúveis da fibrina. Quando se dá o cruzamento do plasma rico em D-Dímero com o reagente látex e tampão de reação, resulta na aglutinação das partículas. Através da aglutinação obtém-se a concentração de D-Dímero, pois o grau de aglutinação é diretamente proporcional à concentração de D-Dímero presente no plasma (13).

Só é possível quantificar o D-Dímero quando a plasmina digere a rede de fibrina. Mas, se a plasmina estiver na presença de inibidores, a enzima perde a capacidade das suas funções. O teste de D-Dímero ajuda na exclusão de tromboembolismo venoso (TEV) em pacientes em ambulatório com indícios de trombose venosa profunda (TVP), tromboembolismo pulmonar (TEP), embolismo pulmonar (EP) ou coagulação intravascular disseminada (CID). Para interpretar os resultados, recorre-se aos valores de referência. Um resultado de D-Dímero

negativo, juntamente com uma análise clínica de baixa probabilidade pré-teste, indica ter um valor preditivo negativo elevado para TVP e EP (7)(13).

I.3 Métodos

I.3.1 Esfregaço de sangue

O esfregaço de sangue periférico deve ser preparado com amostra de sangue fresca, normalmente contendo anticoagulante EDTA.

Para dar início ao processo, as lâminas devem estar limpas para evitar esfregaço/manchas irregulares. Coloca-se uma gota de sangue a uma distância de 1cm a partir de uma das extremidades. A seguir, com a ajuda de uma lamela, em ângulo de 30° à 45°, desliza em movimento contínuo, de forma a obter uma fina camada de células sanguíneas sobre uma lâmina de vidro, para o exame microscópico (2).

Em casos de sangue anémico, a espessura correta é conseguida através de um ângulo maior, sendo que o ângulo deve ser mais estreito, para o sangue policitémico.

A espessura do esfregaço de sangue ideal é obtida quando os eritrócitos se encontram sobrepostos na maior parte do comprimento da lâmina, mas na extremidade final da lâmina, se encontrem todos separados e os WBC são facilmente reconhecidos ao longo da maior parte da lâmina. Numa lâmina mal-executada os WBC serão distribuídos de forma desigual, com monócitos e outros WBC grandes arrastados até ao final das franjas do esfregaço. As lâminas devem ser deixadas a secar ao ar. Em condições de humidade, podem ser expostas à corrente de ar quente, desde que sejam tomadas as devidas precauções (2).

I.3.2 Coloração May Grunwald – Giemsa

A coloração May Grunwald – Giemsa é o método usado para a coloração de células de sangue periférico ou da medula óssea, bem como, para o estudo citológico de elementos celulares. Esta coloração é executada nos esfregaços de sangue periférico, de forma a que os constituintes celulares (linhagens eritrocítica, leucocítica e plaquetária) sejam visíveis ao microscópio óptico (2).

Para executar a coloração, primeiramente faz-se o esfregaço de sangue e deixa-se secar, de seguida, mergulha-se em metanol (agente fixante), presente na solução de May-Grunwald (solução metanólica de eosina e azul metileno), durante um período de tempo de 5 a 10 minutos. Transferem-se, a seguir, as lâminas para uma tina de coloração que contenha solução May – Grunwald, com um volume igual ao do tampão durante 15 minutos. Após esse tempo, lavam-se as lâminas com a água. De seguida, adiciona-se o corante de Giemsa diluído. É preciso lavar rapidamente em três ou quatro mudanças de água, de seguida, as lâminas deixam-se a repousar em água sem agitações, entre 2 a 5 minutos. Após esta etapa,

elas são transferidas a partir de uma solução de coloração para a outra sem se deixarem secar. Quando a diferenciação estiver completa, as lâminas ficam em posição vertical para secar (2).

I.3.3 Gota Espessa - Giemsa

Este teste é efetuado para analisar e contar parasitas, como os da malária.

O processo tem lugar da seguinte forma, coloca-se um a gota grande no centro da lâmina, espalha-se de uma forma circular com um diâmetro de cerca de 15 mm, para criar uma camada muito mais espessa do que o esfregaço de sangue periférico, aumentando a concentração podendo encontrar as parasitas muito mais facilmente e em menos tempo deixa-se secar e depois é colocada numa solução de Giemsa diluído com água destilada, a seguir passa-se por água para arrastar os glóbulos lisados e não fixados. Isto permite facilitar o reconhecimento das parasitas (4).

I.3.4 Teste Malária Pf/Pan Ag 4 Espécies

A malária é uma doença parasitária grave e, por vezes, fatal, caracterizada por febre, calafrios e anemia.

O teste rápido Malária Pf/Pan Ag4 espécies é um teste cromatográfico de fluxo lateral. Compõe-se de:

1. Uma membrana de cor avermelhada, contendo um anticorpo de rato anti Phrp-II, conjugado com ouro coloidal, um anticorpo de rato anti Pldh, conjugada com ouro coloidal, e de IgY de galinha, conjugado com ouro coloidal;
2. uma membrana de nitrocelulose, que contém duas linhas de teste (Pan e Pf) e uma linha de controlo C.

A linha Pan é sensível a todas as quatro espécies *de plasmodium*. Por outro lado, a linha Pf é revestida, com o objetivo de detetar uma infeção pelo *P. falciparum*.

Para a realização do teste, deposita-se no orifício da cassete destinado para o efeito a amostra em estudo e de seguida adiciona-se uma solução diluente. A solução contém um reagente que lisa os glóbulos vermelhos e liberta vários antígenos de *plasmodium*. Se o pfHRP-II está presente na amostra, este ligar-se-á ao conjugado na membrana pelos anticorpos anti-pfHRP-II que a cobrem, formando uma linha avermelhada e indicando um resultado positivo para *plasmodium*. A ausência da linha Pf não exclui ausência de qualquer uma das outras três espécies de *plasmodium*. A ausência de ambas as linhas de teste (Pan e Pf) sugere um resultado negativo. O teste contém, também, um controlo interno, que deverá apresentar uma linha avermelhada de complexo imunitário IgY de galinha-ouro, independentemente do

surgimento ou não das linhas de teste. Se não for assim, o teste será inválido e a amostra deverá ser novamente testada com um novo dispositivo de teste (14).

I.4 Equipamentos

I.4.1 Beckman Coulter® LH 750 E 780 Analyzer

Os Coulter LH 750 e 780® são analisadores automáticos hematológicos.

As contagens das populações celulares baseiam-se na passagem de células sanguíneas em suspensão por um orifício através da corrente elétrica. Durante esta passagem, é provocada uma alteração de impedância, cuja magnitude é diretamente proporcional ao tamanho da célula que passa através do orifício, ou seja, por outras palavras as células podem ser contadas e dimensionadas a partir dos impulsos elétricos que elas geram. Este princípio é chamado de princípio da contagem de impedância (4).

O número de células contadas por amostra é aproximadamente 100 vezes maior do que a que, habitualmente, se verifica na contagem de microscópio. Este método permite-nos a contagem de eritrócitos, WBC e Pts, também fornece contagem de reticulócitos e eritroblastos.

Também faz a diferenciação de WBC. Para a diferenciação de WBC, a Coulter estabeleceu uma tecnologia diferencial “VCS”, (4) usando três medidas: Volume de célula individual, condutividade de alta frequência e dispersão de luz *laser*.

Na análise de volume, utiliza-se uma corrente de baixa frequência. Através da condutividade, conhece-se os componentes celulares, desde constituintes nucleares e granulares até à composição química da célula. A dispersão de luz *laser* fornece informação sobre o tamanho e a granularidade.

O contador Beckman Coulter LH 780®, também conta os eritrócitos e WBC nos fluidos corporais.

Estes analisadores, enviam os resultados, de forma automática, para o sistema informático que de acordo com critérios pré-estabelecidos valida as amostras normais alerta para as que possuem alterações. Depois desta fase, as amostras com alterações são avaliadas, de forma a determinar uma eventual patologia (15).

Por último, a concentração de hemoglobina é medida com ajuda do reagente lítio, que destrói os eritrócitos e converte uma proporção substancial da hemoglobina num pigmento estável. Depois é lido num comprimento de onda específico. A concentração deste pigmento é diretamente proporcional à absorvância. Este método chama-se hemoglobinometria (15).

I.4.2 Aerospray Hematology®

Aerospray Hematology® é um aparelho de coloração de esfregaço de sangue. É considerado semi - automático, pois, para obter amostra de esfregaço de sangue corada é necessário, em primeiro lugar, fazer-se manualmente o esfregaço e secá-lo à temperatura ambiente, de seguida colocar a lâmina no aparelho para corar (16).

Ao longo deste processo, utilizam-se 4 reagentes, entre os quais, dois corantes (tesina e eosina), um fixador (metanol) e água para lavar o excesso de corante e detritos. Durante o estágio, utilizei sempre a coloração de May-Grunwald Giemsa, na qual são usadas tanto a solução concentrada como a diluída, para produzir uma coloração mais longa e extensiva. Os tempos do ciclo variam entre 6 e 10 minutos (16).

A realização de um ciclo de coloração, tendo definidas as devidas programações, processa-se da seguinte forma: primeiro, colocam-se as lâminas no aparelho e, seguidamente, pressiona-se *run* para iniciar o processo de coloração. Assim, o processo é iniciado com a fixação das células na lâmina pelo metanol. Seguidamente, os outros reagentes - tesina, eosina e água - são aplicados.

Após aplicação dos três reagentes, o carrossel aumenta a velocidade, de modo a eliminar o excesso do corante e secar as lâminas. Durante a rotação em alta velocidade, ocorre a pulverização do metanol para limpar as linhas formadas e eliminar os detritos. Quando o ciclo de coloração termina, o sinal de alarme é emitido (16).

I.4.3 Microscópio Óptico

O microscópio óptico é um instrumento que tem como função ampliar imagens de estruturas muito pequenas, devido ao seu grande poder de resolução. Este aparelho é utilizado em diversas áreas como hematologia, bioquímica, microbiologia, etc. Na área de hematologia utiliza-se para análise de componentes sanguíneos, tais como, eritrócitos, WBC e plaquetas. A uso de microscópio óptico ocorre da seguinte forma, inicia-se com a objetiva de (10X) sobre o esfregaço de sangue com óleo de imersão espalhado com ajuda de uma vareta de vidro. De seguida, eleva-se a platina (prato) com o parafuso macrométrico e ajusta-se (foca-se) a imagem do esfregaço num ponto visível na ocular. Quando a iluminação é insuficiente, ajusta-se a luminosidade com o condensador. A seguir, recorre-se ao revólver para passar para a objetiva de (40X). Ajusta-se e o movimento tem de ser minucioso até que se consiga focar a imagem, também se recorre ao parafuso micrométrico. Normalmente, neste *zoom*, conseguem-se identificar melhor as estruturas presentes (2).

Contudo, em alguns casos, onde se efetua a análise morfológica ou contagem diferencial leucocitária, e na pesquisa de espécies de *plasmodium* é necessário recorrer à última objetiva de (100X). Nesta situação, o procedimento é igual aos outros e, antes de elevar a platina onde

se encontra o esfregaço à última objetiva, adiciona-se uma gota de óleo de imersão, com a intenção de melhorar a qualidade da imagem. Para evitar danos nas objetivas anteriores (10X e 40X), deve-se limpar o óleo de imersão após a utilização (2).

A análise morfológica no microscópio nas situações indicadas pelos contadores automáticos, são responsáveis pela interpretação e coerência da avaliação, de forma a serem emitidos resultados mais fidedignos.

I.4.4 Ves - Matic Cube 30®

O teste da velocidade de sedimentação (VS) dos eritrócitos é o teste que avalia a rapidez processo de VS num intervalo de tempo de uma hora. Este exame é feito em tubos que contém anticoagulante EDTA no S-Monovette®. Os tubos são colocados no VES-MATIC Cube 30® em posição vertical e são submetidos a uma rotação que acelera a velocidade de sedimentação (33 minutos). O resultado obtido é convertido automaticamente no resultado em uma hora. O princípio de funcionamento, de acordo com o método de Westergren, está alargado em 3 fases: agregação, sedimentação e empacotamento. Esta análise é executada sem consumo de amostra ou reagentes, nem produção de resíduos (17).

O valor da velocidade de sedimentação depende dos componentes existentes no plasma e do volume celular. Relativamente ao intervalo de referência, para as mulheres, é de < 20 mm/h, para os homens, é < 10 mm/h e, para os recém-nascidos, < 2 mm/h.

Em situações de anemia, verifica-se um valor elevado da VS, pois, neste caso concreto, o volume dos eritrócitos, isto é, do hematócrito (Ht), encontra-se diminuído. Por outro lado, nos casos em que o valor do hematócrito está elevado, o valor da VS aumenta. Estas alterações são possíveis de verificar em casos como policitemia vera.

I.4.5 ACL TOP 700®

ACL TOP 700® é um aparelho que pertence à ACL TOP® FAMILY. Trata-se de uma linha completa de sistemas de testes hemostáticos. Este contador tem um sistema de operação contínua, com acesso às amostras, reagentes e cuvetes em posições pré-definidas.

O aparelho ACL TOP 700® recorre ao uso do princípio das alterações da transmissão da luz por turbidimetria, provocadas pela formação do coágulo (coagulometria) ou pela reação antigénio/anticorpo (imunoturbidimetria), cuja função é detetar o coágulo e, ao mesmo tempo, realizar a medição e o registo do tempo necessário para a formação do coágulo. Para proceder à medição do tempo de coagulação, é preciso medir a mudança da densidade ótica. A conversão do fibrinogénio em fibrina dá origem a formação do coágulo que é detetado a partir da luz que atravessa o meio. Parte desta luz é absorvida pelas cadeias de fibrina, e a restante luz transmitida é detetada pelo fotodetector. A absorção da luz aumenta à medida que

a formação do coágulo de fibrina progride. Por conseguinte, a transmitância da luz através da amostra diminui continuamente e é medida pelo fotodetector. O sinal elétrico que sai do fotodetector muda de acordo com a luz detetada. A saída do sinal é processada através de um software que determina o ponto de coágulo (18)(19).

O aparelho ACL TOP®, embora com menos frequência, também utiliza o princípio da imunoturbidimetria e cromogénico.

II. BIOQUÍMICA

II.1 Introdução

A função da bioquímica é fornecer informações bioquímicas que auxiliem no diagnóstico de patologias.

No departamento da bioquímica clínica, para efetuar muitos exames analíticos, recorre-se a amostras de sangue e de urina pela relativa facilidade em obter essas amostras. Estes são alguns marcadores que podem ser determinados nessas amostras: AST, ALT, GGT, T₃, T₄, TSH, glucose, entre outros. Além dessas amostras, também podem ser analisados alguns fluidos corporais, tais como: líquido ascítico, líquido sinovial, líquido pleural e líquido cefalorraquidiano.

O conjunto dos resultados obtidos podem apoiar no diagnóstico, ajudar na monitorização do tratamento e no prognóstico do doente. Podem ainda ser adotado em ensaios clínicos de novos medicamentos (20)(21).

II.2 Parâmetros

II.2.1 Exame Sumário de urina

O exame de urina fornece dados muito importantes sobre o funcionamento do rim e do trato urinário, proporcionando informação acerca de patologias renais e a etiologia que causou a disfunção. Esta amostra, por ser fácil de colher, ter baixo custo e fornecer tanta informação, é utilizada nos exames de rotina.

A urina deve ser colhida num frasco fornecido pelo laboratório ou adquirido na farmácia, de preferência a primeira emissão da manhã, pois é altura em que todas as substâncias presentes se encontram mais concentradas (22).

A amostra deve ser entregue de imediato no laboratório e geralmente conservada por método de refrigeração em caso do teste não ser imediato. É aconselhável examinar a urina dentro de duas horas após a colheita, para evitar falsos resultados (23).

II.2.1.1 Parâmetros físicos

Inicialmente, a análise da urina começa com avaliação das propriedades físicas, nomeadamente o aspeto, a densidade e a cor.

Aspeto

Por norma, a urina é límpida. Contudo, certos alimentos, medicamentos, produtos metabólicos e infeções podem causar cores anormais e turvação na urina. Ela pode tornar-se turva, em função da precipitação de cristais de fosfatos amorfos em urina alcalina ou de cristais de uratos amorfos em urina ácida. Os cristais de fosfatos amorfos são um precipitado branco que dissolvem em meios ácidos, enquanto que os uratos amorfos são pigmentos urinários de cor rosa que são dissolvidos em amostra aquecida (24).

Na presença de uma urina ácida com aspeto de névoa branca, rosada ou alaranjada pode ser sugestivo da presença de cristais de ácido úrico e de uratos.

Na presença de WBC, bactérias ou células epiteliais, espermatozoides ou líquido prostático a urina pode apresentar-se turva. A confirmação de tais elementos deve ser realizada em exame microscópico do sedimento. A presença de bactérias pode ser explicada por uma infeção, a amostra ter sido mantida à temperatura ambiente ou a sua colheita ter sido realizada de forma incorreta. A urina também pode ter aspeto turvo na presença de muco e eritrócitos e aspeto leitoso, límpido ou opaco na presença de linfa. Em situações de presença de lípidos e contaminantes oleosos na urina, estes podem flutuar à superfície da urina (24).

Densidade

A densidade correlaciona-se com a osmolaridade da urina e fornece informação importante sobre o estado de hidratação do paciente. Este teste também mostra a capacidade de concentração e diluição dos rins. Os valores de referência da densidade estão compreendidos entre 1.003 e 1.030. Um valor inferior a 1.010 indica hidratação relativa, um valor maior que 1.020 indica desidratação relativa. O aumento da densidade está associado a glicosúria e à síndrome de hormona antidiurética, e a sua diminuição está associada ao uso de diuréticos, diabetes insípida, insuficiência adrenal, hipoaldosteronismo e comprometimento da função renal. A densidade urinária em pacientes com doença renal de etiologia renal é de 1.010 (23).

Cor

A urina tem normalmente uma cor amarelada derivada do pigmento urocromo. Indivíduos saudáveis podem gerar urina amarela clara ou escura. A cor da urina fornece-nos informação do grau de hidratação e concentração da urina.

Em certas condições fisiológicas pode-se produzir urina de tonalidade avermelhada, como em situações de contaminação menstrual, porfiria eritropoética e porfiria cutânea; urina castanha amarelada ou castanha esverdeada está relacionada com a presença de bilirrubina na urina e encontra-se em situações de icterícia obstrutiva severa; urina vermelha alaranjada ou castanha alaranjada encontra-se presente em condições de elevada concentração de urobilinogénio na urina; urina castanha escura ou negra pode ser verificada na presença de ácido homogentísico e melanina (24)(23).

II.2.1.2 Parâmetros químicos

Hydrogen ion concentration - pH

O pH da urina pode variar entre 4,5 e 8, mas normalmente é ligeiramente ácido (isto é, os valores estão compreendidos entre 5,5 a 6,5) devido à atividade metabólica. Ingestão de proteínas e frutas ácidas pode resultar em urina ácida, e dietas ricas em citrato, como frutas e vegetais cítricas, podem causar urina alcalina (23).

O pH da urina geralmente reflete o pH sérico, exceto em pacientes com acidose tubular renal. A determinação do pH da urina pode ser útil no diagnóstico e monitorização de infeção do trato urinário e cálculos no trato urinário. A urina alcalina, detetada por fitas reagentes, pode apontar para a existência de infeção no trato urinário e cálculos de ácido úrico estão associados a urina ácida (23).

Leucócitos - WBC

Os WBC podem ser detetados em quantidades pequenas em urinas normais. Mas em situações de aumento de concentração ao ponto de sofrerem agregação entre eles dá-se o nome de piúria. Tendo em conta os diferentes tipos de WBC, os neutrófilos são os mais abundantes.

A esterase de WBC é produzida por neutrófilos e pode sinalizar piúria associada a infeções do trato urinário. Para detetar piúrias significativas com precisão, devem ser permitidos cinco minutos para o reagente da tira reativa mudar de cor (23). Metodologicamente, na tira reativa as esterases neutrofílicas catalisam a hidrólise de ésteres que resulta na síntese dos respetivos ácidos e álcoois. No caso de Multistix recorre-se a éster de 3-hidroxi-5-fenilpirrolN-tosil-L-alanina que irá reagir na presença da esterase leucocitária, dando origem ao álcool pirrol. Este, por sua vez, irá reagir com o sal diazónio, resultando numa cor púrpura. A intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade da enzima, que, por sua vez, também é diretamente proporcional ao número de neutrófilos presentes na urina (24).

Para obter resultados mais fidedignos deve recorrer-se a amostras frescas, não centrifugadas, homogeneizadas e à temperatura ambiente.

Organismos como *Chlamydia trachomatis* e *Ureaplasma urealyticum* devem ser considerados em pacientes com piúria e culturas negativas. Outras causas de piúria estéril incluem balanite, uretrite, tuberculose, tumores de bexiga, infecções virais, nefrolitíase, corpo estranho, exercício, glomerulonefrite e uso de corticosteróides e ciclofosfamida (Cytosan) (23).

Nitritos

Os nitritos normalmente não são encontrados na urina, mas resultam da redução dos nitratos urinários em nitritos através das enzimas redutase produzidas pelas bactérias. Muitos organismos gram-negativos e alguns gram-positivos são capazes desta conversão e um teste de nitrito positivo indica que estes organismos estão presentes em número significativo. Este teste é específico, mas não altamente sensível. Assim, um resultado positivo é útil, mas um resultado negativo não exclui a infecção do trato urinário (23).

Existem dois modelos de tira reativa, o Multistix e o Chemstip. Estes usam reagentes diferentes, mas na reação de ambos se forma um corante azo cor de rosa. O primeiro método deteta nitrito em concentrações de 0,075 mg/dL, enquanto que o segundo deteta concentrações em ordem de 0,05 mg/dL (24).

O reagente de tira reativa do nitrito é sensível à exposição ao ar, por isso, deve-se fechar de imediato após a remoção de uma tira. Após uma semana de exposição, um terço das tiras dá resultados falso-positivos, e após duas semanas, três quartos dão resultados falso-positivos (23).

Proteínas

Em pessoas saudáveis, a parede capilar glomerular é permeável apenas para substâncias com um peso molecular inferior a 20.000 *Daltons*. Uma vez filtradas, as proteínas de baixo peso molecular são reabsorvidas e metabolizadas pelas células do túbulo proximal (23).

Proteínas urinárias normais incluem albumina, globulinas séricas e proteínas secretadas pelo nefrônio (23).

Em situação normal pode-se detetar quantidades pequenas de proteínas de baixo peso molecular. O aumento de proteínas na urina denomina-se proteinúria, e pode servir como indicador de doença renal, sendo que também ocorrem distúrbios renais na ausência de proteinúria (20).

A proteinúria pode ser classificada como transitória ou persistente. Na proteinúria transitória é sempre determinado um tempo para o resultado se tornar negativo (23).

A proteinúria persistente é dividida em três categorias: glomerular, tubular e transbordamento.

Na proteinúria glomerular, a proteína mais comumente detectada é a albumina, a principal proteína urinária (23).

A proteinúria tubular ocorre quando o mau funcionamento das células tubulares já não metabolizam ou reabsorvem a proteína normalmente filtrada. Nesta condição, proteínas de baixo peso molecular predominam sobre albumina (23).

Na proteinúria de transbordamento, as proteínas de baixo peso molecular sobrecarregam a capacidade dos túbulos de reabsorver as proteínas filtradas (23).

O método de testes de tiras reativas é bastante sensível à albumina, a principal proteína excretada, em função de lesão ou doença glomerular.

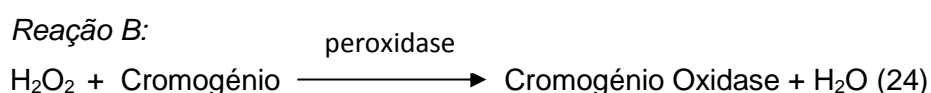
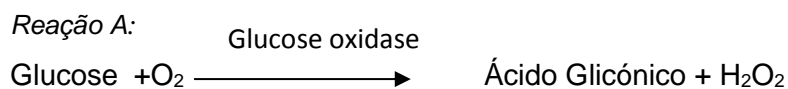
Avaliação adicional da proteinúria persistente geralmente inclui doseamento das proteínas na urina de 24 horas.

Glucose

A glucose é a primeira fonte de energia à qual recorre o nosso organismo, e habitualmente não está presente na urina.

A glucose normalmente é filtrada pelo glomérulo, mas é quase completamente reabsorvida no túbulo proximal. A presença de glucose na urina é denominada de glicosúria. A presença de glicosúria é dependente da concentração de glucose no sangue, do grau de reabsorção e da taxa de filtração. A glicosúria ocorre quando a carga filtrada de glucose excede a capacidade do túbulo de reabsorvê-la (23).

Estas são as reações que ocorrem nas tiras reativas:



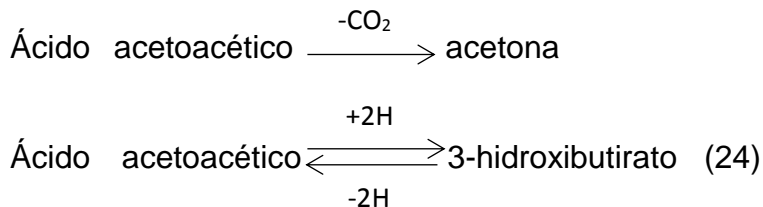
Etiologias responsáveis por glicosúria incluem diabetes mellitus, síndrome de Cushing, doença hepática, doença pancreática e síndrome de Fanconi (23).

Cetonas

As cetonas são produtos do metabolismo da gordura corporal (23), ou seja, são formadas durante o catabolismo de ácidos gordos, e normalmente não são encontradas na urina. A sua presença indica que o organismo está a utilizar lípidos para produzir energia. Isto acontece quando ocorre algum problema no metabolismo ou na absorção dos hidratos de carbono ou em situações de dietas pobres nestes nutrientes (24).

A presença de corpos cetônicos na urina é denominada de cetonúria. Na urina podem ser encontrados 3 tipos de corpos cetônicos: ácido acético (cerca de 20%), acetona (cerca de 2%) e 3-hidroxiacetato (aproximadamente 78) (24).

Estas são as reações que desencadeiam o aparecimento dos corpos cetônicos:



A cetonúria é mais comumente associada à diabetes mellitus descompensada, isto é, quando a glicose não consegue entrar nas células pela ausência de insulina, o corpo utiliza as reservas lipídicas como fonte de energia, podendo levar à cetoacidose diabética. Outros casos onde se pode observar cetonúria são no alcoolismo (cetoacidose alcoólica), quando há jejum prolongado ou vômitos, gravidez e dietas livres de hidratos de carbono (20)(25).

Urobilinogénio

A reação sofrida pela bilirrubina conjugada depois de passar pelos ductos biliares e ter sofrido metabolização no intestino produz um produto chamado urobilinogénio (23).

Grande parte de urobilinogénio é reabsorvido e reexcretado pelo fígado, e uma pequena parte é excretada na urina (20). O seu excesso na urina causa uma urina de coloração castanha escura, frequentemente comparada com a cor da Coca Cola®.

O método que ocorre nas tiras reativas baseia-se em duas reações, na reação química do aldeído de Ehrlich quanto na formação de corante azo vermelho de um composto diazónio (24).

A hemólise e a doença hepatocelular podem elevar os níveis de urobilinogénio, e o uso de antibióticos e a obstrução do ducto biliar podem diminuir os níveis de urobilinogénio (23).

Bilirrubina

A hemoglobina é um dos componentes dos eritrócitos. Na degradação deste componente forma-se uma substância de nome bilirrubina, no sistema reticuloendotelial. Este composto formado é armazenado no fígado e é transportado pela principal proteína urinária, a albumina (20).

Identificam-se dois tipos de bilirrubina no sangue, a bilirrubina não conjugada ou livre e a bilirrubina conjugada [19]. A bilirrubina não conjugada é insolúvel na água e não pode passar através do glomérulo, enquanto que a bilirrubina conjugada é solúvel na água, por isso,

quando os níveis séricos aumentam, ela é excretada na urina, fenômeno designado de bilirrubinúria (23).

No teste de tira reativa, o método consiste na reação química onde a bilirrubina é ligada a um sal de diazônio em meio ácido. O modelo Multistix utiliza 2,4-dicloroanilina diazotada como alternativa de sal diazônio, que resulta na alteração de cor do amarelo-creme para amarelo-queimado depois de 20 segundos. Este método deteta concentração de urina a partir de 0,8 mg/dL. Relativamente ao Chemstrip, esse utiliza o sal diazônio, 2,6-diclorobenzeno-diazônio tetrafluoroborato, promovendo a mudança de cor de rosa à violeta entre 30 a 60 segundos. Este modelo deteta a bilirrubina na urina a partir de concentração na ordem de 0,5 mg/dL (24). A urina normalmente não contém quantidades detetáveis de bilirrubina. A bilirrubinúria é sinal de disfunção hepática ou obstrução do trato biliar (23).

Sangue

A presença de três ou mais eritrócitos na urina é normalmente denominada hematúria (23).

A tira reativa deteta a atividade da peroxidase da hemoglobina existente nos eritrócitos, no entanto, a mioglobina também vão catalisar essa reação, nesse sentido, um resultado positivo pode indicar hematúria, ou mioglobinúria (23).

Exemplificação da reação da hemoglobina:

Atividade de peroxidase do heme

$H_2O_2 + \text{Cromogénio} \longrightarrow \text{Cromogénio oxidado (mudança de cor/verde)} + H_2O$
(24).

A presença de hemoglobina livre na urina é chamada hemoglobinúria, o que é provocada pela hemólise intravascular. A mioglobina é uma proteína pequena facilmente filtrada através do glomérulo e excretada na urina devido à sua rápida depuração na circulação. A sua presença na urina é denominada de mioglobinúria (20).

É muito importante fazer-se exame de sedimento urinário, pois a observação microscópica de eritrócitos intactos, pode diferenciar hematúria de mioglobinúria.

A hematúria está classificada em três tipos: glomerular, renal (não glomerular) e urológica.

Na hematúria glomerular, identifica-se uma concentração significativa de proteínas (proteinúria), cilindros eritrocitário e eritrócitos dimórficos. A nefropatia por IgA é a causa mais comum de hematúria glomerular (23).

Hematúria renal (não-glomerular) está associada apenas a proteinúria significativa, não está associada aos eritrócitos dimórficos e cilindros eritrocitários. Esta hematúria é secundária à túbulo intersticial, renovascular, ou distúrbios metabólicos (23).

E por fim, a hematúria urológica é caracterizada apenas pela presença significativa de eritrócitos, não havendo proteinúria, eritrócitos dimórficos ou cilindros eritrocitários. As principais causas são tumores, cálculos e infecções. Cerca de 5 a 22% dos pacientes sem hematúria, proteinúria ou piúria têm doença urológica grave (23).

Em situações de corrida de longa distância é comum a hematúria, mas o resultado da repetição do exame de urina após 48 à 72 horas deve ser negativo em pacientes com esta condição (23).

II.2.1.3 Exame do Sedimento

O exame microscópico do sedimento urinário é um dos testes que auxilia na análise de doenças renais e do trato urinário. Esta prova constitui uma das ferramentas essenciais no exame de urina.

Este exame inclui a análise de vários parâmetros, como as células (eritrócitos, WBC e células epiteliais), os cristais, os cilindros e os microrganismos que incluem bactérias, leveduras e parasitas, que auxiliam no diagnóstico de diversas condições (23).

Este exame utiliza a urina como amostra, e para o teste, a preparação é feita de seguinte modo: no recipiente da urina são colhidos de 10 a 15 ml, colocados num tubo e de seguida a amostra é centrifugada. O sobrenadante é então descartado e o sedimento é examinado entre lâmina e lamela (23).

Eritrócitos- GV

Os eritrócitos ou glóbulos vermelhos (GV) fazem parte do grupo de elementos que podem ser analisados na observação microscópica de sedimento urinário. A sua presença no sedimento urinário pode indicar, por exemplo, lesões hemorrágicas no rim ou no trato urinário (26).

Normalmente, os GV não estão presentes na urina saudável, mas pode-se detetar até 4 por campo de alta potência. Quando ultrapassa este valor é designada hematúria e a tira reativa reflete a presença de hemácias ou hemoglobina (26).

Microscopicamente a estrutura dos GV varia conforme as propriedades da urina, como a pressão osmótica e pH, assim como o local da hemorragia (26).

