

MESTRADO

Análises Clínicas

Trombocitopenia imune: diagnóstico laboratorial e aspetos clínicos

Juliana Gonçalves Simões

M

2024

Juliana Simões: Trombocitopenia imune: diagnóstico laboratorial e aspetos clínicos

M.FUP 2019

Trombocitopenia imune: diagnóstico laboratorial e aspetos clínicos

Juliana Gonçalves Simões

Faculdade de Farmácia



Trombocitopenia imune: diagnóstico laboratorial e
aspetos clínicos
Immune thrombocytopenia: laboratory diagnosis
and clinical aspects

Juliana Gonçalves Simões

Monografia do 2º Ciclo de estudos conducente
ao Grau de Mestre em Análises Clínicas.

Trabalho realizado sob a orientação da
Prof. Doutora Alice Santos Silva
Com Co-orientação da
Prof. Doutora Susana Coimbra

Junho de 2024

Declaração de reprodução

É autorizada a reprodução parcial deste relatório de estágio, apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Partial reproduction of this internship report is authorized only for research purposes, upon written declaration by the interested party, who commits to it.

Agradecimentos

Neste breve espaço, gostaria de expressar o meu profundo agradecimento e reconhecimento às pessoas que foram fundamentais para o desenvolvimento e concretização desta monografia de Mestrado.

Em primeiro lugar, dirijo a minha sincera gratidão à Professora Doutora Alice Santos Silva, cujo incentivo constante, disponibilidade inabalável e orientação experiente foram cruciais ao longo de todo o percurso. O seu apoio contínuo foi uma fonte constante de inspiração e orientação.

Agradeço igualmente à Professora Doutora Susana Coimbra pela sua postura crítica e rigorosa na supervisão deste trabalho. A sua orientação minuciosa, bem como as suas correções, sugestões e disponibilidade, foram de extrema importância para o aprimoramento desta pesquisa.

À minha família, expresso a minha eterna gratidão pelo voto inabalável de confiança nas minhas capacidades e pelo apoio incondicional. O encorajamento e a força que sempre me transmitiram foram pilares essenciais para a realização deste projeto.

Ao meu colega Hélder Pereira, um sincero obrigado pela sua disponibilidade para esclarecer questões e dúvidas informáticas. O seu apoio nos momentos de maior ansiedade e angústia foi inestimável e muito apreciado.

Finalmente, um agradecimento especial a mim mesma, por ter conseguido manter-me firme na decisão de concluir este projeto. Contudo, saliento que sem o apoio e a colaboração das pessoas acima mencionadas, este feito não teria sido possível. Um bem-haja a todos, com a minha mais profunda gratidão!

Resumo

A trombocitopenia imune (TPI) é um distúrbio hematológico complexo caracterizado por uma redução acentuada do número de plaquetas no sangue periférico, afetando significativamente a hemóstase e a integridade vascular. Este trabalho debruça-se sobre múltiplos aspetos relacionados com as plaquetas, desde a sua morfologia, função e processo de produção (trombocitopoiese), até à fisiopatologia detalhada da TPI, nas suas diversas manifestações em adultos, crianças e grávidas.

As plaquetas, pequenas células enucleadas derivadas dos megacariócitos, desempenham um papel crucial nomeadamente, a sua capacidade de adesão, agregação e libertação de mediadores bioquímicos são críticos para a hemóstase primária. A trombocitopoiese, o processo de produção das plaquetas na medula óssea, é regulado pela trombopoietina (TPO), uma citocina que orchestra a diferenciação e maturação dos megacariócitos.

A TPI emerge como um paradigma da disfunção imunológica, onde autoanticorpos dirigidos contra glicoproteínas na superfície plaquetária promovem a opsonização das plaquetas, determinando a sua remoção prematura pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial. A opsonização de megacariócitos, por sua vez, compromete a trombocitopoiese ao inibir a sua diferenciação e maturação. Adicionalmente, a indução de apoptose tanto de megacariócitos como de plaquetas por ligação de autoanticorpos, bem como a deficiência relativa de TPO, agrava a condição clínica. O mimetismo molecular e a formação de complexos imunes, assim como a lise direta de plaquetas mediada por células T, são mecanismos patogénicos adicionais que contribuem para a complexidade desta patologia.

À medida que a compreensão dos mecanismos moleculares e imunológicos subjacentes à TPI se aprofunda, novas perspetivas no diagnóstico e tratamento desta doença estão a emergir. Investigações recentes apontam para o desenvolvimento de biomarcadores específicos e terapias mais direcionadas, como Atc monoclonais e agentes que modulam a produção de TPO. Estas inovações prometem não só melhorar as taxas de resposta à terapêutica, mas também prolongar a remissão e minimizar os efeitos adversos, abrindo novas fronteiras no tratamento personalizado da TPI.

Palavras-chave: Trombocitopenia; plaquetas; autoanticorpos; trombocitopoiese; imunossupressão.

Abstract

Immune thrombocytopenia (ITP) is a complex hematological disorder characterized by a marked reduction in the number of platelets in the peripheral blood, significantly affecting hemostasis and vascular integrity. This paper delves into multiple aspects related to platelets, from their morphology, function, and production process (thrombocytopoiesis) to the detailed pathophysiology of ITP in its various manifestations in adults, children, and pregnant women.

Platelets, small anucleate cells derived from megakaryocytes, play a crucial role, particularly their ability to adhere, aggregate, and release biochemical mediators, which are critical for primary hemostasis. Thrombocytopoiesis, the process of platelet production in the bone marrow, is regulated by thrombopoietin (TPO), a cytokine that orchestrates the differentiation and maturation of megakaryocytes.

ITP emerges as a paradigm of immune dysfunction, where autoantibodies directed against glycoproteins on the platelet surface promote the opsonization of platelets, leading to their premature removal by macrophages in the reticuloendothelial system. The opsonization of megakaryocytes, in turn, compromises thrombocytopoiesis by inhibiting their differentiation and maturation. Additionally, the induction of apoptosis in both megakaryocytes and platelets through autoantibody binding, as well as the relative deficiency of TPO, exacerbates the clinical condition. Molecular mimicry, immune complex formation, and direct platelet lysis mediated by T cells are additional pathogenic mechanisms contributing to the complexity of this condition.

As the understanding of the underlying molecular and immunological mechanisms of ITP deepens, new perspectives on the diagnosis and treatment of this disease are emerging. Recent research points to the development of specific biomarkers and more targeted therapies, such as monoclonal antibodies and agents that modulate TPO production. These innovations promise not only to improve therapeutic response rates but also to prolong remission and minimize adverse effects, opening new frontiers in the personalized treatment of ITP.

Keywords: Thrombocytopenia; platelets; autoantibodies; thrombocytopoiesis; immunosuppression.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice de Figuras	viii
Lista de abreviaturas, acrónimos e símbolos	ix
Introdução.....	1
1- Plaquetas.....	3
1.1 Morfologia da plaqueta	3
1.2 Função das plaquetas	5
1.3 Produção: Trombocitopoiese	7
2- Fisiopatologia da Trombocitopenia Imune	10
2.1 Opsonização de plaquetas por autoanticorpos - remoção prematura de plaquetas.....	12
2.2 Opsonização de megacariócitos por autoanticorpos - inibição da diferenciação e maturação.....	12
2.3 Apoptose de megacariócitos e plaquetas induzida por autoanticorpos	13
2.4 Deficiência relativa em trombopoietina	14
2.5 Mimetismo molecular e formação de complexos imunes	15
2.6 Lise direta de plaquetas por células T	16
3- TPI no adulto	17
3.1 Apresentação clínica	17
3.2 Diagnóstico.....	18
3.3- Tratamento.....	20
4- TPI na criança.....	23
5- TPI na grávida	25
5.1 Etiologias.....	25
5.2 Exames laboratoriais	27
5.3 Tratamento	34

6- Perspetivas futuras no diagnóstico e tratamento de TPI	35
Conclusão.....	39
Bibliografia	41

Índice de Figuras

Figura- 1 Esfregaços de sangue periférico ilustrando alterações na morfologia das plaquetas	3
Figura 2- Processo adesão e agregação das plaquetas, Adaptado de (11)	7
Figura 3- Representação esquemática da hematopoiese. Adaptado de(12)	9
Figura 4- Replicação endomitótica síncrona, na trombocitopoiese. Adaptado de (13)	10
Figura 5-Formas secundárias e primárias de trombocitopenia imune (TPI) (16)	11
Figura 6-Fagocitose da plaqueta. Adaptado de (19)	12
Figura 7-Mimetismo molecular e ativação do sistema imunitário. Adaptado de (41)	16
Figura 8-Visão geral das terapias usadas no tratamento da trombocitopenia imune no adulto. Adaptado de (47).....	21

Lista de abreviaturas, acrónimos e símbolos

- AAF-** Anticorpo antifosfolípido
aCL- Anticorpos anticardiolipina
ADP- Adenosina difosfato
Ag- Antígeno
AHMA- Anemia hemolítica microangiopática
AL- Anticoagulantes lúpicos
ALT- Alanina aminotransferase
ANAs- Anticorpos antinucleares
ANCP- Antígeno nuclear celular antiproliferativo
ANEs- Antígenos nucleares extraíveis
AST- Aspartato aminotransferase
Atc- Anticorpo
ATP- Adenosina trifosfato
CIVD- Coagulação intravascular disseminada
c-MPL- Receptors of proto-oncogene myeloproliferative leukemia (recetores do proto-oncogene da leucemia mieloproliferativa)
DAI- Doença autoimune
DNA- Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
DvW- Doença de von Willebrand
ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ensaio imunoenzimático)
ESP- esfregaço de sangue periférico
FANs- Fatores antinucleares
FGAG- Fígado gorduroso agudo da gravidez
FvW- Fator de von Willebrand
GP- Glicoproteína plaquetária
HELLP- *Hemolysistic anemia, elevated liver enzymes, low platelet count* (hemólise, enzimas hepáticas elevadas, trombocitopenia)
HPN- Hemoglobinúria paroxística noturna
HPP- Hemorragia pós-parto
IDVC- Imunodeficiência variável comum
IFI- Imunofluorescência indireta
IgG- Imunoglobulina G
IgIV- Imunoglobulinas intravenosas
IRC- Insuficiência renal crónica

JAK- Janus Kinase
LDH- Lactato desidrogenase
LES- Lúpus eritematoso sistémico
LLC- Leucemia linfocítica crónica
LTC- Linfócito T citotóxico
MAT- Microangiopatia trombótica
NMP- Neoplasias mieloproliferativas
PEC- Pré-eclâmpsia
PTT- Púrpura trombocitopénica trombótica
RCT- Recetor de células T
RE- Retículo endoplasmático
RFcn- Recetor Fc neonatal
RIE- Radioimunoensaio
RNA- Ribonucleic acid Messenger (ácido ribonucleico mensageiro)
RNP- Ribonucleoproteína
ROS- Reactive oxygen species (espécies reativas de oxigénio)
SAF- Síndrome antifosfolipídica
SHU- Síndrome hemolítico-urémica
SLPA- Síndrome linfoproliferativo autoimune
Sm- Antígeno de Smith
SMD- Síndrome mielodisplásico
TH- Trombocitopenia hereditária
TIH- Trombocitopenia induzida por heparina
TP- Tempo de protrombina
TPI- Trombocitopenia imune
TPO- Trombopoietina
TSAT- Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TTPA- Tempo de tromboplastina parcial ativado
VHC- Vírus da hepatite C
VIH - Vírus da imunodeficiência humana

Introdução

As plaquetas, também conhecidas como trombócitos, são elementos celulares enucleados fundamentais no processo de hemóstase. (1)

A trombocitopenia, uma condição caracterizada pela diminuição do número de plaquetas no sangue, pode resultar de uma produção deficiente de plaquetas pela medula óssea, de um aumento da destruição periférica das plaquetas ou, por vezes, do sequestro excessivo destas células pelo baço. (2)

Uma vasta gama de etiologias tem sido associada à trombocitopenia, podendo estas ser congénitas ou adquiridas. Entre as causas adquiridas, destacam-se as doenças autoimunes; infeções diversas, que podem comprometer a produção ou sobrevivência das plaquetas; certos fármacos que interferem diretamente na medula óssea ou na viabilidade das plaquetas; e patologias hematológicas, como algumas formas de leucemia. (2)

De entre as formas de trombocitopenia adquirida, destaca-se a trombocitopenia imune (TPI), uma doença autoimune na qual o sistema imunológico ataca e destrói as plaquetas do próprio organismo. A TPI pode ser classificada como primária, quando surge de forma isolada, ou secundária, quando ocorre em associação com outras condições, como infeções virais, doenças autoimunes sistémicas, ou até mesmo como uma reação a determinados medicamentos. (2)

A fisiopatologia subjacente à TPI envolve a produção de autoanticorpos que se ligam às plaquetas, sinalizando-as para destruição precoce pelo sistema reticuloendotelial, particularmente no baço. A variabilidade na gravidade da TPI e na resposta ao seu tratamento representa um desafio clínico substancial, exigindo uma abordagem personalizada e criteriosa para cada doente. (2,3)

Nesta monografia, será abordada de forma aprofundada a complexa fisiologia das plaquetas, focando a sua origem, função vital na hemóstase e os mecanismos que regulam a sua produção e destruição. Serão examinadas as diversas etiologias da trombocitopenia, com especial ênfase na TPI. O trabalho desenvolverá uma análise detalhada da fisiopatologia da TPI, elucidando os processos imunológicos subjacentes, que levam à destruição precoce das plaquetas e comprometem o processo hemostático. Para além disso, serão discutidos os métodos de diagnóstico atuais, que permitem diferenciar entre TPI primária e TPI secundária. (4)

A monografia incluirá uma análise das diferentes apresentações clínicas da TPI em adultos, crianças e mulheres grávidas, realçando as particularidades de cada grupo etário e estado fisiológico, e como estas influenciam tanto o diagnóstico como a escolha terapêutica. Serão destacadas as opções terapêuticas tradicionais e as emergentes, que têm ampliado consideravelmente o leque de alternativas disponíveis, contribuindo para um

melhor prognóstico e qualidade de vida dos doentes. Ao longo deste trabalho, serão enfatizadas as inovações terapêuticas, como novos agentes biológicos e abordagens imunomoduladoras, que representam avanços significativos no tratamento personalizado da TPI, abrindo novas perspetivas para um tratamento mais eficaz desta complexa doença.

(4)

1- Plaquetas

1.1 Morfologia da plaqueta

As plaquetas, também denominadas trombócitos, apresentam uma morfologia característica; são pequenas, com um volume médio de 7 a 11 fL, enucleadas, em condições fisiológicas normais apresentam uma forma discoide. A sua vida útil é relativamente curta, de 8 a 10 dias, após os quais são removidas da circulação pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial, particularmente do baço e fígado. No sangue periférico, o valor de plaquetas em indivíduos saudáveis situa-se entre $150-450 \times 10^9/L$, valores que garantem a integridade vascular e a resposta hemostática adequada. (4)

No contexto de trombocitopenia, o tamanho e o volume das plaquetas assumem particular importância diagnóstica. A presença de plaquetas pequenas pode indicar uma falha na produção medular, sugerindo algumas causas subjacentes, como anemia aplástica, efeito de quimioterapia, radiação, ou outras patologias que comprometem a hematopoiese. Por outro lado, a presença de plaquetas gigantes, significativamente maiores (com um volume próximo do dos eritrócitos), pode estar mais associada a distúrbios como TPI, microangiopatias trombóticas, ou mesmo à coagulação intravascular disseminada (CIVD). (5)

Estas alterações morfológicas das plaquetas não são meramente descritivas, pois refletem mudanças profundas nos processos patológicos que afetam a produção e a destruição das plaquetas, sendo, por isso, indicadores valiosos na avaliação clínica e no diagnóstico diferencial de doenças hematológicas. (4–6)

Na figura 1, podem observar-se algumas alterações na morfologia das plaquetas.

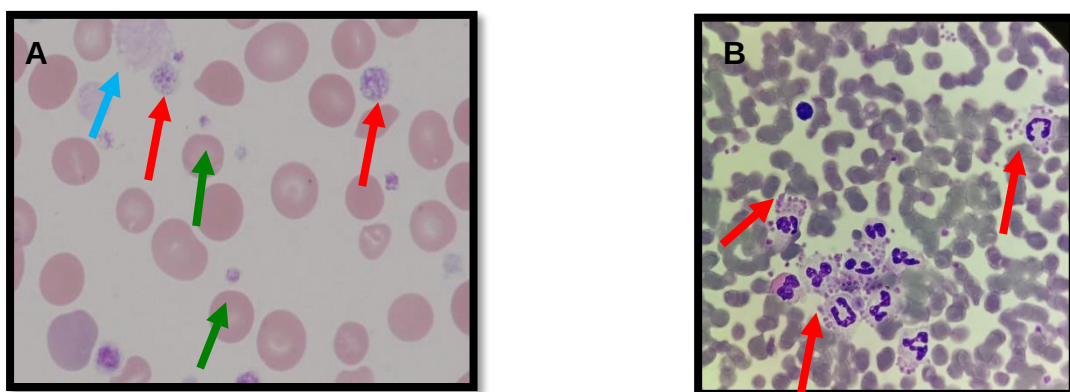


Figura- 1 Esfregaços de sangue periférico ilustrando alterações na morfologia das plaquetas,

(A): Plaquetas de morfologia normal (setas verdes); Plaqueta gigante (seta azul); Plaquetas hipergranuladas, comuns na trombocitopenia imune (setas vermelhas); (ampliação 1000x) (7); (B): Agregados plaquetares,

comuns na pseudotrombocitopenia (seta vermelha) (Imagem cedida por Dra. Beatriz Araújo, Hospital de Braga, E.P.E; ampliação 400x)

As plaquetas, apesar de pequenas, possuem uma organização interna complexa, que reflete a sua intensa atividade metabólica. Na sua região central, conhecida como granulômero, encontram-se finos grânulos azurofílicos, ricos em substâncias bioativas, que desempenham papéis cruciais na hemóstase primária, coagulação, fibrinólise e reparação vascular. Já na região periférica das plaquetas, denominada hialômero, não se observa a presença desses grânulos, conferindo a esta zona uma aparência mais clara e homogênea. (6)

As plaquetas contêm uma variedade de organelas essenciais para a sua função. No seu interior encontram-se organelas funcionais, como o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi, que participam na síntese e modificação de proteínas, bem como mitocôndrias, responsáveis pela produção de energia. Estas características destacam as plaquetas não apenas como fragmentos celulares, mas como componentes vitais e multifacetados da hemóstase, capazes de responder rapidamente a sinais de lesão vascular e de orquestrar uma série de eventos moleculares, necessários para a manutenção da integridade do sistema circulatório. (4)

Como referido, as plaquetas possuem também grânulos especializados, os grânulos alfa e os grânulos densos, que desempenham papéis cruciais na resposta hemostática. Entre eles, destacam-se os grânulos alfa, que são verdadeiros depósitos de substâncias vitais. Estes grânulos contêm fatores essenciais para o processo de coagulação, como o fator V (FV) e o fator VIII (FVIII), e também proteínas como o fibrinogénio e o fator de Von Willebrand (FvW), que são indispensáveis para a adesão e agregação plaquetária e que desempenham também um importante papel na coagulação. (8)

Além disso, estes grânulos alfa possuem componentes envolvidos na fibrinólise e na regeneração do vaso sanguíneo lesado, contribuindo para a restauração da integridade vascular após uma lesão. (9)

Os grânulos densos, por sua vez, são reservatórios de moléculas de sinalização que amplificam a resposta hemostática. Estes contêm ADP (adenosina difosfato) e ATP (adenosina trifosfato), que são potentes mediadores na ativação e recrutamento de plaquetas para o local da lesão. Além disso, os grânulos densos armazenam cálcio, essencial no processo da coagulação, e serotonina, uma molécula que ajuda a promover a vasoconstrição e a agregação plaquetária. A libertação coordenada do conteúdo destes grânulos, após a ativação plaquetária, é fundamental para a amplificação da resposta

hemostática e para o controlo eficiente de hemorragias, ilustrando a complexa funcionalidade e a importância das plaquetas na manutenção da homeostase vascular.

(4,8,10)

Na membrana das plaquetas encontram-se diversas glicoproteínas (GP) que desempenham papéis cruciais nos processos de adesão, ativação e agregação plaquetária, essenciais para a hemóstase. Entre estas, destaca-se a GPIa, capaz de se ligar diretamente ao colagénio exposto aquando de uma lesão vascular, atuando como um primeiro ponto de ancoragem das plaquetas no local de lesão endotelial. Outras glicoproteínas, como o complexo GPIIb/IIIa e a GPIb, interagem indiretamente com o colagénio através de mediadores como o FvW na sua forma polimérica, ou com o fibrinogénio. Estas interações são fundamentais para promover a agregação plaquetária, com formação de um coágulo plaquetário, que é essencial para o controlo da hemorragia.

(9)

O FvW é uma proteína sintetizada por megacariócitos, plaquetas e células endoteliais, sendo armazenado nos corpos de Weibel-Palade das células endoteliais na sua forma polimérica. No plasma sanguíneo, este fator deve ser clivado em monómeros e dímeros pela metaloprotease ADAMTS13, para evitar a ativação descontrolada de plaquetas, o que poderia levar a eventos trombóticos. Esta regulação assegura que o FvW só desencadeia a adesão plaquetária em locais de lesão vascular, evitando assim complicações trombóticas indesejáveis. (9)

Apesar de serem enucleadas, as plaquetas possuem RNAm (do inglês, ribonucleic acid messenger) que lhes confere uma capacidade limitada de síntese proteica. Contudo, a maioria das moléculas necessárias à sua função é pré-formada e herdada dos megacariócitos, e prontamente armazenadas, para uma rápida libertação em resposta à ativação plaquetária. Entre estas moléculas, o ADP (adenosina difosfato) destaca-se como um potente agonista, que amplifica a resposta hemostática ao ativar mais plaquetas na área da lesão, para formação do coágulo plaquetário para a contenção de hemorragias.

(4)

1.2 Função das plaquetas

Quando ocorre uma lesão vascular, é desencadeada uma resposta imediata e coordenada, para conter a hemorragia. Inicialmente, verifica-se uma vasoconstrição reflexa, um mecanismo que reduz o fluxo sanguíneo na área lesada e limita a perda de sangue. (5)

A exposição do colagénio do tecido subendotelial promove a adesão e ativação das plaquetas; as plaquetas ativadas libertam serotonina e tromboxano A₂, substâncias que

reforçam a vasoconstrição inicial, e promovem a agregação das plaquetas, respetivamente. Esta amplificação da ativação plaquetária e da vasoconstrição são cruciais para a formação de um tampão plaquetário e garantir uma resposta hemostática primária adequada. Este tampão plaquetário será posteriormente estabilizado pela fibrina, resultante do processo de coagulação; após dissolução deste coágulo, por fibrinólise, será restaurada a integridade vascular. (5,10)

A hemóstase primária assegura a cessação rápida da hemorragia, e que a resposta hemostática se localize exclusivamente ao sítio da lesão, evitando a extensão da coagulação, comprometendo a circulação e a integridade do sistema vascular. (11)

A adesão das plaquetas ao local da lesão desencadeia um processo de ativação, acompanhado por uma transformação morfológica conhecida como metamorfose viscosa, e pela exposição de glicoproteínas na membrana, importantes no processo de adesão e agregação das plaquetas. Inicialmente, as plaquetas apresentam uma forma discoide, dividida em duas zonas, o granulómero, rico em granulações no centro, e a zona hialina, periférica. Após a ativação, as plaquetas tomam uma forma mais esférica e globosa, com emissão de extensões proeminentes. (11)

Através dessas projeções, as plaquetas libertam o seu conteúdo granular, essencial para a resposta hemostática. Neste processo de desgranulação são libertados compostos que possuem propriedades quimiotáticas, atraindo outras plaquetas para o local da lesão. Este recrutamento adicional resulta na agregação de mais plaquetas, até à formação de um coágulo plaquetário robusto, que feche a lesão vascular, cessando a hemorragia.

O processo de formação do tampão de plaquetário é visualizado na figura 2, ilustrando também o papel das plaquetas na restauração da integridade vascular e na prevenção de hemorragias. (4,5)

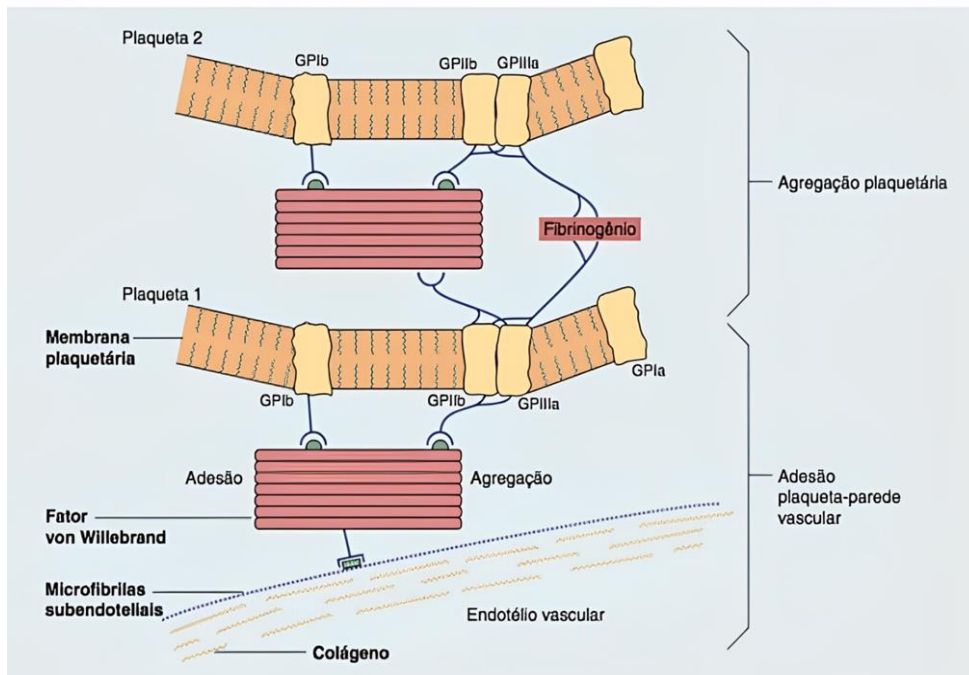


Figura 2- Processo adesão e agregação das plaquetas, GP (11)

As GP presentes na superfície das plaquetas desempenham um papel crucial nos processos iniciais de adesão e agregação plaquetária, eventos fundamentais que culminam na formação do tampão hemostático. A ligação ao colagénio subendotelial é mediada pela glicoproteína Ia (GPIa), um componente essencial para a ancoragem das plaquetas ao local da lesão vascular. De forma concomitante, as GP Ib e IIb/IIIa – também conhecidas como α Ib e β 3 – assumem uma função central na interação com o FwV, facilitando a subsequente ligação das plaquetas ao subendotélio vascular exposto. (12)

Além disso, o complexo glicoproteico IIb/IIIa atua como recetor para o fibrinogénio, uma molécula chave que promove a agregação interplaquetária, essencial para a estabilidade do trombo em formação. Assim, essas interações moleculares orquestram uma resposta coordenada que é vital para a integridade do processo de hemostase e a prevenção de perda sanguínea excessiva. (12)

1.3 Produção: Trombocitopoiese

A trombocitopoiese, também conhecida como megacariocitopoiese, é um processo complexo e altamente regulado que ocorre na medula óssea e é fundamental para a formação de plaquetas. Na hematopoiese, a célula hematopoiética multipotente, com a capacidade de se diferenciar em diversas linhas celulares, pode evoluir para uma célula progenitora mieloide comum ou uma célula progenitora linfóide comum (ver figura 3). (13)

A partir da célula progenitora mieloide comum, ocorrem diferenciações adicionais, guiadas pela presença e concentração de determinados fatores de crescimento hematopoiéticos. Estes fatores regulam a produção de várias linhagens celulares, incluindo eritrócitos, granulócitos, monócitos e, naturalmente, plaquetas. No contexto específico da trombocitopoiese, a trombopoietina (TPO) desempenha um papel crucial como o principal regulador da produção plaquetária. (14)

A TPO é uma citocina que atua promovendo a proliferação e maturação dos megacariócitos, as grandes células multinucleadas da medula óssea, que são as precursoras diretas das plaquetas. À medida que os megacariócitos amadurecem, há invaginação da membrana da célula, com formação de um sistema de membranas no citoplasma, que se fragmenta, para libertar plaquetas maduras no fluxo sanguíneo. Este processo altamente coordenado assegura que o número de plaquetas produzido seja suficiente para manter a homeostase e garantir a integridade vascular. (2)

A TPO é predominantemente produzida no fígado, com uma contribuição secundária dos rins. Após a sua síntese, liga-se aos recetores c-MPL (do inglês, recetores do proto-oncogene myeloproliferative leukemia) localizados na superfície da membrana das plaquetas, onde permanece inativa e não exerce influência sobre a produção de novas plaquetas. Apenas a TPO que circula livremente no plasma, não estando ligada às plaquetas, possui a capacidade de estimular a produção de plaquetas. Portanto, a regulação e a estimulação da trombocitopoiese dependem da quantidade de TPO disponível no plasma, na sua forma não ligada, que atua na medula óssea, promovendo a produção de novas plaquetas. (14)

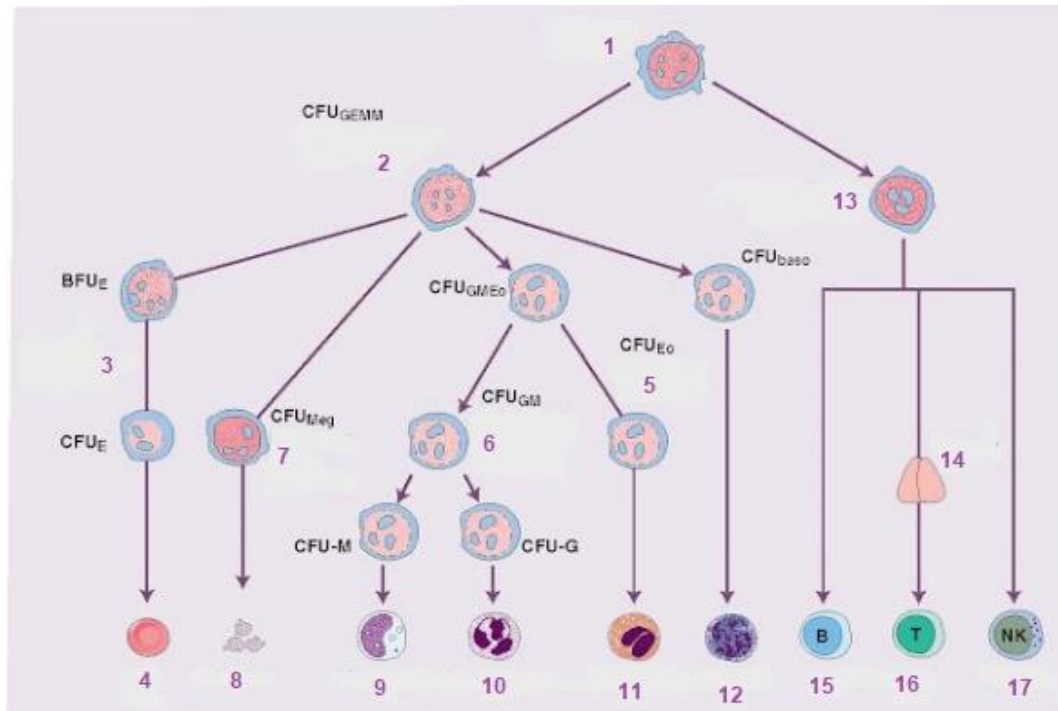


Figura 3- Representação esquemática da hematopoiese. Adaptado de(12)

Legenda: 1- Célula hematopoietica pluripotente; 2- célula progenitora mieloide comum; 3- Eritropoiese; 4- Eritrócito; 5, 6- Granulocitopoiese e Monocitopoiese; 7- Trombocitopoiese; 8- Plaquetas; 9- Monócitos; 10- Neutrófilos; 11- Eosinófilos; 12- Basófilos; 13- Célula progenitora linfóide comum; 14- Timo; 15- Linfócitos B; 16- Linfócitos T; 17- Células natural killer.

Nos megacariócitos, o DNA (do inglês, deoxyribonucleic acid) passa por um processo de replicação sem a subsequente divisão do núcleo celular, conhecido como replicação endomitótica síncrona.

Este processo de endomitose (figura 4), não se observa nos outros processos hematopoiéticos.

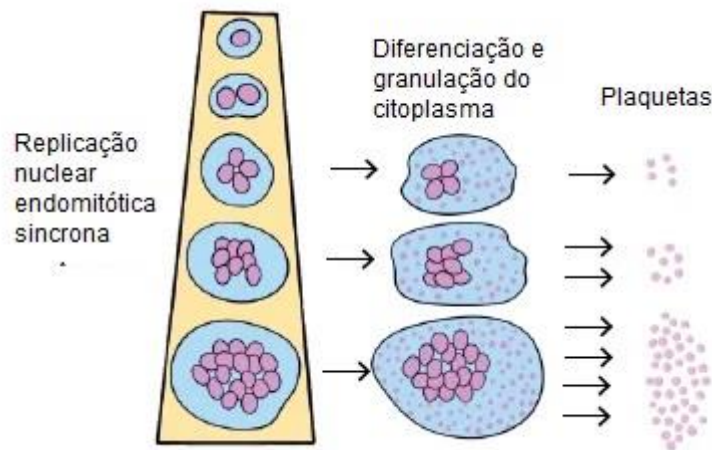


Figura 4- Replicação endomitótica síncrona, na trombocitopoiese. Adaptado de (13)

À medida que ocorrem as endomitoses, o volume da célula aumenta, refletindo a expansão significativa do citoplasma e o aumento do número de lóbulos nucleares, que se mantém sempre em números pares. Simultaneamente, no citoplasma do megacariócito, assiste-se ao surgimento e à multiplicação das granulações azurófilas. Este aumento na quantidade de granulações é diretamente proporcional ao número de ciclos de endomitose; isto é, quanto mais endomitoses ocorrem, maior será a produção de granulações. Por conseguinte, esse aumento nas granulações contribui para uma produção mais abundante de plaquetas (figura 4). (13)

2- Fisiopatologia da Trombocitopenia Imune

A TPI é uma patologia adquirida, que pode afetar indivíduos de todas as idades, incluindo adultos, e crianças, bem como grávidas. Apresenta-se em diferentes formas clínicas, podendo ser recente, com uma duração inferior a 3 meses a partir do diagnóstico; persistente, com uma duração que varia entre 3 e 12 meses; ou crónica, quando persiste por mais de 12 meses. (15)

O quadro clínico predominante da TPI está associado a um risco elevado de hemorragias mucocutâneas, com uma ampla gama de manifestações. Destaca-se, entre essas manifestações, a púrpura cutânea espontânea, que é a principal expressão visível da doença. (16)

Um diagnóstico diferencial metódico é crucial, especialmente no contexto pediátrico, para distinguir com precisão a trombocitopenia induzida por infeções virais, ou por outras causas, da TPI, garantindo uma abordagem terapêutica adequada e eficaz. (10,17)

Na maioria das situações, a TPI manifesta-se predominantemente na sua forma primária ou idiopática (figura 5), em que a etiologia específica da doença permanece desconhecida. Nos casos restantes, a TPI apresenta-se na forma secundária, sendo associada a uma variedade de doenças subjacentes que podem contribuir para o quadro trombocitopénico,(16) nomeadamente, doenças sistémicas, incluindo doenças autoimunes como o lúpus eritematoso sistémico (LES).

Destacam-se também como causa secundária de TPI, os efeitos tóxicos de diversos fármacos. As infeções virais representam outra causa significativa de TPI, com exemplos notáveis como a infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) e o vírus da Hepatite C (VHC). Neoplasias hematológicas, como as doenças linfoproliferativas, entre outras, podem igualmente estar associadas à TPI, evidenciando a complexidade e a necessidade de um diagnóstico diferencial preciso. (15,16,18).