Em condições de urina com alta pressão osmótica ou pH baixo, os GV terão uma aparência de disco, são esféricas, inchadas e atroficas ao microscópio. Em relação ao tamanho dos GV, é quase sempre homogêneo, mas podem existir pequenas variações de tamanho entre eles. Estes

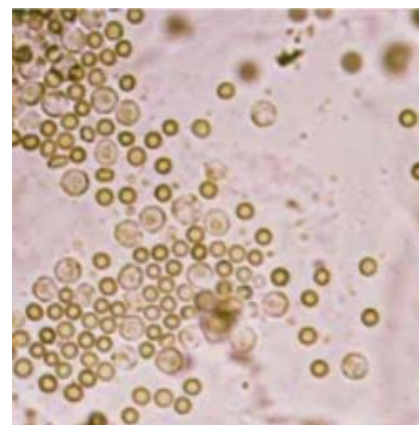


Figura 14 – GV (glóbulos pequenos com círculos escuro a volta) na urina.

casos podem sugerir condições de perda de sangue do trato urinário como é o caso de hematúria não glomerular (26).

E em situações de urina com baixa pressão osmótica ou pH elevado, os GV encontram-se inchadas, deshemoglobinizadas ou incolores na observação microscópica, e normalmente também são detetados cilindros eritrocitários e proteinúria. Relativamente ao tamanho, os GV exibem formas e tamanhos variados e não uniformes. Estes casos estão associados à situações de hematúria glomerular devido a nefrite glomerular e condições similares (26).

Leucócitos - WBC

Os leucócitos/glóbulos brancos (*White Blood Cell* - WBC) fazem parte dos elementos analisados no sedimento urinário. Na urina de indivíduos saudáveis não é suposto detetar mais de quatro células leucocitárias por campo de alta potência (26).

A presença de elevada concentração de WBC na urina é denominada de piúria.

Morfologicamente, dos WBC são esféricas, com diâmetro de 10 a 15 µm. Contudo, as suas características morfológicas podem sofrer alterações consoante a viabilidade celular (células viáveis ou células mortas) e as propriedades da urina, como a pressão osmótica e o pH (26).

Normalmente os WBC tendem a ser células atroficas em situações de elevada pressão osmótica e apresentam-se inchados em baixa pressão osmótica (26).

Dos WBC encontrados na urina, os neutrófilos têm uma presença significativa, podendo ser cerca de 95%. Quando existem situações de aumento do número de linfócitos, eosinófilos ou monócitos/macrófagos na urina devem ser consideradas diversas condições patológicas (26). Quando há uma elevada quantidade de neutrófilos presentes na urina, estamos perante uma infeção do trato urinário, como a cistite, a pielonefrite, a uretrite ou a prostatite (26).

O aumento de concentrações de WBC na urina pode estar associado a lesões inflamatórias, nomeadamente no rim, e infeções do trato urinário (26).

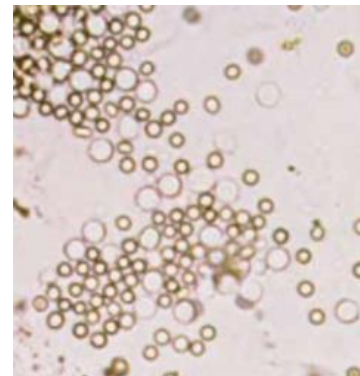


Figura 15 – WBC (círculos maiores com contornos menos carregados).

Células epiteliais

As células epiteliais são um dos elementos normalmente presentes no sedimento urinário.

As células epiteliais encontram-se no trato geniturinário e podem aparecer na urina devido à descamação normal do epitélio. Um número elevado de células epiteliais é sugestivo de inflamação da área de origem das células.

Existem vários tipos de células epiteliais, nomeadamente, células epiteliais escamosas, de transição e tubulares renais (25).

- Células epiteliais pavimentosas

As células epiteliais pavimentosas têm características notáveis. Geralmente, são células grandes, achatadas e de forma poliédrica, tendo citoplasma abundante e núcleos centrais. Estas células são derivadas, sobretudo, da uretra e da vagina. Na urina feminina é muito frequente encontrar muitas células escamosas que resultam da contaminação a partir da vagina ou da vulva e, por este motivo, têm pouca importância diagnóstica (25).

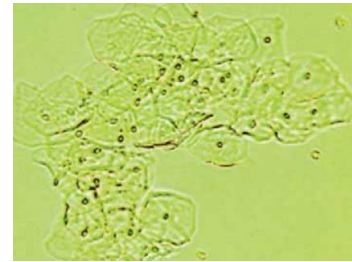


Figura 16 – Células epiteliais pavimentosas presentes na amostra de urina.

- Células epiteliais de transição

São muito maiores do que os WBC, cerca de 2 a 4 vezes. Elas podem ter várias formas, nomeadamente esféricas e piriformes, ou podem expressar projeções caudais. Ocasionalmente, estas células podem conter dois núcleos. As células epiteliais de transição revestem o trato urinário, a começar na pelve renal e a terminar na porção superior da uretra. A presença destas células na urina é indicativo de lesão onde elas se encontram (25).



Figura 17 – Células epiteliais de transição na urina.

- Células epiteliais tubulares renais

As células epiteliais tubulares renais são pouco maiores do que os glóbulos brancos, tendo grandes núcleos esféricos. A presença de um número elevado de células epiteliais tubulares na urina deriva de lesões a nível tubular, que se verificam na pielonefrite, na necrose tubular aguda e na rejeição de transplante renal, entre outras (25).

Por diversos motivos já apresentados, é imprescindível conhecer os diferentes tipos de células epiteliais, pois podem dar-nos informação do local da lesão e que tipos de patologias poderiam estar associados (25).



Figura 18 – Células epiteliais tubulares renais na urina.

Cristais

Os cristais são elementos igualmente analisados no sedimento urinário, e podem estar presentes na urina de indivíduos saudáveis (23).

De forma geral, os cristais presentes na urina têm significado clínico limitado, com exceção nos casos de distúrbios metabólicos, desenvolvimento de cálculos, intoxicação medicamentosa e doenças hereditárias.

Existem vários tipos de cristais. Cada tipo de cristal é dependente de um determinado intervalo de pH urinário (ácido, neutro ou alcalino), podendo ser encontrados, essencialmente, cristais de ácido úrico e oxalato de cálcio em urina ácida e cristais de fosfatos triplos e fosfatos amorfos em urina alcalina (23).

○ Cristais de Ácido úrico

Os cristais de ácido úrico observados ao microscópio são amarelos a castanhos alaranjados e têm forma de diamante ou barril (23).

Estes cristais não indicam propriamente um estado patológico, do mesmo modo que não indicam que o teor de ácido úrico na urina esteja drasticamente elevado. Uma certa quantidade destes cristais na urina é considerada normal. O aumento da sua concentração pode ser um sinal de situações patológicas, como gota, condições febris agudas ou nefrite crônica (25).

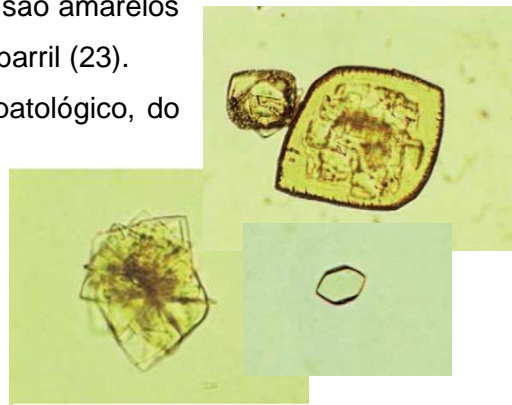


Figura 19 – Cristais de ácido úrico na urina.

○ Cristais de Oxalato de Cálcio

Os cristais de oxalato de cálcio são incolores, com formato octaédrico ou de envelope (23). Estes elementos podem apresentar diversos tamanhos e, ao detetar um típico cristal de oxalato de cálcio, observa-se um “X” no cristal. São solúveis em ácido clorídrico, mas insolúveis em ácido acético.

Normalmente, estes cristais são observados em urina ácida e urina neutra. Concentrações elevadas de cristais de oxalato de cálcio existentes em urina recém-eliminada podem indicar a presença de cálculos de oxalato (25).

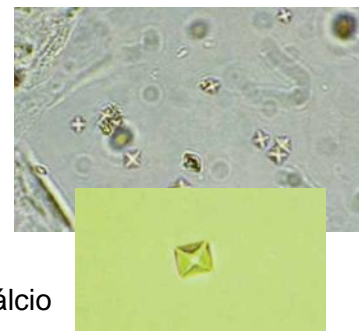


Figura 20 – Cristais de oxalato de cálcio na urina.

- Cristais de Triplo Fosfato

Os cristais de triplo fosfato morfologicamente são incolores e têm uma aparência característica de “tampa de caixa”. Estes cristais existem em urinas neutras e alcalinas e são solúveis em ácido acético. O aparecimento desses cristais na urina encontra-se associado a infecções do trato urinário, tipicamente associado a bactérias que produzem urease, como é o caso de *Proteus spp.* (23)(25).

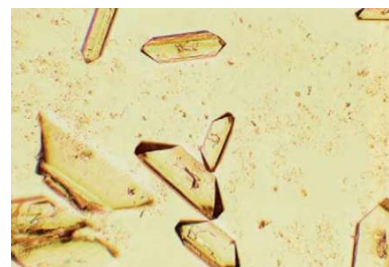


Figura 21 – Cristais de triplo fosfato na urina.

- Sais de fosfatos amorfos

Os sais de fosfatos amorfos normalmente encontram-se em urinas alcalinas, em forma amorfa e não cristalina, não exibindo formato específico. Estes sais são solúveis em ácido acético e não expressam significado clínico (25).

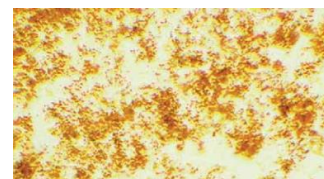


Figura 22 – Sais de fosfatos amorfos na urina.

Cilindros

A formação dos cilindros dá-se no lúmen do túbulo renal, que serve como molde e confere o formato cilíndrico ao produto. O componente da matriz é composto de mucoproteína Tamm-Horsfall, que é secretada por células epiteliais tubulares renais e por uma pequena quantidade de proteínas plasmáticas. Alguns cilindros são formados pela inclusão e subsequente ruptura e degeneração de células sanguíneas, células epiteliais tubulares renais e outros elementos (26).

O aparecimento de cilindros na urina, indica que o túbulo renal estava temporariamente obstruído, seguido do restabelecimento do fluxo urinário. Existem vários tipos de cilindros e, de acordo com o tipo, número e forma presente na urina, pode-se saber a extensão do rim ou túbulo renal que sofreu lesão (26).

Existem uma variedade de cilindros, mas irei descrever os mais encontrados ao longo do estágio (26).

- Cilindros Hialinos

Os cilindros hialinos são os mais frequentemente encontrados na urina. Estes cilindros são homogêneos e transparentes (25).

Os cilindros hialinos têm uma forma cilíndrica com extremidades principalmente arredondadas, mas também podem ser estreitas. Podem apresentar-se numa forma mais flexível, em forma de S e em formas clivadas.

Uma variedade de tipos de inclusões pode ser observada, incluindo cilindros de componente único sem outros conteúdos e contendo pequenas quantidades de vários componentes (até duas células sanguíneas, células epiteliais tubulares renais ou grânulos de gordura, sendo que, componentes granulares representando menos de um terço do total do elenco) (26).

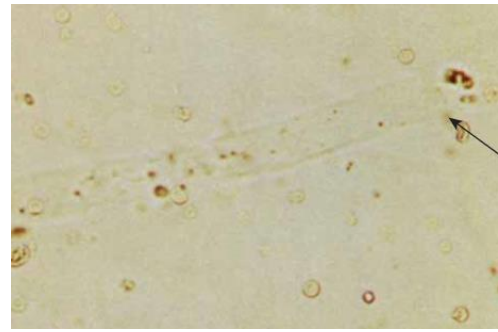


Figura 23 – Cilindro hialino na urina.

Os cilindros hialinos também podem ser encontrados na urina de indivíduos saudáveis, particularmente aqueles que experimentam desidratação frequente associada a exercícios intensos. No entanto, a detecção persistente destes cilindros num indivíduo saudável deve ser valorizada e investigada convenientemente. Além disso, os cilindros hialinos podem ser observados em pacientes com proteinúria renal associada a doença renal, distúrbios do fluxo sanguíneo sistêmico e outras condições (26).

o Cilindros Granulosos

Os cilindros granulosos podem ser derivados da degeneração de cilindros celulares ou da agregação de proteínas séricas na matriz do mucoproteína de Tamm-Horsfall. Normalmente, têm um grande significado clínico, sugerindo doença renal, nomeadamente glomerulonefrite e necrose tubular aguda (25).

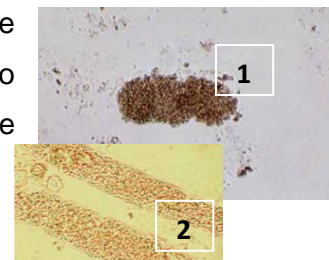


Figura 24 – Cilindro granular grosso (1) e cilindro granular fino (2) na urina.

o Cilindros Hemáticos

Os cilindros hemáticos têm uma coloração castanha ou quase incolor. A presença de cilindros hemáticos na urina é um sinal patológico que indica hematuria renal. Por norma, esta patologia é do tipo glomerular, estando presentes na glomerulonefrite aguda, na nefrite lúpica, na endocardite bacteriana subaguda e no enfarte renal (25).

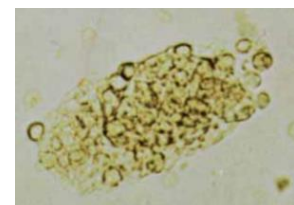


Figura 25 – Cilindro hemático na urina.

- Cilindros Leucocitários

Os cilindros leucocitários são constituídos, essencialmente, por polimorfonucleares, nomeadamente, os neutrófilos. Estes cilindros apresentam-se em condições de infeção e inflamação não infecciosa renal, verificando-se, também, na pielonefrite aguda, na nefrite intersticial, na nefrite lúpica e na doença glomerular (25).

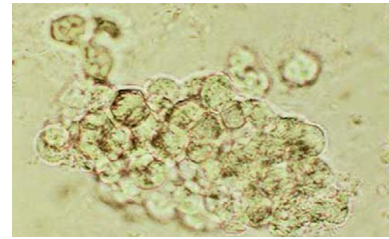


Figura 26 – Cilindro leucocitário na urina.

- Cilindros Epiteliais

Dos cilindros epiteliais fazem parte as células epiteliais tubulares renais dentro da matriz. Esses cilindros podem ser identificados em diferentes estados, variando de um estado no qual o cilindro se encontra constituído por três células epiteliais a um estado no qual um cilindro é composto por uma densa quantidade de células epiteliais (26).



Figura 27 – Cilindro epitelial na urina.

Os cilindros epiteliais raramente são detetados na urina, mas encontram-se presentes em situações de lesão tubular com necrose tubular aguda e nefrite intersticial aguda.

- Cilindros Céreos

Os cilindros céreos derivam da deterioração de cilindros granulosos. Os cilindros céreos apresentam-se em doentes com insuficiência renal crónica grave, hipertensão maligna, amiloidose renal e nefropatia diabética, inflamação e degeneração tubular, entre outros (25).

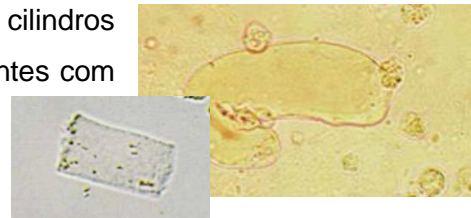


Figura 28 – Cilindros céreos na urina.

- Cilindros de Gordura

Os cilindros de gordura podem ser compostos, essencialmente, por gotículas de gordura, ou seja, resultam da degeneração adiposa do epitélio tubular, tal como acontece na patologia tubular degenerativa. Estes cilindros de gordura também são observados no síndrome nefrótico (25).



Figura 29 – Cilindros de gordura na urina.

Microrganismos

○ Bactérias

As bactérias são categorizadas em dois tipos, bacilos e cocos. Esses microrganismos podem ser encontrados na urina. A sua determinação na urina é essencial para o diagnóstico de infecções do trato urinário, como é o caso de pielonefrite e cistite. Contudo, as bactérias residentes na uretra tornam impossível de eliminar completamente a contaminação, a menos que as amostras de urina sejam colhidas por meio de punção vesical direta (26).

As amostras de urina de mulheres podem ser contaminadas por um grande número de lactobacilos da vagina. Além disso, bactérias deformadas com corpos alongados podem ser observadas em amostras de pacientes usando antimicrobianos (inibidores da síntese da parede celular) (26).

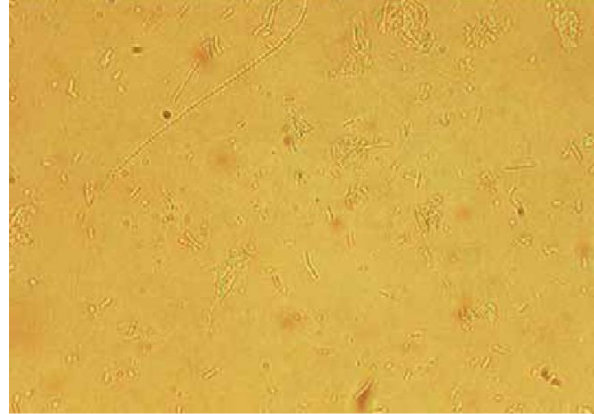


Figura 30 – Bactérias presentes na urina.

A presença de bactérias em uma amostra de urina masculina colhida adequadamente é sugestiva de infecção, e uma cultura urinária deve ser obtida (23).

A principal causa de infecções do trato urinário são infecções por uma bactéria denominada *Escherichia coli* (*E. coli*), contudo também ocorrem infecções por *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* em alguns casos. Metade das infecções do trato urinário complicada são causadas por múltiplas bactérias. Nestas infecções complexas as bactérias etiológicas são diferentes daquelas que causam infecções do trato urinário simples. A *E. coli* passa a ser menos comum, e as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* são observadas com maior frequência (26).

A presença de piúria e bacteriúria numa amostra de urina corretamente colhida é essencial para o diagnóstico de infecção do trato urinário.

- Leveduras

As leveduras podem ter um aspeto semelhante às hemácias ou a WBC segmentados com núcleos aparentes que derivam da degradação.

Geralmente detetam-se leveduras em situações de pós administração de agentes antibacterianos, como resultado de alterações na flora bacteriana intestinal. As leveduras no trato urinário desaparecem espontaneamente, sem qualquer tratamento especial, e poucos pacientes necessitam de tratamento médico. No entanto, os riscos de sepsis e disseminação de infeções em múltiplos órgãos aumentam em pacientes com defesas reduzidas contra infeções, como idosos, diabéticos e imunossupressores (26).



Figura 31 – Leveduras presentes na urina

Como as leveduras residem na vagina, a deteção dessas células em amostras de urina de mulheres, pode ser sugestivo de uma simples contaminação ou infeção do trato urinário (26).

- Parasitas

No exame de sedimento também é possível detetar parasitas, como protozoários e helmintas.

Os protozoários geralmente têm um formato semelhante à pera, apresentam 5 flagelos e podem ser longos ou curtos, com diâmetros de 10-15 μm e 6-12 μm , respetivamente. Na observação microscópica, quando os protozoários estão em movimento, são mais facilmente reconhecidos do que quando estão inativos, pois podem ser confundidos com os WBC. A presença de um flagelo brilhante, branco acinzentado e pálido ajuda na diferenciação. Além disso, esses parasitas são ligeiramente mais espessos que os WBC e exibem variabilidade de tamanho (26).

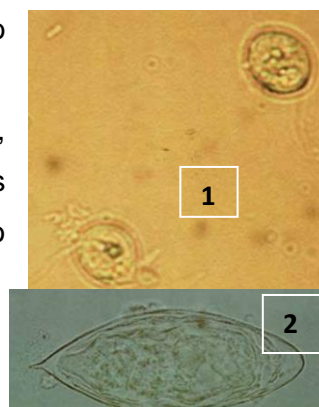


Figura 32 – *Trichomonas vaginalis* com flagelos presentes (1), ovos de *Schistosoma haematobium* (2) na urina.

Os protozoários encontrados nos sedimentos urinários geralmente são as *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*). Embora o *T. vaginalis* seja encontrado principalmente em mulheres, também é encontrado em homens e é frequentemente acompanhado pela presença de células epiteliais escamosas (26).

Relativamente aos helmintas, uma das espécies encontradas na urina são os ovos de *Schistosoma haematobium*. Os ovos de *S. haematobium* têm uma forma de fuso com uma extremidade arredondada e uma casca de ovo castanha amarelada sem opérculo. Existem

ovos mais longos e outros menos, com os seguintes diâmetros: 110-170 µm e 40-70 µm, respetivamente, e um espinho compõe o final da cauda.

Ovos de *Schistosoma haematobium* são raramente encontrados na urina. Estes ovos aparecem na urina em alguns pacientes afetados por parasitas *S. haematobium*, e estes depositam os ovos nas vénulas da parede da bexiga.

O *S. haematobium* é um parasita endémico no continente africano, no Médio Oriente e na Índia. Este parasita devido aos seus efeitos, aumenta a incidência de tumor na bexiga (26).

Além *S. haematobium* também podem ser encontrados na urina outros parasitas como *Strongyloides stercoralis* e outros (26).

II.2.2 Líquidos Orgânicos

Líquido Ascítico ou Peritoneal

O líquido ascítico ou peritoneal é formado pelas células do mesotélio como um ultrafiltrado do plasma, portanto ele é caracteristicamente um líquido amarelo e estéril.

O líquido ascítico circula entre a área parietal, que reveste o abdómen e a zona visceral, que reveste os órgãos, chamada cavidade peritoneal.

Este fluido tem o papel de proteger a cavidade abdominal, lubrificando-o, evitando assim choques entre os órgãos e atritos entre os mesmos no processo de digestão (27).

O líquido peritoneal pode ser classificado em transudado ou exsudado. Esta classificação baseia-se na concentração da proteína total (PT). O líquido ascítico classificado como transudado tem baixas concentrações de PT, condição fisiológica verificada na cirrose, insuficiência cardíaca ou síndrome nefrótica. Situações classificadas como exsudado são caracterizadas de elevadas concentrações de PT, e verificam-se nos processos inflamatórios ou doenças neoplásicas malignas (28).

A nível laboratorial, se o resultado indicar tanto transudado ou exsudado, o doente é submetido ao exame, macroscópico, microscópico e doseamentos químicos.

A análise começa com o exame macroscópico, onde é analisado o aspeto visual do líquido, que pode ser classificado como límpido e amarelo claro ou turvo e cor citrina, hemorrágico, leitoso.

De seguida, após a classificação da amostra, se o resultado indicar uma condição de exsudado, passa-se para a análise microscópica. Neste exame faz-se análise dos GV e dos WBC na câmara de Neubauer. Nos WBC verifica-se se existe predomínio de células polimorfonucleares ou mononucleares. Em caso de presença das células epiteliais, estas só são mencionadas em grande número (27).

Para além do exame microscópico também são feitos alguns testes bioquímicos que irão auxiliar no diagnóstico do paciente.

Estes dados são reunidos juntamente com o resultado dos outros exames que irão ajudar a identificar a causa de ascite.

Ascite é quando ocorre acumulação do líquido ascítico na cavidade peritoneal por produção excessiva ou pela falta de remoção adequada do líquido. Conhecem-se como as principais causas de ascite, as doenças neoplásicas acompanhadas a cirrose (27).

Líquido Sinovial

O líquido sinovial é uma substância incolor / amarelo-clara e tem uma consistência viscosa. A sua principal função é lubrificar as articulações.

Este líquido localiza-se na cavidade sinovial, espaço entre as articulações sinoviais (29). A análise deste líquido é crucial no diagnóstico das doenças articulares. A sua aspiração é indicada para qualquer paciente com derrame articular ou com inflamação articular.

No laboratório de bioquímica, para análise do líquido sinovial, faz-se o exame macroscópico, microscópico e testes bioquímicos. A análise começa com avaliação macroscópica, que analisa o volume, a cor, a viscosidade e a existência de coágulo na amostra (29).

Depois dessa avaliação, segue-se o exame microscópico, que deve ser realizado dentro de uma hora após a colheita da amostra. Este exame passa pela análise de GV e WBC na câmara de Neubauer, nos WBC observa-se se existe ou não predomínio de células polimorfonucleares ou mononucleares. Além dos WBC, também são analisados os GV e só se referem as células epiteliais caso existam em grande número.

E alguns doseamentos químicos também são realizados

Os resultados desses exames irão auxiliar no diagnóstico do paciente.

Alterações nos exames químicos e nas células normais das articulações podem ocorrer como resultado de reações bacterianas, químicas ou danos mecânicos (29).

Líquido Cefalorraquidiano - LCR

O líquido cefalorraquidiano é um ultrafiltrado límpido e incolor e pobre em células e proteínas (30). Este líquido preenche e circula através do sistema de interconexão de espaços dentro do cérebro e da medula espinal. Atua como um amortecedor contra o trauma mecânico e também troca nutrientes e materiais residuais com o sistema nervoso (SN) (30)

Bioquimicamente o LCR é analisado macroscopicamente, microscopicamente e através de alguns testes químicos.

O teste macroscópico consiste na análise do volume, da cor, da viscosidade e presença de coágulo caso presente.

Em condições patológicas, pode apresentar alteração na coloração e pode estar avermelhado, turvo ou leitoso, em virtude da presença de células sanguíneas, microrganismos

ou taxas elevadas de proteínas ou lípidos. Estas alterações podem ser verificadas em patologias, como meningite tuberculosa, infecções, processos inflamatórios e distúrbios cognitivos e de função motora (31).

Após a análise macroscópica, centrifuga-se a amostra e faz-se o exame microscópico na câmara de Neubauer. Este exame consiste em analisar os WBC e referir caso exista predomínio de células polimorfonucleares ou mononucleares. Também se realiza análise de GV e menciona-se células epiteliais caso existam em grande número.

A quantidade de células é, habitualmente, baixa no LCR. Dependendo da concentração de cada tipo de célula encontrada, pode-se classificar a amostra em séptica ou acética e as respetivas patologias que podem estar associadas (32).

Também são efetuadas as contagens das proteínas, da glucose e LDH (desidrogenase láctica) (32). Os resultados de todos esses exames irão auxiliar no diagnóstico do paciente.

Líquido Pleural

O líquido pleural normal é amarelo-pálido e límpido. A coloração e turvação anormal deste líquido corporal, em consequência, expressa fenómenos patológicos, exibindo coloração avermelhada e leitosa.

No departamento de bioquímica laboratorial este líquido sofre exames bioquímicos, macroscópico e microscópico.

Na análise do líquido pleural, a proteína total tornou-se num marcador de diferenciação dos transudados dos exsudados. Se a concentração da proteína for menor indica um transudado, se a concentração for maior indica um exsudado, tendo em conta o valor de referência (28).

Os exames laboratoriais realizados tanto para transudado ou exsudado são os mesmos, o doente é submetido ao exame, macroscópico, microscópico e doseamentos químicos.

No exame macroscópico analisa-se o volume, a cor, a viscosidade e a presença ou não de coágulo na amostra.

O exame microscópico consiste na análise de GV e WBC na câmara de Neubauer, no caso dos WBC verifica-se se existe ou não predomínio de células polimorfonucleares ou mononucleares. As células epiteliais são mencionadas quando se encontram em grande número.

O líquido pleural é avaliado em situações de derrame pleural. O derrame resulta da formação excessiva de fluidos e da sua acumulação no espaço pleural.

O acúmulo está associado a muitas condições médicas que predisõem ao acúmulo do fluido, como o aumento da pressão hidrostática capilar pulmonar, diminuição da pressão oncótica, aumento da permeabilidade da membrana pleural e obstrução do fluxo linfático (33).

As condições mais comuns que resultam em derrame são insuficiência cardíaca, pneumonia e neoplasia maligna (33).

II.3 Equipamentos

A área da bioquímica encontra-se automatizada e constituída por uma cadeia denominada Flexlab. FlexLab é um complexo de vários módulos projetado para automatizar os processos pré-analítico, analítico e pós-analítico, o manuseamento de amostras e o respetivo processamento analítico. Este sistema tem vários métodos analíticos acoplados numa única cadeia de trabalho: módulo de entrada e saída de amostras, módulo de centrifugação 2, módulo de descapsular, aliquotador, módulo selador, módulo de recapsular, Architect i2000®, Architect c16000® e armazenador.

FlexLab também tem um software que permite o controlo da carga de trabalho e a logística do estado dos dispositivos e/ou analisadores a ele ligados. Tudo isto é possível porque o complexo está ligado a outros sistemas informáticos, nomeadamente ao sistema informático do laboratório (34).

II.3.1 Família Architect

A criação modular da família de analisadores Architect proporciona uma única cadeia de trabalho com eficácia na realização de uma grande diversidade de ensaios. Este sistema utiliza tecnologia fotométrica, potenciométrica e/ou CMIA (imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência), para determinar a concentração de analitos em amostras (35).

No laboratório do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Lisboa Central, são usados o ARCHITECT i2000sr®, que tem como princípio de processamento o Método Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA), e o ARCHITECT c16000® que, por sua vez, tem como princípio de funcionamento a espectrofotometria e potenciometria. Estes aparelhos têm como função determinar a concentração de numerosos marcadores biológicos. Tais princípios são explicados seguidamente:

ARCHITECT System (i2000) ®

O imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) é uma técnica que mede e quantifica a concentração dos analitos utilizando um imunoensaio, baseado na reação anticorpo (Ac) - antígeno (Ag).

O método de quimioluminescência baseia-se na emissão de luz quando um eletrão regressa de um nível excitado ou superior de energia, para um nível energético mais baixo. O evento excitatório é causado por uma reação química e envolve a oxidação de um composto orgânico (luminol), com o auxílio de um oxidante. A luz é emitida a partir de um composto excitado

formado pela reação de oxidação. Estas reações ocorrem na presença de catalisadores, tais como enzimas (exemplo: fosfatase alcalina). A partir da emissão de luz através do marcador utilizado quantifica-se o analito em estudo. Os dois principais tipos de reação utilizados nos ensaios imunoquímicos são denominados competitivos e não-competitivos (35).

ARCHITECT System (c16000) ®

ARCHITECT System (c16000) ® Utiliza os seguintes métodos:

Espectrofotometria é a medição da quantidade de luz que uma amostra absorve e envolve a passagem de um feixe de luz através de uma amostra e a medição da intensidade da luz que atinge um detetor.

A lei de Beer estabelece a relação matemática entre a absorvância da solução e a concentração do analito.

a) Ensaios de ponto final: são denominados métodos de ponto final aqueles em que é permitido que a reação continue até à sua finalização, para que todo o substrato tenha sido convertido num produto mensurável

b) Nos ensaios cinéticos é medida a variação da densidade ótica por minuto ou noutro intervalo de tempo especificado (36)(35).

Potenciometria é a medida da diferença de potencial elétrico entre dois elétrodos, numa célula eletroquímica. Nesta célula é, portanto, medida a diferença de potencial entre um eletrodo seletivo de iões e um eletrodo de referência. O potencial é gerado pelos iões da amostra que passam pelo eletrodo seletivo de iões. Este responde de forma seletiva a um ião, na presença de outros iões. A concentração de iões numa solução pode ser calculada pela diferença de potencial medido entre dois elétrodos

Geralmente os elétrodos seletivos utilizados são o sódio, o potássio e o cloro (35).

II.3.2 iRICELL

iRICELL é uma cadeia automatizada de exames de urina que combina dois analisadores, um que analisa a urina pelas tiras reativas (Iricell iChemVELOCITY®) e outro que faz o exame do sedimento do mesmo (Iricell iQ200 ELITE®).

Iricell iChemVELOCITY® - Metodologia: Fotometria de reflectância com câmara digital incorporada. A amostra é aspirada e dispensada na superfície de uma tira reagente que, através de uma reação colorimétrica permite uma avaliação semi-quantitativa de diversos parâmetros físicos e químicos do exame sumário da urina (37).

Iricell iQ200 ELITE®- Metodologia: Microscopia ótica automática. O exame do sedimento urinário é realizado por este equipamento, utiliza uma lâmina com a amostra de urina e que se desloca ao longo da objetiva do microscópio. As partículas presentes na urina, sem

qualquer tipo de pré-tratamento, são fotografadas no seu meio (500 fotografias em 51 segundos, com 1,3 megapixéis) e analisadas através de um software de reconhecimento de imagem, baseado em dados de 26000 elementos armazenados, sendo as imagens classificadas em até 35 categorias diferentes. A urina é fotografada à medida que passa lentamente pela janela de leitura da célula de fluxo de 2 µL de capacidade. O software Auto-Particle Recognition analisa o tamanho, a forma, o contraste e a textura das imagens e classifica-as em elementos celulares e não celulares (37).

III. Imunologia

III.1 Introdução

A Imunologia é a ciência que estuda o Sistema Imunitário.