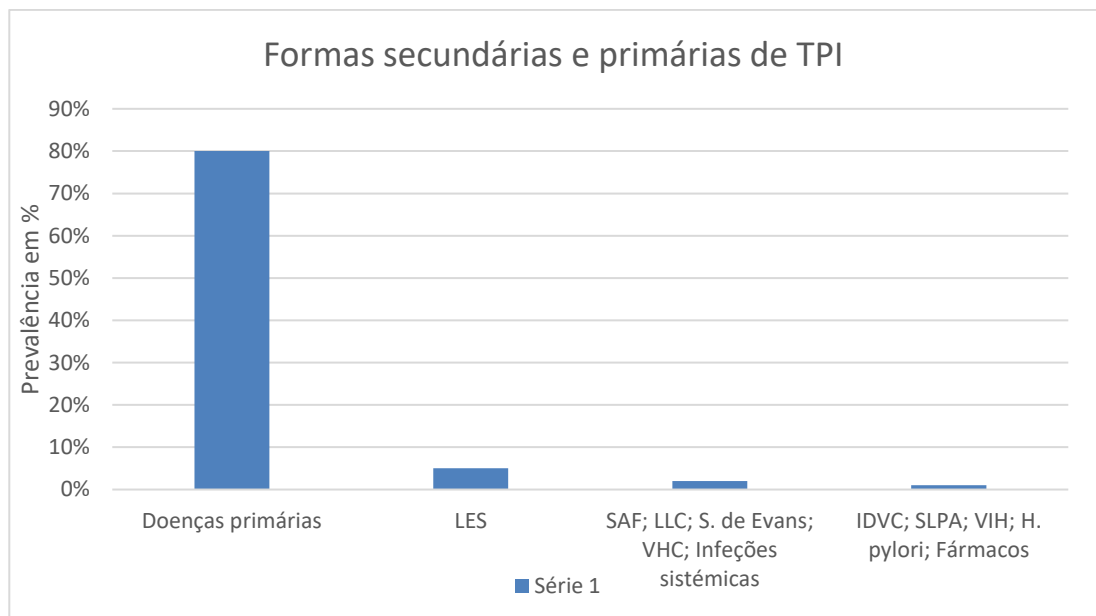


Figura 5-Formas secundárias e primárias de trombocitopenia imune (TPI) (16)

IDVC - Imunodeficiência variável comum; **LES**- Lúpus Eritematoso Sistémico; **LLC** - Leucemia linfocítica crónica; **NE** - Não especificadas; **SAF**- Síndrome anti-fosfolipídico; **SLPA** - Síndrome linfoproliferativo autoimune; **VHC**; Vírus da hepatite C; **VIH** - Vírus da imunodeficiência humana

A apresentação clínica varia, desde casos assintomáticos até hemorragias graves, dependendo de vários fatores, tais como, valor da trombocitopenia ou da disfunção plaquetária, idade do doente, comorbilidades, medicação, entre outros.

2.1 Opsonização de plaquetas por autoanticorpos - remoção prematura de plaquetas

A opsonização de plaquetas por autoanticorpos é um fenómeno intrinsecamente associado à TPI. Neste processo, o sistema imunológico do doente produz autoanticorpos que se ligam de forma específica às plaquetas. Estes autoanticorpos são direccionados contra antígenos (Ag) presentes na membrana das plaquetas, tais como os complexos GPIIb/IIIa e GPIb/IX. (19)

É crucial sublinhar que, embora exista uma associação clara entre a presença de autoanticorpos e a TPI, apenas aproximadamente 50% a 60% dos doentes apresentam autoanticorpos plaquetários detetáveis no sangue periférico. Este dado sugere que, em uma parte dos casos de TPI, outros mecanismos imunológicos ou fatores adicionais podem desempenhar um papel significativo neste tipo de trombocitopenia, evidenciando a complexidade e a diversidade dos mecanismos patológicos envolvidos. (20)

O reconhecimento dos complexos antígeno-anticorpo na superfície das plaquetas pelos macrófagos do sistema fagocítico mononuclear (também conhecido como sistema reticuloendotelial) desencadeia um processo de fagocitose das plaquetas (figura 6). Este processo resulta na captura e destruição das plaquetas pelos macrófagos, o que provoca uma redução significativa no número de plaquetas circulantes. (21,22)

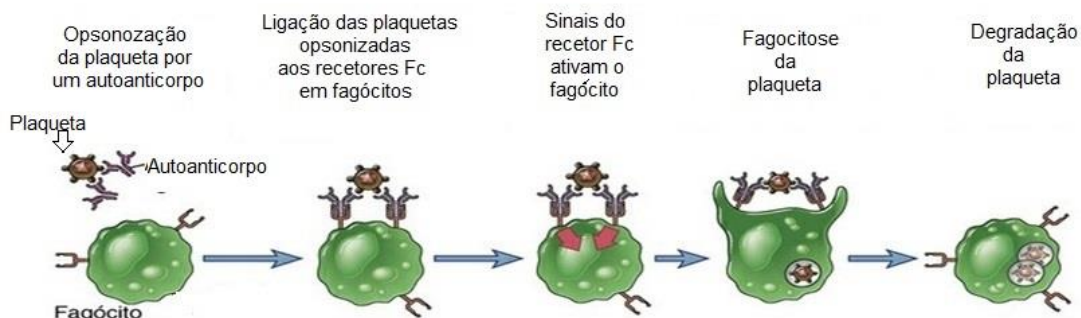


Figura 6-Opsonização e fagocitose da plaqueta. Adaptado de (19)

2.2 Opsonização de megacariócitos por autoanticorpos - inibição da diferenciação e maturação

No início da década de 1980, as investigações sobre a sobrevivência plaquetária autóloga revelaram que, na maioria dos doentes com TPI, o *turnover* plaquetário, ou seja, a renovação das plaquetas, encontrava-se reduzido ou dentro dos parâmetros normais. Estes estudos demonstraram igualmente que a produção de megacariócitos era significativamente reduzida na presença de anticorpos (Atc) antiplaquetários dirigidos contra a GPIb nos doentes com TPI. (23)

Mais recentemente, foi documentado que o plasma de indivíduos com TPI, contendo Atc dirigidos contra GPIIb/IIIa, GPIb, ou ambos, não só reduz a produção de megacariócitos, como também compromete a sua maturação. Esta descoberta acrescenta uma nova dimensão ao entendimento da patogénese da TPI, evidenciando a influência negativa desses autoanticorpos na trombocitopoiese. (24)

A maioria dos autoanticorpos antiplaquetários é dirigida contra complexos de GP presentes na membrana das plaquetas, nomeadamente GPIIb/IIIa (CD41/CD61) e GPIb-IX (CD42b/CD42a). É importante notar que os megacariócitos, as células precursoras das plaquetas, também expressam os marcadores CD41/CD61 e CD42b/CD42a na sua superfície. Assim, os autoanticorpos dirigidos contra as plaquetas podem igualmente ligar-se aos megacariócitos. (25)

A formação destes imunocomplexos na membrana dos megacariócitos pode provocar alterações significativas na sua funcionalidade, afetando a sua maturação ou até mesmo levando à sua destruição. Estas interações comprometem a eficácia da trombocitopoiese, resultando em trombocitopenia. (26)

Os megacariócitos são, portanto, também possíveis alvos de lesão imunomediada, nos doentes com TPI. (27)

2.3 Apoptose de megacariócitos e plaquetas induzida por autoanticorpos

A apoptose é um processo fundamental para o desenvolvimento e manutenção da homeostase celular em organismos multicelulares, assegurando um equilíbrio dinâmico entre a produção e a eliminação de células. Esse processo é crucial para a eliminação programada de células danificadas ou desnecessárias, ajudando a manter a integridade e o funcionamento adequado dos tecidos e órgãos. Este processo é rigorosamente regulado pela ativação de diversas proteases, conhecidas como caspases, e, uma vez iniciado, é geralmente irreversível, conduzindo à morte celular. As caspases são classificadas em duas categorias principais, as caspases iniciadoras e as caspases efetoras. (28)

Os estudos indicam que, na TPI, os autoanticorpos dirigidos contra as plaquetas podem desencadear a apoptose dos megacariócitos de maneira desregulada, embora os mecanismos exatos desse processo ainda não sejam completamente compreendidos. (29) Uma hipótese emergente sugere que o stresse do retículo endoplasmático pode desempenhar um papel central nesta apoptose induzida por autoanticorpos. O stresse do retículo endoplasmático ocorre quando há uma perturbação na homeostase celular, levando à acumulação incorreta de proteínas no lúmen do retículo endotelial (RE). (30,31)

A via intrínseca da apoptose, que é crucial no contexto da TPI, é regulada pela família de proteínas Bcl-2 e depende de fatores libertados pela mitocôndria. Sob condições

de stresse, a integridade da membrana mitocondrial fica comprometida, resultando num aumento da sua permeabilidade e na libertação de fatores pró-apoptóticos, como o citocromo c. Este fator ativa a caspase-9, iniciando a cascata apoptótica intrínseca que conduz à morte das plaquetas. Da mesma forma, a apoptose dos megacariócitos, mediada pela mesma via intrínseca, pode ocorrer na TPI, afetando negativamente a sua função e maturação e contribuindo para a trombocitopenia observada. (30)

Por outro lado, a via extrínseca da apoptose é ativada por ligantes específicos que interagem com recetores de morte presentes na membrana celular. Esta via também tem relevância significativa na TPI. Células do sistema imunitário, como as células natural killer (NK) e os macrófagos, podem reconhecer e ligar-se a recetores na superfície das plaquetas, desencadeando a ativação da caspase-8 e a subsequente cascata de caspases, que resulta na apoptose das plaquetas. (28)

Em resposta ao stresse, o próprio RE tenta restaurar a homeostase ou induzir a morte celular se a adaptação for insuficiente. O stresse do reticulo endoplasmático representa uma resposta adaptativa antiapoptótica inicial, destinada a preservar a célula. No entanto, quando o stresse é severo ou prolongado, a capacidade do RE de restaurar a hemóstase é superada, resultando na apoptose mediada pelo stresse do reticuloendotelial. Esta resposta apoptótica adicional pode intensificar a destruição das plaquetas na TPI. (28,31)

Outra teoria sobre a ativação da apoptose, envolve o aumento dos níveis de ROS (do inglês, reactive oxygen species), como o H_2O_2 , que podem iniciar o processo apoptótico por via mitocondrial nas células megacariocíticas. As ROS têm o potencial de interromper a função da cadeia respiratória mitocondrial, exacerbando a produção de ROS e prejudicando a síntese de ATP (adenosina trifosfato), o que favorece a apoptose. (28,30)

Na TPI, o aumento de ROS pode resultar do stresse oxidativo provocado pela destruição imune das plaquetas e pela inflamação sistémica associada. As ROS podem comprometer a função mitocondrial, levando à libertação de fatores pró-apoptóticos e à ativação da via intrínseca de apoptose. (32)

2.4 Deficiência relativa em trombopoietina

A TPO exerce o seu papel regulador ao ligar-se ao recetor C-Mpl, presente na superfície das plaquetas, dos megacariócitos. Esta interação ativa as vias de sinalização Janus Kinase (JAK) e Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição (TSAT), promovendo a proliferação e maturação dos megacariócitos e, consequentemente, a produção de plaquetas. (26,29)

O equilíbrio dos níveis de plaquetas circulantes é estabelecido por um sofisticado circuito de autorregulação da trombocitopoiese. Apenas a TPO livre, não associada às plaquetas, mantém a sua atividade trombopoética. Quando os níveis de plaquetas são normais, os níveis de TPO circulante e o estímulo da megacariopoiese são baixos, mas adequados para manter o valor de plaquetas. No entanto, quando o número de plaquetas diminui, os níveis plasmáticos de TPO ativa aumentam, promovendo um estímulo para a megacariocitopoiese e a produção de novas plaquetas. (32)

Várias patologias clínicas, como a insuficiência hepática e a insuficiência renal crónica, a quimioterapia e a radioterapia, bem como infeções virais, podem levar a uma deficiência relativa de TPO, resultando em trombocitopenia secundária. (33)(34,35),(36)(37)

Na TPI, observa-se que, apesar de a produção de plaquetas ocorrer a uma taxa normal ou ligeiramente reduzida, estas são eliminadas mais rapidamente pelo sistema imunitário. Mesmo com o tempo vida reduzido, as plaquetas continuam a ligar-se à TPO e a removê-la da circulação a uma taxa normal ou até um pouco elevada. Como resultado, os níveis de TPO não se elevam significativamente, apesar da destruição acelerada das plaquetas. (38)

Entender este mecanismo é crucial para desenvolver estratégias terapêuticas eficazes para a TPI. Estas podem incluir intervenções que modulam a resposta imunitária ou que promovem a produção de plaquetas, independentemente dos níveis de TPO. A complexa relação entre TPI e TPO revela que, na TPI, a deficiência relativa de TPO (não proporcional ao número de plaquetas circulantes) impede que os megacariócitos e as células progenitoras mielopoéticas recebam o sinal necessário para aumentar adequadamente a produção de plaquetas.

2.5 Mimetismo molecular e formação de complexos imunes

Diversos mecanismos foram propostos para explicar como as infeções podem desencadear ou agravar doenças autoimunes. Entre estes mecanismos, destaca-se o mimetismo molecular, em que um antigénio exógeno apresenta semelhanças estruturais ou sequenciais com autoantigénios, ou seja, há semelhança entre peptídeos estranhos (provenientes de microrganismos) e autopeptídeos (Ag do próprio organismo). (39)

Este fenómeno permite que os agentes patogénicos, ao mimetizarem os autoepítomos, consigam "escapar" da deteção pelo sistema imunológico, levando à tolerância imunológica (Figura 7). (39,40)

O mimetismo molecular difere de outros mecanismos inespecíficos que promovem autoimunidade, pois os mimetizadores microbianos direcionam especificamente a resposta

imune para um determinado tecido ou órgão. A homologia estrutural é fundamental neste contexto, pois permite que um anticorpo ou recetor de célula T reconheça e seja ativado por resíduos específicos. (40)

Após o contacto com um agente patogénico, as células B ou T autorreativas podem ser ativadas e, posteriormente, reconhecer e reagir com autoepítomos semelhantes. Esse processo desencadeia a autoimunidade, que resulta da perda da tolerância imunológica – a capacidade do sistema imune de distinguir entre o próprio e o não-próprio. (39)

No caso da TPI, a importância da homologia estrutural é evidente. A semelhança entre peptídeos estranhos e autopeptídeos pode levar à ativação de células B e/ou T autorreativas. Uma vez expostas ao antígeno, estas células imunes podem reagir de forma cruzada com os autoepítomos presentes nas plaquetas. Este processo resulta numa resposta imune direcionada especificamente contra as plaquetas, culminando na sua destruição.

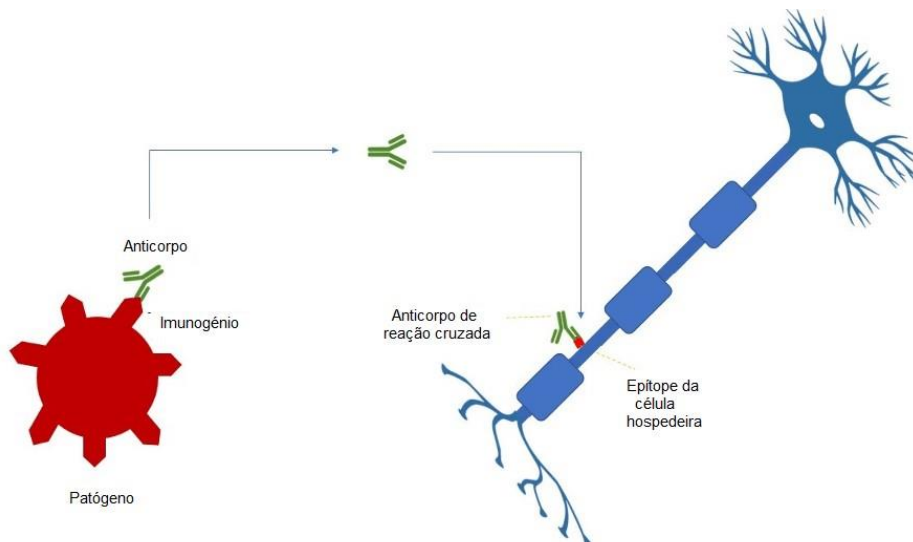


Figura 7-Mimetismo molecular e ativação do sistema imunitário. Adaptado de (41)

2.6 Lise direta de plaquetas por células T

As células T ativadas desempenham um papel crucial na lise direta das plaquetas, reconhecendo Ag específicos presentes na superfície destas células, como o complexo GPIIb/IIIa e outras moléculas expressas na membrana plaquetária. Esta interação pode desencadear uma resposta imune que resulta na destruição das plaquetas. (42)

A ativação das células T pode ocorrer por vários mecanismos. Um dos principais é a apresentação de Ag plaquetários anormais por células apresentadoras de Ag, como as células dendríticas. Estas células especializadas são responsáveis pela captura e apresentação de Ag aos linfócitos T. Quando as plaquetas apresentam alterações nas suas proteínas de membrana, como mutações ou modificações pós-tradução, estas alterações

podem ser reconhecidas pelas células dendríticas. A apresentação desses Ag às células T pode resultar numa resposta imune direcionada, levando à lise das plaquetas. (42,43)

A libertação de citocinas inflamatórias pode desempenhar também um papel significativo na ativação das células T. As citocinas são mensageiros químicos que regulam e amplificam a resposta inflamatória no sistema imunológico. Na TPI, a produção excessiva de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucinas (como IL-2 e IL-6) e interferões, pode estimular as células T a reconhecer e atacar as plaquetas. Estas citocinas promovem um ambiente inflamatório que favorece a ativação das células T e exacerba a resposta autoimune. (42)

Um aspeto adicional relevante é o papel dos linfócitos T citotóxicos (LTC), que têm a capacidade de induzir a morte celular direta. Estes linfócitos podem reconhecer os Ag específicos nas plaquetas através dos recetores RCT (recetor de células T) e desencadear a morte celular mediada por diferentes mecanismos, como a libertação de grânulos citotóxicos contendo perforina e granzimas, que podem causar a lise das plaquetas ao inserir poros na membrana e induzir a apoptose, levando destruição das plaquetas. A interação entre as células T e as plaquetas pode também ser mediada por moléculas de adesão, como as integrinas, que facilitam esta interação, permitindo uma ligação mais eficaz e subsequente lise das plaquetas. (43)

A compreensão dos mecanismos que estão na base da interação entre células T e plaquetas na TPI é importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes. Intervenções que visem bloquear a ativação das células T ou neutralizar as citocinas inflamatórias, podem ser promissoras, para controlar a lise das plaquetas e a progressão da TPI. (42)

3- TPI no adulto

3.1 Apresentação clínica

Como já referido, a TPI é uma patologia adquirida caracterizada por uma redução persistente e muitas vezes crónica no número de plaquetas; frequentemente, os doentes apresentam níveis de plaquetas inferiores a $100 \times 10^9/L$. A doença manifesta-se através de sintomas hemorrágicos variados, incluindo petéquias, púrpuras, hipermenorreia, epistaxes e gengivorragias, entre outros sinais clínicos. A incidência da TPI varia entre 2 a 4 casos por 100.000 adultos. Em jovens adultos, a TPI é mais frequente nas mulheres. No entanto, na população idosa, a prevalência da doença em homens e mulheres é semelhante. Apesar da natureza potencialmente grave da TPI, muitos doentes

permanecem assintomáticos por períodos prolongados, e o diagnóstico da TPI ocorre muitas vezes acidentalmente, durante exames clínicos de rotina. (44)

Uma vez estabelecido o diagnóstico de TPI, é essencial um acompanhamento contínuo para monitorizar os níveis de plaquetas e avaliar a necessidade de intervenções terapêuticas. O objetivo do acompanhamento é evitar complicações hemorrágicas e gerir eficazmente a doença. O tratamento deve ser adaptado às necessidades individuais do doente, considerando a gravidade dos sintomas e a resposta ao tratamento. (45)

3.2 Diagnóstico

O primeiro sinal de alerta de TPI é, com frequência, um valor de plaquetas inferior a $100 \times 10^9/L$, num exame analítico de rotina, sem evidência de outras causas ou distúrbios que expliquem a trombocitopenia. (46)

O diagnóstico de TPI é de exclusão, sendo, portanto, um processo complexo que pode envolver múltiplas etapas. A história clínica detalhada e o exame físico, bem como a realização de um hemograma completo, no qual está incluída a observação do esfregaço de sangue periférico, são cruciais na fase inicial. Esta avaliação é fundamental para identificar a trombocitopenia e excluir outras possíveis causas da redução no valor de plaquetas. Devem ser recolhidas informações sobre medicação (como heparina), imunizações, viagens recentes e exposição a outros fatores de risco de trombocitopenia. A investigação de antecedentes familiares, nomeadamente relacionados com a síndrome antifosfolípido (SAF), também é relevante. (45)

O exame físico deve ser abrangente, incluindo a observação dos olhos para procurar sinais de hemorragia, avaliação do abdómen para detetar esplenomegalia ou hepatomegalia, palpação dos linfonodos para verificar linfadenopatia, e exame da pele para identificar petéquias, púrpura. A avaliação do sistema neurológico e a revisão da história de hemorragias também são importantes. (45)

Os testes laboratoriais desempenham um papel crucial na confirmação do diagnóstico de TPI. O hemograma de um doente com TPI revela trombocitopenia isolada, sem alterações significativas nos valores de leucócitos, eritrócitos, concentração de hemoglobina e índices hematimétricos. A análise do esfregaço de sangue periférico (ESP) é extremamente importante para o diagnóstico. Assim, por exemplo, a presença de agregados plaquetários (ESP com EDTA) é sugestiva de pseudotrombocitopenia; a presença de células precursoras pode estar associada à ocorrência de infeções ou neoplasias hematológicas. Na TPI, a observação de plaquetas gigantes é comum, mas a presença destas também pode ocorrer em trombocitopenias congénitas ou em doenças associadas a um aumento na produção de plaquetas. (45)

A determinação do grupo sanguíneo (sistema Rh) pode ser essencial em certas circunstâncias, nomeadamente se o indivíduo realizar tratamento com imunoglobulina anti-D. (47)

O teste de antiglobulina direta, que é positivo em cerca de 20% dos doentes com TPI, é outro exame laboratorial a considerar. Sendo o resultado positivo, deve proceder-se à avaliação de marcadores de hemólise, como a haptoglobina, lactato desidrogenase (LDH), bilirrubinas e contagem de reticulócitos, para excluir a presença de hemólise. (47)

A avaliação quantitativa das imunoglobulinas é importante para a exclusão de síndromes de imunodeficiência, que podem mimetizar a TPI.

Importa excluir outras causas de trombocitopenia, como síndromes de imunodeficiência, infeções virais (como VIH e VHC), e distúrbios autoimunes. A realização de testes específicos para VIH e VHC é recomendada, já que a trombocitopenia associada a estas infeções pode mimetizar a TPI primária. (47)

Para deteção precoce destas infeções virais são utilizados testes laboratoriais específicos, de elevada sensibilidade e precisão. Os testes de 4ª geração para deteção de infeção por VIH, permitem a deteção de Atc anti-VIH-1 e anti-VIH-2, e do Ag p24. O antigénio p24 é uma proteína do VIH que pode ser detetada mais precocemente do que os Atc, permitindo uma deteção precoce da infeção. É importante realçar que a reatividade positiva nos testes de Atc ou Ag p24 não confirma definitivamente a presença da infeção. Em casos de reatividade positiva, são necessários testes adicionais mais específicos, como a avaliação da carga viral do VIH, para confirmar a presença e carga viral no organismo. Esta avaliação é fundamental para o diagnóstico correto e para o encaminhamento adequado do doente para tratamento e cuidados adicionais, se necessário. (47)

A deteção de *Helicobacter pylori* também pode ser relevante em adultos com sintomas característicos de patologia digestiva ou que residam em áreas de alta prevalência de infeção por este agente. O diagnóstico pode ser feito por teste respiratório, teste de antígeno fecal e testes com biópsias gástricas obtidas por endoscopia. (47)

Em alguns casos, a avaliação da medula óssea é indicada, especialmente quando o doente apresenta alterações no hemograma que não são típicas de TPI ou quando a resposta à terapêutica não é eficaz. A biópsia e o aspirado da medula óssea, complementados com citometria de fluxo para imunofenotipagem e análise citogenética, são úteis para diferenciar a TPI de outras doenças hematológicas, como doenças linfoproliferativas ou síndromes mielodisplásicas. (46)

Também importa investigar uma trombocitopenia, quando está associada a sintomas e sinais clínicos, como febre, dores osteoarticulares, dismorfismos esqueléticos e de tecidos moles, adenopatias e exantema não petequial, e quando existe histórico

familiar de trombocitopenia, e tendência para hemorragias após traumas leves. Esses sinais e sintomas podem indicar a presença de outras patologias subjacentes, que devem ser avaliadas, para um diagnóstico diferencial adequado. (46)

Para uma avaliação mais abrangente, podem ser considerados testes adicionais, embora não sejam obrigatórios, como deteção de Atc antiplaquetários, que podem ajudar na identificação de Atc específicos dirigidos contra as plaquetas.

A avaliação dos níveis de TPO pode fornecer informação sobre a regulação da produção de plaquetas.

Provas de Coagulação, com exames como o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) podem ser úteis para excluir distúrbios secundários da coagulação. (45)

Estes testes complementares podem contribuir para um diagnóstico mais completo e uma gestão adequada da TPI.

3.3- Tratamento

O tratamento da TPI é frequentemente dividido em três categorias: tratamento inicial, tratamento subsequente e tratamento após múltiplos tratamentos sem resposta. O tratamento inicial pode incluir corticosteroides e/ou imunoglobulinas intravenosas (IgIV) em doses elevadas. Estes são especialmente recomendados para doentes com alto risco de complicações hemorrágicas graves. A administração de corticosteroides visa reduzir a resposta imunológica que contribui para a destruição das plaquetas, enquanto as IgIV ajudam a elevar rapidamente o número de plaquetas circulantes e a controlar hemorragias agudas. Em alguns casos, a combinação de corticosteroides e IgIV é empregue para otimizar a resposta terapêutica e acelerar a recuperação dos níveis plaquetários. (46)

Embora estes tratamentos possam ser eficazes a curto prazo, proporcionando um alívio temporário dos sintomas e uma redução rápida da trombocitopenia, é importante notar que a eficácia pode ser transitória. Muitos doentes experimentam uma melhoria temporária que pode não se manter a longo prazo, e ambos os tratamentos podem estar associados a efeitos secundários significativos. Estes efeitos adversos variam, podendo incluir alterações metabólicas e imunológicas e/ou problemas relacionados com o sistema digestivo e endócrino. (48)

Para os doentes que não respondem a múltiplas linhas de tratamento ou que experimentam recidivas, a abordagem terapêutica pode ser ajustada conforme a situação clínica específica. Não existem orientações específicas universalmente aceites quanto à ordem ou esquemas de administração, tornando essencial a personalização do tratamento com base na resposta clínica individual e na tolerância aos medicamentos. (46)

A abordagem terapêutica para a TPI no adulto deve ser cuidadosamente adaptada às necessidades específicas de cada doente, considerando os potenciais efeitos adversos e a resposta ao tratamento. A Figura 8 apresenta uma visão geral das terapias que podem ser utilizadas, ilustrando a variedade de opções disponíveis para o tratamento desta complexa doença. (47)

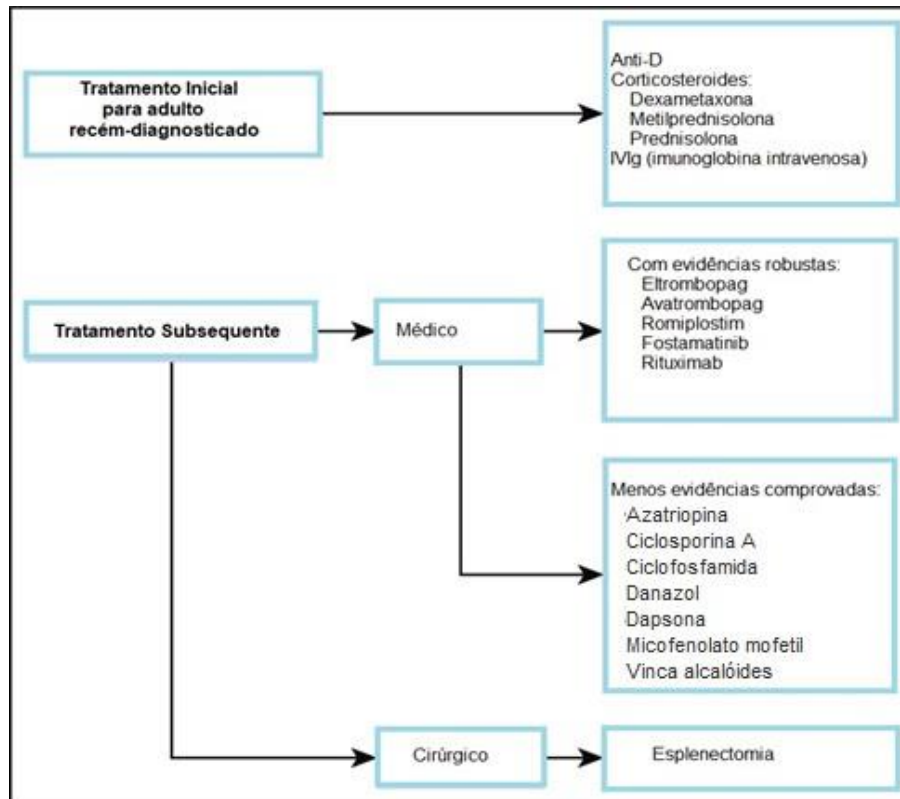


Figura 8-Visão geral das terapias usadas no adulto com trombocitopenia imune. Adaptado de (47)

Como referido, o tratamento inicial para a TPI é frequentemente baseado na administração de corticosteroides, como a prednisolona, por um período limitado, geralmente entre duas a três semanas. Os corticosteroides desempenham um papel crucial na gestão da TPI ao exercer efeitos hemostáticos diversos, pois não só reduzem a destruição das plaquetas pelo sistema imunitário, mas também promovem o aumento da sua produção. Além disso, os corticosteroides podem ajudar a mitigar a hemorragia, devido ao seu efeito estabilizador direto sobre os vasos sanguíneos. Em alguns casos, a dexametasona é utilizada como uma alternativa à prednisolona, oferecendo uma abordagem terapêutica igualmente eficaz. (47)

As IgIV são também uma terapia padrão para a TPI, apresentando uma boa taxa de resposta, variando entre 72,2% e 80,7% de eficácia. Os estudos recentes focam a otimização dos esquemas de infusão, para reduzir a frequência do tratamento, mantendo a eficácia da intervenção. (44)

O tratamento da TPI evoluiu significativamente com o advento de Atc monoclonais e outros agentes inovadores (tratamentos de 2º linha). Agentes como o rituximab, eltrombopag, avatrombopag e romiplostim têm revolucionado o panorama terapêutico. Estes agentes visam diferentes mecanismos patológicos associados à doença e podem oferecer benefícios substanciais, especialmente para doentes que não responderam adequadamente aos tratamentos convencionais. O rituximab, um Atc monoclonal dirigido contra a proteína CD20 presente na superfície de células B, tem sido utilizado com sucesso em alguns casos de TPI refratária. Esta abordagem pode ajudar a reduzir a produção de Atc antiplaquetários e aumentar o número de plaquetas. (44)

A esplenectomia é recomendada apenas após falhas sucessivas de terapias anteriores e deve ser considerada com cautela, tendo em conta a idade e as comorbilidades do doente. Esta intervenção pode ser eficaz em muitos casos, uma vez que o baço é um local primário de destruição das plaquetas. Contudo, é uma solução invasiva que implica riscos e requer uma avaliação cuidadosa dos benefícios e das potenciais complicações. (47)

Outra opção é o uso de agonistas dos recetores de TPO, que atuam estimulando diretamente a produção de plaquetas na medula óssea. Estes fármacos têm mostrado potencial para aumentar o número de plaquetas e reduzir a necessidade de transfusões sanguíneas.

Outras abordagens farmacológicas podem incluir o uso de imunossuppressores, embora os imunossuppressores empíricos mais antigos, com frequência, não alterem a história natural da doença e possam associar uma redução da qualidade de vida. (49)

A abordagem terapêutica para a TPI deve ser individualizada, considerando uma série de fatores que incluem o risco de hemorragia, a idade do doente, comorbilidades, terapias associadas, estilo de vida, e tolerância aos efeitos colaterais. Em situações de trauma, cirurgias, comorbilidades que predispõem a hemorragias, ou em doentes que requerem terapias antiplaquetárias ou anticoagulantes, o tratamento deve ser adaptado com base nas necessidades específicas e no contexto clínico. (49)

O tratamento da TPI é geralmente administrado em ambulatório, salvo em situações de hemorragia ativa, tratamento concomitante com anticoagulantes, necessidade de monitorização constante, ou em casos de trombocitopenia grave com valores de plaquetas $\leq 20 \times 10^9/L$. (50)

A designação de TPI refratária é aplicada quando os doentes que não respondem a múltiplas abordagens terapêuticas, definindo-se pela persistência de trombocitopenia persistente e grave, apesar do tratamento com terapias convencionais adequadas. Nestes doentes, o risco de toxicidade medicamentosa e complicações hemorrágicas graves, que podem ser fatais, pode aumentar. Estes doentes com TPI refratária enfrentam, ainda, um

risco de mortalidade quatro vezes superior ao da população geral, com metade das mortes atribuídas a hemorragias relacionadas com a doença e a outra metade a infeções, muitas vezes associadas a tratamentos severos e prolongados com imunossuppressores que comprometem a resposta imunológica do indivíduo. (48)

A ausência de testes de diagnóstico específicos e o elevado número de distúrbios com características semelhantes à TPI complicam o diagnóstico correto da TPI refratária. A experiência clínica desempenha um papel crucial na obtenção de um diagnóstico preciso.

A investigação continua a focar-se na procura de novas opções terapêuticas, seja em monoterapia ou em regimes combinados, para proporcionar efeitos aditivos ou sinérgicos. Abordagens que visem múltiplos alvos, tanto na destruição de plaquetas quanto nas alterações na trombocitopoiese, podem levar a respostas mais eficazes e ampliar as opções de tratamento disponíveis para os doentes com TPI refratária. (48)

A pesquisa e o desenvolvimento contínuos são essenciais para melhorar a qualidade de vida dos doentes com TPI e para explorar novas possibilidades terapêuticas que possam oferecer uma solução mais eficaz e duradoura. (48)

4- TPI na criança

A TPI manifesta-se frequentemente em crianças, especialmente na faixa etária de um a sete anos, com uma incidência estimada de 2 a 5 casos por 100.000 pessoas. A TPI na criança apresenta um curso tipicamente benigno e autolimitado, resolvendo-se frequentemente de forma espontânea, com ou sem tratamento. A incidência é, de facto, superior à observada em adultos, e curiosamente, nesta faixa etária afeta mais os rapazes, ao contrário do padrão observado na TPI do adulto jovem. (48)

O início da TPI infantil costuma ser abrupto e muitas vezes é precedido por uma infeção viral ou por uma vacinação recente. Por exemplo, pode ocorrer após a administração da vacina tríplice contra a parotidite (papeira), sarampo e rubéola. A fisiopatologia da TPI na infância está frequentemente associada à formação de complexos imunes; os Atc produzidos contra agentes virais podem reconhecer e atacar Ag presentes na superfície das plaquetas, resultando na sua destruição. (51)

O diagnóstico da TPI em crianças é também, predominantemente, um diagnóstico de exclusão. Clinicamente, as crianças com TPI apresentam equimoses, petéquias ou hemorragia nas mucosas, enquanto o exame físico geralmente não revela linfadenopatias nem organomegalias. O hemograma revela trombocitopenia isolada, sem alterações significativas nos valores de hemoglobina e de leucócitos, e na morfologia das células sanguíneas. Adicionalmente, deve ser realizada uma baciloscopia do sangue periférico para descartar a infeção por *Mycobacterium tuberculosis*. Por rotina, a aspiração de medula

óssea não é necessária para o diagnóstico, exceto em casos com manifestações incomuns, como dor óssea, linfadenopatias, hepatomegalia e/ou esplenomegalia, anemia sem causa identificada, leucocitose ou leucopenia, ou ainda presença de células precursoras no sangue periférico.(51,52)

Para a TPI infantil recém-diagnosticada, as opções terapêuticas iniciais incluem a administração de IgIV, corticosteroides e, em alguns casos, imunoglobulina anti-D, seja isoladamente ou em combinação. Nos casos em que os sintomas são ligeiros e não comprometem a qualidade de vida, a intervenção imediata pode não ser necessária, sendo suficiente uma vigilância cuidadosa. (52)

A maioria das crianças com TPI experimenta uma remissão completa no período de seis meses após o diagnóstico, com uma recuperação geralmente observada entre 6 a 12 semanas. No entanto, cerca de 20% a 30% das crianças podem continuar a apresentar trombocitopenia e sintomas hemorrágicos seis meses após o diagnóstico.