O sistema imunitário (SI) compreende uma série de células e moléculas que estão envolvidas na defesa natural do indivíduo contra agressões por agentes estranhos. Os constituintes do SI reconhecem moléculas e padrões moleculares do “*self*”, atuando contra constituintes celulares e moleculares estranhos. Este sistema encontra-se simplisticamente dividido em duas linhas de defesa: sistema imunitário inato e o sistema imunitário adaptativo ou adquirido.

III.1.1 Sistema Imunitário Inato

O sistema imunitário inato é a primeira linha de defesa do SI a um agente estranho – antigénio, sendo uma resposta não específica a este. Os principais mecanismos de defesa do SI inato são a fagocitose, libertação de mediadores inflamatórios, síntese de proteínas de fase aguda e de citocinas, bem como a ativação das moléculas que compõem o sistema do Complemento (38).

Componentes celulares

As células fagocíticas têm como principal função englobar e ingerir (fagocitose) os microrganismos com finalidade de os eliminar. Fazem parte das células fagocíticas os macrófagos e os neutrófilos.

As células Natural Killer (NK) reconhecem os agentes estranhos e atuam perfurando a membrana celular através de moléculas denominadas perforinas e injetando granzimas que levam à morte celular.

As células dendríticas são células que reconhecem os agentes patogênicos através da presença de estruturas moleculares à superfície destes e que não se encontram nas células humanas. Determinantes antigênicos dos elementos invasores são apresentadas às células do SI adquirido para uma resposta mais específica (39).

Sistema Complemento - SC

O Sistema Complemento (SC) é constituído por um grande número de glicoproteínas plasmáticas, produzidas maioritariamente no fígado, e numa menor percentagem por macrófagos e fibroblastos. Desta ativação resulta a lise celular.

O SC pode ser ativado por três diferentes vias: clássica, alternativa e via das lectinas ligadas à manose (*Mannose-binding lectin* - MBL). Desta ativação resulta a formação de uma C3 convertase que está envolvida na formação do Complexo de Ataque à Membrana (*Membrane Attack Complex* - MAC) que promove a lise osmótica do agente invasor (39).

Em suma, as principais funções do sistema complemento são a opsonização (corresponde a fixação de opsoninas na superfície dos agentes infecciosos, resultando na fagocitose), lise da membrana celular, quimiotaxia (migração dirigida de células imunes), início da inflamação ativa através da ativação direta dos mastócitos (38).

III.1.2 Sistema Imunitário Adaptativo ou Adquirido

O sistema imunitário adaptativo ou adquirido, consiste numa série de mecanismos que permitem uma resposta específica ao antígeno, ao contrário da resposta imunológica desenvolvida pelos componentes do SI inato. Este sistema de defesa adaptativo têm como células efetoras os linfócitos T e B (38).

Linfócitos T e B

Existem três grandes tipos de linfócitos, os linfócitos T (LT), os linfócitos B (LB) e os linfócitos NK. Os LB e LT são específicos o que significa que atuam contra determinado antígeno. Como tal, são as principais células responsáveis pela resposta do sistema imunológico adaptativo.

Os LB em repouso são capazes de ligar-se diretamente aos antígenos livres através de Imunoglobulinas que se encontram na superfície da membrana celular, que atuam como

receptores antigénicos iniciando-se uma série de eventos intracelulares que levam à ativação dos LB com produção e libertação de anticorpos capazes de neutralizar, ou até mesmo destruir, os antígenos (38). Os LB funcionam também como células apresentadoras de antígeno, após interiorizarem e processarem o Ag ligado ao receptor de superfície, receptor de células B (*B-cell receptor* - BCR). A resposta dos LB a antígenos peptídicos requer a ajuda dos LT auxiliares.

Os LT só reconhecem antígenos processados, apresentados por moléculas de complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* – MHC) na superfície de uma célula apresentadora de antígeno. O receptor de células T (*T-cell receptor* – TCR) expresso na membrana dos LT é um complexo proteico que reconhece os péptidos antigénicos apresentados pelas moléculas do complexo MHC, o que leva à ativação do LT.

Os LT subdividem-se em LT CD4⁺ e LT CD8⁺ conforme interagem com moléculas MHC de classe II ou I, respetivamente.

Os LT CD4⁺ são LT auxiliares (*LT helper* - LTh) sendo responsáveis por orquestrar outras células da resposta imune para a eliminação dos agentes patogénicos, nomeadamente são muito importantes na ativação dos LB, macrófagos ou mesmo LT CD8, através da produção de citocinas. Os LT CD8⁺ são linfócitos citotóxicos estando envolvidos principalmente nas respostas antivirais e possuem também atividade anti-tumoral. Ambos os subtipos apresentam papel muito importante no controle de patógenos intracelulares.

Anticorpos

Os anticorpos são imunoglobulinas e desempenham dois papéis importantes. O primeiro é a ligação com o antígeno e o segundo é a interação com os tecidos hospedeiros e os sistemas efetores, de forma a garantir a remoção do antígeno (38).

Existem cinco diferentes tipos de imunoglobulinas no sistema imune humano, nomeadamente IgM, IgG, IgA, IgE e IgD. A IgG subdivide-se em quatro subclasses, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (38).

A imunoglobulina compõe-se por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. As cinco cadeias pesadas conhecidas são α , χ , δ , ϵ e μ e existem dois tipos de cadeias leves, κ appa (κ) e lambda (λ) (39).

Cada anticorpo tem a sua função específica e a detecção de cada tipo de anticorpo em certas situações pode fornecer-nos informações e auxiliar no diagnóstico ou monitorização de certas doenças.

Na secção de Imunologia observei a pesquisa identificação e quantificação de autoanticorpos nas doenças autoimunes, quantificação de populações linfocitárias, quantificação de Imunoglobulinas, frações do Complemento, proteínas de fase aguda e algumas técnicas de imunoserologia.

III.1.3 Autoimunidade

A autoimunidade verifica-se quando os mecanismos de defesa do sistema imunológico perdem a capacidade de reconhecer e diferenciar as estruturas do próprio organismo atacando as células do próprio indivíduo.

A capacidade de reconhecimento do “self” é designada por autotolerância e envolve os LB e LT, quer a nível central quer periférico. A perda de autotolerância pode ser provocada por causas intrínsecas e por causas extrínsecas. As causas intrínsecas estão diretamente relacionadas com o polimorfismo de moléculas de histocompatibilidade, elementos da imunidade inata (sistema complemento, receptores *Toll-like*), elementos da imunidade adaptativa (linfócitos com atividade reguladora, citocinas), fatores hormonais intimamente relacionados com o controlo genético. Relativamente as causas extrínsecas, são conhecidas as infeções bacterianas e virais, contato a agentes físicos e químicos, tais como os raios UV, pesticidas e drogas (40).

Em determinados indivíduos pode verificar-se uma predisposição genética para a autoimunidade. São já conhecidos certos alelos que estão associados a uma maior susceptibilidade para patologias autoimunes. Mas para o desenvolvimento da doença é necessário o agente que estimule a autoreatividade. Tem-se como exemplo o alelo HLA-B27 associado à espondilite anquilosante, à artrite reativa e à artrite psoriásica, bem como os alelos HLA-DRB1 que apresentam o epitopo compartilhado com artrite reumatoide. Os indivíduos portadores de HLA-DQ2 e HLA-DQ8 são passíveis de desenvolver a doença celíaca, pela ingestão de glúten, pois este irá provocar a produção de autoanticorpos que levarão ao desenvolvimento da doença (40).

Relativamente às causas extrínsecas, existe uma íntima associação entre situações infecciosas e doença autoimune. A perda de autotolerância pode ser provocada por dano tecidual e necrose celular, expondo epitopos que se comportam como autoantígenos ou propicia o acesso de células imunocompetentes a antígenos isolados, ativação policlonal de

células T e B por superantígenos microbianos, ativação de células imunocompetentes não diretamente envolvidas na resposta ao patógeno e mimetismo molecular (40).

Outro processo que pode desencadear doença autoimune é o fenómeno de apoptose conhecido como o mecanismo de morte celular programada. Este influencia a manutenção da tolerância central e periférica e o controlo dos linfócitos produzidos numa resposta imunitária (40).

Falhas no processo de apoptose ou na eliminação de células ou resíduos apoptóticas podem desencadear doenças autoimunes. Por esse motivo é essencial a remoção imediata dos corpos apoptóticos, evitando a exposição constante de autoantígenos. Como exemplo, numa situação de défice de depuração de células apoptóticas, pode-se desenvolver Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) (40).

Em situações de deficiência genética de certos componentes do sistema complemento, como o C1q, C2 e C4, há uma relação direta com a susceptibilidade em desenvolver LES. A probabilidade de desenvolvimento de LES varia entre os indivíduos que apresentam essas deficiências genéticas, sendo que no défice de C1q há 90% de probabilidade, no de C4 há 75% e no de C2 a probabilidade de desenvolver LES é menor.

Em suma, a relação estabelecida entre deficiência do sistema complemento e autoimunidade tem sido demonstrada pela falta de depuração de imunocomplexos e células apoptóticas (40).

Autoanticorpos

As doenças autoimunes caracterizam-se pela presença de autoanticorpos. A sua deteção permite o diagnóstico, monitorização clínica e da eficácia terapêutica de numerosas doenças autoimunes.

Em muitos doentes com patologia autoimune é possível identificar autoanticorpos contra anticorpos antinucleares (*Antinuclear Antibodies* - ANA) (anti-dsDNA, anti-Sm, anti-Ro, entre outros), e contra anticorpos citoplasmáticos.

Tendo em conta a doença, pode-se indicar os possíveis autoanticorpos presentes, por exemplo, nas doenças autoimunes sistémicas como o LES pode-se identificar autoanticorpos ANA positivo (Anti - dsDNA, anti - Sm) (41).

Já os autoanticorpos anti-SS-A (Ro) e anti-SSB (La) são mais característicos no Síndrome de Sjogren. Os anticorpos anti centrómero cursam no CREST.

Durante o estágio verifiquei que um dos testes de rastreio mais frequentemente utilizado é a pesquisa dos autoanticorpos ANA, que auxiliam no diagnóstico, monitorização e prognóstico das doenças autoimunes como o LES, síndrome de Sharp, síndrome de Sjogren, esclerose sistêmica, entre outras, e determinar uma doença iminente em um indivíduo assintomático (42)(43). Um resultado negativo praticamente exclui o diagnóstico de LES, sendo que 95% dos pacientes com LES são ANA positivos, e apresentam concentrações altas de anticorpos, mas é importante reforçar que um resultado positivo não é confirmatório (44)(43).

III.2 Parâmetros

O LES é uma doença crônica multissistêmica caracterizada por inflamação em múltiplos órgãos, incluindo os rins, o coração, o pulmão e o cérebro. O LES é, por ventura, a doença autoimune mais bem estudada e compreendida atualmente. No decurso desses estudos foi criada a pesquisa do ANA, que atualmente inclui anticorpos que atacam componentes nucleares, citoplasmáticos e ribossomais.

Durante os estudos do LES, o primeiro autoanticorpo descoberto foi o anti-DNA de cadeia dupla (anti-dsDNA), seguidamente os anticorpos anti-antígeno Smith (anti-Sm) e anticorpos anti-histonas, consideradas, na época, os marcadores para o diagnóstico do LES (45).

Ao longo dos anos, foram-se descobrindo outros possíveis marcadores específicos para o LES, como as ribonucleoproteínas (RNP), SS-A (Ro), SS-B (La), Scl-70, Jo-1 e PM1. Contudo, ainda existe uma sobreposição clínica. A sensibilidade e especificidade também varia dependendo do tipo de CTD subjacente (45).

Nos últimos anos foram descobertos outros autoanticorpos como a topoisomerase I, proteínas do centrômero, RNA polimerase I e III, UM, TM, Ku, Mi-2, RA33, entre outros. Contudo, muitos deles ainda se encontram em estudos para o seu uso na prática clínica e científica (45).

Durante o estágio, o diagnóstico das doenças autoimunes começava com o teste de triagem, concretamente, nas pesquisas do ANA pelo método de imunofluorescência indireta (IFI), que será descrita posteriormente. De seguida a lâmina era analisada no microscópio de fluorescência para identificar a existência ou não de padrões. Se o resultado fosse negativo, a informação era reportada ao médico, caso fosse positivo era analisado o padrão, e consoante o padrão, juntamente com a história clínica, prosseguia-se para a identificação e quantificação do(s) anticorpo(s) presentes na amostra, pelo método de ELISA ou de imunoblots/dots que serão descritos posteriormente.

Os estudos do diagnóstico de LES claramente ajudou na efetivação do diagnóstico de muitas outras doenças autoimunes, particularmente as de forma reumática, como a síndrome de Sharp, síndrome de Sjogren, esclerose sistema, entre outros. Por esse motivo, descrevo os principais autoanticorpos pesquisados para diagnóstico do LES.

III.2.1 Anti-DNA

A identificação de autoanticorpos anti ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid* - DNA) é importante no diagnóstico do LES.

Para o diagnóstico do LES, a detecção de cadeia dupla de DNA (*double stranded DNA* – dsDNA) é considerado um dos principais critérios. Normalmente no teste de triagem observa-se um padrão nuclear homogêneo, ou seja, a presença de dsDNA na amostra está associada ao padrão nuclear homogêneo. Se historia clínica apresentar suspeitas do LES, prossegue-se com a quantificação do dsDNA pelo método de ELISA (46).

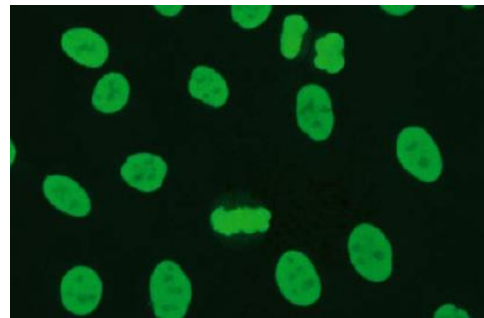


Figura 33 - Padrão nuclear homogêneo observado ao microscópio de fluorescência

A prevalência dos autoanticorpos anti-dsDNA no LES é de 60 a 90%, mas em caso de resultado negativo, este não exclui na totalidade a existência do LES. Para além do LES, estes autoanticorpos também podem ser identificados em outras doenças autoimunes e infeções (47)(43).

III.2.2 Anti-histona

As histonas fazem parte das proteínas nucleares que se ligam ao dsDNA formando nucleossomas. São conhecidas como subunidades funcionais de cromossomas no núcleo celular. Encontram-se classificadas em 5 tipos distintos, H1, H2A, H2B, H3 E H4. Eventualmente, é possível a formação de todos os autoanticorpos contra os 5 tipos, mas os mais frequentes são os anticorpos anti-H1 e anti-H2B.

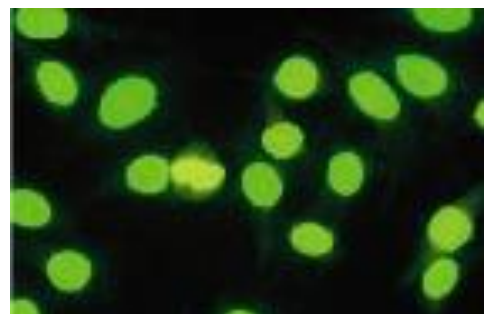


Figura 34 – Padrão nuclear homogêneo observado ao microscópio de fluorescência

Estes anticorpos também podem estar presentes no LES. Geralmente no teste *screening*, na pesquisa de ANA estão associados ao padrão nuclear homogêneo. A quantificação deste anticorpo por ELISA também vai

depende se a história clínica aponta para lúpus eritematoso induzido por medicamentos, LES ou artrite reumatoide (46)(43).

A prevalência desses autoanticorpos no lúpus eritematoso induzido por medicamentos é de 95%.

Contudo, estes autoanticorpos também podem se fazer presente no LES com uma prevalência de 95%, e na artrite reumatoide com uma prevalência de 15% a 40% (43).

III.2.3 Anti-nRNP/Sm

A proteína ribonuclear (nRNP/Sm) de baixo peso molecular, os anticorpos, reagem apenas as proteínas do núcleo, A, C e 70 kDa de U1-nRNP.

No teste de triagem, na pesquisa de ANA, os autoanticorpos anti-nRNP/Sm estão associados ao padrão nuclear granular grosso. Se a história clínica indicar suspeita de síndrome de Sharp ou LES, realizam-se testes confirmatórios dos anticorpos anti-nRNP/Sm pelos métodos de imunoblots ou imunodots (46)(43).

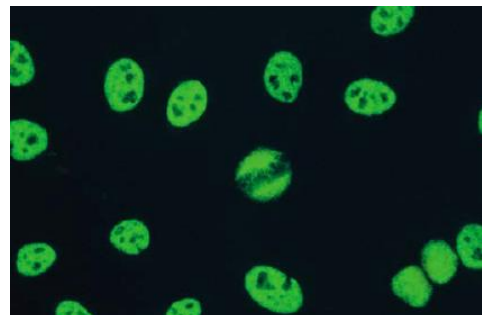


Figura 35 - Padrão nuclear granular grosso observado ao microscópio de fluorescência.

Verifica-se uma prevalência de 95% a 100% de autoanticorpos anti-nRNP/Sm na síndrome de Sharp

ou doença mista do tecido conjuntivo (DMTC), deste modo, é considerado um marcador característico desta doença. Contudo, também é possível verificar autoanticorpos anti-nRNP/Sm em pacientes com LES, indicando uma prevalência de 15% a 40% (47).

III.2.4 Anti-Sm

O antígeno Smith (Sm) é um tipo de proteínas ribonucleares que participam na união do RNA pré-mensageiro (pré-mRNA). O Sm é um RNA de baixo peso molecular, com elevado teor de uridina (U-RNA) e múltiplas proteínas, com massas moleculares de 9 a 70 kDa.

Os autoanticorpos anti-Sm, quando realizado a pesquisa de ANA, estão associados ao padrão nuclear granular grosso, e se a história clínica indicar suspeita de LES, estes anticorpos serão doseados pelos métodos de imunoblots ou imunodots (46).

Os autoanticorpos anti-Sm são considerados como um dos importantes marcadores, pois têm uma prevalência de 5% a 40% nos doentes com LES e têm uma ótima especificidade acima de 90% para o LES. Os anticorpos anti-Sm associados aos anticorpos anti-dsDNA são considerados patognomônicos para o LES (47).

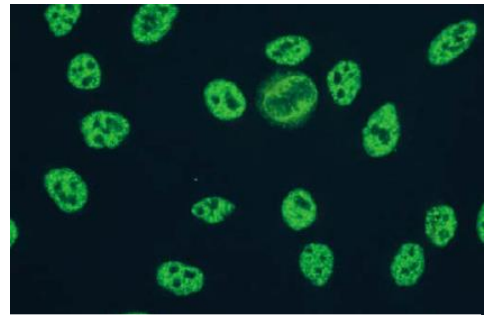


Figura 36 - Padrão nuclear granular grosso observado ao microscópio de fluorescência.

A prevalência entre as diferentes etnias é variável, nos Caucasianos é acima de 5% a 10%, nos Árabes é de 20% a 42% e volta de 30% nos Africanos e Chineses (47).

III.2.5 Anti-SS/A (Ro)

A substância solúvel A (SS/A) associado a síndrome de Sjogren A (SS/A), é um conjunto de pequenos RNA nucleares que se localizam no citoplasma. Os autoanticorpos anti-Ro são proteínas do núcleo da célula. Os autoanticorpos anti-SS-A podem ser detetados em diversas doenças autoimunes. O modo de aquisição destes anticorpos normalmente ocorre pela transmissão através da placenta ao feto, induzindo reações inflamatórias, bloqueio cardíaco congênito em casos de mães anti-SS/A(Ro) positiva, especialmente na presença de anti-SS/B (Anti-La).

Quando é feito o teste de pesquisa de ANA, como exame de triagem, estes anticorpos são associados ao padrão nuclear granular fino. Se a informação médica apontar para síndrome de Sjogren ou LES faz-se a quantificação deste anticorpo pelas técnicas imunoblots ou imunodots (46).

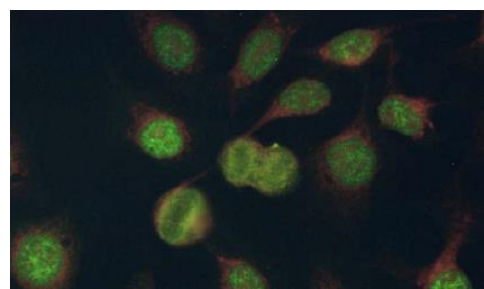


Figura 37 - Padrão nuclear granular fino observado ao microscópio de fluorescência

Relativamente as doenças, os anticorpos anti-SS-A (Ro) são frequentemente detetados na síndrome de Sjogren com uma prevalência de 45 a 95%. Também são detetados no LES e a prevalência é de 20 a 60%, em casos de cirrose biliar primária, com a prevalência nos doentes a ser de 20%. No lúpus eritematoso neonatal, também é possível detetar os anticorpos anti-SS-A (Ro), em quase todos os pacientes. Ou seja, a prevalência é de 100% (47).

III.2.6 Anti-SS/B (La)

O SS/B, conhecido como substância solúvel B, associada a síndrome de Sjogren, fator necessário que está envolvido na terminação da transcrição no núcleo pelo RNA polimerase III.

No teste de pesquisa de ANA, estes anticorpos estão associados a um padrão nuclear granular fino denso. Se a história clínica indicar suspeita de síndrome de Sjogren, LES ou lúpus eritematoso neonatal, estes anticorpos são quantificados pelos métodos de imunoblots ou imunodots (46).

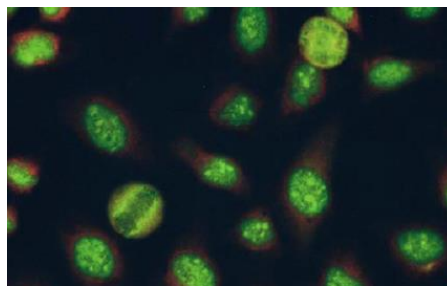


Figura 38 - Padrão nuclear granular fino denso observado ao microscópio de fluorescência

Os autoanticorpos anti SS/B (La) encontram-se apenas nas mulheres com síndrome de Sjogren, associado a uma prevalência de 40 a 95%.

Estes anticorpos também podem ser detetados no LES com prevalência de 10 a 20% e no lúpus eritematoso neonatal com uma prevalência é de 75% nos doentes.

Os principais marcadores da síndrome de Sjogren são os anticorpos anti-SS/B (La) e anti-SS/A combinados (47).

III.2.7 Anti-PCNA

O antígeno nuclear de proliferação celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen* - PCNA) é uma proteína auxiliar da DNA polimerase delta e também está envolvido na regulação do ciclo celular, quando presente inicia-se a fase S e a proteína sofre rutura a meio da fase G2.

Quando se faz o teste de triagem pela pesquisa de ANA, os anticorpos anti-PCNA estão associados a uma variação de padrões consoante as fases do ciclo celular, conhecido como padrão PCNA. Se a história indicar suspeita de LES, prossegue-se o doseamento pelos métodos de imunoblots ou imunodots (46).

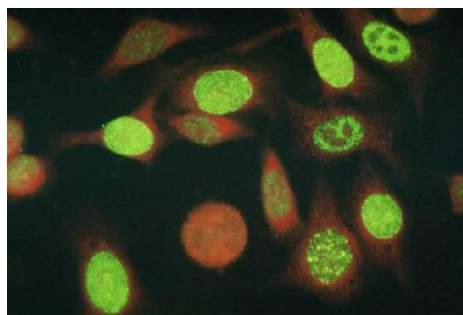


Figura 39 - Padrão PCNA observado ao microscópio de fluorescência

Os autoanticorpos anti-PCNA são exclusivamente detetados no LES ocorrendo em 3% dos doentes e têm uma especificidade de 99% (47).

III.2.8 Anti-A/PRib

As proteínas-P ribossomais (A/PRib) correspondem a três proteínas da subunidade ribossômica 60S. Os autoanticorpos anti-A-PRib são marcadores específicos no diagnóstico do LES.

Na realização do teste de pesquisa de ANA, estes anticorpos estão associados a um padrão citoplasmático homogêneo, com acentuação perinuclear que está relacionada ao padrão nucleolar. Tendo em consideração a informação médica, em caso de suspeita de LES, estes anticorpos são quantificados pelas técnicas de imunoblots ou imunodots (46).

Nesta doença, a concentração do anticorpo anti-A-PRib não é diretamente proporcional a atividade da doença. A prevalência deste anticorpo nos doentes com LES é de 10% (47).

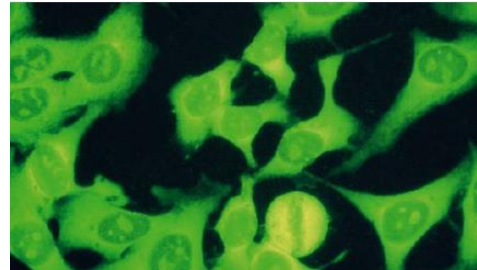


Figura 40 - Padrão citoplasmático homogêneo, com acentuação perinuclear que está associado ao padrão nucleolar

III.2.9 Anti-Nucleossoma

Os nucleossomas são subunidades funcionais de cromossomas nucleares da célula, constituídos por histonas e dsDNA. Os autoanticorpos anti-nucleossoma podem estar presentes no LES.

Nos testes de triagem pela pesquisa de ANA, os autoanticorpos anti-nucleossoma estão associados ao padrão nuclear homogêneo. Se a informação médica indicar suspeita de LES ou esclerose sistêmica, segue-se o doseamento do anticorpo anti-nucleossoma pelo método de ELISA (46).

Durante o estágio utilizou-se o kit do Euroimmun, para a detecção de anticorpos anti nucleossoma que utiliza uma preparação nova de antigénio, que apresenta uma elevada purificação juntamente com uma especificação de aproximadamente 100% para o LES (47).

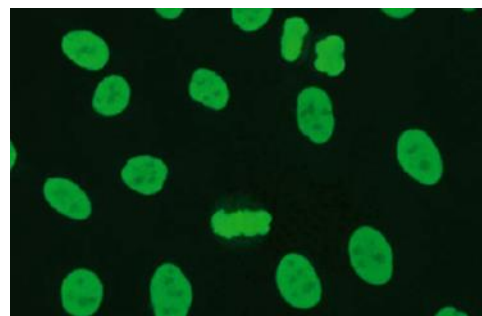


Figura 41- Padrão nuclear homogêneo observado ao microscópio de fluorescência.

III.3 Métodos

Na secção de imunologia, desenvolveu-se algumas técnicas como a Pesquisa de ANA, ELISA, Imunodots/blots, Imunofenotipagem celular por citometria de fluxo, RPR-carbono, Treponema pallidum Hemagglutination Assay (TPHA), Rosa Bengala, Imunodifusão radial (IDR), entre outros. De seguida passo a descrevê-los.

III.3.1 Pesquisa de Anticorpos Antinucleares – ANA

ANA é o teste de triagem para a pesquisa de autoanticorpos no diagnóstico de quase todas as doenças reumáticas autoimunes sistémicas porque a sua sensibilidade é maior comparada com outros testes, embora a sua especificidade seja menor. O método padrão para deteção de ANA é a Imunofluorescência Indireta (IFI) em células epiteliais humanas do carcinoma da laringe (HEp-2) (48).

Na pesquisa dos ANA, os antígenos estão presentes nas células HEp2. Estas células são incubadas com o soro do doente. Se neste existirem autoanticorpos, estes ligam-se ao antígeno correspondente. A ligação é visualizada através de um segundo anticorpo dirigido contra os autoanticorpos presentes. O segundo anticorpo é conjugado com uma molécula fluorescente de Isotionato de Fluoresceína (*Fluorescein Isothiocyanate* - FITC). A leitura é feita em microscópio de fluorescência. É possível assim identificar anticorpos dirigidos contra autoantígenos nucleares, contra antígenos expressos durante o ciclo celular e autoantígenos presentes no citoplasma. A distribuição dos antígenos nas células vai definir o padrão de fluorescência observado (43).

Durante o estágio, o sistema comercial usado para a leitura automatizada de IFI para os testes de ANA foi o Euroimmun.

Os testes de IFI identificam mais de 50 autoanticorpos contra 30 diferentes antígenos citoplasmáticos e nucleares. O uso de grandes células cultivadas com elevado número de mitoses, permite o reconhecimento adequado de padrões, pela avaliação da distribuição de fluorescência durante diferentes fases do ciclo celular, como a interfase e a mitose celular (48).

Fazem parte dos padrões nucleares: padrão homogénio, padrão periférico, padrão granular grosso, padrão granular fino, padrão granular fino denso, padrão PCNA, padrão granular difuso com mitoses, padrão centrómero, padrão nucleolar homogénio, padrão granular nucleolar, padrão aglutinado nucleolar, padrões múltiplos, padrão centríolo, padrão MAS, entre outros (48).

Os padrões citoplasmáticos são, entre outros: padrão homogêneo difuso, padrão granular fino, padrão granular discreto, padrão de fibras citoplasmáticas.

Um teste positivo requer a realização de testes de segunda linha que permitem a identificação precisa do anticorpo envolvido. Os testes de segunda linha mais utilizados são o ELISA e os imunodots/blots.

III.3.2 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática - ELISA

O ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* -ELISA) é uma técnica bastante utilizada para quantificar anticorpos ou hormonas no soro humano.

O método de ELISA para a pesquisa e quantificação de anticorpos passa pela sensibilização de uma superfície sólida com antigénio, de seguida adiciona-se amostra em estudo para promover a ligação do anticorpo presente na amostra com o antigénio presente na placa (49).

Após esta etapa prossegue-se á lavagem para remover os não ligantes, de seguida adiciona-se o segundo anticorpo ligado a uma enzima como a peroxidase. Este anticorpo irá ligar-se ao primeiro anticorpo e de seguida segue-se o processo de lavagem de modo a remover os anticorpos não ligantes (49).

A seguir a este passo, adiciona-se um substrato cromogénio que irá ligar-se a enzima promovendo a produção de cor. A quantidade e a identificação de anticorpo em questão é medida pela produção de cor que se traduz num sinal detetável (49).

III.3.3 Imunoblot

Os dispositivos que recorrem esta técnica contêm tiras de teste revestidas com linhas paralelas de antigénios altamente purificados.

Numa primeira fase do teste, as amostras dos pacientes previamente diluídas são adicionadas em cada canal que contém tira de teste de imunoblot e incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos num agitador rotativo (47).

Após o tempo da incubação remove-se o líquido de cada canal e todos eles são lavados entre 3 a 5 minutos com tampão de lavagem no agitador rotativo. Em situações de amostras positivas os anticorpos se presentes ligam-se ao antigénio correspondente (47).

Para a deteção de formação do complexo antigénio-anticorpo adiciona-se em cada canal conjugado enzimático (imunoglobulina IgG, IgM ou IgA anti-imunoglobulina humana marcada com fosfatase alcalina) previamente diluído e deve ser novamente incubado a temperatura

ambiente cerca de 30 minutos num agitador rotativo. Este conjugado enzimático catalisa uma reação que produz cor (47).

Após a incubação remove-se novamente o líquido em todos os canais e prossegue-se com a lavagem dos canais entre 3 a 5 minutos com tampão de lavagem no agitador rotativo.

De seguida adiciona-se solução de substrato nos canais e incuba-se por 10 minutos a temperatura ambiente no agitador rotativo.

Depois deste processo, lavam-se os canais de suporte com água destilada de 3 a 1 minuto. Por fim, as tiras de teste de imunoblot são colocadas no protocolo de avaliação e deixa-se secar a temperatura ambiente, de seguida os resultados são avaliados (47).

Os kits comerciais utilizados durante o estágio foram o Euroimmun. Estes eram utilizados em casos de ANA positivo.

III.3.4 Imunofenotipagem celular por citometria de fluxo

A imunofenotipagem por citometria de fluxo permite identificar e quantificar proteínas expressas pelas células.

As células em suspensão são incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com moléculas fluorescentes (fluorocromos) que emitem luz em diferentes comprimentos de onda. A quantidade de luz dispersa é proporcional à quantidade de antígeno presente na célula. Os sinais luminosos são convertidos pelos softwares em dados digitais que são apresentados em gráficos denominados histogramas que podem ser monoparamétricos ou bi-paramétricos.

A imunofenotipagem de linfócitos por intermédio da citometria de fluxo, tem sido utilizada na quantificação de subpopulações linfocitárias na vigência de alguns estados patológicos e/ou nas alterações do sistema imunitário.

Para uma interpretação correta dos gráficos, é importante saber que todos os leucócitos expressam CD45⁺ (50), sendo que os linfócitos expressam maior intensidade. Isto porque são células com pouquíssima granulação, e quanto maior for a granularidade menor é a intensidade da expressão de CD45⁺ e vice-versa.