Quando a TPI se torna crónica, a esplenectomia pode ser considerada, embora o uso de rituximab tenha se tenha mostrado uma alternativa eficaz e não invasiva. Nas crianças com TPI crónica deve ser incluído no estudo para diagnóstico o teste para Atc antinucleares, para investigar uma possível TPI secundária. (53)

Para crianças que persistem com TPI crónica e não respondem às terapias padrão referidas, devem considerar-se as opções de tratamento de segunda linha, como o rituximab, altas doses de dexametasona, agonistas dos recetores de TPO, esplenectomia ou outras terapias imunossupressoras.(53)

Para situações de risco elevado de hemorragia intracraniana ou de hemorragias graves, especialmente quando os valores de plaquetas estão abaixo de $10 \times 10^9/L$, é imprescindível iniciar tratamentos de emergência. Por outro lado, quando os valores de plaquetas estão acima desse limiar, a abordagem recomendada é geralmente a de "vigilância e espera", pois a maioria dos casos de TPI em crianças resolve-se espontaneamente. (52)

Desta forma, a terapia inicial convencional é indicada para valores abaixo de $10 \times 10^9/L$ ou diante de sinais clínicos de hemorragia significativa, enquanto para valores superiores, geralmente se opta pela observação e monitoramento, sem intervenção imediata.

Em resumo, a TPI na infância, apesar de ser uma doença frequentemente autolimitada, requer uma abordagem diagnóstica cuidadosa e um tratamento personalizado, de acordo com a gravidade dos sintomas e a resposta ao tratamento inicial. A vigilância e a intervenção oportuna são cruciais para garantir a gestão mais adequada da doença e minimizar o impacto na saúde e bem-estar da criança. (51)(52)

5- TPI na grávida

Durante a gravidez, a trombocitopenia pode ocorrer em aproximadamente 10% das gestantes e pode ser atribuída a uma variedade de causas. (54)

A TPI na grávida pode representar desafios significativos, tanto para a mãe, como para o feto. A compreensão aprofundada da fisiopatologia da TPI é crucial para a tomada de decisões clínicas adequadas e para minimizar os riscos associados. Quando devidamente tratada, a TPI não impede, na maioria dos casos, uma gravidez e um parto bem-sucedidos. No entanto, a diferenciação entre TPI e trombocitopenia gestacional, geralmente benigna, é essencial para a prevenção de complicações hemorrágicas, como hemorragias intracranianas no feto, e para minimizar a toxicidade associada ao tratamento.(54–56)

5.1 Etiologias

A trombocitopenia na gestação ocorre secundariamente a diversas etiologias, diferindo na sua fisiopatologia e apresentação.

- 1. Trombocitopenia gestacional** - O mecanismo subjacente permanece pouco conhecido. A diluição decorrente da expansão do volume plasmático que ocorre durante a gestação, a agregação ou o consumo de plaquetas, alterações na atividade do FvW e ADAMTS-13, o aumento de fatores pró-inflamatórios da placenta e uma resposta inadequada à TPO, são alguns dos mecanismos propostos como determinantes da trombocitopenia gestacional. Em teoria, acredita-se que a trombocitopenia gestacional ocorra devido às diversas mudanças que ocorrem na gravidez. (57)
- 2. Trombocitopenia imune-** A TPI pode ser diagnosticada durante a gravidez. Na grávida, assim como na mulher adulta não grávida, a TPI pode estar associada a doenças autoimunes, como o LES, a artrite reumatoide, a esclerodermia, a SAF, entre outras; além disso, pode manifestar-se como uma combinação de trombocitopenia autoimune mediada e induzida por microangiopatia trombótica (MAT). (57)
- 3. Microangiopatia trombótica (MAT):** Associa características clínicas e patológicas comuns à anemia hemolítica e à TPI. A apresentação clínica inclui anemia hemolítica microangiopática (AHMA), trombocitopenia e lesão de órgãos. As MATs são definidas por lesão vascular, que se manifesta como trombose arteriolar e capilar, apresentando alterações características no endotélio e na

parede do vaso sanguíneo. Na gravidez dividem-se em MAT específica da gravidez e MAT não gestacional. (57)

A MAT específica da gravidez é secundária a complicações obstétricas, como a pré-eclampsia (PEC), síndrome HELLP (hemólise, enzimas hepáticas elevadas, trombocitopenia) e fígado gordo agudo da gravidez (FGAG).

A MAT não específica da gravidez inclui a púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), que ocorre devido à ausência/inibição da ADAMTS-13, e a síndrome hemolítico-urémica (SHU) atípica, que ocorre devido a uma mutação na função ou expressão de proteínas que controlam a via alternativa C3 convertase. (57)

4. Coagulação intravascular disseminada (CIVD)- denota uma alteração hemostática, com ativação excessiva das vias que promovem a coagulação e o comprometimento das vias de inibição da coagulação e do sistema fibrinolítico. Neste desequilíbrio hemostático há também ativação e consumo de plaquetas.

Pode ocorrer como uma complicação do processo de parto, com hemorragia pós-parto (HPP), atonia uterina, lacerações vaginais, descolamento prematuro da placenta, feto morto (retido), ou em associação com outras complicações da gravidez como a síndrome HELLP, FGAG ou outras causas de MAT. (57)

5. Trombocitopenia hereditária (HT)- muito rara, é habitualmente diagnosticada no primeiro trimestre da gravidez.

6. Outros

- Síndromes de falência medular
 - Anemia aplástica
 - Síndromes mielodisplásicas (SMD)
 - Neoplasias mieloproliferativas (NMP)
 - Leucemias/linfomas
 - Distúrbios infiltrativos da medula óssea
- Hemoglobinúria paroxística noturna (HPN)
- Trombocitopenia induzida por xenobióticos
- Doença de von Willebrand (DVW) tipo IIB
- Trombocitopenia induzida por heparina (TIH)

Todas estas etiologias da trombocitopenia devem ser avaliadas de acordo com o trimestre de gestação e o valor de plaquetas, pois isso também auxiliará no diagnóstico, identificando causas fisiológicas e causas patológicas, na monitorização do risco para a mãe e para o feto e no planeamento do tratamento. (57,58)

A apresentação da TPI na gestação é semelhante à do adulto. Nas grávidas com TPI anterior à gravidez, pode observar-se um agravamento da trombocitopenia ou permanecer quiescente durante a gestação.

Na ausência de avaliação do valor de plaquetas antes da gravidez, a observação de trombocitopenia significativa no primeiro trimestre, com declínio do valor de plaquetas à medida que a gestação progride, é consistente com TPI; quando a trombocitopenia é ligeira e se desenvolve no segundo ou terceiro trimestre da gravidez e não está associada a hipertensão ou proteinúria, provavelmente, representa uma trombocitopenia incidental. (58,59)

Há outras questões relevantes, que devem ser avaliadas numa grávida com trombocitopenia, nomeadamente a existência de complicações em partos anteriores, por hemorragia excessiva, e se o recém-nascido apresentou trombocitopenia ou complicações hemorrágicas.

O exame físico deve concentrar-se na exclusão de causas secundárias de trombocitopenia, como pressão arterial elevada e/ou observação de edema periférico e aumento de peso. Se, além dos sintomas mencionados, compatíveis com o desenvolvimento precoce da síndrome HELLP, a grávida apresentar também dor difusa no quadrante superior direito, mal-estar progressivo ou cefaleia intensa, esses sinais devem ser cuidadosamente avaliados durante o exame físico, pois podem indicar a presença da síndrome HELLP. (54)

5.2 Exames laboratoriais

A avaliação laboratorial da trombocitopenia durante a gravidez começa com a realização de um hemograma completo. Utilizando EDTA como anticoagulante, esta análise inicial é fundamental, para confirmar a presença de trombocitopenia e ajudar a distinguir entre as diversas causas potenciais.

No contexto da trombocitopenia, é crucial realizar uma observação cuidadosa do esfregaço de sangue periférico com EDTA, pois a presença de agregados de plaquetas ou de satelitismo plaquetário, são sugestivos de pseudotrombocitopenia. Esta condição, que afeta cerca de 1% das grávidas, ocorre devido a Atc antiplaquetários dependentes de EDTA, que causam uma agregação "artificial" das plaquetas. Para obter uma avaliação precisa da contagem de plaquetas, é recomendada a realização de uma nova colheita de sangue, utilizando citrato de sódio como anticoagulante, e repetir a contagem automática de plaquetas. (47)

Um hemograma completo fornece informações detalhadas não só sobre o número e o volume das plaquetas, mas também sobre as outras células sanguíneas, oferecendo informações importantes sobre a gravidade da trombocitopenia e possibilitando a investigação da causa subjacente. A análise morfológica das células num esfregaço de

sangue, permite a avaliação da morfologia das três linhas celulares, ajudando na deteção de alterações morfológicas significativas e na eventual deteção de células imaturas.

A presença de fragmentos de células vermelhas (esquistócitos) pode indicar fragmentação e hemólise, sendo um sinal importante para diferenciar a trombocitopenia associada a MAT na grávida. (49)

Na gravidez, a trombocitopenia pode ser isolada ou associada a alterações nas células vermelhas e/ou nos glóbulos brancos. Esta diferenciação é essencial para identificar a causa da trombocitopenia e para orientar a escolha do tratamento adequado, garantindo a saúde da mãe e do bebé. A trombocitopenia em casos de TPI é, por definição, uma alteração hematológica isolada; no entanto, é comum observar-se também anemia fisiológica ligeira da gravidez e/ou deficiência de ferro, que devem ser consideradas. (49)

Na trombocitopenia gestacional podem encontrar-se valores de plaquetas inferiores a $100 \times 10^9/L$, mas não se observam agregados plaquetários. Esta é a apresentação mais frequente de trombocitopenia na grávida, resolvendo-se espontaneamente após o parto.

A observação de linfócitos reativos no esfregaço de sangue, sugere que se deve investigar possíveis infeções virais, como VIH ou VHC. A observação de blastos no esfregaço, frequente em leucemias ou outras patologias hematológicas neoplásicas, requer avaliações adicionais. (49)

A deteção precoce de anemia nas grávidas é crucial para a prevenção de complicações maternas e fetais. A análise dos níveis de reticulócitos desempenha um papel fundamental na diferenciação entre a hemodiluição fisiológica da gravidez e a presença de anemia verdadeira. A combinação de uma concentração reduzida de hemoglobina com trombocitopenia pode ser uma alteração benigna relacionada à gestação ou, alternativamente, indicar uma condição patológica subjacente, como a TPI ou outras causas de trombocitopenia.

Nesses casos, a avaliação dos reticulócitos torna-se essencial: um valor elevado de reticulócitos sugere uma resposta compensatória da medula óssea à anemia em desenvolvimento, sinalizando um processo de destruição ou perda sanguínea ativa. Por outro lado, um valor de reticulócitos dentro da normalidade pode indicar que a anemia observada é resultado da hemodiluição fisiológica, característica da gravidez, sem a presença de um quadro patológico. (49)

Em resumo, a análise detalhada do hemograma e do esfregaço de sangue periférico é essencial para uma correta avaliação e gestão da trombocitopenia durante a gravidez, permitindo, ainda, a identificação de doenças subjacentes, que associam trombocitopenia, e a escolha de estratégias terapêuticas apropriadas. (49)

Para além dos exames laboratoriais já referidos, esfregaço de sangue periférico, todas as grávidas devem ser cuidadosamente avaliadas quanto à presença de fatores de

risco para infeção pelo VIH e VHC. O exame da medula óssea não é recomendado na grávida, tal como no adulto, a menos que outras alterações hematológicas ou achados laboratoriais sugestivos sejam identificados, ou se observem também alterações sugestivas no exame físico. (58)

O estudo laboratorial da grávida pode também incluir o estudo da coagulação, de grande importância no auxílio ao diagnóstico e posterior monitorização da grávida, para identificação de coagulopatias, como trombofilias hereditárias, SAF, deficiência de proteína C e S, trombocitopenia gestacional, CIVD, pré-eclâmpsia/eclâmpsia. (58)

- **Tempo de protrombina-** avalia a integridade da via extrínseca e da via comum da coagulação, que podem estar ligeiramente diminuídas na gravidez. Alterações no TP podem indicar uma diminuição da atividade dos fatores de coagulação dessas vias, o que pode ocorrer em algumas grávidas com TPI, devido à terapia com corticosteroides ou com IgIV. (58)
- **Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada-** avalia a integridade da via intrínseca e da via comum da coagulação. Na gestação, é comum observar-se uma ligeira diminuição no valor de TTPA; este estado de “hipercoagulabilidade” associado à gravidez atribui-se a uma preparação fisiológica para o parto. Por outro lado, um aumento significativo pode indicar uma disfunção no sistema de coagulação, que pode ser exacerbada pela TPI; a presença de Atc contrafatores de coagulação, pode aumentar o risco de hemorragia na grávida com TPI. (58)
- **Fibrinogénio-** O fibrinogénio é uma proteína essencial no processo de coagulação; nas grávidas com TPI, os níveis de fibrinogénio podem aumentar, devido à resposta inflamatória associada à doença ou à terapia com corticosteroides. No entanto, em casos graves de TPI ou em gestantes com complicações como a CIVD, os níveis de fibrinogénio podem diminuir significativamente, aumentando o risco de hemorragia. (55,60)

No caso de se observarem valores aumentados de TP e TTPA, trombocitopenia, baixa concentração de fibrinogénio e aumento de produtos de degradação da fibrina e de D-dímeros, poderemos estar perante um caso de CIVD. (55)

Como o TP e o TTPA estão diminuídos durante a gravidez, devido ao aumento da atividade dos fatores de coagulação, um prolongamento do TP ou do TTPA em relação ao valor basal pode ser indicativo de CIVD. (60)

Durante a gravidez, os testes laboratoriais para avaliação da função hepática podem apresentar alterações em cerca de 3-5% das gestantes. Essas variações podem refletir patologias ou alterações fisiológicas da gravidez, sendo, portanto, fundamental distinguir entre disfunções hepáticas reais e mudanças associadas à gestação. (60)

Os principais testes para avaliação da função hepática incluem a determinação da concentração de bilirrubina (direta e indireta), albumina, proteínas totais, AST e ALT, γ -glutamyl transferase e fosfatase alcalina. Alterações nos resultados destes testes podem indicar disfunção hepática, que pode ocorrer tanto em situações de TPI como em complicações associadas à gravidez. De notar, que os tratamentos com corticosteroides e IgIV, podem ter efeitos colaterais, influenciar os resultados destes testes. (60)

Durante a gravidez, são comuns algumas alterações hepáticas, que podem não indicar patologia hepática. Por exemplo, a albumina sérica apresenta frequentemente uma redução, enquanto a fosfatase alcalina pode aumentar, chegando a 2 a 4 vezes o valor de referência superior para adultas não grávidas. Este aumento está associado à produção da isoenzima placentária, pelo que, mulheres grávidas com níveis elevados de fosfatase alcalina isolada geralmente não necessitam de investigação adicional.

O aumento das transaminases, até 1,5 vezes o limite superior de referência, é uma ocorrência relativamente comum na grávida e não indica necessariamente uma doença hepática, desde que não haja sintomas adicionais. No entanto, qualquer alteração significativa nos níveis de bilirrubina deve ser investigada, pois pode ser indicativa de condições patológicas que requerem atenção. (60)

Algumas grávidas com TPI podem ter doenças hepáticas pré-existentes, como hepatite crónica ou doença hepática autoimune. Nestes casos, a avaliação regular da função hepática durante a gravidez é crucial, pois pode ser necessário ajustar o tratamento. A análise cuidadosa dos testes de função hepática permite a deteção precoce de qualquer alteração que possa impactar a saúde da mãe e do bebé, possibilitando uma gestão adequada e eficaz. (61)

Os testes de função hepática podem ajudar na deteção precoce de complicações hepáticas, e também na exclusão de diagnósticos; a colestase hepática gestacional (doença hepática mais comum na gravidez) também associa alterações na função hepática (níveis elevados de bilirrubina e fosfatase alcalina) e não tem associação com a TPI. (62)

A síndrome HELLP, como se referiu, baseia o seu diagnóstico em alguns marcadores séricos de função hepática – AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e bilirrubina. Se estes testes de função hepática estiverem elevados, devem efetuar-se testes a outros marcadores, como a haptoglobina, e a desidrogenase láctica, e estudos de coagulação - fibrinogénio, TP e TTPA - pois pode coexistir CIVD. (61)

No caso do FGAG as alterações laboratoriais incluem o aumento dos níveis de transaminases (300- 500 UI/L), bilirrubinas (até 10 mg/dl), e fosfatase alcalina, hipofibrinogenemia e aumento do TP; mas, ao contrário da síndrome HELLP, a hemólise e a trombocitopenia são incomuns. (63)

A síndrome HELLP e FGAG apresentam alta mortalidade, morbidade materna e fetal, pelo que o rápido diagnóstico, para um célere tratamento, se torna premente. O teste “golden standard” seria a biópsia hepática, mas dada a importância da rapidez na obtenção do diagnóstico, utiliza-se a avaliação física e a avaliação laboratorial referida, em situações de urgência. (63)

Outra das causas de alterações na função hepática associada a trombocitopenia, na grávida, pode ser a pré-existência de infeções por VIH ou VHC, pelo que todas as grávidas devem fazer o seu rastreio no período pré-natal.

Anticorpos antifosfolipídicos

A SAF é um distúrbio autoimune caracterizado por um aumento anormal da coagulação sanguínea, associado à presença de Atc antifosfolipídicos (AAF). Estes Atc, produzidos pelo sistema imunológico, ligam-se de forma inadequada aos fosfolípidos e proteínas presentes nas membranas celulares. Tal como em outras doenças autoimunes, incluindo o LES, a etiologia da SAF permanece desconhecida. (64)

As manifestações clínicas da SAF incluem principalmente trombose vascular e complicações obstétricas, como abortos espontâneos recorrentes e, com menor frequência, trombose materna. Contudo, a presença isolada de AAF, sem as manifestações clínicas típicas, não é suficiente para o diagnóstico de SAF. Existem grávidas que, apesar de serem positivas para AAF, permanecem assintomáticas durante longos períodos. Assim, tal como no LES, a pesquisa destes Atc assume um papel crucial no diagnóstico diferencial de condições autoimunes. (64,65)

No que se refere à TPI, a SAF e o LES partilham alterações imunológicas comuns, nomeadamente a produção de autoanticorpos, como os AAF e os anticoagulantes lúpicos (AL). Estes autoanticorpos podem interferir com os mecanismos normais de coagulação, contribuindo para um quadro clínico mais complexo. Devido a estas semelhanças, a pesquisa de autoanticorpos, como os Atc anticardiolipina (aCL) e AL, torna-se relevante para o diagnóstico diferencial entre SAF, LES e TPI, prevenindo potenciais erros de diagnóstico e assegurando um tratamento adequado. (64)

Em termos laboratoriais, as diretrizes recomendam a triagem de AL através de dois ou mais ensaios de coagulação dependentes de fosfolípidos, e a investigação de aCL. Cerca de um terço dos pacientes com LES são positivos para aCL, enquanto a prevalência

de AL neste grupo é de cerca de 15%. É importante notar que um teste AL positivo tende a ser mais específico para o diagnóstico de SAF do que um teste aCL elevado, reforçando a importância desta investigação no contexto da gestação e da trombocitopenia.(55–57,62,66)

A associação destes Atc com eventos trombóticos varia; geralmente, os Atc aCL não representam um fator de risco trombótico tão significativo como os Atc AL; de facto, estes são consistentemente identificados como preditores mais poderosos de eventos trombóticos em doentes com LES. A força da associação entre SAF e eventos trombóticos varia nestes doentes com LES; cerca de 40% dos doentes com LES apresentam AAF, mas menos de 40% deles acabarão por apresentar eventos trombóticos; a SAF trombótica é um importante fator adverso para o prognóstico de doentes com LES. (64,67,68)

O título de anticorpo e o isotipo são também importantes; o anticorpo aCL do tipo IgG está mais fortemente associado a eventos trombóticos do que o anticorpo aCL do tipo IgM, e o risco de trombose aumenta com títulos mais altos (>40 U). (64)

Presume-se que os eventos trombóticos causem muitas das complicações gestacionais associadas à SAF, mas a mais comum é o aborto espontâneo recorrente. Aproximadamente metade das perdas gestacionais associadas aos AAF ocorrem no primeiro trimestre (perda pré-embriónica e embriónica, < 10 semanas de gestação). (64)

O diagnóstico da SAF deve ser feito apenas quando ocorrem três ou mais abortos consecutivos, na ausência de outras etiologias identificáveis. Os dois fatores de maior risco para perda fetal são altos títulos de aCL do tipo IgG e história de perda fetal prévia. Atualmente, é atribuído até 80% de risco de perda gestacional, estando os Atc aCL do tipo IgG e IgM associados a um risco elevado de aborto espontâneo, embora em menor grau do que o AL.(64,68)

As manifestações obstétricas da SAF não se restringem à perda fetal, pois esta síndrome também pode causar parto precoce, oligodrâmnio (baixos níveis de líquido amniótico), complicações neonatais (prematuridade estimada em 30-60% e mais comum em grávidas com LES; restrição de crescimento intrauterino; sofrimento fetal e, raramente, trombose fetal ou neonatal), complicações obstétricas maternas associadas, como pré-eclâmpsia/eclâmpsia e síndrome HELLP. (64)

Testes serológicos para LES

O LES é uma doença autoimune, caracterizada pela produção de Atc antinucleares (ANAs), que formam imunocomplexos, que medeiam a patogénese por deposição tecidual ou indução da produção de citocinas. No LES, especialmente na sua forma sistémica, os

autoanticorpos ligam-se a Ag nucleares, citoplasmáticos e da membrana celular, sendo considerados a marca serológica da doença. (69)

Os fatores antinucleares (FANs) são um conjunto de autoanticorpos direcionados para diferentes especificidades antigénicas. Esses Ag nucleares incluem DNA (ácido desoxirribonucleico) de cadeia simples (ss) e dupla (ds), proteínas de histonas, nucleossomos (complexo histona-DNA), proteínas dos centrómeros e Ag nucleares extraíveis (ANEs) (antígeno de Smith (Sm), Ro, La, ribonucleoproteína (RNP), etc.). Os FANs estão presentes em cerca de 95% dos doentes com LES, com doença ativa. (70)

Embora a presença de autoanticorpos no LES seja conhecida há mais de 60 anos, ainda hoje é feito um grande esforço e pesquisa para entender o significado patogénico, diagnóstico e prognóstico destes autoanticorpos. Em particular, os estudos têm se focado na importância dos FANs, dos Atc anti-C1q e dos AAF.

As técnicas para a deteção destes autoanticorpos são: imunofluorescência indireta (IFI) usando culturas de células, ensaio imunoenzimático (ELISA) e radioimunoensaio (RIE).(70,71) O método ELISA é mais sensível, mas menos específico que a IFI; a IFI é uma técnica sensível, reproduzível e de fácil execução; estes são os métodos mais comuns no trabalho de rotina. O método ELISA é o preferido quando a titulação exata dos FANs é necessária no seguimento do LES. Ultimamente, têm sido usados ensaios de ELISA “multiplex” para a titulação de FANs e estas novas técnicas, mais sofisticadas, são capazes de detetar simultaneamente múltiplos autoanticorpos a partir de uma única amostra, o que se mostra mais eficiente e sensível. (71,72)

Durante a gravidez, o LES pode ser exacerbado nas grávidas com a doença ativa na conceção ou com história prévia de doença renal. Estas crises podem levar ao aumento de eventos adversos na gravidez, incluindo perda fetal, pré-eclâmpsia, parto prematuro e bebés de baixo peso para a idade gestacional (restrição de crescimento intra-uterino). Além disso, as grávidas com AAF podem ter episódios trombóticos ou maiores taxas de perda fetal.

Grávidas que têm Atc anti-Ro/SSA e anti-La/SSB (capazes de romper a barreira protetora materno-fetal) precisam de acompanhamento especial, pois existe o risco de os fetos sofrerem bloqueio cardíaco completo congénito e lúpus neonatal. Idealmente, as grávidas com LES devem ter a doença controlada (recorrendo a medicamentos compatíveis com a gravidez) antes da conceção e serem monitorizadas ao longo de toda a gravidez, parto e pós-parto.(54,58,60,63,66,73,74)

5.3 Tratamento

O uso de corticosteroides e IgIV não beneficia grávidas com trombocitopenia gestacional, mas podem ser importantes quando há associação de TPI com a trombocitopenia gestacional. Os recém-nascidos de mães com trombocitopenia gestacional não desenvolvem trombocitopenias. (75)

Embora existam muitas opções de tratamento para mulheres adultas com TPI, na gravidez é essencial minimizar o risco materno-fetal.

O tratamento da trombocitopenia na gravidez depende do valor das plaquetas e do risco de complicações. O tratamento é instituído quando o número de plaquetas está significativamente baixo, especialmente se estiver abaixo de um limiar seguro, que pode variar entre diferentes protocolos clínicos. Este limiar pode ser definido em torno de um valor de plaquetas de 50 a $70 \times 10^9/L$, mas a decisão depende de avaliação clínica individual e das políticas institucionais. (75)

Os corticosteroides são frequentemente utilizados como tratamento de primeira linha, especialmente se houver necessidade de aumentar rapidamente o número de plaquetas, como acontece antes de procedimentos invasivos, como o parto ou a administração de anestesia epidural. É importante balancear os benefícios do tratamento com os potenciais riscos, como o desenvolvimento de diabetes gestacional, hipertensão ou ganho de peso excessivo, que podem ser mais proeminentes se o tratamento for iniciado no terceiro trimestre. Se iniciado o tratamento no primeiro trimestre, o risco associado de fenda palatina fetal é mínimo. (57)

Para uma abordagem terapêutica mais precisa e individualizada, além da monitorização rigorosa do valor de plaquetas, é essencial a avaliação contínua da saúde materna e fetal, incluindo a possibilidade de complicações relacionadas com a passagem de Atc IgG para a circulação fetal, através da placenta.

Uma dose única de IgIV (1000 mg/kg), permite obter um rápido aumento das plaquetas, em 24 horas; é uma resposta de curta duração (2 a 3 semanas), que pode ser repetida de forma isolada ou em combinação com corticosteroides, se não se conseguir obter a resposta desejada; neste caso, há um pequeno risco de acidose tubular renal e de trombose. (57)

O rituximab tem sido usado com segurança durante a gravidez, com complicações mínimas para a mãe, mas há relatos de linfopenia transitória neonatal de células B, que habitualmente se resolve aos seis meses de idade.

A esplenectomia pode ser feita com segurança, usando uma abordagem laparoscópica, no segundo ou terceiro trimestre da gravidez; no entanto, deve ser reservada para doentes refratários ao tratamento de primeira linha. Outras opções

terapêuticas incluem azatioprina e ciclosporina (associados a risco de malformações congénitas e risco aumentado de aborto espontâneo). (57)

A monitorização da microangiopatia na gravidez deve concentrar-se na causa antecedente, pois a trombocitopenia existente é uma consequência da mesma, e, portanto, melhora com a resolução da doença subjacente. Para isso, é fundamental diferenciar entre a MAT específica da gravidez e a MAT não específica da gravidez, como já foi referido, pois o tratamento das duas é muito diferente. (57)

6- Perspetivas futuras no diagnóstico e tratamento de TPI

A TPI primária é atualmente reconhecida como uma síndrome autoimune com vários tipos de mecanismos subjacentes. Infelizmente não existem ensaios específicos para distinguir as diferentes etiologias. O excesso de tratamento continua a ser um problema para os doentes com TPI, podendo condicionar a sua qualidade de vida e saúde. É essencial uma melhor estratificação dos doentes, a fim de evitar o tratamento excessivo, e direcionar o tratamento para os que serão efetivamente beneficiados.(49)

Na TPI a fração de plaquetas imaturas (%FPI) está elevada, a destruição de plaquetas opsonizadas por Atc aumenta, encurtando o tempo de vida das plaquetas; ou seja, aumenta a percentagem de plaquetas imaturas em circulação. O método padrão para avaliar o valor de plaquetas imaturas em circulação, consiste em, por técnicas de citometria de fluxo, usando laranja de tiazol, identificar as plaquetas ricas em RNA, à semelhança do que se faz para deteção/quantificação de reticulócitos e respetivas frações de maturação. No entanto, esta avaliação da percentagem de plaquetas reticuladas não está ainda padronizada, não sendo usada na rotina laboratorial. (76)

Um método recentemente desenvolvido, permite a avaliação da FPI usando um contador globular automatizado (Sysmex, Japão). (76) Neste estudo, foi proposta a avaliação da FPI e do valor plasmático de TPO, para uma diferenciação clara entre TPI e trombocitopenia hipoplásica (falência medular).(76)

Continua a ser crucial o diagnóstico diferencial da TPI de muitas outras doenças, através de diferentes estudos analíticos, e uma avaliação mais aprofundada do valor dos diferentes critérios usados para o seu diagnóstico.

Atualmente, o tratamento da PTI pode incluir o uso de agonistas dos recetores de TPO de segunda geração. Estes agentes são desenhados para não terem semelhança estrutural com a TPO endógena. Desta forma, quaisquer Atc que o doente possua, que sejam dirigidos contra a TPO nativa, não reagirão de forma cruzada com estes agentes. Os agonistas dos recetores TPO imitam os efeitos da TPO ao ligarem-se aos recetores de TPO nas células megacariocíticas, estimulando a produção de plaquetas. Foi reportado

que o número de plaquetas começa a aumentar cerca de cinco dias após a administração desses agentes. (26)

Há já outras terapêuticas que estão em desenvolvimento clínico. É o caso dos inibidores do recetor Fc neonatal (RFcn); este recetor é uma proteína com um papel importante na reciclagem de certas substâncias, como a IgG e a albumina. O RFcn liga-se à IgG e à albumina dentro dos endossomas. Esta ligação é crucial, pois o RFcn medeia a libertação da IgG e da albumina dos endossomas, impedindo a sua degradação. Desta forma, a vida útil destas moléculas é prolongada, aumentando a sua estabilidade e circulação no organismo. Assim, ao inibir o recetor RFcn, o inibidor reduz a reciclagem de IgG, levando à sua degradação. O objetivo do Rozanolixizumab é, portanto, diminuir os níveis de IgG circulantes, incluindo aquelas envolvidas em distúrbios autoimunes

Esta molécula bloqueia, portanto, o RFcn, promovendo a quebra da IgG dentro dos endossomas, o que vai ser útil em condições em que há excesso de IgG patológica, como em algumas doenças autoimunes, ajudando a reduzir os níveis de IgG e a controlar os sintomas da doença. (46) Os inibidores de RFcn foram desenvolvidos, como os Atc monoclonais - rozanolixizumab e efgartigimod usando uma porção Fc modificada de IgG1. Estudos de fase I/II demonstraram uma boa tolerância e resposta em 38% e em 50% dos doentes com TPI, no tratamento com efgartigimod com e rozanolixizumab, respetivamente. (77)

Outros agentes em estudo incluem os inibidores de tirosina quinase de Bruton (ITKB). Esta tirosina quinase de Bruton e a proteína tirosina cinase Syk são duas proteínas importantes na sinalização que ocorre quando os recetores Fcγ, que são encontrados em células do sistema imunológico, como as células B e as plaquetas, são ativados. Foram desenvolvidos vários ITKBs para o tratamento de doenças como a leucemia linfocítica crónica; no entanto, foi relatado que os ITKB inibem a agregação plaquetária, podendo associar risco de episódios hemorrágicos, nomeadamente em doentes com TPI. (78)

Acredita-se que o sistema do complemento esteja envolvido na patogénese da TPI em alguns doentes; no entanto, o mecanismo subjacente não está ainda claramente compreendido. Neste âmbito, foram realizados ensaios clínicos com sutimlimab, que é um anticorpo monoclonal IgG4 que se liga e inibe o C1s do complemento. Nestes estudos foram incluídos doentes adultos com TPI, que tinham sido tratados sem sucesso com outras terapias. Dos 12 doentes tratados, 42% responderam ao tratamento, verificando-se um aumento do número de plaquetas, para valores de pelo menos $50 \times 10^9/L$. (50)

O fostamatinib é um inibidor da Syk, que é recrutada para o local de ação através da fosforilação, através da ativação da tirosina imunorrecetora, presente nos domínios intracelulares dos recetores Fcγ (FcγR). As sequências de tirosina imunorrecetora ativada, são sequências específicas de aminoácidos que, quando fosforiladas, servem como

plataformas de recrutamento para proteínas sinalizadoras como a Syk. Após a ligação dos Atc às plaquetas, os recetores FcγR nas células imunes (como macrófagos) são ativados. Esta ativação resulta na fosforilação das sequências de tirosina imunorrecetora no domínio intracelular dos FcγR. A Syk, uma vez recrutada e fosforilada, desencadeia uma cascata de eventos de fosforilação no interior da célula. Esta cascata de sinalização é essencial para a ativação de vários processos celulares. A fosforilação da Syk e a subsequente cascata de sinalização levam à ativação do processamento de fagocitose da célula imune. Além da fagocitose, a ativação da Syk também resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, moduladoras da resposta imune, promovendo a inflamação e recrutando mais células imunes para o local de ação.(49,78)

A modulação da fagocitose por imunoglobulinas multiméricas recombinantes tem sido também estudada. Embora as imunoglobulinas usadas no tratamento endovenoso, com IgG purificada, sejam altamente eficientes na TPI, a sua disponibilidade depende das doações de sangue, levando a carências recorrentes. Para evitar esse problema, estão a ser desenvolvidas imunoglobulinas multiméricas recombinantes.(78)

As terapias direcionadas para células B e plasmócitos incluem o uso de Atc monoclonais anti-CD20, como o veltuzumab e o obinutuzumab. Estes Atc foram humanizados para reduzir a indução de Atc antidrogas. Apesar da boa tolerância e da sua eficácia, o veltuzumab não é utilizado rotineiramente na prática clínica, pois aumenta a citotoxicidade e a depleção de células B, sendo, por isso, usado no tratamento de neoplasias hematológicas de células B. Não há evidência suficiente para determinar se o veltuzumab é capaz de aumentar as taxas de resposta ou prolongar a duração da resposta em doentes com TPI. (78)

A não resposta ao rituximab, em parte devido ao surgimento de plasmócitos de vida longa num microambiente enriquecido com fator ativador de células B, levantou o interesse de uma combinação de rituximab com belimumab, uma terapia monoclonal direcionada contra o fator ativador de células B. Esta combinação é de particular interesse no tratamento de doentes com TPI que não respondem adequadamente ao rituximab. O belimumab pode ajudar a suprimir o ambiente rico em fator ativador de células B que suporta a sobrevivência dos plasmócitos de vida longa, potencialmente aumentando a eficácia do rituximab e melhorando as taxas de resposta e a duração da resposta ao tratamento da TPI. Avaliada pela primeira vez num modelo experimental de TPI, esta terapia combinada mostrou uma diminuição dramática no número de plasmócitos esplénicos. (78)

Outra forma de diminuir os plasmócitos de vida longa é o uso de inibidores de proteassoma, como o bortezomib, licenciado para o tratamento do mieloma múltiplo; este tipo de tratamento poderia ser útil para esgotar os plasmócitos autorreativos na TPI. Da

mesma forma, Atc monoclonais direcionados contra grupos de diferenciação expressos por plasmócitos, como o CD38 ou o CD19, poderiam ser interessantes.