Relativamente aos linfócitos, o receptor CD3 é positivo para os LT (LTh, LT citotóxicos) e o mesmo marcador é negativo para os LB e NK. O marcador CD4 é positivo para os LTh, e negativo para os LT citotóxicos e NK (51). O receptor de superfície CD8 é positivo para LT citotóxicos e numa subpopulação de células NK, e negativo para LTh. Os marcadores positivos para os LT NK são CD16 e CD56 (51).

Em suma, os perfis fenotípicos normais de células linfocíticas maduras presentes no sangue periférico são os seguintes: LTh (CD45⁺, CD3⁺ CD8⁻ CD4⁺), LT citotóxicos (CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ CD4⁻), linfócitos NK (CD45⁺ CD3⁻ CD8⁻ CD4⁻) (51), LB (CD45⁺ CD19⁺ CD20⁺ CD22⁺ CD8⁻ CD4⁻) (51)(52).

O método de imunofenotipagem por citometria de fluxo, diferencia e reconhece células normais, também consegue estruturar e diferenciar os perfis fenotípicos das células anormais no organismo, o que ajuda no diagnóstico de muitas doenças como é o caso de Leucemias e dos linfomas Hodgkin e Não-Hodgkin.

A imunofenotipagem tem sido utilizada para auxiliar na classificação e no diagnóstico de algumas neoplasias hematológicas, tais como, leucemias, linfomas, neoplasias de células plasmáticas, síndromes mielodisplásicas, entre outras doenças, e é ainda útil na monitorização e diagnóstico do vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus* – HIV). Na secção de Citometria do Serviço de Patologia clínica do CHLC procede-se à quantificação de populações linfocitárias essencialmente em doentes HIV positivos e à Tipagem HLA B27.

III.3.4 Carbono - RPR

O carbono (*Rapid Plasm Reagin* - RPR) é uma forma modificada do clássico (*Venereal Disease Research Laboratory* – VDRL). É um teste de aglutinação, não treponémico, que auxilia no diagnóstico de sífilis, através da análise/determinação qualitativa e semi - quantitativa de anticorpos no soro humano. Estes anticorpos são conhecidos como um grupo de imunoglobulinas que atacam o próprio organismo, produzidos por doentes com sífilis (53).

A patologia em questão é causada pela bactéria *Treponema pallidum*, que provoca danos no fígado e coração. As lesões geram libertação de minúsculos fragmentos destes órgãos para os vasos sanguíneos, estes antigénios não são reconhecidos pelo próprio organismo, levando a produção de anticorpos dirigidos contra os mesmos fragmentos (53).

O RPR é realizado em pacientes com suspeita de infeção por *Treponema pallidum*.

Na realização do teste, quando os elementos de carbono entram em contacto com o soro que contém anticorpos em pesquisa, dá-se aglutinação das partículas, o que indica resultado positivo, na ausência de aglutinação é considerado resultado negativo (53).

A análise do teste RPR auxilia na monitorização terapêutica do paciente e também é usado como teste de triagem, enquanto que os testes treponémicos são usados como testes confirmatórios para os soros reativos nos testes de triagem (53).

III.3.5 Ensaio de hemaglutinação *Treponema pallidum* - TPHA

O teste de ensaio de hemaglutinação *Treponema pallidum* (*Treponema pallidum* Hemagglutination Assay - TPHA) é um teste indireto de hemaglutinação para análise e determinação qualitativa e semi – quantitativa de imunoglobulinas específicas, dirigidas contra anti-*T. pallidum* em soro humano (54).

Esta bactéria é conhecida como o agente causal da doença sífilis, onde a transmissão dá-se pelo contacto direto com a lesão e ocorre principalmente durante o ato sexual (54).

Recorre-se a este exame, depois de um resultado positivo no teste de triagem (RPR ou VDRL).

Ao executar o teste, quando os eritrócitos de aves estabilizados e sensibilizados com componentes antigénicos do *Treponema pallidum* entram em contacto com os anticorpos anti – *T. pallidum*, dá-se o fenómeno de aglutinação com padrões específicos, indicando assim, resultado positivo. Na ausência de aglutinação o teste será classificado com negativo para anti – *T. pallidum* (54).

III.3.6 Rosa de Bengala

O teste de Rosa de Bengala é um exame que determina qualitativamente e semi – quantitativamente os anti-*Brucella* em soro humano ou animal (55).

Este exame é realizado nos testes de triagem, em doentes com suspeita de brucelose.

A brucelose é uma doença infecciosa de origem animal causada por um cocobacilo gram-negativo do género *Brucella*, adquirida normalmente pela ingestão de leite e derivados contaminados, por este fato, efetivar os exames de Rosa de Bengala torna-se um recurso laboratorial muito importante.

Para a realização do exame, o soro do paciente é colocado em contacto com o antigénio Rosa de Bengala, em caso da amostra possuir anticorpos específicos (IgG ou IgM) da brucelose, desenvolve-se uma reação de aglutinação, dado como resultado positivo, na ausência de aglutinação o resultado é reportado como negativo (55).

III.3.7 Imunodifusão Radial - IDR

A Imunodifusão Radial (IDR) é um método que se realiza nos testes de triagem para dosear as concentrações de diversos antigénios solúveis em fluidos corporais.

A técnica realizada comporta a difusão radial de antígeno através de um poço cilíndrico, em gel de agarose, que contém anticorpo mono-específico adequado. As amostras são aplicadas em “poços” circulares já feitos no gel. À medida que a difusão ocorre, a reação antígeno-anticorpo forma anéis de precipitação, e a conclusão da formação dos círculos de precipitação dá-se quando se atinge o equilíbrio entre o processo de formação e de degradação desses complexos (56).

Nessa fase, a concentração do antígeno é diretamente proporcional ao raio do círculo de precipitação. Para medir o diâmetro do círculo do precipitado, utiliza-se uma tabela de referência que faz uma relação linear entre o diâmetro do anel formado com a concentração de proteínas (56).

E desta forma consegue-se fazer o doseamento da proteína em estudo.

Durante o estágio utilizou-se esta técnica para quantificar proteínas do Sistema do Complemento.

III.4 Equipamentos

III.4.1 BD FACS Canto II®

BD FACS Canto II é um dos equipamentos que se encontra na área de imunologia e hematologia clínica. Este aparelho funciona com base no princípio de citometria de fluxo. A citometria de fluxo é uma metodologia que recorre ao princípio da dispersão de luz e da emissão de fluorescência, utilizando fluorocromos conjugados a anticorpos monoclonais específicos para identificar populações celulares (57).

No CHCL, este aparelho é utilizado para vários fins, tais como, identificação de LB e LT, para monitorização de doentes com HIV, diagnóstico de leucemias e de outras doenças hematológicas.

III.4.2 Capillarys Sebia 2®

Capillarys Sebia 2 é utilizado para a separação das proteínas existentes numa amostra de soro. Para tal efeito, o aparelho funciona com a tecnologia de eletroforese capilar (EC). A EC é a técnica de quantificação de proteínas através de um tubo capilar de sílica fundida (58).

A EC é uma técnica desenvolvida na última década para usos em laboratório clínico. O processo decorre com um pequeno volume de amostra que de seguida é aspirado num tubo capilar de sílica fundida. A forte carga negativa no interior do capilar, juntamente com o

revestimento estreito, fornece uma grande área de superfície negativa. Sob condições de eletroforese, isso define um forte fluxo endosmótico de cátions em direção ao cátodo. Neste sistema do fluxo endosmótico é mais forte do que a atração do ânodo para as proteínas aniônicas. As proteínas, então, migram em direção ao cátodo, com base na carga negativa das proteínas. Assim, o campo elétrico separa as proteínas por carga. O detetor determina a concentração da proteína (58).

Dependendo do perfil que se possa obter na EC, pode-se, posteriormente, dosear-se e saber-se qual é a proteína que está aumentada ou diminuída, o que, conseqüentemente, poderá facultar na informação do tipo de distúrbio presente. Em suma, é conveniente a realização de eletroforese em doenças hepáticas, inflamatórias e / ou infecciosas, renais e nas gamapatias monoclonais.

III.4.3 Hydrasys Focusing®

O aparelho Hydrasys Focusing® tem como metodologia de funcionamento a imunoeletroforese.

A imunoeletroforese é a combinação de eletroforese convencional com a técnica de imunofixação. Inicialmente, separam-se as principais proteínas séricas de uma amostra num gel (agarose), seguindo-se, numa segunda fase, a fixação e a precipitação dos complexos anticorpo-antígeno. O gel é removido do aparelho e as calhas contêm anticorpos que reagem com três principais classes de cadeias pesadas γ (IgG), α (IgA), μ (IgM) cadeias leves κ e λ (58).

Esta técnica é utilizada nos estudos de gamapatias monoclonais. Após a realização da eletroforese, se houver aumento ou diminuição na região gama em situações aparentemente monoclonais ou policlonais, é necessário identificar e caracterizar a(s) imunoglobulina(s) envolvidas (57).

III.4.4 Dade Behring Nefelómetro BN II®

O equipamento Dade Behring Nefelómetro BN II® é um dos aparelhos utilizados na área da imunologia clínica e funciona através do princípio de nefelometria.

Este princípio é baseado no processo de formação de complexos antígeno-anticorpo, que, depois de precipitados, são capazes de dispersar ou refletir a luz que passa pela amostra onde estão presentes. A determinação do precipitado formado é feita através de um detetor (57).

No departamento de imunologia do laboratório de patologia clínica do Hospital São José o aparelho Dade Behring Nefelómetro BN II® é utilizado para medir as concentrações de IgA, IgM e IgG, c3, c4, cadeia δ e IgD, haptaglobina, pré-albumina e fator reumatoide, entre outras proteínas plasmáticas presentes numa amostra.

III.4.5 Triturus®

O equipamento Triturus® é utilizado nos exames de rotina e o seu funcionamento é regido pelo princípio denominado ELISA.

ELISA é uma técnica que deteta e quantifica proteínas em fluídos biológicos (57).

Para a pesquisa de autoanticorpos, a técnica de ELISA envolve a imobilização do antigénio numa superfície sólida, um anticorpo específico é então exposto na mesma superfície sólida para que se possa ligar ao antigénio. É adicionado em segundo anticorpo conjugado a uma enzima, e na fase final adiciona-se um substrato, que reage com a enzima. A alteração de cor traduz-se num sinal detetável, permitindo a identificação e quantificação da proteína em estudo (41).

No Hospital de São José, este aparelho é utilizado para quantificar várias proteínas, como a glicoproteínas IgM e β_2 , glicoproteínas IgG, gliadina IgG e IgA, cardioplipina IgM e cardioplipina IgG, dsDNA, entre muitas outras.

Em casos de suspeitas de doença celíaca, artrite reumatoide, doenças autoimunes, síndrome antifosfolipídico entre outras patologias são doseadas as respetivas proteínas.

III.4.6 Architect i2000®

ARCHITECT i2000® baseia-se no princípio de espectrofotometria e tem como função determinar a concentração de inúmeros marcadores biológicos.

O princípio da espectrofotometria é o método de análise ótica que mede a intensidade emitida da luz a um determinado comprimento de onda. A conceção fotométrica permite determinar a quantidade da luz emitida, independentemente do comprimento de onda, ou seja, é a medição da intensidade da luz absorvida por uma amostra, medindo-se, também, a quantidade de luz que chega ao detetor (36).

A Lei de Beer defende que a quantidade de um analito é diretamente proporcional à quantidade de luz absorvida, e inversamente proporcional ao logaritmo da luz transmitida (36).

Este aparelho quantifica uma grande diversidade de proteínas, como CMV IgG e IgM, rubéola IgG e IgM, anticorpo anti-HIV, anticorpo anti-HCV e anticorpo anti-HBC e HBS, entre outros elementos.

IV. Microbiologia

IV.1 Introdução

Laboratorialmente, a microbiologia clínica examina amostras orgânicas, com o intuito de isolar e identificar potenciais microrganismos que podem ser a causa, direta ou indireta, das doenças infecciosas.

Na prática clínica, a estratégia para diagnosticar uma doença num paciente passa por obter uma boa história clínica por parte do médico, que decide quais os testes a realizar. Nesta decisão devem ter em conta informações sobre quais os agentes infecciosos mais frequentemente presentes no quadro clínico em estudo, as hipóteses de diagnóstico que se colocam, a fase evolutiva da doença infecciosa e a elaboração dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos (59).

IV.2 Parâmetros

IV.2.1 Hemocultura

A hemocultura é um teste laboratorial onde o sangue do paciente é inoculado em frascos que contêm um meio nutritivo para certos microrganismos, como as bactérias e os fungos, de modo a testar a sua presença a ou não na amostra (60).

Normalmente este teste é requisitado em casos de suspeita de infeção ou sépsis.

A colheita de sangue para hemocultura deve ser executada em 3 amostras de sangue num intervalo de 24 horas, de forma aleatória. A colheita nas 3 amostras deve respeitar um determinado volume. Nos adultos, este volume deve corresponder a cerca de 20 mL distribuídos por 2 garrafas, sendo que cada garrafa deverá ter uma proporção de 1:10 (amostra/anticoagulante), enquanto que nas crianças e recém-nascidos o volume é bem menor, e a quantidade da amostra depende do peso corporal do paciente (61).

Nos casos de análises em adultos ou crianças, após a inoculação do sangue nos dois frascos de meio nutritivo, estes devem ser incubados. A incubação é feita no aparelho BacT ALERT® durante 5 dias à temperatura de 37°C (60).

Em caso de amostra positiva, em pelo menos um dos frascos, recorre-se ao exame direto (microscópio) e ao indireto (cultural). O exame direto ou microscópico consiste na observação da morfologia das possíveis bactérias existentes no meio, após a realização da coloração de Gram. Juntamente a este teste, realiza-se a sementeira de sangue em dois meios de crescimento de cultura, gelose de sangue e gelose de chocolate polivitex (PVX), tornando possível o crescimento das bactérias.

A seguir à sementeira, as amostras são incubadas durante 24 horas à temperatura de 37 °C em atmosfera de CO₂.

Se houver crescimento num dos meios de cultura, e após análise macroscópica das colónias, o médico solicita o isolamento de uma colónia, com a finalidade de identificar a estirpe bacteriana no analisador automático VITEK® MS. Depois da identificação, fazem-se os estudos de antibiograma, isto é, o Teste de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA), com um perfil de antibióticos para o microrganismo em estudo.

Posteriormente a este processo é testada a concentração mínima inibitória (CMI), de modo a indicar adequadamente qual é a terapêutica.

Os microrganismos mais frequentes e isolados ao longo do estágio foram: *Staphilococcus spp.*, *Klebsiella pneumonie*, *Haemophilus spp.*, *Salmonella spp.*, *Micrococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*.

Caso o resultado seja negativo, as placas permanecem incubadas até ao fim dos 5 dias de incubação.

IV.2.2 Líquido cefalorraquidiano - LCR

O líquido cefalorraquidiano é um fluído obtido por punção lombar, apresentando um aspeto límpido, cristalino e transparente. Este líquido orgânico, no seu estado normal, é estéril, o que exige uma colheita cuidadosa, utilizando um tubo estéril e fechado, e a amostra deve ser imediatamente entregue no laboratório (61).

Ao chegar à secção de microbiologia, é feita a coloração de Gram, que irá indicar o agente com certa fiabilidade, realizando-se também o exame cultural, que implica um manuseamento consciente e cuidadoso, devido à grande sensibilidade dos microrganismos que possam estar presentes na amostra (61).

Todos os testes realizados a partir de LCR são manuseados no departamento específico de pesquisa de microrganismos altamente contagiosos. Em certas situações, o líquido límpido pode conter um elevado número de células, o que se verifica em processos crónicos e agudos.

Nesta amostra, as bactérias mais frequentemente encontradas são *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*. Todos estes microrganismos causam meningite, por isso este exame é efetuado em casos de suspeita de meningite.

IV.2.3 Urina Assética

A urina assética é considerada um produto estéril, sem contaminações de microrganismos. Este produto é uma das amostras utilizadas na área da microbiologia para pesquisas bacteriológicas e micológicas. A sua análise normalmente é solicitada em situações de suspeita de infeção do trato urinário.

A urina assética é uma amostra com algumas atenções a tomar na hora da colheita, uma vez que existem microrganismos que fazem parte da flora da uretra e que facilmente a contaminação da amostra. No momento da colheita, para evitar contaminações da uretra, deve-se lavar a área genital, descartar a primeira parte da micção e colher apenas a micção intermédia de forma a evitar a contaminação celular. É importante encaminhar as amostras de imediato ao laboratório, para evitar a precipitação de alguns elementos que podem ser encontrados na urina (62)(61).

No laboratório de microbiologia onde estagiei, após a receção da amostra na triagem de microbiologia, esta é utilizada para fazer o exame cultural, em meio de gelose de sangue e MacConkey, no aparelho PREVI® Isola. Depois da realização da sementeira, as amostras são incubadas durante 24 horas numa atmosfera de aerobiose.

Em caso de crescimento bacteriano, e após análise macroscópica do mesmo, o patologista responsável deve sugerir o isolamento de uma colónia, com o objetivo de conseguir caracterizá-la e identificá-la pelo VITEK® MS ou VITEK® 2. De seguida também se efetua o TSA. Este fornece-nos informações acerca da sensibilidade dos agentes em estudo a determinados antimicrobianos.

Em caso de alguma dúvida, pode-se recorrer à coloração de Gram da amostra em questão, fazendo-se uma observação da lâmina ao microscópio, de forma a recolher mais informações.

Os microrganismos mais frequentes e isolados ao longo do estágio pertencem à família das *enterobacteriaceae*, como a *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*,

Enterobacter spp., *Pseudomonas spp.* Para além das *enterobacteriaceae*, também foram identificados *Staphylococcus spp.*.

Caso o resultado seja negativo, as amostras são descartadas e o relatório é enviado ao médico.

Em suma, a técnica urocultura, uma vez que tem como amostra a urina assética, o crescimento de microrganismos no meio de cultura geralmente fornece informações acerca do agente etiológico que provoca a infeção e possibilita a realização do TSA, indicando possíveis terapêuticas. A grande limitação associada é a demora para obter o resultado dos testes (62).

IV.2.4 Exsudado vaginal e uretral

Os exsudados vaginal e uretral são amostras utilizadas para pesquisar agentes infecciosos associados a doenças sexualmente transmissíveis, como a sífilis, e infeções da uretra (uretrites) ou da próstata (prostatites). O diagnóstico etiológico de certas condições oferece um grande desafio aos laboratórios de microbiologia. O diagnóstico laboratorial tem um grande impacto na monitorização e controle da doença (63).

A colheita de amostras genitais é sempre feita com algumas indicações, de forma a garantir amostras livres de contaminação, e a entrega das mesmas deverá ser imediata no respetivo laboratório (63).

Assim que as amostras e as respetivas lâminas com coloração de Gram chegam à zona de triagem de microbiologia onde decorreu o meu estágio, estas estão sujeitas aos exames bacteriológicos, as lâminas serão observadas ao microscópio para análise da morfologia das bactérias, caso existam.

Além do exame microscópico, também se realizam exames culturais em diferentes meios de cultura, tais como gelose de sangue, PVX, VCAT3, cândida ID, granada e chocolate hemófilos. Estes meios são usados consoante a situação fisiológica ou a faixa etária. Por exemplo, o meio de crescimento granada é utilizado para pesquisa de *Streptococcus agalactiae* nas amostras de mulheres grávidas, para detetar portadores de *Streptococcus agalactiae* e selecionar pacientes que devem administrar a profilaxia antibiótica intraparto, de modo a prevenir a infeção neonatal precoce por *Streptococcus agalactiae*.

Após a realização da sementeira nos respetivos meios de cultura, as amostras serão incubadas em tempos diferentes, a partir de 24 horas e até às 72 horas, e em atmosferas distintas com presença de CO₂ ou ambiente de aerobiose. Quando o exame cultural é feito no

meio de crescimento granada, em situações de 3º trimestre de gravidez, a temperatura de incubação deverá ser de 30°C.

Posteriormente ao tempo de incubação, em caso de crescimento e as colónias forem analisadas macroscopicamente, os patologistas podem solicitar o isolamento da colónia em estudo, com posterior identificação no aparelho VITEK® MS ou VITEK® 2, acompanhado com o TSA no meio de cultura Mueller Hinton, caso seja necessário.

As bactérias mais frequentes encontradas nos exsudados vaginais e uretrais são *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* e *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, respetivamente (63).

Em casos de amostras que indicam resultados negativos, os resultados são reportados aos médicos e as amostras são descartadas (61).

IV.2.5 Expetoração

Existem vários tipos de amostras respiratórias, cuja colheita é feita de acordo com a sintomatologia clínica de infeção respiratória superior ou inferior.

Se a pesquisa do microrganismo patológico for realizada no sistema respiratório superior, a colheita pode ser feita com uma zaragatoa nas amígdalas, faringe posterior, numa área inflamada ou com úlcera. Se a sintomatologia for de sinusite, a amostra é obtida por aspiração das secreções (61).

As colheitas de amostras para o estudo de microrganismos do aparelho respiratório inferior incluem a expetoração, broncoscopia, lavagem broncoalveolar e a aspiração transtraqueal. São, geralmente, mais complicadas de se realizar do que as colheitas de amostras do aparelho respiratório superior (61).

A colheita de expetoração e as colheitas por broncoscopia podem estar contaminadas com bactérias do sistema respiratório superior, razão pela qual a observação da amostra ao microscópio é obrigatória. Se houver contaminação, a amostra deve ser imediatamente descartada e o clínico deve solicitar a colheita de uma nova amostra. As amostras do trato respiratório inferior são sujeitas ao exame cultural.

No laboratório de microbiologia onde decorreu o estágio, os meios de cultura utilizados para o exame cultural são gelose de sangue, gelose de hemófilos e MacConckey. Após a sementeira os produtos finais são incubados entre 24h à 48h numa atmosfera de CO₂. Na fibrose quística é usado o agar de Chapman (MAS) ou o meio de Burkholderia.

Em caso de amostra positiva, as colónias são análise macroscopicamente, e pode-se solicitar o isolamento de uma ou mais colónias para serem estudadas, as quais serão identificadas no aparelho VITEK® MS, e no VITEK® 2 será realizada o TSA.

Os microrganismos patológicos mais frequentes no aparelho respiratório são *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Haemophilus spp.*.

Em caso de resultados dos exames bacteriológicos negativos, as amostras são descartadas e os resultados são repostados ao médico.

IV.2.6 Fezes

Em caso de suspeita de infeções gastrointestinais, o clínico recorre às fezes como amostra ideal. As amostras devem ser transportadas num contentor esterilizado o mais rápido possível para o laboratório, em caso de suspeita de infeções por bactérias entéricas, as quais têm um meio especial de crescimento (61).

No laboratório de microbiologia onde decorreu o estágio, não se submetia as amostras de fezes ao exame microscópico e recorria-se à coprocultura em meios de gelose de sangue e meio de SS (*Salmonela – Shigela*), de seguida as amostras seriam incubadas 24 horas numa atmosfera de aerobiose. Também se pode semear no meio *Campylobacter* até 48 horas em microaerofilia a 42°C. Se o clínico solicitar a pesquisa de *Yersinia spp.*, a sementeira teria que ser realizada no meio YER (*Yersinia*) e incubada entre 24 a 48 horas à temperatura de 30°C. Em caso de pesquisa de *Escherichia coli O157*, a amostra seria semeada no agar SMAC (Sorbitol MacConkey) e incubada durante 24 horas numa atmosfera de aerobiose.

Em caso de crescimento das colónias e o exame macroscópico, é possível a solicitação do isolamento de algumas colónias ou apenas uma delas para identificar e realizar o teste de antibiograma, pelo VITEK® MS e VITEK® 2, respetivamente.

Para auxiliar na identificação do microrganismo, por vezes, recorre-se ao exame direto.

Além da coprocultura, também se realiza o teste de oxidase para pesquisa de *Salmonella spp.* e *Shigela spp.*, sendo que estas têm oxidase negativa e a *Campylobacter spp.* tem oxidase positiva.

Também pode-se fazer o exame parasitológico para pesquisa de *Giardia spp.*, se solicitado (63).

Os microrganismos mais frequentes encontrados em amostras de fezes são *Salmonella spp.*, *Shigela spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*.

Além desses exames, também é possível fazer pesquisas de antígenos através de testes rápidos de bactérias como *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium difficile* (63).

Para além dos exames bacteriológicos, as amostras fecais também são sujeitas aos testes rápidos parasitológicos, para pesquisa de *Giardia intestinalis* e testes rápidos virais de pesquisa de *astrovírus spp.*, *norovírus spp.*, *rotovírus spp.* e *adenovírus spp.*

As amostras com resultados negativos são descartadas e o resultado é repostado ao médico (61).

IV.2.7 Líquido Pleural

O líquido pleural é de cor amarelo claro e de aspeto límpido. Este líquido pode ser classificado como transudado ou exsudado, dependendo da concentração da proteína total (PT). Recorre-se a análise deste líquido em situações de derrame pleural, causado pela produção excessiva de líquido e da sua acumulação no espaço pleural. O derrame pleural pode ocorrer em diversas condições como a pressão hidrostática capilar pulmonar, diminuição da pressão oncótica, aumento da permeabilidade da membrana pleural e obstrução do fluxo linfático (28)(33).

A colheita do líquido é feita por aspiração cirúrgica e a amostra deve ser colocada em tubo estéril e enviada ao laboratório de microbiologia o mais rápido possível.

Quando a amostra chega a triagem, faz-se o exame cultural utilizando três meios de cultura, agar de chocolate, gelose de sangue e BHI (*Brain Heart Infusion*). Após a sementeira os produtos serão incubados durante o tempo, a temperatura e atmosfera adequada.

Depois de terminado o respetivo tempo, é feita uma análise macroscópica, e este pode vir acompanhada por uma solicitação médica de isolamento de uma ou mais colónias que futuramente poderão ser identificadas pelo aparelho VITEK® 2 ou VITEK® MS e realização de TSA se necessário.

Em caso de dúvida, pode-se recorrer a observação microscópica da morfologia do microrganismo em questão na lâmina preparada por coloração de Gram.

Durante o estágio não houve prevalência de nenhum microrganismo patológico, detetam-se *Haemophilus spp.*

Caso o resultado das análises negativem, o resultado deverá ser reportado ao médico.

IV.2.8 Líquido Ascítico ou Peritoneal

O líquido ascítico ou peritoneal é um fluido ultrafiltrado/estéril e amarelo, produzido pelas células do mesotélio. Este líquido lubrifica a cavidade peritoneal no abdômem, prevenindo de choques entre órgãos e no processo de digestão (27). O líquido peritoneal pode ser classificado em transudado ou exsudado, dependendo da concentração da PT.

Análise deste líquido pode ser solicitada pelos médicos em suspeita de cirrose, insuficiência cardíaca, doenças inflamatórias, neoplasias malignas, entre outros (28).

O líquido ascítico é colhido por aspiração e o produto deve ser colocado em tubo estéril e transportado para o laboratório de microbiologia.

Assim que a amostra chega a triagem de microbiologia, são feitas sementeiras nos meios de crescimento de agar de PVX, agar de gelose de sangue e BHI. De seguida as amostras semeadas serão incubadas a um determinado tempo, temperatura e atmosfera.

Em caso de crescimento de colônias, essas serão analisadas macroscopicamente e pode-se solicitar isolamento de uma ou mais colônias a fim de serem posteriormente identificadas pelo VITEK® 2 ou VITEK® MS, e se necessário faz-se o TSA.

Por vezes, recorre-se a observação microscópica do microrganismo pela lâmina feita por coloração de Gram, de forma a confirma o microrganismo presente. Se houver suspeita de microrganismos álcool-ácido resistentes, deve-se preparar as lâminas para coloração de Ziehl Neelsen.

Os microrganismos patológicos comumente identificados no líquido ascítico são a *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Mycobacterium spp.*, e *Nocardia spp.*.

Em situações de resultados negativos, as amostras são descartadas e o resultado é reportado ao médico.

IV.2.9 Líquido Sinovial

O líquido sinovial é um produto que pode ser amarelo claro ou incolor de consistência viscosa. Este líquido encontra-se na cavidade sinovial para lubrificar as articulações sinoviais e geralmente a sua análise é solicitada na suspeita de doenças articulares.

A aspiração deste líquido é recomendada para todos os pacientes com derrame articular ou inflamação articular (29).

Após a colheita da aspiração cirúrgica, as amostras devem ser enviadas o mais rápido possível ao laboratório de microbiologia, quando este chega a triagem, são realizadas exame cultural nos meios de agar de PVX, agar de gelose de sangue e BHI. De seguida, prossegue-se a incubação das sementeiras realizadas a um tempo, temperatura e atmosfera adequado.

Em caso de crescimento de colónias, as amostras serão analisadas macroscopicamente, seguidamente pode-se indicar o isolamento de uma ou mais colónias com intuito de serem identificadas pelo VITEK® 2 e VITEK® MS, e realização de TSA, caso seja necessário.

Em caso de alguma dúvida, pode-se fazer a observação microscópica do microrganismo na lâmina feita pelo método de coloração de Gram.

Os microrganismos patológicos mais frequentes identificados no líquido sinovial são *Staphylococcus aureus* e *Neisseria gonorrhoeae*.

Em caso de resultado negativo, as amostras são descartadas e o resultado é reportado ao médico.

IV.2.10 Exsudado purulento

Exsudado purulento pode ser proveniente de lesões cutâneas superficiais ou de queimaduras infectadas. Como exemplo, apresentam-se as lesões das úlceras do pé diabético que levam ao surgimento especialmente da neuropatia e da microangiopatia degenerativa definida por mudança da estrutura capilar e do papel endotelial protetor (64).

As amostras da úlcera diabética dos membros inferiores são colhidas com zaragatoa estéril e a lesão é previamente tratada em condições de antissepsia, e de seguida é transportada em condições adequadas até ao laboratório (65).

Quando as amostras chegam a triagem da microbiologia, são realizados exames culturais em meios de agar de MacConkey, agar de gelose de sangue e BHI. Após a sementeira, estes produtos serão incubados entre 24h, a temperatura de 37°C em atmosfera rica em CO₂ ou aerobiose.

Em caso de crescimento de colónias, prossegue-se com a análise macroscópica, por vezes acompanhada de solicitação de isolamento de uma ou mais colónias que posteriormente poderão ser identificadas no VITEK® 2 ou VITEK® MS, e se necessário faz-se o TSA.

Por vezes recorre-se ao exame direto, observação microscópica da lâmina preparada por coloração de Gram, de forma a auxiliar na identificação do microrganismo em questão.

Os microrganismos mais comumente identificados nestas amostras são as *enterobacteriaceae*, como o *Staphylococcus aureus* (o mais frequentemente encontrado, que muitas vezes aparece a dominar a cultura), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*; além destas bactérias também se detetam a, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus spp.*, entre outras.

Em caso de resultado negativo, o resultado é reportado ao médico e a amostra é descartada.

IV.3 Métodos

IV.3.1 Técnica de Coloração de Gram

A técnica de coloração de Gram, considerada uma coloração bacteriológica, é uma metodologia que tem como principal função subdividir as bactérias pela sua reação a esta coloração. São assim divididas naquelas que a retêm, designadas Gram-positiva, e naquelas que são descoradas, conhecidas como Gram- negativo, e por vezes identifica-se Gram variáveis (66).

A diferenciação entre esses dois grandes grupos de bactérias passa pela constituição da parede bacteriana. Quando as bactérias são coradas com cristal violeta, a parede das bactérias Gram-negativas descoloram na presença de certos diluentes orgânicos, como o etanol ou acetona. No caso das bactérias Gram-positivas, estas têm uma maior resistência a esses solventes, retendo assim, a coloração (67).

A retenção ou não da coloração está diretamente relacionada com a composição da parede bacteriana. Geralmente a parede das bactérias Gram-negativas são mais finas e têm uma maior quantidade lipídica do que as bactérias Gram-positivas.

No procedimento do método, quando as bactérias Gram-negativas estão em contacto com o álcool, este remove os lípidos, e conseqüentemente aumenta a permeabilidade da parede bacteriana, perdendo-se assim o cristal violeta, o que torna a bactéria descorada. Nas bactérias Gram-positivas, devido ao seu pobre conteúdo em lípidos na parede, na presença de álcool desidratam, o que leva à diminuição da porosidade das paredes de peptidoglicano e o cristal violeta mantém-se na parede bacteriana, concedendo coloração (66).

A coloração de Gram é, portanto, usada como um passo inicial na identificação de bactérias.