Como o CD154 é uma molécula que desempenha um papel importante e é expressa em células dendríticas e células T foliculares auxiliares, a sua inibição tem sido investigada no tratamento da TPI. Verificou-se que o anticorpo anti-CD154 induziu baixas taxas de resposta (16%–43%); houve também relatos de casos de trombose, devido à ativação plaquetária pela ligação de CD154 expresso na sua membrana; na sequência destes resultados, todos os ensaios clínicos foram suspensos. No entanto, novas terapias anti-CD154 com uma porção Fc modificada ou sem a porção Fc, envolvida na ativação plaquetária, estão a ser desenvolvidas.(78)

Alguns doentes com TPI apresentam níveis anormais de ácido siálico na superfície de suas plaquetas. O ácido siálico é um componente importante dos glicanos, presentes nas glicoproteínas da membrana celular(79); considerando que a destruição plaquetária é parcialmente suportada pela redução de ácido siálico da membrana celular, que ocorre no fígado, o oseltamivir, um inibidor da neuraminidase-1, tem sido ocasionalmente usado no tratamento da TPI refratária. Este inibidor da neuraminidase-1 mostrou o seu potencial ao melhorar a resposta a imunossuppressores ou a agonistas do recetor de TPO (TPO-Ras, são pequenas moléculas peptídeo ou não-peptídeo que atuam estimulando a produção de megacariócitos e, finalmente, de plaquetas na medula óssea, através da via do recetor TPO. (79)(78)

Com um mecanismo de ação trombocitopoiética semelhante aos do eltrombopag, mas sem interações dietéticas, os TPO-Ras, avatrombopag e lusutrombopag, exibiram segurança e eficácia no tratamento da TPI. Enquanto o avatrombopag pode ser indicado para o tratamento de trombocitopenia grave em doentes adultos com doença crónica hepática, o lusutrombopag é particularmente recomendado para o tratamento da trombocitopenia crónica relacionada com doença hepática.(77–79)

O interesse em várias moléculas diferentes está a ser investigado, incluindo outros agonistas do recetor da TPO, lusutrombopag e hetrombopag, bem como uma molécula anti-CD38 (daratumumab, que pode ser útil nos casos de TPI refratária, causada por plasmócitos de vida longa), entre outros.(46,49,80)

Conclusão

A TPI é a forma mais prevalente de trombocitopenia isolada e tem uma longa história de nomenclaturas, sendo amplamente reconhecida como "púrpura trombocitopénica idiopática". A trombocitopenia é conhecida e estudada há muito tempo e, como tal, avanços significativos têm sido feitos na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que sustentam a doença, bem como na melhoria das abordagens diagnósticas e terapêuticas. (81)

Os progressos recentes na patogénese da TPI reforçam a visão de que se trata de uma síndrome autoimune complexa, com diversos mecanismos subjacentes, e não de uma patologia única. Esses avanços demonstram que múltiplas vias patológicas podem levar à trombocitopenia, apresentando-se de formas distintas em cada doente. Esta variabilidade nas respostas terapêuticas sugere que os mecanismos de ação podem variar de um momento para outro, tornando a gestão da doença um desafio. (82)

A incerteza sobre a seleção dos doentes que necessitam de tratamento persiste, bem como da escolha da terapia mais adequada e da duração do tratamento. O excesso de tratamentos continua a ser um problema significativo, impactando a qualidade de vida e a saúde dos doentes com TPI. Assim, é essencial classificar com maior precisão e rapidez a patologia dos doentes para evitar tratamentos desnecessários e direcionar as terapias para aqueles que realmente beneficiarão de abordagens específicas para a trombocitopenia. (49)

Apesar das limitações, a contagem de plaquetas continua a ser o biomarcador mais utilizado para monitorizar a TPI. É também fundamental realizar rastreios para infeções, como o VHC e o VIH, especialmente em grávidas, para possibilitar a implementação rápida de medidas terapêuticas adequadas. No contexto dos adultos, a exclusão da infeção por *Helicobacter pylori*, dada a sua alta prevalência, é igualmente importante. Comparações entre os dados nacionais e internacionais sobre esta infeção podem fornecer uma melhor compreensão das variações na prevalência e no impacto clínico.

Na infância, a TPI primária costuma seguir um curso benigno e autolimitado. O início da doença é frequentemente abrupto e pode ser precedido por uma infeção viral ou vacinação, ocorrendo geralmente algumas semanas antes. O diagnóstico de TPI em crianças, semelhante ao dos adultos, baseia-se principalmente na exclusão de outras condições. As opções iniciais de tratamento para a TPI infantil recém-diagnosticada podem incluir IgIV, corticosteroides e imunoglobulina anti-D, isoladamente ou em combinação. (52,53)

Durante a gravidez, a trombocitopenia é a segunda alteração hematológica mais comum. A observação do esfregaço de sangue periférico é o primeiro passo na avaliação

laboratorial da trombocitopenia. A trombocitopenia gestacional, a causa mais prevalente de trombocitopenia na gravidez, é um diagnóstico de exclusão e tende a resolver-se espontaneamente. A TPI é a causa mais frequente de trombocitopenia no primeiro trimestre da gestação, sendo que os tratamentos de primeira linha incluem corticosteroides e IgIV. (56,65)

É antecipado que, no futuro próximo, novas moléculas com mecanismos de ação inovadores estejam disponíveis para o tratamento da TPI. Além disso, espera-se uma expansão do conhecimento sobre novos biomarcadores analíticos, que apoiarão os clínicos na tomada de decisões diagnósticas e terapêuticas, aprimorando assim a gestão eficaz da TPI primária. (77,78)

Bibliografia

1. Audia S, Mahévas M, Samson M, Godeau B, Bonnotte B. Pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Autoimmun Rev.* 2017 Jun 1;16(6):620–32.
2. Ivetic N. Investigating autoantibodies in the pathophysiology of platelet underproduction in imune Thrombocytopenia. 2020.
3. Hemostasis and Its Regulation Part 1.
4. Robier C. Platelet morphology. Vol. 44, *Journal of Laboratory Medicine*. Walter de Gruyter GmbH; 2020. p. 231–9.
5. Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. Vol. 2016, *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation; 2016.
6. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Rev.* 2005;19(2):111–23.
7. Hutchinson C V, Brereton ML, Burthem J. Digital imaging of haematological morphology. *Clin Lab Haematol.* 2005 Dec;27(6):357–62.
8. Gremmel T, Frelinger AL, Michelson AD. Platelet physiology. Vol. 42, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. Thieme Medical Publishers, Inc.; 2016. p. 191–204.
9. Mojzisch A, Brehm MA. The Manifold Cellular Functions of von Willebrand Factor. *Cells.* 2021 Sep 8;10(9).
10. Blockmans D, Deckmyn H, Vermynen J. Platelet Activation.
11. A. Victor Hoffbrand, Paul A. H. Moss. Platelets, blood coagulation and haemostasis. In: *Hoffbrand's Essential Haematology*. 7th ed. Wiley-blackwell; 2016.
12. pediagenosis. Haemopoietic Stem And Progenitor Cells [Internet]. 2018 [cited 2024 Aug 28]. Available from: <https://www.pediagenosis.com/2018/09/haemopoietic-stem-and-progenitor-cells.html?m=0>
13. Hemostasis: Comprehensive Guide to Clotting and Anticoagulation [Internet]. [cited 2024 Jun 12]. Available from: <https://www.prepladder.com/neet-ss-medicine/hematology/hemostasis-comprehensive-guide-to-clotting-and-anticoagulation>
14. Blockmans D, Deckmyn H, Vermynen J. Platelet actuation. *Blood Rev.* 1995 Sep;9(3):143–56.
15. Cuker A, Cines DB. Immune thrombocytopenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010;2010:377–84.
16. Cines DB, Bussel JB, Liebman HA, Luning Prak ET. The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood.* 2009 Jun 25;113(26):6511–21.

17. Goelz N, Bosch AMS, Rand ML, Eekels JJM, Franzoso FD, Schmutz M. Increased levels of IL-10 and IL-1Ra counterbalance the proinflammatory cytokine pattern in acute pediatric immune thrombocytopenia. *Cytokine*. 2020 Jun 1;130.
18. Terrell DR, Beebe LA, Vesely SK, Neas BR, Segal JB, George JN. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports. *Am J Hematol*. 2010 Mar;85(3):174–80.
19. Paola TP. Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2012 Jul;23(4):446–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0716864012703358>
20. Shrestha S, Nazy I, Smith JW, Kelton JG, Arnold DM. Platelet autoantibodies in the bone marrow of patients with immune thrombocytopenia. *Blood Adv*. 2020 Jul 14;4(13):2962–6.
21. Semple JW, Provan D. The immunopathogenesis of immune thrombocytopenia: T cells still take center-stage. *Curr Opin Hematol*. 2012 Sep;19(5):357–62.
22. Johnsen J. Pathogenesis in immune thrombocytopenia: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:306–12.
23. McMillan R, Wang L, Tomer A, Nichol J, Pistillo J. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood*. 2004 Feb 15;103(4):1364–9.
24. Yang L, Wang L, Zhao C hong, Zhu X juan, Hou Y, Jun P, et al. Contributions of TRAIL-mediated megakaryocyte apoptosis to impaired megakaryocyte and platelet production in immune thrombocytopenia. *Blood*. 2010 Nov 18;116(20):4307–16.
25. McMillan R, Nugent D. The effect of antiplatelet autoantibodies on megakaryocytopoiesis. Vol. 81, *International Journal of Hematology*. 2005. p. 94–9.
26. Iraqi M, Perdomo J, Yan F, Choi PYI, Chong BH. Immune thrombocytopenia: Antiplatelet autoantibodies inhibit proplatelet formation by megakaryocytes and impair platelet production in vitro. *Haematologica*. 2015;100(5):623–32.
27. Vrbensky JR, Nazy I, Toltl LJ, Ross C, Ivetic N, Smith JW, et al. Megakaryocyte apoptosis in immune thrombocytopenia. *Platelets*. 2018 Oct 3;29(7):729–32.
28. Yang S, Wang L, Wu Y, Wu A, Huang F, Tang X, et al. Apoptosis in megakaryocytes: Safeguard and threat for thrombopoiesis. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2023.

29. Kuter DJ. The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists. *Int J Hematol*. 2013 Jul;98(1):10–23.
30. Almanza A, Carlesso A, Chintia C, Creedican S, Doultisinos D, Leuzzi B, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. Vol. 286, *FEBS Journal*. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 241–78.
31. Chen X, Shi C, He M, Xiong S, Xia X. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. Vol. 8, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2023.
32. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. Vol. 115, *Journal of Clinical Investigation*. 2005. p. 3339–47.
33. Sigal S, Mitchell O, Feldman D, Diakow M. The pathophysiology of thrombocytopenia in chronic liver disease. *Hepat Med*. 2016 Apr;39.
34. Lambert MP. Platelets in liver and renal disease. *Hematology*. 2016 Dec 2;2016(1):251–5.
35. Dorgalaleh A, Mahmudi M, Tabibian S, Khatib ZK, Tamaddon GH, Moghaddam ES, et al. Anemia and thrombocytopenia in acute and chronic renal failure. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2013;7(4):34–9.
36. Kuter DJ. Managing thrombocytopenia associated with cancer chemotherapy. *Oncology (Williston Park)*. 2015 Apr;29(4):282–94.
37. Raadsen M, du Toit J, Langerak T, van Bussel B, van Gorp E, Goeijenbier M. Thrombocytopenia in virus infections. Vol. 10, *Journal of Clinical Medicine*. MDPI; 2021. p. 1–33.
38. Kuter DJ, Gernsheimer TB. Thrombopoietin and Platelet Production in Chronic Immune Thrombocytopenia. Vol. 23, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2009. p. 1193–211.
39. Maoz-Segal R, Andrade P. Molecular Mimicry and Autoimmunity. In: *Infection and Autoimmunity*. Elsevier; 2015. p. 27–44.
40. Cusick MF, Libbey JE, Fujinami RS. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012 Feb;42(1):102–11.
41. Molecular mimicry: perfect match propels pathologies [Internet]. [cited 2024 Jul 14]. Available from: <https://www.immunopaedia.org.za/breaking-news/perfect-match-propels-pathologies/>
42. Ji X, Zhang L, Peng J, Hou M. T cell immune abnormalities in immune thrombocytopenia. *J Hematol Oncol*. 2014 Dec 2;7(1):72.
43. Malik A, Sayed AA, Han P, Tan MMH, Watt E, Constantinescu-Bercu A, et al. The role of CD8 + T-cell clones in immune thrombocytopenia *Medscape*

- Continuing Medical Education online [Internet]. Available from: http://ashpublications.org/blood/article-pdf/141/20/2417/2051731/blood_bld-2022-018380-main.pdf
44. Lambert MP, Gernsheimer TB. Clinical updates in adult immune thrombocytopenia. *Blood*. 2017 May 25;129(21):2829–35.
 45. Gauer RL, Braun MM. Thrombocytopenia [Internet]. Vol. 85. 2012. Available from: www.aafp.org/afp.
 46. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L, Crowther MA. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. 2011; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/117/16/4190/1336019/zh801611004190.pdf>
 47. Provan D, Arnold DM, Bussel JB, Chong BH, Cooper N, Gernsheimer T, et al. Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood Adv*. 2019 Nov 26;3(22):3780–817.
 48. Vianelli N, Auteri G, Buccisano F, Carrai V, Baldacci E, Clissa C, et al. Refractory primary immune thrombocytopenia (ITP): current clinical challenges and therapeutic perspectives. *Ann Hematol*. 2022 May 1;101(5):963–78.
 49. Provan D, Semple JW. Recent advances in the mechanisms and treatment of immune thrombocytopenia. *EBioMedicine*. 2022 Feb;76:103820.
 50. Provan D, Semple JW. Recent advances in the mechanisms and treatment of immune thrombocytopenia-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). 2022; Available from: <https://doi.org/10.1016/j>.
 51. Lee JM. Advances in management of pediatric chronic immune thrombocytopenia: a narrative review. *Journal of Yeungnam Medical Science*. 2023 Jan 9;
 52. Singh G, Bansal D, Wright NAM. Immune Thrombocytopenia in Children: Consensus and Controversies. *The Indian Journal of Pediatrics*. 2020 Feb 11;87(2):150–7.
 53. Faki Osman M El. Childhood immune thrombocytopenia: Clinical presentation and management. *Sudan J Paediatr*. 2012;12(1):27–39.
 54. Bussel JB, Knightly KA. Immune thrombocytopenia in pregnancy. *Br J Haematol* [Internet]. 2024 Jan 23; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bjh.19230>

55. Ciobanu AM, Colibaba S, Cimpoca B, Peltecu G, Panaitescu AM. Thrombocytopenia in Pregnancy. *Maedica (Bucur)*. 2016 Mar;11(1):55–60.
56. Cines DB, Levine LD. Thrombocytopenia in pregnancy. *Blood*. 2017 Nov 23;130(21):2271–7.
57. Mangla A, Hamad H. Thrombocytopenia in Pregnancy [Internet]. StatPearls Publishing; 2022 [cited 2024 May 11]. 0–30 p. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547705/>
58. Stavrou E, McCrae KR. Immune Thrombocytopenia in Pregnancy. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Dec;23(6):1299–316.
59. Pishko AM, Levine LD, Cines DB. Thrombocytopenia in pregnancy: Diagnosis and approach to management. *Blood Rev*. 2020 Mar;40:100638.
60. Yan M, Malinowski AK, Shehata N. Thrombocytopenic syndromes in pregnancy. *Obstet Med*. 2016 Mar 21;9(1):15–20.
61. Guarino M, Cossiga V, Morisco F. The interpretation of liver function tests in pregnancy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2020 Feb;44–45:101667.
62. Pishko AM, Levine LD, Cines DB. Thrombocytopenia in pregnancy: Diagnosis and approach to management. *Blood Rev*. 2020 Mar;40:100638.
63. Machado L, Lauren K, Burrmann M, Grund B, Vieira FE, Filho C. SÍNDROME HELLP E FÍGADO GORDUROSO AGUDO NA GESTAÇÃO KEYWORDS PREGNANCY; HELLP SYNDROME; FATTY LIVER; PRE-ECLAMPSIA.
64. Di Prima FAF, Valenti O, Hyseni E, Giorgio E, Faraci M, Renda E, et al. Antiphospholipid Syndrome during pregnancy: the state of the art. *J Prenat Med*. 2011 Apr;5(2):41–53.
65. Chighizola CB, Gerosa M, Trespidi L, Di Giacomo A, Rossi F, Acaia B, et al. Update on the current recommendations and outcomes in pregnant women with antiphospholipid syndrome. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014 Nov 10;10(11):1505–17.
66. Dao KH, Bermas BL. Systemic Lupus Erythematosus Management in Pregnancy. *Int J Womens Health*. 2022;14:199–211.
67. Suryanarayan D, Garcia D. Anti-Phospholipid Antibodies and Pregnancy. *The Hematologist*. 2014 Jul 1;11(4).
68. Radu A, Dudu SC, Ciobanu A, Peltecu G, Iancu G, Botezatu R, et al. Pregnancy Management in Women with Antiphospholipidic Syndrome. *Maedica (Bucur)*. 2019 Jun;14(2):148–60.
69. Pisetsky DS, Lipsky PE. New insights into the role of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2020 Oct 3;16(10):565–79.

70. Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, Parodi A. Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. *Autoimmune Dis.* 2014;2014:1–13.
71. Johnson SR, Aringer M. Diagnosis and Classification of Systemic Lupus Erythematosus. In: *Outcome Measures and Metrics in Systemic Lupus Erythematosus.* Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 51–66.
72. Kostopoulou M, Ugarte-Gil MF, Pons-Estel B, van Vollenhoven RF, Bertsias G. The association between lupus serology and disease outcomes: A systematic literature review to inform the treat-to-target approach in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2022 Mar 23;31(3):307–18.
73. Mohammed RHA, Mumtaz H, Sangah AB, Shaikh SS, Nasir N, Jabeen S. Pregnancy in lupus: an updated consensus to guide best practice strategies. *Egyptian Rheumatology and Rehabilitation.* 2022 Dec 27;49(1):67.
74. Gernsheimer T, James AH, Stasi R. How I treat thrombocytopenia in pregnancy. *Blood.* 2013 Jan 3;121(1):38–47.
75. Alesia Kaplan, Darrell J. Triulzi, Mark H. Yazer. Platelet transfusion [Internet]. 2021 [cited 2024 Aug 28]. Available from: <https://www.isbtweb.org/resources/educational-modules-on-clinical-use-of-blood/platelet-transfusion.html>
76. Kashiwagi H, Kuwana M, Murata M, Shimada N, Takafuta T, Yamanouchi J, et al. Reference guide for the diagnosis of adult primary immune thrombocytopenia, 2023 edition. *Int J Hematol.* 2024 Jan 13;119(1):1–13.
77. Song F, Al-Samkari H. Management of Adult Patients with Immune Thrombocytopenia (ITP): A Review on Current Guidance and Experience from Clinical Practice. *J Blood Med.* 2021;12:653–64.
78. Audia S, Mahévas M, Nivet M, Ouandji S, Ciudad M, Bonnotte B. Immune Thrombocytopenia: Recent Advances in Pathogenesis and Treatments. *Hemasphere.* 2021 Jun;5(6):e574.
79. Ou Y, Zhan Y, Zhuang X, Shao X, Xu P, Li F, et al. A bibliometric analysis of primary immune thrombocytopenia from 2011 to 2021. *Br J Haematol.* 2023 Jun 1;201(5):954–70.
80. Syed YY. Hetrombopag: First Approval. *Drugs.* 2021 Sep 6;81(13):1581–5.
81. Classification of immune system oldand-new-classification [Internet]. [cited 2024 Jun 11]. Available from: <https://present5.com/classification-of-immune-system-old-and-new-classification/>
82. Immune Thrombocytopenic Purpura - StatPearls - NCBI Bookshelf.