IV.3.2 Coloração de Ziehl – Neelsen

A coloração de Ziehl – Neelsen é utilizada para diferenciar as bactérias álcool-ácido-resistentes das não álcool-ácido-resistentes em amostras biológicas. Este método de coloração ajuda na detecção de bacilos álcool-ácido-resistentes em amostras orgânicas (61).

O que auxilia na diferenciação das bactérias álcool-ácido-resistentes das outras por este princípio, é a existência de uma substância cerosa denominada ácido micólico que se encontra na parede bacteriana das álcool-ácido-resistentes. O ácido micólico torna a parede bacteriana impermeável e quando as bactérias são coradas, resistem à descoloração com ácido-álcool (67).

A coloração contém fenol que ajuda a solubilizar a parede bacteriana. O calor também é aplicado durante a coloração primária para aumentar a penetração. Todas as células ficarão coradas com a coloração primária, de seguida é aplicado o ácido-álcool que irá descolorar todas as não álcool-ácido-resistentes e as outras mantêm-se inalteradas. Seguidamente aplica-se o azul metileno que irá corar as bactérias anteriormente descoloradas, criando o contraste de coloração entre os dois tipos de bactérias (67).

Na observação microscópica as bactérias álcool-ácido-resistente apresentam-se avermelhadas e as não álcool-ácido-resistentes apresentam-se azuladas.

Após esta diferenciação e observação, segue-se a identificação da bactéria presente na amostra.

No departamento de microbiologia clínica do Hospital Dona Estefânia, esta técnica é utilizada para pesquisa de *Mycobacterium spp.*, e *Nocardia spp.*, mas mais especificamente na detecção de *Mycobacterium tuberculosis*.

IV.3.3 Exame Cultural

O exame cultural é um dos exames de crescimento microbiano no estudo de microrganismos, que engloba bactérias, fungos e alguns parasitas.

Para o exame cultural, utiliza-se um meio de crescimento adequado. Com a ajuda de uma pinça esterilizada, colhe-se a amostra (pode ser urina, fezes, secreções etc) e inocula-se no meio de cultura, processo denominado de sementeira. Após a sementeira, as culturas são incubadas em estufa, a temperatura, humidade e atmosfera adequada ao crescimento do agente em questão. A escolha do meio de crescimento é consoante o agente patogénico de que se suspeita (61).

O exame cultural pode ser direto ou a amostra pode sofrer alguma alteração, como por exemplo, diluição, antes de ser semeada.

Relativamente aos meios de cultura, estes estão classificados em meios não seletivo, seletivo e diferencial. No primeiro, espera-se o crescimento de todos os microrganismos presentes na amostra inoculada, no segundo cresce apenas um grupo de microrganismos e no último, o meio mais específico, espera-se o crescimento de um determinado microrganismo. Os meios não seletivo, seletivo e diferencial mais frequentemente usados ao longo do estágio foram a gelose de sangue, MacConkey e Mannitol Salt Agar, respetivamente (61)(59).

Este exame permite a multiplicação dos microrganismos presentes na amostra, o que facilita a identificação do microrganismo em estudo.

Depois do crescimento microbiano, pode ser necessário executar alguma técnica de isolamento do agente infeccioso, para ser identificado.

IV.3.4 Antibiograma

O antibiograma, também conhecido como Teste de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA), tem como objetivo a determinação da sensibilidade à terapêutica antibiótica, isto é, avalia a capacidade que um agente microbiano tem de se multiplicar *in vitro* quando se encontra em contacto com determinados fármacos.

Manualmente, esta técnica é realizada numa caixa de *Petri* contendo meio de cultura sólido (agar de *Mueller Hinton*). Colhe-se amostra, faz-se o espalhamento, seguidamente aplicam-se determinados discos de papel (geralmente 3 a 5 discos por caixa de *Petri*) com concentrações de antibióticos conhecidas e a placa é seguidamente incubada. Durante a incubação o agente difunde-se do disco, criando um gradiente de concentração que diminui com a distância dos discos (67).

Tendo em conta o tempo de crescimento do microrganismo em estudo é preciso, posteriormente, verificar se houve ou não criação de halos de inibição de crescimento bacteriano. Caso o microrganismo seja resistente a um ou alguns dos discos presentes na caixa de *Petri*, o halo será inexistente, em casos de sensibilidade forma-se um halo à volta do disco, e esse diâmetro será medido, pois o tamanho do diâmetro é diretamente proporcional a sensibilidade do antimicrobiano em questão (59)(61).

Para a classificação mais precisa, os resultados do diâmetro são comparados com os valores de uma escala padrão, que indica se o microrganismo é resistente, intermediário ou sensível ao antibiótico. Sensível significa que o agente microbiano é inibido por uma concentração do

antimicrobiano obtida clinicamente; Resistente significa que os microrganismos não são inibidos; intermediário significa que considerações especiais devem ser seguidas se o antibiótico for usado (67).

Este método foi bastante usado durante o estágio, auxiliando na identificação bacteriana. Com este teste, o clínico orienta-se com mais confiança em relação a indicação de terapêutica.

IV.4 Equipamentos

IV.4.1 BacT/ ALERT

O equipamento BacT/ALERT® tem como um dos produtos a BacT/ALERT® FN PLUS, sendo utilizado para isolar e detetar os microrganismos anaeróbios e facultativos no sangue e noutros fluídos orgânicos, normalmente estéreis, retirados de um paciente suspeito de infeção (68).

Além deste produto de BacT/ALERT®, a BacT/ALERT® FA PLUS também é usado para exame qualitativo de microrganismos aeróbios numa amostra de sangue (69)

Um dos produtos utilizados do equipamento BacT/ALERT é o BacT/ALERT® PF PLUS, utilizado para análise qualitativa de microrganismos aeróbios e facultativos numa amostra de sangue.

O sistema BacT/ALERT® e os frascos de hemocultura, são um sistema de deteção microbiana, constituído por um meio nutritivo adequado ao crescimento dos microrganismos frequentemente presentes nas infeções da corrente sanguínea e outros líquidos biológicos normalmente estéreis (68).

O frasco com amostra é inserido no aparelho, onde é incubado entre 5 a 21 dias.

A metodologia processa-se de seguinte modo: para a deteção de gentes infecciosos no sangue, este equipamento recorre a um sensor colorimétrico e à reflexão da luz para pesquisar a presença e a produção de CO₂ diluído no meio de crescimento. A positividade é associada à presença de CO₂ dissolvido na cultura de crescimento, pois os microrganismos metabolizam os substratos existentes no meio de cultura, produzindo-se assim o CO₂. Na presença de CO₂, a cor do sensor altera de verde-azulado para amarelo. E em caso de negatividade da amostra, a cor do sensor mantém-se (68).

A refletância do frasco é monitorizada e registada pelo aparelho de 10 em 10 minutos (68).

IV.4.2 PREVI® Isola

O aparelho PREVI Isola é um equipamento revolucionário nos laboratórios de microbiologia que utiliza o sistema de placas automatizadas para processamento de sementeira das amostras.

A análise processa-se do seguinte modo, as amostras são inseridas no aparelho, o sistema está programado para colher uma parte da amostra e fazer o espalhamento no meio de crescimento adequado a um padrão previamente definido, processo denominado sementeira. Posteriormente à sementeira realizada na placa de *Petri*, essas caixas serão automaticamente identificadas. Após todo esse processo, as amostras são tiradas do aparelho e conduzidas para a estufa, e dali ficam o tempo necessário para se dar o crescimento microbiano.

Este sistema oferece um avanço em relação à sementeira urinária, pois consegue semear 180 placas/hora, diminuído, assim, o fluxo de trabalho, e aumenta a eficiência e a produtividade, garantindo também um melhor isolamento das colónias (70).

IV.4.3 MINI Vidas®

O equipamento MINI VIDAS® consiste num sistema de imunoensaio automatizado, baseado nos princípios de ensaio de fluorescência ligado as enzimas (*Enzyme-linked Fluorescent Assay - ELFA*). É um aparelho de fácil uso, de resultados precisos e analisa até 36 amostras por hora (71).

O princípio de ELFA baseia-se num ensaio imunoenzimático fluorescente que desenvolve o método sanduíche em duas fases distintas, e a deteção da formação dos complexos na fase final é detetada por fluorescência. O complexo antigénio-anticorpo é marcado com uma imunoglobulina ligada a uma enzima fosfatase alcalina, que reage com um substrato, originando um composto fluorescente. A emissão da fluorescência é diretamente proporcional a concentração do analito em estudo (57).

Este equipamento é de fácil uso, pois todas as fases da reação de imunoensaio enzimático estão automatizadas, desde pipetar, incubar, lavar e ler. A saída dos resultados é imediata para a impressora acoplada (71).

No laboratório de microbiologia, durante o estágio, este equipamento foi utilizado para detetar toxinas.

IV.4.4 VITEK® 2

O sistema automático VITEK® 2 é um analisador de antibiogramas ou TSA e também realiza a identificação microbiana, e dá informações que auxiliam no cuidado do doente.

Os cartões de identificação de VITEK® 2 e fornecem uma ampla gama de testes. O cartão recorre a tecnologia “Advanced Colorimetry” que identifica centenas de espécies bacterianas, baseado numa base de dados e nas novas cartas de identificação colorimétrica de VITEK® 2.

O VITEK® 2 tem incorporado um programa para a validação dos exames de resistência aos antibióticos e a interpretação dos resultados, denominado *Advanced Expert System* (AES). Este sistema também informa o perfil fenotípico preciso do mecanismo de resistência bacteriana para cada colónia analisada (72).

IV.4.5 VITEK® MS

O VITEK MS é um equipamento que identifica as bactérias e os fungos a partir de colónias presentes num meio de agar. Este sistema tem como princípio o método de espectrometria de massa por ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight*).

Durante o estágio este aparelho foi usado para identificação bacteriana.

A análise bacteriana inicia-se com a colheita de uma colónia numa placa de agar, e de seguida é espalhada em um dos poços da lâmina de VITEK® MS, um reagente matriz é adicionado ao mesmo poço e deixa-se secar. Considerando que a solução controlo também se encontra aplicada na lâmina, esta é colocada no aparelho VITEK® MS.

No equipamento, a amostra irá sofrer muitos disparos de laser no interior do espectrómetro de massa, a solução matriz irá vaporizar-se devido a absorção da luz laser, e juntamente com a amostra irão adquirir uma carga elétrica no processo de ionização. Os campos elétricos orientam os iões para o tubo de vácuo que os separa consoante o tempo de voo e o peso molecular, isto é, as moléculas menores deslocam-se mais rapidamente que as maiores.

Os resultados são apresentados em forma de espectro, exibindo diferentes fragmentos oriúndos das moléculas originais da amostra. O perfil do espectro é comparado com o banco de dados de espectros que define uma ampla gama de espécies de bactérias. A interpretação dos espectros de amostra fornecerá, assim, resultados de identificação dos microrganismos, com um bom nível de confiança (73).

V. Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ)

O Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) baseia-se num conjunto de procedimentos definidos para controlar uma organização/entidade relativamente à qualidade do serviço/produto oferecido. As inspeções e os controlos realizados no que diz respeito ao SGQ, englobam a estrutura organizacional, os processos e os procedimentos, de modo a garantir um serviço de qualidade e fidedigno (74).

Para garantir a precisão e confiabilidade dos testes, este sistema está organizado em 3 fases: pré-analítica, analítica e a pós-analítica, por outras palavras, o SGQ começa com a chegada do paciente ao laboratório até a saída dos resultados. A ocorrência de um erro numa das fases pode comprometer o resultado final laboratorial. Para evitar esses resultados indesejáveis, todas as fases do SGQ têm implementados métodos de deteção de erros (74).

Portanto, todos os procedimentos associados às 3 etapas do SGQ, devem ser rigorosamente postos em prática, de forma a evitar oferecer ao paciente um resultado laboratorial pouco fidedigno (74).

Para garantir um SGQ nos laboratórios, alguns fatores são imprescindíveis no sistema laboratorial, de forma a garantir a qualidade dos testes. Alguns dos fatores são o ambiente laboratorial, procedimentos de controlo de qualidade, comunicação, manutenção de registos, equipa competente e conhecedora da matéria, reagentes e equipamentos de boa qualidade (74).

O desenvolvimento dos SGQ deve estar de acordo com as normas ISO. O sistema ISO oferece uma variedade de técnicas que auxiliam a otimizar as atividades internas de uma indústria, empresa ou instituição (74).

Nos dias de hoje, os laboratórios decidem implementar o SGQ de modo a produzir resultados mais fidedignos, ou seja, mais precisos e exatos. A produção correta dos resultados ajudará a fazer um real diagnóstico, prognóstico, acompanhamento da terapia, uma correta análise de evolução e prevenção das doenças (74).

V.1 Fase Pré - Analítica

A fase pré-analítica é a primeira fase do ciclo SGQ e inicia-se com o pedido do exame, a preparação do paciente, a colheita das amostras biológicas pretendidas, a identificação de

amostras, o transporte das mesmas, a triagem dos produtos e o envio para as respectivas valências laboratoriais, e só termina quando se inicia a realização dos exames (74).

O laboratório não consegue ter controlo a 100% de todos esses procedimentos, pois alguns dependem da colaboração do próprio paciente, principalmente em algumas condições que antecedem a colheita da amostra. Para além dessas condições, é impossível eliminar todos os erros humanos que podem estar associados aos técnicos de saúde (74).

Por esse motivo, passo a indicar alguns dos erros pré-analíticos mais frequentes:

a identificação incorreta do paciente, a identificação incorreta das amostras biológicas ou a sua não identificação, preparação inadequada dos utentes, colheita de amostras inadequadas para análise (como hemólise, lipemia, quantidade insuficiente e amostra com coágulo), má conservação das amostras, transporte de amostras em condições que as danifiquem e má conservação de reagentes (74).

V.2 Fase Analítica

A fase analítica corresponde à etapa onde a partir de amostras biológicas se efetuam exames analíticos, seguindo uma sequência de procedimentos com o intuito de obter resultados numéricos ou características de uma propriedade em estudo. Por outras palavras, a fase analítica inicia-se com o manejo de diversas amostras orgânicas nos vários sistemas analíticos, e termina quando se recolhe os resultados analíticos (74).

As diversas variáveis analíticas envolvidas na realização de um exame laboratorial devem ser muito bem controladas para assegurar que os resultados sejam precisos e exatos. Para tal, os laboratórios implementam certos modelos de avaliação para analisar a eficácia da gestão de qualidade através de Controlo de Qualidade Interno (CQI) e Controlo de Qualidade Externo (CQE). Este, por sua vez, conta com a participação de programa de Avaliação Externa de Qualidade (AEQ). O CQI é praticado apenas na fase analítica, enquanto que CQE estende-se a todas as fases (74).

O CQI é um controlo intralaboratorial, isto é, baseia-se nos exames diários de uma amostra controlo, cujos valores analíticos são conhecidos, avaliando assim a precisão. Por outras palavras, CQI é um procedimento que estuda a precisão dos analisadores automáticos, ou seja, o laboratório clínico deve ter amostras de controlo adequadas a todos os parâmetros que executa e deve usá-las sempre que efetuar os respetivos exames, de modo a vigiar a precisão dos seus sistemas analíticos (74).

O CQE é um controlo interlaboratorial, pois o resultado obtido de cada parâmetro efetuado no laboratório participante é devidamente comparado com a média de consenso do seu grupo, definindo assim a exatidão dos resultados.

Relativamente a AEQ, o ideal é o laboratório estar inscrito nos Programas de AEQ para todos os parâmetros que realiza, de modo a poder aferir a exatidão dos resultados que produz (74).

Implementando devidamente os programas de SGQ, diminuiu-se o risco de erros na fase analítica, mas não os eliminou na totalidade. Os problemas mais comumente encontrados nos laboratórios de patologia clínica podem-se verificar na gestão de amostras, no processo analítico, gestão de reagentes e equipamentos, calibrações, cálculos e equipa incompetente. Em caso de erros analíticos, esses devem ser investigados para determinar se o erro é aleatório ou sistemático (74).

Todos os processos analíticos devem ser documentados de forma detalhada, implementados e colocados à disposição dos responsáveis para realização dos diversos exames.

V.3 Fase Pós-analítica

A fase Pós-analítica corresponde à etapa posterior ao exame, que inclui revisão sistemática, formatação e interpretação, realização do relatório, transmissão dos resultados, armazenamento de amostras posterior aos exames e arquivagem dos resultados que serão posteriormente utilizados na avaliação da auditoria de qualidade (74).

Para ter um ótimo serviço, os laboratórios devem garantir sistemas de comunicação informático adequado, onde se possa verificar os resultados e interpretá-los de acordo com a história clínica, fazer a entrega dos resultados/relatórios de forma eficaz e segura. Também é importante assegurar a entrega dos resultados atempadamente aos utentes, que, de igual forma esperam um atendimento satisfatório, tendo em mente o seu conforto e privacidade (74).

Apesar da implementação dos programas de SGQ, continua a verificar-se alguns erros encontrados nos laboratórios. Alguns destes erros são difíceis de detetar, são eles, engano na transcrição dos resultados na realização do relatório, produção de relatórios ilegíveis e envio do relatório para o local errado, com conseqüente perda completa do relatório, ou não envio do mesmo (74).

Relativamente aos erros que ocorrem nas três fases do SGQ, geralmente pode-se afirmar que o índice de erro é maior na fase pré-analítica (74).

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



MONOGRAFIA: TERAPÊUTICA DA INFEÇÃO POR HIV

Ana Maira Semedo Cassamá

Monografia orientada pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira

Mestrado em Análises Clínicas

TERAPÊUTICA DA INFEÇÃO POR HIV

I. Introdução

I.1 História

A família *Retroviridae* é classificada em sete gêneros: *Gammaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Spumavirus*, *Lentivirus*, *Betaretrovirus*, *Alpharetrovirus* e *Deltaretrovirus*. No gênero *Lentivirus* encontram-se espécies como *Visna Maedi Vírus* (VMV), Vírus da Anemia Infeciosa Equina (*Equine Infectious Anemia Virus* – EIAV) e Vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus* – HIV). Este último está dividido em HIV-1 e HIV-2 com base nas características genéticas e diferenças nos antígenos virais (75).

O HIV-1 foi isolado em 1983 e o HIV-2 em 1986 em pacientes com imunodeficiência grave. A doença causada por este vírus é denominada de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

O HIV tem a sua origem num vírus que infeta o macaco, o Vírus da Imunodeficiência Símia (*Simian Immunodeficiency Virus* – SIV), com o qual partilha muitos aspetos [61]. Esta doença inicialmente afetou homens jovens, homossexuais, cidadãos haitianos, utilizadores de heroína e hemofílicos nos Estados Unidos da América. Porém, atualmente, esta patologia não atinge apenas estes grupos, dado que qualquer indivíduo que tenha estado em contacto com o vírus poderá ficar infetado (76).

I.2 Classificação e Diversidade

O HIV está dividido em dois tipos HIV-1 e HIV-2, que partilham aproximadamente 40% de homologia antigénica. O HIV-1 é o mais virulento dos dois e atinge todos os continentes. Contudo, a maior incidência do HIV-2 verifica-se na África Ocidental (61).

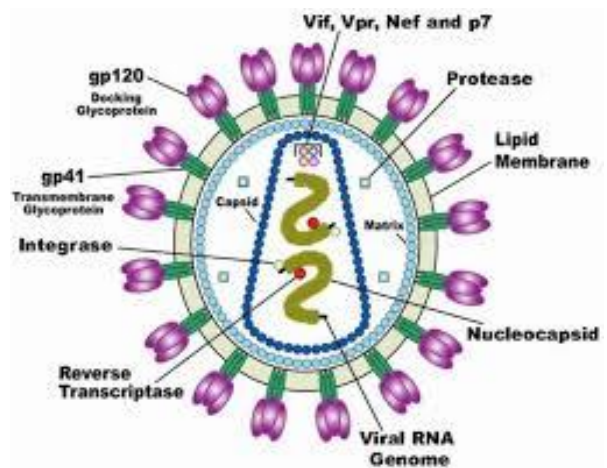
O HIV caracteriza-se por apresentar alta propensão a sofrer mutações genéticas, criando, conseqüentemente, uma elevada diversidade genética. Esta variabilidade proporcionou o aparecimento de diversos grupos e subtipos, sendo o HIV-1 classificado nos grupos M, O, N e P. Estes grupos diferem entre eles em cerca de 30% ao nível das sequências no gene *gag* e 47% no gene *env* (61). As infeções causadas pelo HIV-1 são essencialmente provocadas pelo grupo M.

Em relação ao HIV-2, existem oito grupos categorizados do A ao H, mas só os grupos A e B causam infecção nos humanos, sendo o A, de longe, o mais predominante a nível mundial (77).

I.3 Estrutura

Os vírus da família *Retroviridae* têm um formato esférico, apresentando um diâmetro de, aproximadamente, 80 a 120 nm. No caso do HIV o diâmetro é cerca de 100 nm e o invólucro é constituído por glicoproteínas virais (gp120 e gp41). No interior do invólucro encontra-se a cápside que contém duas cópias semelhantes do genoma de ácido ribonucleico de cadeias simples (*single stranded Ribonucleic Acid* – ssRNA) e apresenta polaridade positiva. Os ssRNA do vírus HIV estão revestidos por nucleocápside. Todas estas estruturas são apresentadas na figura 1. A morfologia da cápside do virião do HIV é comparável a um cone. (61)(76).

A nível genómico, o vírus HIV codifica três genes denominados *gag*, *pol* e *env*, que se encontram nesta ordem no genoma como ilustra a figura 2 (75). Analisando separadamente, o gene *gag* codifica as proteínas da matriz (MA, p17), da cápside (CA, p24) e da nucleocápside (NC, p7). O gene *pol* codifica três proteínas: protease (PR, p10), transcriptase reversa (TR, p51) e integrase (IN, p32). E por fim, o gene *env*, que codifica as glicoproteínas do invólucro presentes na superfície dos retrovírus, glicoproteínas da superfície (SU, gp120) e glicoproteínas transmembranares (TM, gp41) (75). **Figura 1** – Ilustração da estrutura do HIV (78)



A figura seguinte ilustra a ordem dos principais genes juntamente com as proteínas reguladores no genoma do HVI-1 e HIV-2.

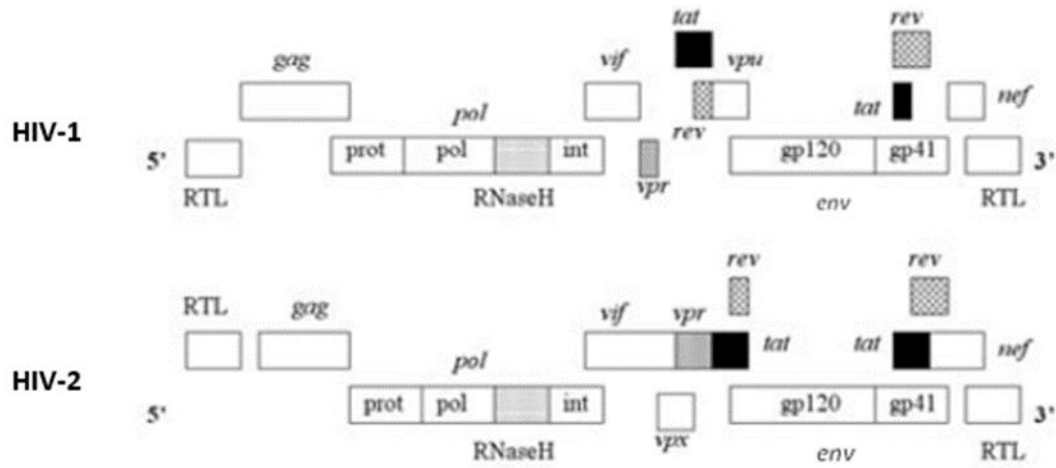


Figura 2 – Organização genética dos vírus HIV-1 e HIV-2 (79).

Para melhor compreensão entre os genes, as suas respectivas proteínas codificadas e as funções exercidas, a tabela 1 apresenta um resumo simplificado.

Tabela 1 - Resumo simplificado dos genes presentes no genoma do HIV-1 e HIV-2, as respectivas proteínas e funções desempenhadas (76)(80).

Genes	Proteínas	Funções
<i>gag</i>	Proteínas da membrana central ou proteína da matriz (MA, p17); proteína da cápside (CA, p24); nucleocápside (NC, p7)	Durante a montagem participa no transporte de Gag à membrana plasmática e na incorporação das glicoproteínas do invólucro; Protege o complexo RNA/NC, participa no processo da montagem viral, após a entrada do vírus na célula alvo e na fase inicial do ciclo replicativo; Protege o RNA
<i>pol</i>	Protease (PR, p10); Transcriptase reversa (TR, p51); Integrase (IN, p32)	Cliva os precursores proteicos do Gag e Gag-Pol; Responsável pela transcrição reversa do RNA viral em dsDNA; Responsável pela integração do dsDNA no genoma celular
<i>env</i>	Glicoproteínas da superfície (SU, gp120); Glicoproteínas transmembranares (TM, gp41)	Responsáveis pela ligação e entrada do vírus na célula hospedeira
<i>tat</i>	Proteína transativadora (Tat, p14)	Aumenta a síntese de transcritos de RNA
<i>rev</i>	Regulador de <i>splicing</i> de RNA (Rev, p13)	Responsável pelo processamento e transporte do mRNA em direção ao citoplasma
<i>nef</i>	fator regulador negativo (Nef, p27)	Reduz os níveis de CD4; melhora a incorporação do invólucro nos viriões, estimula as vias de sinalização dos linfócitos T CD4, reduz a expressão de MHC I
<i>vif</i>	fator de infetividade viral (Vif, p23)	Influencia positivamente a replicação do DNA viral; inibe a proteína celular Apobec3G
<i>Vpu</i> (HIV-1)	Proteína viral única (Vpu, p16)	Degrada o CD4, diminui a expressão de MHC I; essencial na liberação das partículas virais
<i>vpr</i>	Proteína viral r (Vpr, p15)	Mediador do transporte do PIC para o núcleo hospedeiro; provoca a paragem do ciclo celular na fase G2
<i>vpx</i> (HIV-2)	Proteína viral x (Vpx, p15)	Responsável por inibir a ação para proteína celular SAMHD.

I.4 Transmissão

A transmissão do HIV ocorre essencialmente através de contacto sexual, uma vez que o vírus pode estar presente no sêmen, sangue e secreções vaginais (61). Além destas causas, apontam-se uma série de circunstâncias que podem levar a transmissão da infeção, como, por exemplo, exposição ocupacional ou não ocupacional a sangue contaminado (incluindo transfusões sanguíneas), exposição a hemoderivados contaminados e transmissão vertical (ou seja, infeção transmitida durante o período perinatal aos recém-nascidos de mães seropositivas) (61). Contrariamente a estes modos, a transmissão do vírus não se dá pelo toque, contacto casual, abraço, beijo, tosse, espirro, picadas de insetos, água, alimentos, piscinas ou sanitários públicos (61).

Quanto aos grupos de indivíduos em que a transmissão do vírus ocorre com maior incidência, destacam-se os indivíduos sexualmente ativos (homossexuais e heterossexuais) que não utilizam métodos contraceptivos de barreira, indivíduos que usam drogas endovenosas, profissionais de saúde e pessoas envolvidas nas práticas de tatuagem (61).

II. Ciclo de Replicação

O ciclo replicativo dos vírus HIV é classificado em duas fases: a fase inicial e a fase tardia. A fase inicial começa com a ligação do vírus aos receptores da célula e termina na integração do ácido desoxirribonucleico complementar (*complementary Deoxyribonucleic Acid* – cDNA) viral no genoma da célula. Por outro lado, a fase tardia inicia-se com a expressão dos genes virais e termina com a libertação e maturação dos viriões. Estas duas fases estão ilustradas na figura 3 (81).

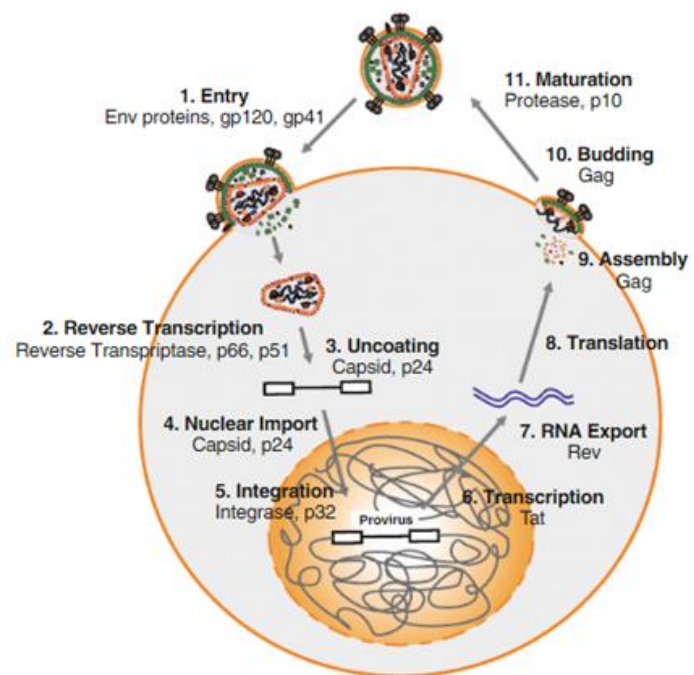


Figura 3 – Diversas fases do ciclo replicativo do HIV na célula hospedeira (81).

De seguida estão descritas as várias fases do ciclo de replicação do HIV.

II.1 Ligação

Esta fase começa com a ligação dos vírus à superfície das células alvo.

Sabe-se que a afinidade do complexo das glicoproteínas (gp120 - gp41) do invólucro do HIV para o receptor CD4 é relativamente baixo, principalmente nos casos do primeiro contacto viral. Por esse motivo, acredita-se na existência de outros fatores que induzem a concentração viral na superfície da célula alvo. No caso do HIV, acredita-se que um outro receptor que contribui para a célula alvo é o sulfato de heparano (81).

Está descrito que as células dendríticas capturem os viriões nas mucosas e os conduzam para os gânglios linfáticos, levando a uma infecção mais eficaz dos linfócitos T CD4⁺.

II.2 Entrada

Depois do processo de ligação, os retrovírus recorrem aos receptores específicos membranares das células alvo através das interações com o complexo das glicoproteínas presentes no invólucro viral (81).

O mecanismo de entrada viral começa com a ligação da gp120, presente na superfície dos vírus, com o receptor celular CD4 reconhecido pelo complexo glicoproteico. Esta ligação provoca alterações conformacionais no CD4 e na gp120, que permite a ligação aos co-receptores (receptores das quimiocinas, especialmente CXCR4 e CCR5). Com o recrutamento dos co-receptores, novas alterações conformacionais ocorrem nas glicoproteínas do invólucro. As consecutivas e sequenciais mudanças conformacionais levam à separação da gp120 da gp41, e a alteração conformacional do gp41 vai permitir a fusão do vírus com a célula alvo (81).

A efetiva entrada do vírus na célula resulta da inserção do péptido de fusão presente na gp41 na membrana da célula alvo, induzindo a fusão do invólucro viral com a membrana celular, com conseqüente libertação da NC no citoplasma celular.

II.3 Transcrição reversa

A fusão do invólucro viral com a membrana celular resulta na libertação da NC do vírus para o citoplasma celular, onde ocorre o processo de transcrição reversa pela proteína TR, que sintetiza uma molécula de DNA de dupla hélice.

Posteriormente à fusão, a NC sofre o processo de desmontagem parcial e progressiva, que resulta em partículas subvirais denominadas complexos de transcrição reversa (*Reverse-*

Transcription Complexes - RTCs) e complexos de pré-integração (*Pre-Integration Complexes* - PICs) (81).

A definição clara do papel destes dois complexos ainda não foi possível, mas no caso do HIV, os RTCs estão associados ao citoesqueleto da célula hospedeira, e acredita-se que resultam de uma interação direta entre as MA e a rede de actina. Em relação aos PICs do HIV, pensa-se que estes englobem a PR, a IN, e TR (81).

Alguns estudos demonstram que certas proteínas influenciam o processo de desmontagem e/ou a transcrição reversa de retrovírus. No caso do HIV, apontam-se o Nef, o Vif e a proteína celular ciclofilina. Efetivamente, os vírus que não têm estas proteínas são menos infecciosos em comparação com aqueles que as apresentam (81).

II.4 Integração

Após a síntese do DNA de dupla hélice no citoplasma celular, este é transportado através da membrana nuclear para o núcleo da célula e integrado no genoma da célula hospedeira, formando o chamado provírus (81).

A condução e a integração do DNA de cadeia dupla (*double stranded* DNA - dsDNA) no genoma celular é da responsabilidade da enzima IN que faz parte do complexo PIC. Deste modo, a célula hospedeira ficará infetada durante toda a sua vida, e quando sofre a divisão celular, o genoma celular será replicado juntamente com o DNA proviral, resultando na propagação da infeção viral. A propagação também pode ocorrer pela infeção de novas células (82).

Relativamente aos reservatórios virais, acredita-se que os linfócitos T CD4⁺ constituam o maior reservatório.

II.5 Transcrição

Após o processo de integração, o DNA proviral irá servir de molde para a transcrição do DNA em RNA pela enzima celular DNA polimerase II. Depois da síntese do RNA, segue-se o processo de *splicing*, que modifica o RNA em RNA mensageiro (*messenger* RNA - mRNA) (82).

A transcrição do provírus do HIV inicia-se no promotor viral, que inicialmente depende de fatores de transcrição celular, tais como o fator nuclear *kappa* B (*fator nuclear kappa B* - NF-κB) e o fator nuclear de células T ativadas (*Nuclear factor of activated T-cells* – NFAT).

Após a síntese da proteína viral Tat, esta vai aumentar a síntese de transcritos a partir do DNA proviral, resultando em vários mRNAs codificadores de diversos precursores. Entre estes precursores encontram-se os já referidos Gag, Pol e Env, algumas proteínas reguladoras, como Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev e Nef, e outros RNAs usados como RNA genómico (82).

II.6 Tradução e Montagem

Como foi dito anteriormente, alguns mRNAs codificam o Tat, Rev e Nef. A função do Tat passa pela estimulação da transcrição viral e o alongamento na síntese do RNA. O Rev tem a capacidade de mediar a deslocação do RNAs parentais parcialmente processados em direção ao citoplasma. Por fim, a proteína Nef confere à célula infetada uma camuflagem de forma a não ser reconhecida pelo sistema imunitário, através da modulação negativa de múltiplos receptores, tais como CD4 e o complexo major de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC) de classe I. Por outro lado, também confere às células uma maior capacidade de produção viral (82).

Relativamente ao processo de montagem, de forma sucinta, os precursores de Gag e Gap-Pol ligam-se às jangadas lipídicas no folículo interno da membrana plasmática. As glicoproteínas do Env, por sua vez, ligam-se à estrutura montada pela conexão com as MA. Por fim, a esta plataforma constituída juntam-se duas cópias de RNA viral e também são recrutadas proteínas Vif, que se distribuem pelas regiões de montagem e são incorporadas nas partículas virais.

A concentração de proteínas virais e RNA na membrana plasmática, leva a formação de partículas esféricas revestida por invólucro derivado da membrana citoplasmática (82).

II.7 Libertação e Maturação

No processo de libertação dos vírus para fora da célula, o p6 do Gag e uma proteína celular Tsg101 participam no mecanismo de saída do HIV, permitindo que este entre em circulação (82).

Estas partículas que entram em circulação ainda não têm capacidade infecciosa. Durante ou posteriormente à libertação, a PR viral é ativada e cliva as proteínas precursoras Gag e Gag – Pol nos seus componentes finais maduros. Consequentemente, este processo resulta na configuração das proteínas e reorganização de modo a formar a NC, carregada de eletrões internamente, tornando o vírus infeccioso (82).

III. Sinais e Sintomas

A infecção por HIV, no início, pode não se manifestar nos indivíduos infetados. Porém, em certos casos manifesta-se através de sintomas inespecíficos, tais como erupção cutânea, febre, diarreia, artralgias, mialgias, náuseas, odinofagia, letargia, cefaleias ou torcicolo (61).

Contudo, com a progressão da infecção, o indivíduo poderá entrar numa grande imunossupressão apresentando o estado da doença propriamente dita, a SIDA.

A SIDA totalmente desenvolvida ocorre quando a contagem das células T CD4⁺ é inferior a 200/μL. Nesta fase surgem sintomas mais significativos, incluindo perda de peso e diarreia durante mais de 1 mês, aparecimento de outras doenças indicadoras da SIDA, como, sarcoma de Kaposi, linfoma não-Hodgkin, linfomas relacionados ao vírus Epstein-Barr ou patologias oportunistas específicas. Dentro destas últimas, podemos referir a pneumonia por *Pneumocystis carinii*; o Síndrome de Lady Windermere - que consiste numa infecção por complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*; a candidíase oral; o toxoplasma cerebral; a meningite por *Criptococcus*; a tuberculose; a diarreia provocada por *Salmonella*, *Campylobacter* e, embora raras vezes, também por *Cryptosporidium*, entre outras situações. Estas são algumas das doenças definidoras de SIDA (61).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a manifestação clínica da infecção por HIV/SIDA em 5 fases, em doentes com mais de 15 anos de idade. As 5 fases são classificadas em infecção primária, estágio clínico I, estágio clínico II, estágio clínico III e estágio clínico IV (61). A evolução das fases clínicas é demarcada pela gravidade da imunodeficiência no paciente e a manifestação progressiva das infeções e tumores oportunistas em quase todos os sistemas orgânicos (61).

IV. Diagnóstico

As técnicas de diagnóstico da infecção por HIV passam por dois grandes grupos: os métodos diretos e os métodos indiretos.

Nos métodos diretos detetam-se partículas virais ou elementos que o constituem. Fazem parte destes as técnicas de isolamento e cultura viral, a deteção do antígeno p24, a identificação de RNA genómico viral por reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (*Reverse transcription polymerase chain reaction* - RT-PCR) e a deteção de DNA proviral por reação em cadeia da polimerase (*Reverse transcription polymerase* – PCR). Enquanto que, nos métodos indiretos pesquisam-se anticorpos específicos para antígenos virais (83). Só é

possível detetar anticorpos quando ocorre a seroconversão que se dá a partir da terceira ou quarta semana de infeção.

Os testes por métodos diretos poderiam ser usados como testes de rastreio, mas, devido ao elevado custo associado, normalmente recorre-se aos testes por métodos indiretos (83).

O método de imunoensaio enzimático (*Enzyme Immunoassay* - EIA), também conhecido como método de ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA), tem sido melhorado desde que foi desenvolvido, há 30 anos atrás. Com a melhoria desta técnica é possível detetar mais cedo a infeção. Os testes que recorrem a este método são usados como testes de rastreio (84).

Atualmente existem 4 tipos de EIA, classificados em EIAs da primeira geração, EIAs da segunda geração, EIAs da terceira geração e, por fim, EIAs da quarta geração.

As duas primeiras detetam anticorpos IgG contra o HIV; os EIAs da terceira geração, que recorrem ao método EIA *sandwich*, considerado mais sensível e específico, deteta IgG e IgM contra o HIV. Sabendo que IgM é o primeiro anticorpo produzido após a infeção, a identificação deste anticorpo permite encurtar a janela imunológica.

Por fim, os testes de quarta geração, apresentam vantagens adicionais pois, identifica a infeção mais cedo que a geração anterior. Estes testes detetam IgM e IgG como também o antigénio p24 que encurta mais a janela imunológica (84).

Além das quatro gerações de EIA, também existem outros testes utilizados como exames de rastreio: os testes rápidos. Esses testes também recorrem ao método de EIA e apresentam resultados em menos de 30 minutos.

Atualmente a FDA aprovou a utilização de 6 testes rápidos ilustrados na tabela 2 para a deteção do HIV, em que 4 deles podem ser utilizados em locais de atendimento não clínicos, uma vez que a amostra pode ser sangue total ou fluido oral, e são simples e fáceis de realizar (84).

Tabela 2 - Características de diagnóstico dos testes rápidos do HIV aprovados pelo FDA dos Estados Unidos (84).

Assay, by specimen analyzed	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Whole blood		
OraQuick Advance Rapid HIV-1/2 Antibody Test	99.6 (98.5–99.9)	100 (99.7–100)
Uni-Gold Recombigen HIV test	100 (99.5–100)	99.7 (99.0–100)
Clearview HIV 1/2 Stat-Pak	99.7 (98.9–100)	99.9 (98.6–100)
Clearview Complete HIV 1/2	99.7 (98.9–100)	99.9 (98.6–100)
Serum or plasma		
Reveal G3 Rapid HIV-1 Antibody Test	99.8 (99.2–100)	99.9 (98.6–100)
Multispot HIV-1/HIV-2 Rapid Test	100 (99.9–100)	99.9 (99.8–100)

As vantagens dos testes rápidos em relação aos outros métodos incluem a entrega do resultado no mesmo dia, o acesso a tratamento mais precocemente, auxiliam em ambientes com grande volume de trabalho, como nas urgências e ajudam em situações que requerem tratamento urgente, como em situações de grávidas em trabalho de parto com serologias desconhecidas (84).

Outro teste também aprovado pela FDA, utilizado para rastreio da infecção de HIV e confirmação de testes rápidos positivos, é o teste de amplificação de ácidos nucleicos (*Nucleic Acid Amplification Tests* - NAAT), que pode detetar o RNA do HIV-1 após 9 dias depois da transmissão ter ocorrido. Isto é, geralmente o RNA pode ser detetado 1 semana antes da deteção do p24 e 12 dias antes de um anticorpo ser detetado nos EIAs de terceira geração. Com estes dados, conclui-se que o NAAT reduz bastante a janela imunológica, apresentando-se assim como a melhor opção para a deteção precoce da infecção de HIV. Contudo, esta técnica oferece um custo financeiro elevado aos laboratórios clínicos (84).

Quando o diagnóstico do HIV é feito através de testes que detetam o RNA genómico, devem ser realizados testes serológicos de forma a comprovar a ocorrência do processo de seroconversão e testes confirmativos como *Western blot* ou ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) (84).

Para compreender melhor qual a altura mais apropriada para realizar os mais variados testes referidos anteriormente que auxiliam no diagnóstico da infecção do HIV é preciso compreender primeiramente o conceito da janela imunológica. A noção da janela imunológica corresponde ao período compreendido entre o início da infecção e a deteção dos anticorpos, por outro lado, ilustra a evolução da infecção indicando em cada período quais são os potenciais marcadores possíveis de detetar como se vê na figura 4 (85).

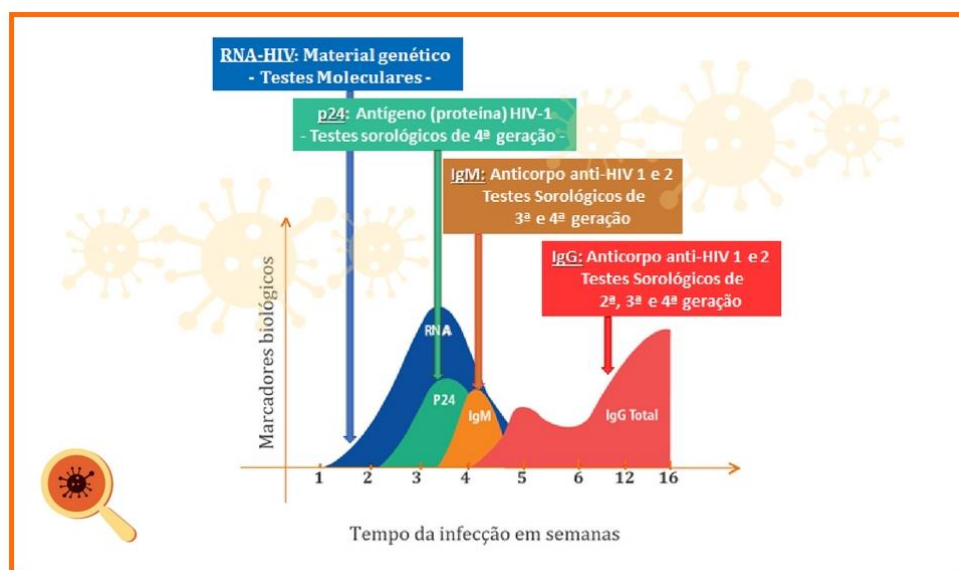


Figura 4 – Ilustra o aparecimento dos diferentes marcadores ao longo das semanas após a infecção e os respectivos testes possíveis em cada fase da infecção (86).

Para finalizar, alguns estudos indicam que a transmissão do HIV é mais eficaz durante a infecção aguda. Deste modo, é de grande importância fornecer testes capazes de identificar a infecção nesta fase, prevenindo, deste modo, a transmissão viral.

Os métodos de detecção de RNA viral, antígeno p24 e os testes rápidos são ferramentas que ajudam na identificação da infecção aguda e na obtenção de resultados eficazes e rápidos, respetivamente (83)(84).

IV.1 Problemas no Diagnóstico da Infecção pelo HIV

O diagnóstico precoce da infecção por HIV é uma das principais ferramentas para prevenir a transmissão e propagação do vírus. Contudo, pode-se encontrar algumas limitações na realização do diagnóstico da infecção por HIV (83).

Um dos problemas são os falsos negativos. Quando os testes de rastreio para o diagnóstico da infecção do HIV são baseados em métodos indiretos, que detetam anticorpos, o paciente pode ter uma infecção aguda e apresentar resultado negativo porque ainda não ocorreu a seroconversão que se dá geralmente a partir da terceira semana de infecção (83). Nesses casos, é aconselhável a repetição dos testes em indivíduos que tiveram comportamentos que potencializam a transmissão viral, pois podem-se encontrar no período de janela imunológica (83).

Os métodos diretos são as melhores técnicas para diagnóstico da infecção aguda do HIV, detetando o DNA proviral, RNA viral e antígeno p24, entre outros (83). O teste de detecção do

DNA proviral nas células infetadas são usadas para diagnosticar infecção aguda por HIV de bebês de mães HIV positivo, antes dos 18 meses. Os exames de detecção do RNA viral podem ser realizados após 9 dias (oferecendo uma janela imunológica bastante reduzida) e geralmente uma semana antes da presença de antígeno p24 na corrente sanguínea (83).

Todavia, estes métodos não se encontram disponíveis em todos os países e situações, pela complexidade e o custo associado. Por estes motivos muitos países recorrem a métodos mais simples e económicos, como os testes rápidos e EIA (83).

Uma das situações que exige uma interpretação cuidadosa é o caso do diagnóstico de infecção por HIV nos bebês com menos de 18 meses de idade. Normalmente, a mulher grávida seropositiva pelo HIV passa ao feto os seus anticorpos, assim sendo, todos os recém-nascidos de mães seropositivas apresentam resultados positivos nos testes de detecção de anticorpos. Isto porque estes exames não têm a capacidade de distinguir os anticorpos transferidos pela mãe seropositiva dos possíveis anticorpos produzidos pelo bebê (83). Por esse motivo, recorre-se à detecção do DNA proviral como teste de eleição.

Outro ponto que pode dificultar o diagnóstico da infecção por HIV são os doentes que se encontram na fase sintomática inespecífica, pois os sintomas não indicam claramente a aquisição da infecção. Caso o paciente comunique ao profissional de saúde algum ato de risco de transmissão viral, o clínico pode suspeitar da infecção por HIV.

Para finalizar, mesmo com a existência de alguns testes que diminuem o tempo da janela imunológica, sendo os testes de detecção do RNA os preferenciais, ainda continua preocupante o diagnóstico da infecção aguda por HIV. Atualmente não existe nenhum modelo de teste capaz de detetar a infecção nos primeiros dias da transmissão e esta deve ser uma prioridade no campo da investigação do HIV (83).

A descoberta precoce da infecção contribui para a prevenção (evitando futuras transmissões) e para o início de tratamento precoce, evitando chegar a estádios de doença avançada. Desta forma é possível diminuir a morbidade e mortalidade associadas à infecção por HIV, criando condições do indivíduo ter uma vida normal ou próximo do normal (83).

V. Terapêutica

A terapêutica do HIV tem como objetivo controlar a infecção e tentar a erradicação do vírus. Mas a cura da doença torna-se difícil de alcançar devido ao *pool* de linfócitos T CD4⁺ infetados de forma latente após a infecção aguda (87).

Atualmente, a terapia antirretroviral combinada (*combination Antiretroviral Therapy - cART*) disponível e utilizada como primeira linha para os pacientes com infecção de HIV/SIDA é capaz de diminuir a morbidade, prolongar a sobrevivência e ainda prevenir a transmissão viral (87).

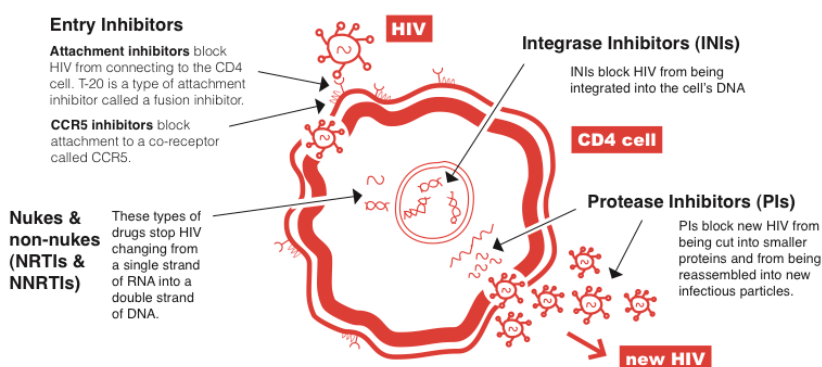


Figura 5 – Ilustração das cinco classes de medicamentos (88).

Por outro lado, uma elevada e duradoura supressão da viremia plasmática dá espaço à manutenção e à preservação da função imunológica, retarda ou previne a ocorrência de mutações resistentes aos fármacos e ainda pode diminuir a atividade imunológica e a inflamação, que contribuem para a lesão de órgãos alvo (87).

Atualmente encontram-se disponíveis no mercado mais de 30 medicamentos antirretrovirais (*Antiretroviral - ARV*), que podem ser administrados numa combinação de ART ou como agentes únicos. (89) A tabela 3 apresenta os medicamentos aprovados.

Tabela 3 - Visão geral dos medicamentos disponíveis para terapia do HIV (89).

Nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors (NRTI)	Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI)	Protease inhibitors (PRI or PI)	Integrase inhibitors (INI)	Entry inhibitors
Azidothymidine – Zidovudine (1987)*	Nevirapine (1996)	Saquinavir (1995)	Raltegravir (2007)	Enfuvirtide (T20) (2003)
Didanosine (1991)	Efavirenz (1998)	Indinavir (1996)	Elvitegravir (2013)	Maraviroc (2007)
Zalcitabine (1992)	Delavirdine* (2007)	Ritonavir (1996)	Dolutegravir (2013)	
Stavudine (1994)	Etravirine (2008)	Nelfinavir (1997)		
Lamivudine (1995)	Rilpivirine (2011)	Lopinavir + Ritonavir (2000)		
Abacavir (1998)		Atazanavir (2003)		
Tenofovir (2001)		Fosamprenavir (2003)		
Emtricitabine (2003)		Tripanavir (2005)		
		Darunavir (2006)		

*Year of approval in parentheses.
**Not approved in Germany.

Estes ARV encontram-se classificados em 5 grupos distintos, tendo em conta o local de atuação no ciclo de replicação do vírus HIV, e são eles: os inibidores de entrada (IEs), inibidores da retrotranscriptase análogos dos nucleósidos ou nucleótidos (NRTIs), inibidores da retrotranscriptase não análogos dos nucleósidos ou nucleótidos (NNRTIs), inibidores da integrase (INIs) e os inibidores da protease (IPs) como se vê na figura 5 (89).

V.1 Classes de Fármacos para a Terapêutica Antirretroviral

- Inibidores de entrada/fusão (IEs)

Resumidamente, a entrada/fusão do HIV na célula hospedeira passa pela ligação das glicoproteínas gp120/gp41 do vírus com o receptor celular CD4, induzindo mudanças conformacionais no gp120 e CD4. Estas alterações permitem a ligação dos co-receptores celulares, o CCR5 e o CXCR4, que induzem outras alterações conformacionais, causando a separação da glicoproteína gp120 da gp41, permitindo a inserção do péptido de fusão presente na gp41 na membrana celular. Este processo culmina na fusão do invólucro viral com a membrana celular (81).

Em geral, o objetivo dos inibidores de entrada/fusão é impedir a ligação do HIV à superfície da célula alvo, como as células T CD4 ou o processo que leva à fusão do invólucro do vírus com a membrana da célula.

A idealização do desenvolvimento dos inibidores de entrada/fusão surgiu a partir da descoberta que a interação entre dois domínios homólogos da glicoproteína viral gp41 induz a fusão, e em caso de mimetização de um dos domínios por uma proteína heteróloga capaz de se ligar e interromper a interação intramoleculares da proteína do vírus, impedindo o processo de fusão como ilustra a figura 6. Com base nesse princípio produziu-se o fármaco T-20 (enfuvirtida) com grande potencial de ação antiviral *in vivo* (90).

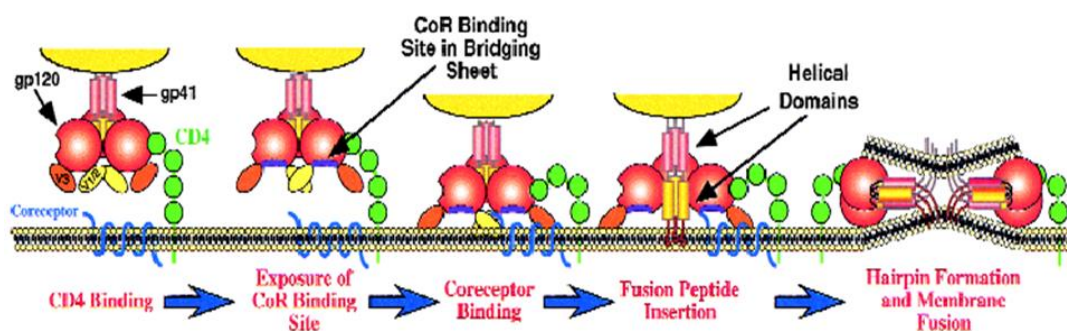


Figura 6 - Mecanismo de ação de inibidores de fusão (91)

A monoterapia com enfuvirtida diminui a eficiência de fusão do vírus, reduz a aptidão viral, mas permite o rápido aparecimento de mutantes resistentes.

Além deste mecanismo de inibição, também foram desenvolvidas antagonistas da ligação ao co-receptor CCR5, como inibidores de entrada.

Os antagonistas de CCR5 ligam-se às bolsas hidrofóbicas nas hélices transmembranares de CCR5, não se sobrepondo às regiões de ligação dos agonistas de CCR5 ou do invólucro do vírus HIV-1. Contudo, a ligação do fármaco estabiliza o co-receptor numa conformação que não é reconhecida pelos agonistas ou pelas glicoproteínas (gp120/gp41) do invólucro do HIV-1 como ilustra a figura 7. Deste modo, os antagonistas de CCR5 são considerados inibidores alostéricos. Em condições ideais, os inibidores das de CCR5 inibiriam a ligação ao invólucro do HIV-1, mas continuariam a ligar aos receptores da família das quimiocinas (90).

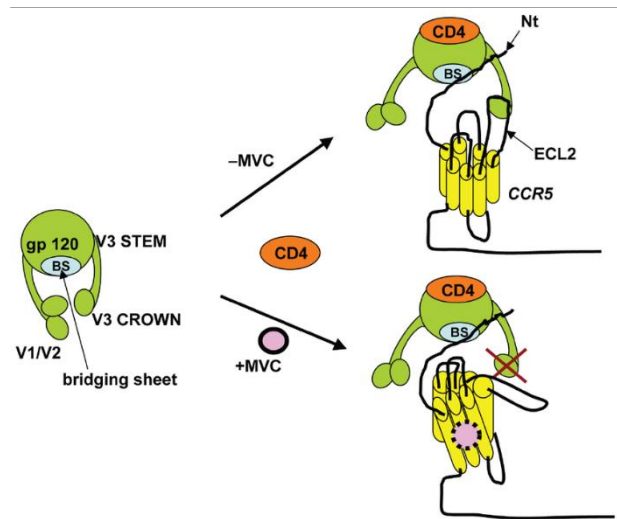


Figura 7 – Mecanismo de ação dos Inibidores fusão (92)

Atualmente existem apenas três antagonistas (VCV, Maraviroc e Aplaviroc) que inibem a replicação viral em humanos. Destes, o único aprovado pela FDA é o Maraviroc. (90)(93).

Este fármaco tem uma forma diferente de atuar em relação aos outros medicamentos uma vez que interage diretamente com a célula hospedeira e não com o vírus, como é o caso dos outros antirretrovirais.

- Inibidores da Retrotranscriptase Análogos dos Nucleósidos ou Nucleótidos (NRTIs)

Os Nucleótidos Inibidores da Transcriptase Reversa (NRTIs) foram os primeiros fármacos a serem aprovados pela FDA para terapêutica ARV. O objetivo desta classe de fármacos é inibir a síntese da cadeia dupla de DNA a partir do RNA viral.

Esta classe de medicamentos é administrada como pro-fármacos, entrando na célula hospedeira pela fosforilação de cinases celulares antes de poderem provocar um efeito antiviral (90).

A forma de atuação dos fármacos desta classe ocorre do seguinte modo: na estrutura dos NRTIs falta um grupo 3'-hidroxilo no anel da pentose (2'-desoxirribosil) que permite a ligação ao nucleótido seguinte, este facto irá impossibilitar a ligação fosfodiéster 3'- 5' entre os NRTIs e os nucleótidos trifosfatos de 5' que chegam para serem incorporados na síntese de

molécula, o que leva à terminação da síntese da cadeia de DNA viral como mostra a figura 8 (90).

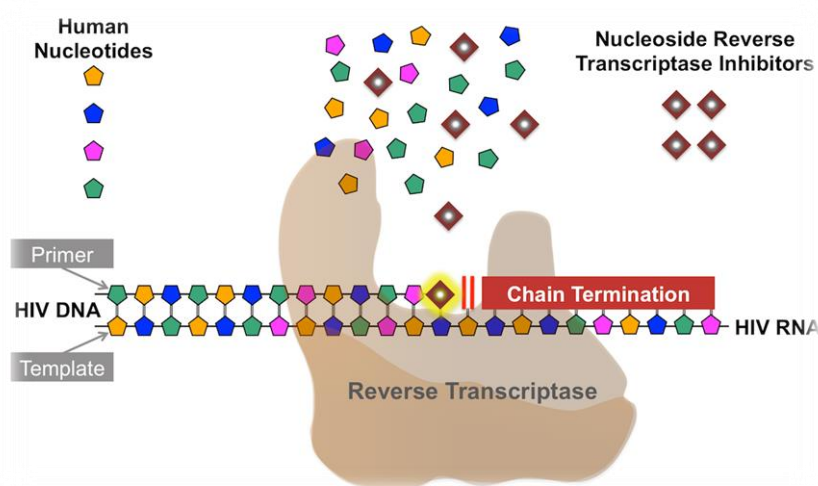


Figura 8 - Mecanismo de ação de Inibidores da Retrotranscriptase Análogos dos Nucleósidos (NITRs) (94).

Existem vários NRTIs, FDA aprovou cerca de oito NRTIs para uso terapêutico, nomeadamente o abacavir (ABC, Ziagen), a didanosina (ddI, Videx), a emtricitabina (FTC, Emtriva), a lamivudina (3TC, Epivir), a estavudina (d4T, Zerit), a zalcitabina (ddC, Hivid), a zidovudina (AZT, Retrovir) e o fumarato de tenofovir desoproxila (TDF, Viread), um inibidor de nucleótido de TR (90).

A administração destes fármacos também leva ao aparecimento de estirpes de HIV resistentes a estes medicamentos. Os mecanismos de resistência identificados nesta classe de fármacos podem ser de dois tipos: remoção de NRTI incorporado durante a síntese da cadeia de DNA pela reação pirofosforólise dependente de ATP, que leva ao primeiro desbloqueio, permitindo a continuação da síntese molecular; o outro mecanismo baseia-se numa maior capacidade de diferenciação/discriminação entre os desoxirribonucleótidos nativos e os inibidores (90).

As mutações que ocorrem na TR que contrariam as ações dos NRTIs são classificadas como mutações associadas a nucleótidos (*Nucleotide Associated Mutations* - NAMs) ou mutações análogas da timidina (*Thymidine Analog Mutations* - TAM). As mutações TAM induzem a pirofosforólise que remove, por exemplo, a AZT e d4T na cadeia em síntese do DNA (90).

As mutações que ocorrem na TR associadas a discriminação dos nucleótidos nativos dos inibidores são a M184 e a K65R. A primeira geralmente ocorre nos tratamentos com 3TC ou

FTC, enquanto que, a segunda ocorre associada a terapias com Tenofovir, ddC, ddI, d4T e ABC (90).

Uma grande parte das mutações primárias e secundárias associadas aos fármacos desta classe, ou combinações destes, diminuem a atividade da TR e a replicação viral. Alguns estudos mostram vantagens clínicas relacionadas com a diminuição da multiplicação de estirpes resistentes aos NRTIs. Em situações de tratamento contínuo pode ocorrer acumulação de múltiplas mutações, promovendo um elevado nível de resistência (90).

- Inibidores Da Retrotranscriptase Não Análogos Dos Nucleósidos Ou Nucleótidos (NNRTIs)

Os Inibidores Não Nucleótidos da Transcriptase Reversa (NNRTIs) têm o mesmo objetivo que os NRTIs: inibir a síntese de cadeia dupla de DNA a partir de RNA viral.

A inibição ocorre quando os NNRTIs bloqueiam a atividade de TR do HIV-1 pela ligação e indução da formação de uma bolsa hidrofóbica proximal, sendo que esta ligação não se sobrepõe ao local ativo. A ligação dos NNRTIs a TR resulta numa mudança de conformação espacial da região de ligação ao substrato, diminuindo conseqüentemente a ação da polimerase, como ilustra a figura 9 (90).

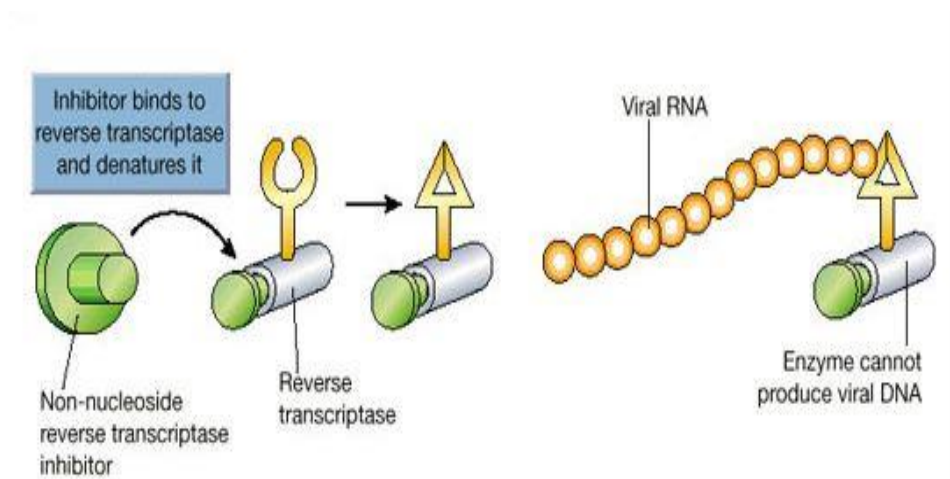


Figura 9 – Mecanismo de ação de Inibidores Não Nucleótidos da Transcriptase Reversa (NNRTIs) (95).

Contrariamente aos inibidores NRTIs, os fármacos NNRTIs, considerados inibidores não competitivos, não inibem a atividade da TR de outros lentivírus como o HIV-2 e o SIV.

Existem vários NNRTIs aprovados, nomeadamente a etravirina, a delavirdina, o efavirenz e a nevirapina; outros encontram-se em desenvolvimento.

Na toma contínua dos NNRTIs alguns vírus podem desenvolver resistência. O mecanismo de resistência passa pela substituição de aminoácidos, nomeadamente L100, K101, K103, E138, V179, Y181 e Y188 na bolsa de ligação a NNRTIs da TR. Por outro lado, também podem ocorrer padrões complexos de mutações resistentes aos NNRTIs. A maioria das mutações dos NNRTIs geram algum nível de resistência cruzada entre os diferentes NNRTIs (90).

- Inibidores da Integrase (INIs)

A IN foi a enzima mais recentemente estudada como alvo de novos fármacos. De momento, foi aprovado pelo FDA, o raltegravir (RAL), elvitegravir e dolutegravir; alguns fármacos encontram-se em estado de desenvolvimento clínico (90).

Posteriormente ao processo de entrada do DNA na membrana nuclear, a enzima IN transfere as cadeias para o núcleo através da membrana nuclear. Em geral, os INIs em desenvolvimento têm como alvo a reação de transferência das cadeias de DNA (90).

O mecanismo de ação dos INIs passa pela ligação do INI ao complexo IN - DNA viral e interação com dois cofatores de magnésio metálico essenciais no local ativo da IN e do DNA.

Desta forma, todos os INIs são constituídos por dois elementos essenciais: um farmacóforo capaz de se ligar ao metal e recrutar o magnésio no local ativo, e um grupo hidrofóbico que se liga ao DNA viral e à enzima do complexo. Com isto, pode-se afirmar que os INIs são o único grupo dos ARV que interage com dois componentes importantes do vírus, a enzima IN e o DNA viral (90). Este mecanismo de inibição é apresentado na figura 10.

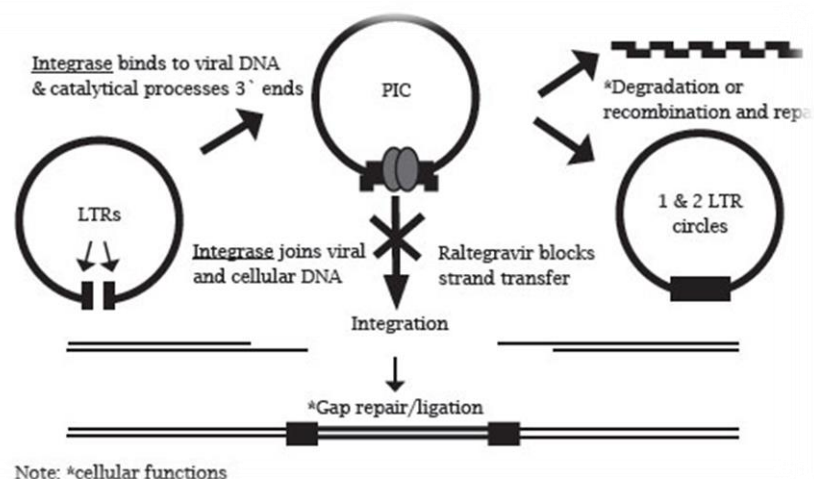


Figura 10 – Mecanismo de ação de Inibidores da Integrase (96).

Como não foge à regra, foram descritas mutações de resistência aos INIs. Curiosamente quase todas ocorrem no local ativo da IN próximo aos aminoácidos que coordenam os cofatores de íons magnésio. Deste modo, essas mutações irão provocar na enzima IN efeitos deletérios/destrutivos e conseqüentemente diminuição da replicação viral no que diz respeito aos efeitos associados no DNA viral (90).

Alguns estudos clínicos mostram que a resistência ao RAL está relacionada a três vias independentes ou conjunto de mutações nos genes da enzima IN, conhecidas como mutações primárias ou de assinatura, e são elas: Y143, N155 ou Q148 (90). Normalmente as mutações primárias ocorrem associadas às mutações secundárias específicas.

No caso de resistência cruzada significativa entre os INIs, esta é quase sempre independentes dos conjuntos de mutações primária/secundária.

- Inibidores da Protease (IPs)

A enzima PR do HIV tem como função a clivagem dos precursores da poliproteína viral Gag e Gag-Pol no decurso da maturação viral.

Os Inibidores da Protease (IPs) são responsáveis pelo bloqueio da montagem/maturação de novas partículas do HIV.

O mecanismo de ação da classe dos IPs passa pela ligação dos mesmos ao local ativo da protease, impedindo que este clive os precursores proteicos em proteínas maduras e funcionais, como os precursores Gag e Gag-Pol. Este mecanismo é apresentado na figura 11.

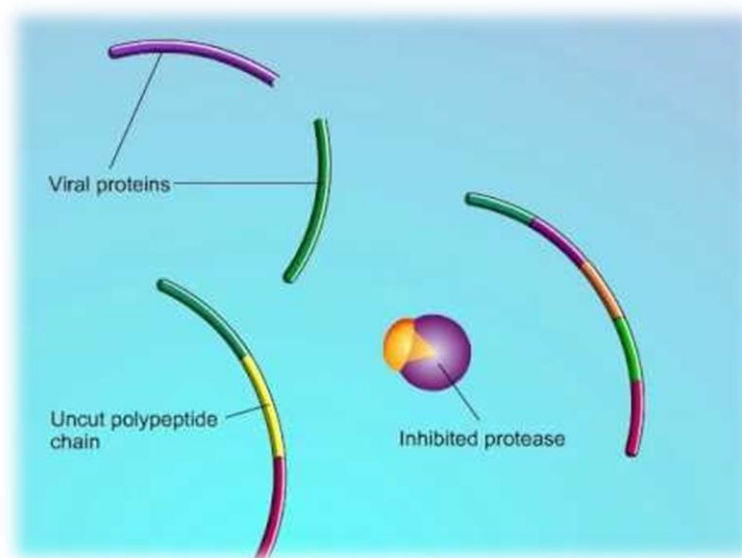


Figura 11 – Mecanismo de ação de Inibidores de Protease (97).

Alguns IPs estão aprovados para o tratamento da infecção do HIV/SIDA, nomeadamente amprenavir (APV, Agenerase), atazanavir (ATZ, Reyataz), darunavir (TMC114, Prezista), fosamprenavir (Lexiva), indinavir (IDV, Crixivan), lopinavir (LPV), nelfinavir. (NFV, Viracept), ritonavir (RTV, Norvir), saquinavir (SQV, Fortovase / Invirase) e tipranavir (TPV, Aptivus) (90).

Como a PR é codificada por um gene pequeno, esperava-se que a probabilidade de aparecimento de resistências aos IPs fosse mínima. No entanto, a taxa de polimorfismo nesses genes é elevada, constatados em 49 dos 99 codões e mais de 20 substituições conhecidas relacionadas a resistência. O aparecimento da resistência aos IPs provavelmente é devido ao acumular gradual das mutações primárias e secundárias ou compensatórias (90).

Os IPs também apresentam resistência cruzada entre eles. Tendo em conta que os IPs têm estruturas químicas relativamente semelhante, as resistências aos IPs associadas às mutações primárias ocorrem geralmente próximo do local ativo da enzima, na zona de ligação do substrato/inibidor. Essas mutações provocam efeitos deletérios na multiplicativa (90).

Para além das mutações primárias nos genes da PR, as mutações secundárias ou compensatórias não ocorrem no local ativo da PR. Não apresentam um efeito sobre a conformação da enzima, mas em conjunto com as mutações primárias melhoram a capacidade de replicação do vírus. Para além destas duas formas de escape aos efeitos farmacológicos, o vírus também seleciona as mutações nos principais locais de clivagem dos precursores das poliproteínas Gag e Gag-Pol que restauram o processamento da proteína e aumentam a produção da própria PR do HIV-1 (90).

V.2 Terapêutica Antirretroviral

- Quando deve ser iniciada

Como é de conhecimento geral, a ART oferece inúmeras vantagens clínicas a pacientes com HIV/SIDA. Mas a tomada da decisão em iniciar a ART requer uma avaliação global da situação, principalmente uma análise cuidadosa acerca dos potenciais riscos e os possíveis benefícios associado ao tratamento (98).

A *priore* sabe-se que o tratamento oferece múltiplos benefícios aos indivíduos infetados pelo HIV/SIDA, devido à supressão da replicação viral. Consequentemente terá efeitos na melhoria do estado da função imunológica, como o aumento quantitativo das células CD4. A supressão da replicação viral também diminui a morbidade e a mortalidade associadas à SIDA, diminui a probabilidade de aparecimento de outras doenças como patologias renais, cardíacas,

hepáticas e tumores não associados à SIDA, e ainda em alguns casos o indivíduo pode voltar a ter uma qualidade de vida próxima do normal (98).

As orientações sugeridas desde as primeiras *guidelines* indicam que qualquer adulto infectado por HIV que apresenta certos sintomas, tais como febre inexplicável, perda de peso, diarreia, deve começar o quanto antes a ART, porque na fase sintomática estes pacientes têm uma grande probabilidade de desenvolver complicações e patologias tradicionalmente associadas à SIDA. De igual modo, indivíduos que apresentam contagem celular CD4 < 200 células/ μ l devem iniciar o ART para toda a vida, uma vez que irá promover a diminuição da morbidade e mortalidade associada a doença (98).

No entanto, a discussão do momento ideal para se iniciar o ART em pacientes adultos assintomáticos com o número de contagem de células CD4 acima de 200 células/ μ l ainda não está claramente definido. Atualmente, as *guidelines* aconselham a iniciar o ART em condições de análise quantitativa de células CD4 < 350 células/ μ l. No entanto, algumas pesquisas recentes de como melhorar o tratamento iniciar a ART com contagem de CD4 até 500 células/ μ l (98).

O grupo NA-ACCORD recentemente publicou um estudo onde defendia o tratamento precoce com ART com contagem celular de CD4 acima de 350 células/ μ l, mostrando efeitos positivos na diminuição da mortalidade.

De igual modo, as *guidelines* sugerem ponderar iniciar o tratamento precoce com ART em doentes com comorbilidades (duas ou mais doenças em simultâneo na mesma pessoa) e elevado risco de evolução da doença.

Ultimamente tem havido uma maior preocupação com certos fatores de risco não associados à SIDA, como é o caso dos fatores de risco cardiovascular. Estes fatores podem ser equacionados no momento de iniciar o tratamento com ART (98).

Estudos recentes concluíram que o tratamento imediato com ART nos indivíduos infectados e sem contagem de células CD4 é capaz de diminuir drasticamente a propagação do vírus HIV, uma vez que reduz o fluxo de transmissão viral. A Organização Mundial da Saúde (OMS) acredita que este plano poderia erradicar a nível mundial a infeção pelo HIV/SIDA em 50 anos (98).

Atualmente não existe nenhum padrão que determine claramente o momento ideal para iniciar a ART em adultos assintomáticos com contagem de células CD4 a partir de 350 células/ μ l. A tomada de decisão de quando iniciar a terapêutica ainda é subjetiva para cada doente, requer

um esclarecimento sobre o assunto por parte do paciente, a sua motivação e compromisso sério com o tratamento (98).

Relativamente a situações em que o paciente apresenta infeções oportunistas agudas associadas à SIDA, contrário às situações abordadas anteriormente, a questão “quando iniciar o tratamento com ART?” gera outras perguntas como “Será que a ART deve ser iniciada no momento do tratamento da infeção oportunista ou a ART deve ser adiada até que a infeção oportunista aguda seja tratada?”.

Atualmente, as *guidelines* sugerem que o tratamento com ART deve ser iniciada precocemente enquanto o tratamento da infeção oportunista aguda se encontra em curso, desde que não haja contra-indicação clínica absoluta para fazê-lo (98).

Estudos recentes mostram que ART em simultâneo com o tratamento para a infeção oportunista reduz cerca de 50% de mortes quando comparado com situações em que se iniciou o ART após o tratamento da infeção oportunista. Portanto, estes resultados foram associados a maior produção de células CD4, o que melhora a resposta imunológica e consequentemente diminui o surgimento de complicações adicionais e/ou morte relacionada à imunodeficiência avançada (98).

- Com que ART se deve iniciar

O regime de tratamento menos complexo, tóxico e dispendioso é o regime ideal para iniciar a ART em todos os estadios da infeção.

Nos últimos 25 anos foram desenvolvidos cerca de 30 medicamentos ARV diferenciados em classes distintas.

Contudo, mesmo com estes múltiplos fármacos desenvolvidos, as *guidelines* orientam de forma simples e direta a seleção dos fármacos para a ART de primeira linha. Geralmente, a sugestão de tratamento preferencial para a primeira linha, no caso de adulto infetado pelo HIV, as *guidelines* sugerem dois NRTIs com um IP potencializado com ritonavir ou um NNRTI (98).

O aconselhamento de IPs potencializados com ritonavir deve-se à grande metabolização dos IPs pelo sistema P450, e na presença de ritonavir esta metabolização diminui, permitindo níveis plasmáticos mais elevados de IP. Desta forma pode-se dizer que o ritonavir é essencialmente usado em doses baixas pois potencializa a ação dos IPs (99).

O ato da seleção da melhor combinação dos fármacos para a ART é acompanhado com algumas questões, tais como: a resistência transmitida, esquema da dosagem, capacidade de tolerância, condições patológicas como problemas cardiovasculares, doença renal, co-infeções (exemplo: a hepatite B e C), análise prévia do perfil de toxicidade do regime da ART a longo prazo. Tendo em conta todos estes pontos, uma grande parte dos médicos optam pelo regime de dose fixa composto por efavirenze (EFV), tenofovir (TDF) e emtricitabina (FTC), considerado um regime único, com boa tolerância, bastante eficaz com uma toma diária, de nome comercial: Atripla (98).

Todavia, existem vários esquemas de IPs potencializados, principalmente em casos de resistência aos NNRTIs, como se verifica na gravidez. Alguns IPs potencializados recomendados podem fazer parte de um regime juntamente com o TDF/FTC.

O fármaco mais recentemente apresentado e que se pode juntar à terapêutica de primeira linha para combinar com o TDF/FTC pertence ao grupo dos INIs, e é denominado RAL como ilustra a tabela 4 (98).

Tabela 4 - Ilustra a inserção do raltegravir como uma nova escolha de primeira linha. Um componente da coluna A e um componente da coluna B devem ser selecionados, para a formação do regime de tratamento (98).

	Column A (NNRTI or PI or RAL)		Column B (Dual-NRTIs)
Preferred components	<u>NNRTI</u> EFV	<u>PI</u> ATV/r (QD), DRV/r (QD), FPV/r (BID), LPV/r (QD or BID)	TDF + FTC
Alternatives	<u>NNRTI</u> NVP	<u>RAL</u> <u>PI</u> ATV FPV FPV/r (QD) SQV/r	+ ZDV + 3TC ABC + 3TC [if HLA-B*5701 negative] ddl + (FTC or 3TC)

Neste sentido, para a criação de um regime terapêutico, os médicos escolhem entre um IP potencializado ou um NNRTI ou um INI em combinação com a dose fixa de TDF/FTC. A criação de regimes com base nesta fórmula é devida à maior toxicidade relacionada às outras combinações, como é o caso dos análogos da timidina – AZT e estavudina (D4T), que deixaram de ser a primeira escolha no que diz respeito ao tratamento da primeira linha, devido à indução das complicações metabólicas relacionadas ao uso a longo prazo. De igual forma, as *guidelines* não apoiam o uso de IPs não potencializados com ritonavir, ou a utilização de combinações com “triple nuc”, tais como abacavir/lamivudina/zidovudina, os quais pela falta de potência antiviral, não seriam eficazes para o tratamento. Combinações como didesoxiinosina (ddl)-TDF também não são recomendadas pela aparente toxicidade (98).

Em relação ao tratamento ideal de certas populações, como é o caso das crianças, adolescentes e grávidas, esses podem ter alguns pontos que diferem dos adultos.

No caso do tratamento das crianças infetadas pelo HIV, normalmente as recomendações de ART são similares às dos adultos infetados pelo HIV. Crianças infetadas com mais de 3 anos de idade é recomendado o tratamento com a nevirapina, como a primeira opção para a ART de primeira linha, enquanto que em crianças infetadas com menos de 3 anos de idade é aconselhável o efavirenze combinado com dois NRTIs, para o tratamento baseado nos IPs, o LPV/r com dois NRTIs, é o preferido (98).

No caso dos adolescentes as recomendações geralmente são iguais às dos adultos.

Por fim, nas mulheres grávidas, as *guidelines* recomendam o tratamento imediato, independentemente do número das células CD4, de modo a minimizar o risco de transmissão vertical. Deste modo, ainda é aconselhado o AZT, um fármaco da classe dos NRTIs, como tratamento preferido, devido ao seu efeito na diminuição da transmissão vertical em monoterapia (98).

- Quando mudar e o que mudar

Geralmente, passado algum tempo, é normal ocorrerem mudanças na ART devido a problemas virológicos, como desafios de adesão (por exemplo, por efeitos colaterais medicamentosos) ou intolerância (resistência pré-existente aos medicamentos) e toxicidades (98)(99). Geralmente é considerada falha terapêutica quando há concentrações plasmáticas persistentes de RNA do HIV depois de 16 a 24 semanas de tratamento (99). Neste contexto surge a possibilidade de mudança do regime de primeira linha para o regime de segunda linha, e às vezes ainda ocorrem complicações que levam à alteração para um regime de terceira linha (99).

Para criação do regime de segunda linha, dada a grande diversidade de fármacos, os médicos devem criar uma combinação de ART totalmente ativo com a capacidade de suprimir o vírus do HIV no plasma para menos de 50 cópias/ml na maioria dos pacientes, incluindo aqueles em que o vírus ganhou resistência a múltiplos fármacos. Este momento de ouro no tratamento viral provavelmente não irá manter-se por muito tempo (98).

Na alteração do regime dos ARV não é aconselhável a interrupção de fármacos únicos. Estes devem ser interrompidos apenas em casos de estabilização de supressão da carga viral ideal, ou seja, quando a carga viral no plasma é inferior a 50 cópias/ml. Estas alterações são normalmente feitas de forma a minimizar a toxicidade ou problemas de tolerância e deve-se acompanhar por uma monitorização cautelosa (98).

Nos casos de falhas no tratamento de ART, para prosseguir com a criação de novo regime no cenário de falha virológica, é aconselhável fazer um teste de resistência aos fármacos e padrões de adesão do doente de forma a garantir as necessidades do indivíduo. Para além destes dois pontos, é necessário estudar todo o histórico terapêutico de ART acompanhado com os exames de resistência passados (98).

A construção de um regime novo totalmente ativo no contexto de falha virológica deve ser constituída por mais de dois fármacos ativos e menos de três medicamentos ativos em quase todos os pacientes. Em geral, recomenda-se um regime que contém um medicamento parcialmente ativo, de forma a garantir o sucesso de tratamento virológico a longo prazo (98).

Os fármacos mais recentemente disponíveis e que podem fazer parte da construção do novo regime de medicamentos ativos são o RAL (INI), o maraviroc (inibidor do CCR5) e os fármacos de nova geração como etravirina, darunavir e tipranavir (98).

Para além das falhas virológicas, também podem ocorrer falhas no sistema imunológico. Estas são reconhecidas quando a restauração das células CD4 é ineficaz para a adequada proteção do paciente contra a morbilidade associada ou não à SIDA. Deste modo, é considerado um resultado imunológico perfeito para proteger o indivíduo quando as concentrações das células CD4 são superiores à 500 células/ml (99).

Observa-se a falha imunológica quando o início de tratamento ocorre num estágio bastante avançado da doença e em pacientes com idade avançada. A resolução da falha imunológica tem sido um desafio para os médicos e atualmente é um dos pontos de investigação clínica (99).

V.3 Efeitos Colaterais do Tratamento da Infecção pelo HIV/SIDA

- Toxicidade dos ARV

São claramente indiscutíveis os benefícios oferecidos pelo tratamento moderno da infeção pelo HIV. Como abordado anteriormente, existe atualmente uma imensidão de medicamentos disponíveis para a ART.

Os regimes desenvolvidos ajudam na supressão da carga viral, de forma a proporcionar ao indivíduo infetado uma qualidade de vida normal ou próxima do normal (99). Contudo, os fármacos mais utilizados nos regimes de tratamento são notavelmente tolerados e seguros, embora todos tenham uma certa taxa de efeitos colaterais, ou seja, efeitos de toxicidade.

Os mecanismos responsáveis pela maioria dos efeitos colaterais presentes numa grande parte dos doentes infetados pelo HIV/SIDA ainda estão por esclarecer. Como exemplos de

efeitos colaterais observa-se perda de gordura periférica (lipoatrofia) e acumulação de gordura central (lipohipertrofia). Estes efeitos podem estar na origem do atraso de tratamento de ART ou mesmo na supressão da ART (99).

- Tipos de toxicidades associadas a fármacos ARV de primeira, segunda e terceira linha

Como já foi dito anteriormente, as cinco classes dos fármacos que podem constituir os regimes de tratamento causam efeitos tóxicos nos doentes em tratamento de ART pela infeção do HIV/SIDA.

Prossegue-se a descrição dos principais efeitos tóxicos causados em cada classe.

Em relação à toxicidade causada pelos inibidores de fusão, a enfuvirtida é um fármaco de elevado custo, pouco tolerado pela necessidade de toma de injeções duas vezes ao dia, que normalmente causa reações subcutâneas dolorosas. Geralmente, este medicamento é recomendado na ausência de outras alternativas (99). Dos inibidores do CCR5, o maraviroc é um fármaco recentemente desenvolvido, que tem boa tolerância e não apresenta toxicidade a curto prazo e nem a longo prazo, até ao momento. No que diz respeito ao mecanismo de ação deste fármaco, ao contrário dos outros medicamentos, este liga-se diretamente à célula hospedeira, podendo posteriormente causar maiores riscos a longo prazo, potencialmente graves [16].

Relativamente ao grupo dos NRTIs, os fármacos mais usados são o tenofovir, o abacavir e a estavudina, que também não fogem à regra da toxicidade. O tenofovir é capaz de provocar efeitos tóxicos no sistema renal e potencializar osteopenia. O abacavir é um fármaco que pode aumentar o risco de problemas cardiovasculares e também está fortemente relacionado a complicações de hipersensibilidade grave em doentes que são positivos para HLA-B*5701. No caso dos análogos da timidina, como a estavudina, eram considerados totalmente benignos, mas atualmente sabe-se que podem causar efeitos colaterais, muitos deles irreversíveis, como é o caso da lipoatrofia (99).

No caso dos NNRTIs, o efavirenze é um agente que causa malformações congénitas, ou seja, é teratogénico. Por este motivo, não é recomendado a mulheres grávidas ou a mulheres em idade fértil. Além desse efeito toxicogénico, também provoca efeitos colaterais a curto prazo no Sistema Nervoso Central (SNC). A nevirapina é um fármaco bastante usado em todo mundo devido ao seu baixo custo e pode causar hepatotoxicidade substancial e complicações de hipersensibilidade. Geralmente, observam-se as reações de hipersensibilidade nas primeiras semanas do tratamento. Também é de notar efeitos tóxicos da nevirapina quando

administrada a pacientes que começam o tratamento com número elevado de células CD4. O mecanismo responsável ainda não é claro. Deste modo, não é recomendado em mulheres com contagem de CD4 acima de 250 células/ μ l e homens com contagem de células CD4 superior a 400 células/ μ l (99).

No caso dos INIs, o RAL não apresenta quaisquer efeitos tóxicos a curto prazo nem a longo prazo. É um fármaco considerado seguro e tem boa tolerância.

Em relação aos IPs, os seus efeitos colaterais são essencialmente o aumento de concentrações lipídicas no plasma, o que aumenta o risco de doenças cardiovasculares. Por outro lado, uma grande parte dos IPs tem interações medicamentosas clinicamente relevantes, principalmente quando estão associados a doses baixas de ritonavir, provocando o aumento da concentração do IP em questão. Geralmente, os efeitos tóxicos oriundos dos IPs provocam distúrbios gastrointestinais. O atazanavir, um IP, tem como efeitos colaterais o aumento da concentração da bilirrubina plasmática não conjugada e por vezes provoca icterícia reversível (99).

Atualmente, os efeitos tóxicos desconhecidos a longo prazo são um dos argumentos contra o início do tratamento precoce.

V.4 Dificuldade no Tratamento

No que diz respeito às dificuldades encontradas no tratamento de ART pode-se enumerar as principais causas: custo do tratamento, resistência viral aos medicamentos administrados, toxicidade causada pelos fármacos que compõem os regimes de tratamento e muitas vezes a falta de compromisso do doente em seguir o tratamento de forma adequada e contínua (99).

- Custo do tratamento

Relativamente ao custo, este é um fator limitante no acesso ao tratamento contra a infeção pelo HIV/SIDA, principalmente nos países carentes de recursos. Atualmente este fator também tem preocupado alguns países ricos em recursos (99).

A nível mundial, uma grande parte dos indivíduos infetados com HIV não têm acesso contínuo ao tratamento. Os projetos a nível internacional que dão acesso a fármacos ARV nos países com recursos financeiros mais limitados, atingem apenas uma parte da população infetada e atualmente esses projetos internacionais estão ameaçados pela crise económica e pelos ajustes das novas políticas (99).

Normalmente, as soluções encontradas nas regiões com menos recursos é a administração de fármacos menos dispendioso, como a zidovudina, estavudina e a nevirapina. Esses medicamentos estão associados a baixo custo mas normalmente não fazem parte da primeira opção recomendada nas *guidelines*, ou seja, não são agentes preferencialmente recomendados nos países ricos em recursos, devido aos seus potenciais efeitos tóxicos (99).

Nos países mais afortunados, como os EUA, normalmente o tratamento é financiado pelo Estado e o custo da terapia é calculado por volta dos \$12.000 anuais, por indivíduo. A preocupação aparente nessas regiões é a capacidade de o país fornecer o tratamento individualmente e de forma contínua a todos os pacientes que dele precisam. Atualmente, a lista de espera tem crescido e por outro lado, a economia do país pode não ter capacidade para providenciar tratamento adequado a todos os que dele necessitam (99).

O que pode atenuar o custo do programa de tratamento seria a substituição dos fármacos originais por medicamentos genéricos, como é o caso da lamivudina genérica e do saquinavir genérico. Por outro lado, os efeitos secundários dos medicamento genéricos não são conhecidos (99).

- Resistência viral aos medicamentos

Muitas vezes é possível estabelecer uma associação entre a resistências aos fármacos e a má adesão à terapêutica. É esperada uma adesão estrita de forma a ser atingida e mantida a supressão viral. Mesmo com boa adesão à terapêutica, a administração de certos medicamentos pode causar desenvolvimento de resistências a esses medicamentos a curto prazo. Estes são considerados fármacos com baixa barreira genética. Esse desenvolvimento rápido pode ser observado em alguns fármacos mais populares que constituem o regime da primeira linha, como a lamivudina, a emtricitabina, a nevirapina e o efavirenze. Outros fármacos, como os IPs, são considerados fármacos com alta barreira genética, pois acredita-se que as resistências só aparecem a longo prazo. Por outro lado, pensa-se que esses inibidores sejam mais tolerantes em termos de má adesão (99).

Com tudo isso, pode-se dizer que alguns fármacos são mais suscetíveis a desenvolver resistência que outros, nomeadamente por mecanismos de mutação genética, troca de tropismo (uso CXCR4 em vez de CCR5 para a entrada do vírus), maior afinidade pelo co-receptor CCR5 e diminuição do MPI devido aos vírus resistentes que desenvolvem a capacidade de se ligarem à forma modificada do CCR5.

Em geral, as condições que favorecem a formação de estirpes resistentes são: má terapêutica com os mais variados fármacos, a má adesão à terapêutica com tomas descontinuadas ou

autossuspensões, a toxicidade dos fármacos que muitas vezes leva à suspensão do tratamento, a limitada potência do regime de tratamento selecionado, mecanismos de má difusão através da membrana que diminui a concentração intracelular do fármaco, entre outras.

O desenvolvimento da resistência é um dos fatores que leva à interrupção do tratamento devido a falha virológica, dificultando assim o tratamento contínuo do indivíduo infectado. Portanto, a implementação de medidas para retardar o desenvolvimento de fármacos resistentes do HIV são uma prioridade (99).

- Toxicidade e a má adesão ao tratamento

Como já foi mencionado, a toxicidade originada pelos fármacos é uma das grandes limitações no tratamento da população com infecção do HIV. Infelizmente, a maioria dos fármacos que compõem os regimes de tratamento têm efeitos tóxicos a longo prazo, o que contribui para o surgimento de complicações patológicas, não promovendo a recuperação do sistema imunitário, diminuindo a qualidade de vida do paciente e encurta a esperança média de vida(99).

Muita das vezes, os pacientes param a ART, o que complica o próprio tratamento. As razões que levam os pacientes a terem essas atitudes, grande parte das vezes, é devido aos efeitos colaterais originados pelo tratamento e a mudança de rotina (99).

VI. Prevenção e Profilaxia

Uma das principais formas de prevenir a infecção pelo HIV é apostar na educação da comunidade, informar acerca dos modos de transmissão e as possíveis medidas de prevenção da transmissão viral, disponibilizar os testes de diagnóstico de HIV e acesso ao tratamento adequado, de forma a evitar futuras transmissões (100).

As medidas de prevenção passam pelo maior acesso aos serviços de prevenção, tais como a profilaxia pré-exposição oral e a pós-exposição oral, prática de sexo seguro, com o uso de preservativo; evitar o uso de agulhas reutilizadas entre os toxicodependentes de drogas endovenosas;(101) análise de sangue dos potenciais doadores e a contra-indicação de amamentação de crianças de mães seropositivas. Contudo, a detecção precoce de indivíduos infectados é o método de prevenção mais efetivo, evitando que os mesmos se tornem potenciais transmissores do vírus.

No entanto, a utilização da profilaxia com ARV é o método mais eficiente para prevenir a transmissão vertical do HIV da mãe infetada para o filho, o que conseqüentemente reduz a percentagem de crianças infetadas (61).

Nos países desenvolvidos, em condições fisiológicas de gravidez, recorre-se à terapia antirretroviral altamente ativa (*highly active antiretroviral therapy* - HAART). Esta terapêutica usa um regime de medicamentos que reduzem a viabilidade de escolher clones de vírus portadores de diversas mutações genéticas e oferecer resistência ao regime combinado de três ARV (90). Este tratamento é combinado com um parto por cesariana, o que leva à diminuição da taxa de transmissão para valores inferiores a 1%. Na prática, houve uma quase erradicação da transmissão vertical do HIV. Nos países em desenvolvimento está em vigor a utilização de programas de tratamento profiláticos compostos por nevirapina, com ou sem zidovudina, administrados durante um período não prolongado [45]. Nesses casos, a percentagem de transmissão perinatal do HIV varia entre os 5-7%, dependendo dos países e do regime aplicado.

As práticas mais recentemente implementadas nas medidas de prevenção são a profilaxia pré-exposição oral (PrEP) e a pós-exposição oral (PEP).

VI.1 Profilaxia Pré-exposição Oral

A nível mundial, mesmo com as medidas tomadas para a prevenção do HIV, a transmissão desse vírus continua a verificar-se e mesmo a aumentar. Desta forma, foi necessário implementar novas estratégias de prevenção: profilaxia pré-exposição (*Pre-Exposure Prophylaxis* - PrEP) e a profilaxia pós-exposição (*Post-Exposure Prophylaxis* - PEP) (100).

A PrEP foi aprovada pelo FDA em 2012 e é constituída por uma combinação única de doses fixas de TDF (300mg) e de emtricitabina (200mg). Este esquema é utilizado em indivíduos com elevado risco de aquisição do HIV, englobando os homens homossexuais e heterossexuais, mulheres que têm diversos parceiros sexuais sem prevenção e indivíduos que utilizam drogas endovenosas (100).

Atualmente existem dois ensaios clínicos da PrEP, a TDF/emtricitabina e a FTT/emtricitabina. A TDF/emtricitabina é administrada uma vez ao dia, durante o tempo em que o doente estiver em risco de adquirir a infeção viral (100).

Antes de iniciar as administrações de PrEP é essencial descartar a possibilidade de ter ocorrido previamente a infeção pelo HIV, porque a toma de PrEP em casos de infeção leva ao desenvolvimento de resistência à emtricitabina num curto espaço de tempo, o que

futuramente poderia criar certas limitações no desenvolvimento dos regimes de tratamento para o paciente em questão (100).

A TDF/emtricitabina, devido à toxicidade causada nos nefrónios, não é indicada em indivíduos com uma *clearance* da creatinina inferior a 60 ml/min.

O outro ensaio clínico, o FTT/emtricitabina da PrEP, está diretamente associado à adesão do utente.

Certos estudos mostram que nos indivíduos assíduos na toma diária de PrEP com o TDF/emtricitabina houve uma diminuição da transmissão viral para 86% nos homens homossexuais e para 75% nos homens heterossexuais e mulheres, em comparação com o grupo controlo onde foi administrado placebo (substâncias neutras) correspondentes. Nos homens homossexuais com boa adesão à PrEP, fazendo corretamente as tomas diárias, não se verificou nenhum caso de infeção pelo HIV (100).

Estudos clínicos têm vindo a demonstrar a segurança e eficácia da PrEP com os medicamentos TDF/emtricitabina. No entanto, a prescrição da PrEP tem sido indicada somente para grupos considerados de risco (100).

Como é de notar, são indiscutíveis os benefícios e a eficácia da PrEP na prevenção da infeção do HIV. Todavia, este tratamento apresenta alguns efeitos adversos, como problemas a nível da função renal e óssea. Entre esses destacam-se o Síndrome de Fanconi ou acidose tubular renal tipo IV, a osteopenia e a osteoporose. Os efeitos colaterais do tratamento da PrEP com TDF/emtricitabina nas grávidas ainda não estão bem esclarecidos, mas se a mulher grávida se encontrar num risco elevado, os benefícios da prevenção da infeção pelo HIV parecem compensar os riscos nessa situação (100).

Relativamente ao risco de desenvolvimento de resistências ao uso de TDF/emtricitabina, observa-se em doentes com infeção aguda pelo HIV que apresentaram resultados falsos negativos nos testes de triagem para a deteção de anticorpos de HIV. Devido a este facto, é recomendado aos médicos um rastreio cuidadoso a todos os utentes com suspeita da infeção aguda pelo HIV, antes da prescrição para iniciar a PrEP com a TDF/emtricitabina. Pacientes com uma história de contactos sexuais recentes, e alguns sintomas de infeção aguda pelo HIV, como a febre, a erupção cutânea, a faringite e a linfadenopatia, recomenda-se o exame de RT - PCR quantitativo do HIV para avaliar a infeção aguda. Também se pode fazer o teste da quarta geração para o diagnóstico de infeção aguda pelo HIV antes da prescrição médica para iniciar a PrEP com TDF/emtricitabina. Conhecendo o tempo de janela que impossibilita a deteção de RNA viral, anticorpos e Ag24, nos primeiros 10 dias após o contágio pode-se ter resultados falsos negativos. Nessas situações aconselha-se a repetição dos testes antes da

prescrição para a PrEP. Em casos de falsos negativos, o pré-tratamento com o TDF/emtricitabina pode levar à aquisição de resistência aos dois ou a um desses fármacos, diminuindo as opções de escolha de medicamentos que possam fazer parte dos regimes de tratamento (100).

Atualmente existe uma preocupação no que diz respeito ao desenvolvimento de novas estratégias de PrEP. Ensaio com um anel intravaginal que contém dapivirina, pertencente à classe dos NNRTIs, reduziu a infecção do HIV em mulheres africanas comparativamente aos placebos. Este método ainda se encontra em estudo (100).

O cabotegravir é um inibidor de transferência da cadeia de IN de ação prolongada, um produto injetável, seguro e bem tolerado. De momento também se encontra em avaliação em pessoas transsexuais e mulheres africanas, onde é quantificada a dosagem de 8 em 8 semanas após a toma inicial (100).

Outro método de prevenção que se encontra em estudo recorre ao uso de anticorpos monoclonais amplamente neutralizantes (bNAbs), ou seja, é uma forma de imunoprofilaxia. Esses anticorpos neutralizantes têm a capacidade de impedir a replicação viral de mais de uma estirpe de HIV-1. O VRC01 é um anticorpo monoclonal amplamente neutralizante, injetável, seguro e bem tolerado depois de muitas administrações intravenosas. De momento encontra-se em testes (100).

Atualmente estuda-se ainda a possibilidade da utilização de antirretrovirais transdérmicos implementados para a prevenção da infecção do HIV, como regimes de quimioprofilaxia em que a toma seria a cada poucos meses.

VI.2 Profilaxia Pós-exposição Oral

A profilaxia pós-exposição (*post-exposure prophylaxis* - PEP) é uma medida de prevenção que utiliza os fármacos ARV durante um curto espaço de tempo para diminuir o risco de aquisição da infecção pelo HIV após a exposição (102).

A publicação da *guideline* da OMS em 2014 recomenda a utilização da PEP em situações em que o indivíduo esteve vulnerável a exposições que oferecem um grande risco de transmissão do HIV. Este tratamento é aconselhável preferencialmente dentro de 72 horas após a situação de risco (102).

Certas exposições podem levar à necessidade de prescrever o PEP, como o contato por picada ou corte, por exemplo com o sangue, saliva que contenha sangue, leite materno,

secreções genitais, líquidos cefalorraquidiano, amniótico, peritoneal, sinovial, pericárdico ou pleural, prática sexual, entre outros (102).

Contrariamente a estas exposições, outras não levam a prescrição da PEP, tais como, pacientes HIV positivo comprovado, lágrimas sem conter sangue, saliva sem conter sangue, urina e suor (102).

Nestas situações, o utente deve ser informado sobre a limitação e o risco de futuras exposições. Normalmente não é requerido o teste de HIV, mas pode-se fazer em caso de pedido pela pessoa exposta (102).

Relativamente à prescrição da PEP pela OMS, o regime de tratamento é composto por dois fármacos, considerado eficaz, mas são preferíveis três medicamentos (102).

No caso dos adultos e adolescentes é recomendado o regime com TDF/3TC (ou FTC) como primeira linha. Para a composição de um regime de PEP com três medicamentos, o LPV/r ou o ATV/r são os fármacos de eleição. Como alternativas a esses dois fármacos existem o RAL, DRV/r ou EFV (102).

As recomendações da OMS no que diz respeito à prescrição de PEP nas crianças com idade superior a 10 anos, passa pela prescrição de AZT/3TC como regime preferencial, e como regimes alternativos tem-se ABC/3TC ou TDF/3TC (ou FTC). Nestes casos, para a formação de regimes de 3 medicamentos estão disponíveis o LPV/r como primeira opção, as opções alternativas encontra-se entre ATV / r, RAL, DRV, EFV e NVP (102).

VII. Novos Medicamentos e Novo Tratamento

O surgimento de estirpes resistentes a um ou múltiplos fármacos de primeira linha durante o tratamento de ART da infeção pelo HIV tem criado grandes preocupações, principalmente no que toca aos pacientes com resistência multi-classe. Estes doentes são mais difíceis de tratar e construir um regime terapêutico eficaz, devido às limitadas opções, levando muitas vezes à utilização de medicamentos que não fazem parte da recomendação da terapêutica inicial (87).

Estes motivos, acoplados à toxicidade associada a muitos fármacos existentes, incentivam ao desenvolvimento de novos medicamentos.

VII.1 Novos Medicamentos

Atualmente encontram-se alguns medicamentos em desenvolvimento utilizando mecanismos relativamente diferentes dos fármacos existentes.

Pertencente à classe dos NNRTIs encontra-se em estudo um novo fármaco, a doravirina. Este apresenta um ótimo perfil, pois mantém-se ativo contra o vírus com mutações K103N e Y181C as quais conferem resistência a outros fármacos desta classe. Da categoria NRTIs, está em desenvolvimento o cabotegravir, quimicamente associado ao dolutegravir (DTG) com uma atividade promissora. Outro medicamento pertencente a esta classe é o GS-9883, o qual está a ser testado clinicamente em combinação com o novo tenofovir – TAF e FTC (87).

Além destes fármacos, também estão sob desenvolvimento dois inibidores de maturação, o BMS-955176 e o GSK2838232. O mecanismo de ação destes inibidores de maturação é diferente dos mecanismos dos IPs. Ambos pertencem à classe dos inibidores de maturação de segunda geração. O primeiro apresenta-se como um promissor fármaco ativo para variantes de HIV com polimorfismo na poliproteína do Gag. O segundo inibidor de maturação é ativo sobre isolados de HIV resistentes ao bevirimat (87).

Os bNAbs estão em estudo como fármacos com ação antiretroviral e têm como alvo o invólucro viral. De momento dois anticorpos, o 3BNC117 e o VRC01, mostram ser capazes de suprimir a replicação do HIV em múltiplos pacientes (87).

Atualmente, estes são alguns exemplos de fármacos em estudos. Em geral, os novos fármacos em desenvolvimento apresentam potenciais melhorias em termos de eficácia e de tolerância em relação aos fármacos existentes.

VII.2 Futuras direções de tratamento do HIV

Para o sucesso da terapêutica contra o HIV a longo prazo é imprescindível uma eficácia duradoura, segura e tolerável. Uma das apostas para futuras direções de tratamento do HIV é a simplicidade dos regimes ART (87).

De momento encontram-se em desenvolvimento dois fármacos de *Short Tandem Repeat* (STRs), o DTG/RPV e o 3TC/DTG, desafiando o paradigma dos regimes constituídos por dois NRTIs e um terceiro medicamento. Um estudo envolvendo o 3TC/DTG mostra resultados promissores após 24 semanas de tratamento em pacientes que nunca fizeram tratamento com fármacos ARV.

O darunavir é um NRTI que está em estudos juntamente com a combinação de DTG/cobicistat (NCT02499978 e NCT02486133) (87).

Embora os testes revelem resultados promissores em 24 semanas de tratamento ou mais, é importante avaliar a durabilidade a longo prazo da supressão viral sem aparecimento de resistência aos regimes de dois medicamentos (87).

Os novos fármacos em desenvolvimento encontram-se em diferentes estádios de ensaios clínicos. Se forem aprovados, serão uma mais valia no que diz respeito à ampliação de opções de tratamento, principalmente em pacientes com resistência a multi-classes de fármacos (87).

Esta evolução, no que toca ao desenvolvimento de novos modelos de tratamento, irá acompanhar a emergência de fármacos ARV genéricos. Todos esses avanços serão imprescindíveis para alcançar as metas ambiciosas implementadas a nível mundial (87).

Concomitantemente às inovações da ART, também estão em curso estudos de possíveis abordagens/estratégias que procuram alcançar a cura. Grande parte dessas pesquisas encontram-se numa fase inicial de ensaios clínicos, sendo ainda necessário um compromisso sistemático de longo prazo para avaliar os seus potenciais terapêuticos (87).

VIII. Possibilidade da cura

São inegáveis os benefícios e o sucesso do tratamento com ART nos pacientes com infeção por HIV. Todavia esses regimes de tratamento estão associados a diversos efeitos colaterais, dependentes de uma ótima adesão ao longo da vida, a um elevado custo, à incapacidade de fornecer de forma contínua o respetivo tratamento e o surgimento de resistências aos fármacos com consequente falha terapêutica. Tornam-se assim prioritários estudos em busca da cura definitiva do HIV/SIDA.

Algumas abordagens de cura do HIV-1 têm estado em estudo. São eles a modificação de células hospedeiras para resistir ao HIV-1, engenharia de células T para eliminar células infetadas pelo HIV, bNAbs do HIV-1, vacinação terapêutica e a estratégia de “chutar e matar”, ou seja, expor o HIV-1 latente com agentes de reversão de latência (*latency reversing agents* - LRAs) e matar as células expostas através de funções efetoras imunológicas. Atualmente esta última estratégia tem sido a mais explorada e pesquisada, e restam dúvidas se as LRAs são capazes de esgotar os reservatórios virais *in vivo* ou se os LRAs existentes atualmente são seguras para o uso na prática clínica (103).

Basicamente o esquema desenhado para alcançar a cura passa por 3 abordagens: cura por erradicação (eliminação de todos os reservatórios), cura funcional (controlo imunológico sem erradicação do reservatório) e cura híbrida (redução do reservatório com melhor controlo imunológico como ilustra a figura 12 (103).

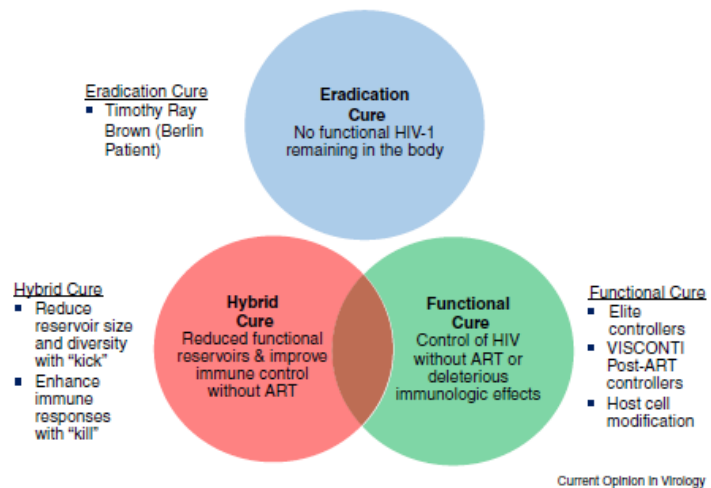


Figura 12 – As três abordagens idealizadas para alcançar a cura (103)

VIII.1 Cura da erradicação

Relativamente às três estratégias que têm em vista a cura para o HIV, a cura por erradicação só tem um exemplo: Timothy Ray, o paciente de Berlim. Este baseia-se na substituição do sistema imunológico infetado, através de um transplante alogénico de células estaminais hematopoéticas, por um sistema imunológico resistente ao HIV-1. Este sistema é constituído por linfócitos que apresentam uma mutação de 32 pares de bases em homozigotia no gene que codifica para o co-receptor CCR5 devido a uma mutação no gene CCR5D32 homozigótico das células do doador. Em situações de transplante quase completo do sistema imunológico do indivíduo receptor, a erradicação viral não é garantida. Este modelo de cura tem limitações na sua abordagem, como o alto risco de morbilidade e mortalidade, pelo ato de transplante alogénico (103). Por outro lado, não é uma garantia de cura pois podem existir estirpes que não precisem do CCR5 para infetar as células.

Devido a estas limitações, acredita-se que talvez seja mais segura e eficaz a cura pelas outras duas estratégias, a cura funcional e a híbrida.

VIII.2 Cura funcional

A cura funcional tem vários modelos de estratégia. Uma delas é a alteração do genoma humano nas células T CD4⁺ autólogas ou nas células estaminais hematopoiéticas autólogas, através de endonucleases, a fim de eliminar o gene do CCR5, inibindo a entrada do HIV através da eliminação do co-receptor principal. As limitações associadas a esta teoria são as seguintes: não se sabe se é possível a modificação de uma quantidade suficiente de células

alvo e se no futuro não poderá surgir um vírus com tropismo para CXCR4 ao longo do tempo (103).

Outra abordagem para a cura funcional é investir na resposta imunitária, projetando o aparecimento do receptor de antígeno quimérico nos linfócitos T citotóxicos efetores contra epitopos de HIV-1 no MHC-I ou invólucro de HIV-1 na superfície celular. O desafio aparente desta estratégia é se existe um número suficiente de células T modificadas com o receptor de antígeno quimérico que possam ser direcionadas a epitopos de HIV-1 invariantes (103).

Uma estratégia para a cura funcional pode ser a utilização de uma infusão passiva de um anticorpo monoclonal amplamente neutralizante, ou um conjunto deles. Atualmente testa-se a capacidade deste modelo em diminuir a quantidade de reservatórios *in vivo*.

A abordagem da modulação da imunidade mediada por células T também pode controlar a replicação viral na ausência de ART. Os controladores de elite podem controlar a replicação viral em situações de ausência de ART, muitas vezes através de alelos HLA favoráveis e respostas de células T CD8⁺ altamente eficazes. Esta estratégia no cenário de uma infecção latente estabelecida em humanos é atualmente incerta (103).

A estratégia de cura funcional denominada VISCONTI é uma abordagem que apresenta capacidade de controlo durável da viremia depois do início da ART precoce na ausência de alelos favoráveis de controladores de elite. Ainda são desconhecidos mecanismos de controlo imunológico desta abordagem (103).

VIII.3 Cura Híbrida

Relativamente à última estratégia, a cura híbrida, esta tem dois grandes objetivos: reduzir o reservatório viral e aumentar o controlo imunológico do reservatório residual na ausência da ART. Esta estratégia denomina-se “choque e morte” ou “chutar e matar” (103).

Nesta abordagem reduz-se o reservatório através da reativação farmacológica de provírus latentes (choque/chutar) com LRAs, resultando na morte de células infetadas (morte/matar) pela depuração imunitária ou efeitos citostáticos das proteínas expressas pelo HIV-1 na célula hospedeira (103).

Os ensaios clínicos de LRAs do HIV-1 melhor estudados são os inibidores da desacetilase das histonas (*histone deacetylase inhibitors* - HDACi), tais como o vorinostat, panobinostat e romidepsin.

Os estudos com vorinostat demonstram a capacidade que este fármaco tem em aumentar a expressão do RNA do HIV-1 da célula hospedeira, apesar de este efeito não ser consistente depois de algumas doses repetidas e sem aumento em simultâneo da virémia (103).

Os ensaios de panobinostat e romidepsin demonstraram o aumento da expressão do RNA do HIV-1 das células hospedeiras, e simultaneamente observa-se o aumento relativo da virémia plasmática. Entre algumas limitações é importante destacar a incapacidade dos métodos que quantificam o RNA do HIV-1 no plasma (*Transcription-Mediated Amplification* - TMA e AmpliPrep/TaqMan) em distinguir o RNA viral associado ao virião do DNA do HIV-1 no plasma que resulta da citotoxicidade da HDACi (103).

Contudo, estudos provaram que os HDACi podem apresentar efeitos colaterais a longo prazo a nível da expressão genética *in vivo*.

Além de ensaios *in vivo*, também foram realizadas avaliações *ex vivo* de novos LRAs.

As últimas pesquisas em *ex vivo* analisaram conjuntos de inibidores de proteína quinase C (*Protein kinase C* – PKC), ou inibidores BRD4 (domínio-bromo que contém 4 proteínas) com os HDACi. Os resultados obtidos por esses estudos demonstraram que os agonistas de PKC isolados são normalmente os LRAs com mais potencial. Pensa-se que este facto resulta da ativação parcial de células T por via PKC (103). Alguns estudos indicam que a transcrição do genoma do HIV-1 pode ser modulada pelas LRAs como HDACi, PKC ou BRD4. Uma das questões importantes levantadas neste contexto é se esses compostos, isoladamente ou em combinação, serão seguros o suficiente para uso em pacientes com HIV positivo que têm a virémia suprimida pela ART (103).

Em relação aos LRAs restam dúvidas se são capazes de reduzir o reservatório em *ex vivo*. Acredita-se que uma estratégia para a cura funcional passa pela diminuição do tamanho e diversidade do reservatório, seguida do aumento da resposta imune para epítomos virais conservados. Esta abordagem poderia ser conhecida como uma estratégia de "chutar, matar e conter" (103).

Pesquisas associadas a mudanças de tamanho do reservatório e investigação do controlo por mecanismos do sistema imunológico irão revelar se esta estratégia poderá ser o novo caminho para alcançar a cura do HIV-1.

IX. Conclusão

Atualmente, como ainda não se alcançou a cura, a boa adesão ao tratamento de ART e o combate aos efeitos tóxicos tardios dos fármacos são a melhor opção para os doentes com

infecção pelo HIV. Isto porque o tratamento visa a supressão viral prolongada, reduzindo assim a morbidade e mortalidade permitindo que o paciente tenha uma vida normal ou próximo do normal. Por outro lado, o tratamento diminui a propagação da doença, prevenindo a transmissão viral, tendo consequências positivas no que diz respeito à expansão da epidemia global (87)(99).

Contudo, os esforços feitos, no que diz respeito ao desenvolvimento dos novos fármacos de forma a tornar o tratamento mais eficaz, os estudos das várias abordagens de cura não devem ser poupados, serão necessárias pesquisas e um compromisso sistemático para avaliar os verdadeiros potências terapêuticos. Mas estes esforços precisarão ser apoiados pelos líderes políticos para que a epidemia seja verdadeiramente controlada.

NOTA: Trabalho feito de acordo com o novo acordo ortográfico.

Referências Bibliográficas

1. Alemu Y, Atomsa A, Sahlemariam Z. Hematology. Ethiopia Public Health Training Initiative. 2006. 1–549 p.
2. Bain B, Bates I, Laffan M, Lewis SM. Dacie and Lewis Practical Hematology. 11th ed. Elsevier; 2012. 1–653 p.
3. Kaushansky K, Lichtman M, Beutler E, Kipps T, Prchal J, Seligsohn U. Williams Hematology. 8th ed. McGraw-Hill Professional. 2010. 1–2460 p.
4. Bain BJ. Blood cells: A practical guide [Internet]. 4th ed. Chemistry & Blackwell; 2006. 1–487 p. Available from:
http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract%5Cnhttp://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=9Oe8OaZOoaAC&oi=fnd&pg=PP2&dq=Blood+Cells,+A+practical+guide&ots=wRV01s-jBS&sig=xFnFsl94pIBp_AOIx4VaG033jh8
5. Failace R. Hemograma manual de interpretação. 5th ed. Artmed; 2009. 1–424 p.
6. Moore G, Knight G, Blann A. Haematology. 1st ed. Oxford University Press; 2010. 1–728 p.
7. Saraiva A, Sternick G, Santos M, Montalvão S, Machado T, Rocha T. Manual de diagnóstico laboratorial das Coagulopatias Hereditárias Plaquetopatias. 1st ed. MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Atenção à Saúde Coordenação- Geral de Sangue e Hemoderivados; 2012. 1–134 p.
8. Recombiplastin 2G. Hemosil; 2012.
9. Roshal M. Prothrombin Time. In: Transfusion Medicine and Hemostasis: Clinical and Laboratory Aspects: Second Edition. 2013. p. 799–803.

10. Manzato F. The prothrombin time: Review. Riv Ital della Med di Lab [Internet]. 2009;5:131–7. Available from: <http://www.simel.it/articoli/articolo-101805.pdf%5Cnhttp://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L354711296>
<http://novacat.nova.edu:4550/resserv?sid=EMBASE&issn=1825859X&id=doi:&atitle=The+prothrombin+time%3A+Review&stitle=Riv>.
11. Synthasil: Instrumentation Laboratory. Hemosil; 2012.
12. Roshal M. Activated Partial Thromboplastin Time. In: Transfusion Medicine and Hemostasis: Clinical and Laboratory Aspects: Second Edition. 2013. p. 805–7.
13. D-Dímer HS. Hemosil; 2012.
14. Dedicio, editor. Malária Pf/Pan Ag 4 Espécies (teste cassete). 2015.
15. Use and Function Reference Information, Beckman Coulter LH 750 and 780. 2015.
16. Informações Essenciais para Aerospray Hematology Slide Stainer/Cytocentrifuge (Modelo 7150)(Colorador de Lâminas de Hematologia/Citocentrífuga), Respetivos Acessórios e Suprimentos. Wescor; 2009. ~1-31.
17. Diesse VES - MATIC Cube Family. A. Menarini diagnostics. 2018. p. 1.
18. Instruções de utilização e fundamento teórico do Aparelho ACL TOP 700. 2015.
19. Hemostasis Diagnostics, ACL TOP Family. 2018. p. 1.
20. Gaw A, Murphy MJ, Cowan RA, O`Reilly DSJ, Stewart MJ, Shepherd J. Clinical Biochemistry. 3rd ed. Churchill Livingstone; 2004. 1–349 p.
21. Marshall W, Bangert SK. Clinical Chemistry. 5th ed. Elsevier Limited; 2004. 1–422 p.
22. Colombeli AS da S, Falkenberg M. Comparação de bulas de duas marcas de tiras reagentes utilizadas no exame químico de urina. Scielo. 2006;1–9.
23. Simerville JA, Maxted WC, Pahira JJ. Urinalysis: A comprehensive review. American Family Physician. 2005. p. 1153–62.
24. McPherson, Richard A, Pincus, Matthew R, editors. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais de Henry. 21st ed. Manole; 2007. 1–1669 p.
25. Mundt LA, Shanahan K. Graff`s Textbook of Urinalysis and Body Fluids. 2nd ed. Wolters Kluwer, Lippincott Williams e Wilkins; 2011. 1–330 p.
26. Unknown. Urinary sediment examination. Japanese Assoc Med Technol. 2017;51–85.
27. Comar RS, Schulz T, Machado AN, França FS, Haas P. Análise citológica do líquido peritoneal. 2010 p. 73–9.
28. Kopcinovic LM, Culej J. Pleural, Peritoneal and Pericardial Effusions - A biochemical approach. Biochemia Medica. 2014. p. 123–37.
29. Mundt LA, Shanahan K. Synovial Fluid. In: Graff`s textbook of routine urinalysis and body fluids. 2nd ed. Wolters Kluwer, Lippincott Williams e Wilkins; 2011. p. 218–21.

30. Srivastava R, Murphy MJ, Jeffery J. Cerebrospinal fluid: the role of biochemical analysis. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2008;218–21.
31. Comar SR, Machado NDA, Dozza TG, Haas P. Análise citológica do líquido cefalorraquidiano. *Estud Biol Ambient e Divers*. 2009;93–102.
32. Tarchoon A. Revisiting Cerebrospinal Fluid (CSF) Examination. *Lab Insights*. 2016;(1–9).
33. McGrath EE, Anderson PB. Diagnosis of Pleural Effusion: A Systematic Approach. *Am J Crit*. 2011;20:119–27.
34. Laboratories A. Manual de funcionamento, Abbott Diagnostic: Verão de software 3.6. 2012.
35. Laboratories A. Manual de Operação do Architect System. 2012.
36. Burtis C, Ashwood E, Bruns D. *Tietz Fundamentos de Química Clínica*. 6th ed. Elsevier; 2008. 1–952 p.
37. Group W. Memória Técnica. IRICELL. 2008.
38. *Basic Immunology*. Assoc Optom City Univ London; Greg Heath BSc (Hons), MCOptom, Dip Clin Optom. 2002;1–6.
39. Botucatu ECAR, Cruvinel L de M, Júnior WM, Araújo DAP, Júlio, Catelan TT, et al. ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reum*. 2010;434–61.
40. Souza AWS De, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Cruvinel WDM, Andrade LEC, et al. Sistema imunitário: parte II . O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. *Rev Bras Reumatol*. 2010;552–80.
41. Lleo A, Invernizzi P, Gao B, Podda M, Gershwin ME. Definition of human autoimmunity - autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*. 2010. p. 259–66.
42. Birtane M. Diagnostic Role of Anti-Nuclear Antibodies in Rheumatic Diseases. *Turkish J Rheumatol*. 2012;79–89.
43. EUROIMMUN. Mosaico HEp-2/Figado (macaco) Instruções para o teste de imunofluorescência indirecta. 2015.
44. Parija SC. *Microbiology Immunology*. 2nd ed. Elsevier; 2012. 1–684 p.
45. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: A journey revisited. *Diagn Pathol*. 2009;1–10.
46. *Atlas of Antinuclear Antibodies*. Medical e Biological Laboratories; 2016. 10–35 p.
47. EUROIMMUN. EUROLINE ANA Profile 3 plus DFS70 (IgG) Instruções do teste. 2015.

48. Meroni PL, Bizzaro N, Cavazzana I, Borghi MO, Tincani A. Automated tests of ANA immunofluorescence as throughput autoantibody detection technology: Strengths and limitations. *BMC Medicine*. 2014. p. 1–5.
49. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. *Immunology*. 7th ed. Canada: Elsevier Limited; 2006. 1–563 p.
50. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: A consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011. p. 567–674.
51. Qouzi A Al, Salamah A Al, Rasheed R Al, Musalam A Al, Khairy K Al, Kheir O, et al. Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes in Saudi Men. *Am Soc Microbiol*. 2002;
52. Júnior M, Danilo Antônio Pereira Araújo, Júlio Tiekao Takao Catelan, Tânia Wagner Silva de Souza, Alexandre de Melo Cruvinel WECA, Luís Pereira da Silva N. ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reum*. 2010;552–80.
53. RPR - Carbono Aglutinação em placa. 2016.
54. TPHA Microplate hemagglutination. ChronoLab; 2014.
55. Rosa de Bengala - Aglutinação em placa. ChronoLab; 2015.
56. For research use only. The Binding Site Group Ltd; 2011.
57. Arosa F, Cardoso E, Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia*. 2nd ed. LIDEL; 2012. 1–605 p.
58. Keren DF. *Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis*. Arnold; 2003. 1–395 p.
59. Ferreira W, Sousa J, Lima N. *Microbiologia*. Lisboa: LIDEL; 2010. 1–611 p.
60. Weekley, Dr Susan; Dunne M. *Blood Culture*. Biomérieux; 1–36 p.
61. Barroso H, Silvestre A, Teixeira N. *Microbiologia Médica*. 1st ed. Lisboa: LIDEL; 2014. 1–79 p.
62. Lopes HV. *Diagnóstico das infecções do trato urinário*. Scielo. 2005;1–3.
63. Vandepitte J, Kraesten E, Rohner P, Peter P, Claus C H. *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2003. 1–121 p.
64. Fernandes L de F, Pimenta FC, Fernandes F de F. Isolamento e perfil de suscetibilidade de bactérias de pé diabético e úlcera de estase venosa de pacientes admitidos o pronto-socorro do principal hospital universitário do estado de Goiás, Brasil. 2007;1–7.
65. Carvalho CBM, Neto RM, Oliveira MM, Nogueira MB, Forti AC. *Pé Diabético: Análise Bacteriológica*. 2004;1–8.

66. Bisen PS. Microbial staining. *J Microbiol.* 2014;139–55.
67. Tóth E, Márialigeti K. *Practical Microbiology.* Eötvös Loránd University; 2013. 1–229 p.
68. BacT/ ALERT FN PLUS. 2013.
69. Lee D-H, Kim SC, Bae I-G, Koh E-H, Kim S. Clinical Evaluation of BacT/Alert FA Plus and FN Plus Bottles Compared with Standard Bottles. *J Clin Microbiol.* 2013;4150–5.
70. PREVI Isola. *Biomérieux.* p. 1.
71. MINI VIDAS. *Biomérieux.* p. 1.
72. VITEK 2. *Biomérieux.* p. 1.
73. VITEK MS Fluxo de Trabalho Manual do Utilizador de Utilização Clínica. 2014. p. 1–54.
74. *Laboratory Quality Management System.* Geneva: World Health Organization; 2011. 1–74 p.
75. Strauss E, Strauss J. *Viruses and Human Disease.* 2nd ed. California: Elsevier; 2008. 1–480 p.
76. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Medical Microbiology.* 8th ed. Elsevier; 2016.
77. Barroso H, Borrego P, Bártolo I, Marcelino JM, Família C, Quintas A, et al. Evolutionary and structural features of the C2, V3 and C3 envelope regions underlying the differences in HIV-1 and HIV-2 biology and infection. *PLoS One.* 2011;1–12.
78. Discovery of key component of HIV virus yields new drug target. *Med Res Counc.* 2016;1–5.
79. De Melo EB, Bruni AT, Castro Ferreira MM. Inibidores da HIV-integrase: Potencial abordagem farmacológica para tratamento da AIDS. *Quim Nova.* 2006;555–62.
80. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemotherapy.* 2016;1–20.
81. Nisole S, Saïb A. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology.* BioMed Central; 2004. p. 1–20.
82. Kirchoff F. HIV Life Cycle: Overview. *ResearchGate.* 2013;1–7.
83. Loreto S, Azevedo-Pereira JM. A infecção por HIV – importância das fases iniciais e do diagnóstico precoce. *Acta Farm Port.* 2012;1–13.
84. Branson BM. State of the art for diagnosis of HIV infection. *Clin Infect Dis.* 2007;1–5.
85. Lazzarotto AR, Deresz LF, Sprinz E. HIV/AIDS e Treinamento Concorrente: a Revisão Sistemática. *Cent Univ FEEVALE Pró-Vida – Esc Educ Física da Univ Fed do Rio Gd do Sul PPG Ciências da Saúde Cardiol e Ciências Cardiovasc da FAMED/UFRGS Ambulatório HIV/AIDS do HCPA, FAMED/UFRGS.* 2010;1–6.
86. Freitas K. *Infectologia.* 2017. p. 1.
87. Cihlar T, Fordyce M. Current status and prospects of HIV treatment. *Curr Opin Virol.* 2016;50–6.

88. Hattis RP. Guidelines for Antiviral Treatment of Adults and Adolescents with HIV-1. Beyond AIDS Foundation. 2013. p. 1–330.
89. Page M, Taylor S. Antiretroviral pharmacology. *Medicine (United Kingdom)*. 2018. p. 287–292.
90. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;1–24.
91. HIV Infection Immunology. p. 1.
92. Latinovic O St., Kuruppu JC. Pharmacotherapy of HIV-1 Infection: Focus on CCR5 Antagonist Maraviroc. 2009;1497–510.
93. Yoshimura K, Harada S, Boonchawalit S, Kawanami Y, Matsushita S. Impact of maraviroc-resistant and low-CCR5-adapted mutations induced by in vitro passage on sensitivity to anti-envelope neutralizing antibodies. *J Gen Virol*. 2014;1816–1826.
94. David H. Spach M. HIV Life Cycle and Antiretroviral Drug Targets. 2018;8–28.
95. Medical Pharmacology Chapter 36: Antiviral Drugs. p. 1.
96. Hazuda DJ. Resistance to inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1 integration. *SciELO*. 2010;513–8.
97. HIV: Mechanisms of Action of Protease Inhibitors (PIs). 2013. p. 1.
98. Zolopa AR. The evolution of HIV treatment guidelines: Current state-of-the-art of ART. *Antiviral Res*. 2010;241–4.
99. Volberding PA, Deeks SG. Antiretroviral therapy and management of HIV infection. In: *The Lancet*. 2010. p. 49–62.
100. Riddell J, Amico KR, Mayer KH. HIV Preexposure Prophylaxis. *JAMA*. 2018;1261–8.
101. McCray E, Purcell DW, Hall HI, Cleveland JC, Theresa Larkin. HIV Prevention Progress Report, 2019. ATLANTA: CentersS for Disease Control and Prevention (CDC); 2019. 1–92 p.
102. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach. World Heal Organ. 2016;
103. Cillo AR, Mellors JW. Which therapeutic strategy will achieve a cure for HIV-1? *Curr Opin Virol*. 2016;14–19.