Faculdade de Farmácia do Porto

**Relatório de estágio do 2º ciclo de estudos conducente ao
grau de mestre em Análises Clínicas**

Juliana Gonçalves Simões

Mestrado em Análises Clínicas



Estágio realizado sob a orientação de:
Dr. Filipe Dias Ferreira Sampaio

Julho de 2024

Declaração de reprodução

É autorizada a reprodução parcial deste relatório de estágio, apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrito do interessado, que a tal se compromete.

Agradecimentos

Neste estágio, cumpre-me humildemente, prestar um agradecimento especial a todas as pessoas que sendo merecedoras da minha gratidão, tiveram um papel basilar, para a execução do mesmo.

Primeiramente, começo por dirigir as minhas palavras de sentido agradecimento ao meu orientador de estágio Dr. Filipe Sampaio por ter aceite esta função e por toda ajuda que me deu para a realização deste relatório.

Não posso, de forma alguma, deixar de agradecer de maneira muito especial ao Dr. Augusto Silva, diretor técnico do laboratório INNO, por todas as dúvidas que me retirou, e pela forma entusiástica com que explica as minhas dúvidas.

Agradeço também às restantes médicas veterinárias, Dra. Margarida Boto e Dra. Joana Cristóstomo, que também tanto me ajudaram na realização deste relatório.

Mas quero agradecer, principalmente aos técnicos, que são um modelo exímio de profissionalismo, pela sua disponibilidade distinta, peculiar paciência e compreensão mostradas desde sempre mediante as dúvidas por mim apresentadas, a minha disponibilidade horária, entre outros.

Agradeço de forma especial à Técnica Diana Freitas, que sempre agilizou a minha disponibilidade horária com a compatibilidade do laboratório, e no último mês à Técnica Inês Barros.

Mas o meu maior agradecimento, é para a Técnica Filipa Pinto, que além de profissional neste laboratório, é amiga de longa data, e foi nela que me apoiei nos dias de maior desalento, e também foi por ela o primeiro contacto com o laboratório INNO.

Neste laboratório, toda a equipa, desde administrativos a estafetas, técnicos a médicos veterinários, estão de parabéns, pelo empenho diário que demonstram, e pelo bom ambiente que criam.

Não poderia estar mais feliz pela minha escolha quanto ao local de estágio, por isso
OBRIGADO LABORATÓRIO INNO!

Resumo

O presente relatório refere-se ao estágio realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. No estágio de 450 horas, foram abordadas as valências de bioquímica, imunologia, hematologia, endocrinologia e microbiologia no Laboratório de análises veterinárias INNO, sob a orientação do Dr. Filipe Sampaio.

Este relatório descreve de uma forma sucinta as atividades realizadas no laboratório como o controlo de qualidade, os parâmetros analíticos avaliados, equipamentos utilizados, fundamento dos métodos e interpretação dos resultados relativamente a cada valência.

Palavras-chave: Bioquímica; Imunologia; Hematologia; Microbiologia; endocrinologia.

Abstract

This report refers to the internship carried out under the Master's Degree in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy of the University of Porto. During the 450-hour internship, the areas of biochemistry, immunology, hematology, endocrinology, and microbiology were addressed at the INNO Veterinary Analysis Laboratory, under the guidance of Dr. Filipe Sampaio.

This report provides a brief description of the activities performed in the laboratory, such as quality control, evaluated analytical parameters, used equipment, method principles, and interpretation of results for each area.

Keywords: Biochemistry; Immunology; Hematology; Microbiology; Endocrinology.

Índice

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract	4
Índice de ilustrações	7
Lista de abreviaturas e símbolos.....	10
Introdução.....	12
Laboratório Veterinário INNO.....	14
Receção de Amostras.....	15
Procedimento interno de controlo e manutenção dos aparelhos.....	17
Manutenção Semanal.....	17
Manutenção diária.....	17
Hematologia.....	20
Hemogramas ou CBC	21
Leucograma.....	22
Eritrograma.....	23
Plaquetas.....	23
Estudos de efusão	28
Valores de referência e exemplos de resultados:.....	30
Tipificação sanguínea	32
Endocrinologia	33
Bioquímica	34
Indicadores de lesão hepática	35
Indicadores da função hepática	35
Indicadores pancreáticos	38
Indicadores renais e pancreáticos.....	38
Imunologia	39
Coagulação.....	41

Parasitologia	42
Exame Macroscópico Fecal	42
Técnica de Flutuação Fecal	42
Técnica de Baerman.....	44
Amostras de sangue total para deteção de hemoparasitas.....	45
Análise de urina	46
Microbiologia.....	50
Amostras de Urina	50
Amostras de Fezes.....	51
Amostras de Exsudados	52
Processamento de Anaeróbios	53
Amostras de Pelos, Pedacos de Pele/Crostas ou Unhas	54
Amostras de Sangue para Hemocultura	55
Resultados e interpretações:	56
Identificação Microbiana e Antibiógrama.....	57
Conclusão.....	59
Bibliografia	60

Índice de ilustrações

Figura 1- Logótipo Laboratório Veterinário INNO (www.inno.pt).....	14
Figura 2- Cabeçalho das requisições padronizadas INNO	15
Figura 3- Cobas c 501 module (roche.com)	18
Figura 4- IMMULITE 2000 - Siemens Healthineers Portugal (siemens-healthineers.com)	19
Figura 5- XT-2000-Hematology-Analyzer (sysmex.com)	19
Figura 6- CA-560-Hemostasis-Analyzer (sysmex.com).....	20
Figura 7- MINICAP FLEX-PIERCING Sebia PT.....	20
Figura 8- Técnica de esfregaço (vidrariadelaboratorio.com.br).....	21
Figura 9- Colorador automático- RAL STAINER (biomerieux.it)	21
Figura 10- Escala de leitura de Microhematócrito	24
Figura 11- Câmara de Neubauer, representação esquemática: L - leucócitos; E- eritrócitos.(13)	25
Figura 12- Lâmina com amostra de sangue de papagaio cinzento, coloração de Romanowsky, 100X . A- Eritrócitos; B- Neutrófilo (na seta a vermelho); C- Trombócitos (nas setas a vermelho)	26
Figura 13- Eosinófilos de diferentes espécies, coloração de Romanowsky, 100X. A- Eosinófilo de cavalo (seta vermelha); B- Eosinófilos cão (seta verde), basófilos cão (seta vermelha)..	27
Figura 14- Bacilos (considerado contaminação da amostra), coloração de Romanowsky, 100X. A- Bacilos (seta vermelha); B- Bacilos a serem fagocitados por um neutrófilo (seta vermelha)	27
Figura 15- Coloração de Romanowsky, 100X A- Plaquetas granulares em gatos (nestes casos vêm o valor das plaquetas óticas por ser mais fiável) (seta vermelha); B- Corpos de Holly-Jolly (seta vermelha).....	27
Figura 16- Leucemias, coloração de Romanowsky, 100X. A- Aspeto de uma possível leucemia monocítica (a confirmar por biologia molecular); B- Aspeto de uma possível leucemia linfocítica num cão (a confirmar por biologia molecular).....	28
Figura 17- A- Valores de referência de um hemograma para caninos (seta amarela); B- Valores de referência no felino (seta amarela).....	30
Figura 18- Exemplo de relatório de avaliação de esfregaço sanguíneo para um papagaio cinzento (<i>Psittacus erithacus</i>)	30
Figura 19- Hemograma de Chimpanzé-comum (<i>Pan troglodytes</i>).....	31
Figura 20- Estudo de efusão abdominal de um felídeo (exemplo de resultado)	31
Figura 21- Representação de um sangue canino DEA 1.1 positivo (cartão verde) e de um sangue felino do tipo B (cartão vermelho). Estes kits rápidos permitem testar apenas o tipo DEA 1.1, o mais comum em cães, e os tipos A, B e AB em gatos.	32
Figura 22- Eletroforese de proteínas séricas normais(33)	36
Figura 23- Ciclo da ureia- freepik.com	37
Figura 24- Metabolismo da glicose- commons.wikimedia.org	37

Figura 25- A- Preparação do material necessário pra a técnica de flutuação fecal; B- Colocação da amostra de fezes na compressa com ajuda da vareta; C- Colocação da lamela, onde fica a repousar por 20 a 30 minutos; D- Gota de lugol colocada em todas as lâminas, para de seguida colocar a respetiva lamela correspondente.	43
Figura 26- Técnica de flutuação, 40X, A- <i>Cytoisospora</i> spp. Nas fezes de um gato (seta vermelha); B- <i>Eimeria</i> spp. nas fezes de um coelho (seta vermelha).....	43
Figura 27- Técnica de Baermann- www.rvc.ac.uk	44
Figura 28- Coloração de Romanowsky, 100X A- Amastigotas da <i>Leishmania</i> spp.; B- <i>Babesia</i> spp.; C- <i>Hepatozoon canis</i> ; D- <i>Leucocytozoon</i> spp.; E- <i>Anaplasma platys</i> ; F- Microfilárias.	45
Figura 29- A- Equipamento de Análise de Urina Siemens Clinitek Status®, B- Tiras Reagentes Multistix 10 SG, C- Refratómetro.	48
Figura 30- Urina, 40X A- Cristais de uratos de amónia (setas vermelhas); B- Bacilos na urina (setas vermelhas); C- Células epiteliais e eritrócitos; D- Urólitos de estruvita e eritrócitos (setas vermelhas).	49
Figura 31- A- <i>Enterococcus faecalis</i> ; B- <i>Proteus</i> ; C- <i>Escherichia coli</i>	51
Figura 32- Sementeira por método de esgotamento	53
Figura 33- A- Frasco de anaerobiose, a chama da vela queima até extinguir o O ₂ presente no frasco adaptado de (57); B- Frascos utilizados no INNO.	54
Figura 34- Sementeira de amostras de pelos, agar Dermatophyte.....	54
Figura 35- Lâminas de fita cola com Lactophenol cotton blue stain, 40X. A e B- <i>Cladosporium</i> spp; C- <i>Malassezia</i> ; D- <i>Beauveria</i> spp; E- <i>Microsporum canis</i> ; F- <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	55
Figura 36- Exemplo de frascos de hemoculturas utilizados na INNO-Sistema de Hemocultivo - Bioartis SRL v2.....	56
Figura 37- Previcolor Biomerieux-bioMérieux Portugal Pioneering diagnostics (biomerieux.pt)	57
Figura 38- VITEK® 2 Compact e Cartas de Identificação VITEK® 2 ID Cards-bioMérieux Portugal Pioneering diagnostics (biomerieux.pt).....	57

Índice de Tabelas

Tabela 1- Material para colheita de amostras.....	14
Tabela 2- Procedimento mediante valor de WBC.....	26
Tabela 3- Kits para deteção de Anticorpos (Atc), Antígenos (Ag) e microrganismos, utilizados no laboratório veterinário INNO(1,2).....	36

Lista de abreviaturas e símbolos

ACTH-	Hormona adrenocorticoide
Ag-	Antigénio
ALT-	Alanina aminotransferase
AST-	Aspartato aminotransferase
Atc-	Anticorpo
ATPase-	Adenosina trifosfatase
BM-	Biologia molecular
CAMV-	Centro de atendimento médico veterinário
CBC-	Complete blood count (Contagem de sangue total)
CDV-	Morbilivírus
CFAS-	Calibrator for automated systems (Calibrador de sistemas automáticos)
CNA-	Agar sólido Columbia + 5% sheep blood (sangue de ovelha)
COS-	Agar sólido Columbia + 5% sheep blood (sangue de ovelha)
DEA-	Dog erythrocyte antigen (Antigénio eritrocitário do cão)
DRC-	Doença renal crónica
EDTA-	Ácido etilenodiaminotetracético
ESP-	Esfregaço de sangue periférico
FA-	Fosfatase alcalina
FeLV-	Leucemia viral felina
Hct-	Hematócrito
ISE-	Ion selective electrode (elétrodo seletivo de iões)
K-	Potássio
LDH-	Lactato desidrogenase
MCK-	Agar Sólido MacConkey
Na-	Sódio
NaOH-	Hidróxido de sódio
PCR-	Protein chain reaction (Reação em cadeia de proteínas)
PIF-	Peritonite infecciosa felina
PLI-	Pancreas specific lípase (Lipase específica do pâncreas)
PRC-	Percentagem de reticulócitos corrigida
PUC-	Proteins in urine (Proteínas na urina)
Ret-	Reticulócitos
RPM-	Rotações por minuto
SCS-	Schaedler Agar + 5% Sheep Blood
SDMA-	Symmetric dimethylarginine (Dimetilarginina simétrica)

T3 total- Triiodotironina total

T4 livre- Tiroxina livre

TFG- Taxa de filtração glomerular

TK9- Tirosina cinase 9

TLI- Tripsina imunoreactiva

TP- Tempo de protrombina

TSH- Hormona estimulante da tiroide.

TPPA- Tempo de tromboplastina parcialmente ativada

UIBC- Capacidade de ligação do ferro insaturado

WBC- White blood cells (Células brancas sanguíneas)

Introdução

O estágio curricular é parte integrante do plano de estudos do curso de Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia do Porto.

Este estágio teve como principais objetivos:

1. Colocar em prática os conhecimentos adquiridos ao longo do curso;
2. Desenvolver a capacidade e compreensão das técnicas de rotina realizadas num laboratório veterinário;
3. Adquirir competências práticas que possam ser conjugadas com os conhecimentos teóricos aprendidos;
4. Aprender as técnicas e princípios básicos inerentes aos equipamentos utilizados;
5. Alargar o conhecimento prévio a nível laboratorial na área animal.

Atualmente, os exames laboratoriais desempenham um papel fundamental nos cuidados de saúde, contribuindo para um correto diagnóstico, monitorização, prognóstico e prevenção da doença tanto no ser humano, como nos restantes animais, dado que estes ocupam cada vez mais um importante lugar na sociedade. Com este aumento crescente, torna-se fundamental e imperativo o papel do médico veterinário e do diagnóstico clínico para a manutenção da saúde e bem-estar dos animais. Desta forma, os exames laboratoriais veterinários são grandes aliados no diagnóstico veterinário.

Por isso, é essencial garantir a qualidade dos resultados que dependem das atividades executadas ao longo de todo o processo analítico, que engloba 3 fases:

- Fase pré-analítica que envolve todos os procedimentos desde a solicitação da análise até ser feita a sua determinação, como exemplo disso, são a confirmação de uma correta identificação do tutor e do animal, as suas características como raça, idade, etc., visualização da presença de coágulos em amostras de Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), entre outros.
- Fase analítica corresponde à análise da amostra, envolvendo o controlo de qualidade e a validação técnica dos resultados.
- Fase pós-analítica que consiste na validação dos resultados por médicos veterinários, sendo posteriormente enviados para as respetivas clínicas/hospitais/universidades veterinárias(os).

O estágio foi realizado no Laboratório veterinário INNO, escolhido por mim, pelo seu prestígio, diferenciação e localização. O laboratório Veterinário INNO revelou ser a melhor escolha para mim e um desafio, pelo facto de se dedicar à veterinária, pois era a área das análises clínicas, com a qual nunca tinha tido nenhum contacto anterior, e por isso proporcionou-me grandes aprendizagens.

Na minha passagem pelos dois laboratórios (central e microbiologia) integrei-me na rotina dos mesmos, manuseei os equipamentos, acompanhei e ajudei na receção das amostras, realizei os controlos internos, participei no processamento das amostras e acompanhei a validação técnica dos resultados.

Tudo isto permitiu uma profunda integração no funcionamento global, organização e metodologias de um laboratório veterinário.

Laboratório Veterinário INNO

O laboratório INNO, foi fundado em 2007, com o objetivo de ser um dos melhores da área, e por isso foram feitos investimentos em pessoal técnico, equipamentos, formações, médicos veterinários, etc.

É um laboratório de referência nacional na prestação de serviços especializados para Medicina Veterinária. Ao nível da prestação de serviços, fornece o serviço de análises de rotina, nomeadamente, a hematologia, bioquímicas, análises de urina, parasitológicas, provas de coagulação, imunologia, endocrinologia, microbiologia, alergologia, citologia, histopatologia, e futuramente biologia molecular.

A recolha de amostras é feita através de estafetas e carros próprios da empresa na zona norte do país. No centro e sul do país, a empresa conta com a colaboração de empresas transportadores especializadas no transporte de amostras biológicas. Esta eficiência de recolha e entrega de amostras, permite a realização e envio de resultados de diversas análises no próprio dia da sua requisição.

O laboratório é totalmente informatizado, o que permite a disponibilização de resultados e a consulta do histórico de análises dos pacientes ou do estado do pedido, por parte do médico veterinário, em qualquer lugar.

A equipa de profissionais que constitui a equipa de trabalho do laboratório veterinário INNO é composta por médicos veterinários, técnicos de laboratório e outros profissionais responsáveis pela gestão, atendimento, recolhas, entre outros. Em conjunto, todos garantem que o lema do laboratório seja cumprido- *“Making the difference in animal care”* (Figura 1)



Figura 1- Logótipo Laboratório Veterinário INNO (www.inno.pt)

Receção de Amostras

Após a recolha e transporte das amostras biológicas, estas chegam ao laboratório prontas a serem registadas e processadas.

Todas as amostras devem vir acompanhadas por uma ficha de requisição predefinida pela empresa INNO, onde constem todas as informações necessárias à sua identificação e pedido de análises.

Esta ficha deve conter informações acerca da clínica que envia e requisita as análises, do animal do qual foram colhidas as amostras biológicas (Figura 2) e a indicação do tipo de análises que são pretendidas, assim como, localização anatómica da colheita (nomeadamente em amostras de citologia/histopatologia e de microbiologia)

A cada amostra é atribuído um número de identificação do paciente que permite aceder diretamente à sua requisição na base de dados, a qualquer momento, onde são registados todos os dados, pedidos e informações clínicas presentes na ficha de requisição, e com este sistema de rastreabilidade, permite-nos identificar o CAMV (centro de atendimento médico veterinário).

Após a abertura de todos os pedidos no sistema informático, é impressa uma lista de trabalho onde são compiladas todas as análises solicitadas para cada um dos departamentos.

Após entrada administrativa, é feita uma distribuição das amostras pelos diferentes departamentos para posterior processamento. As amostras que se destinam a análise bioquímica, coagulação e endocrinologia são centrifugadas previamente a 3500 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos. Os tubos de EDTA são homogeneizados durante 5 minutos e processados para realização de hemograma e/ou contagem de reticulócitos e avaliação de esfregaço sanguíneo.

FICHA DE REQUISIÇÃO

GERAL

Clinica veterinária: Consultório Médico Veterinário Quinta Monte dos Vendeiros
M.V. responsável: _____ Contacto: _____ Sigla: _____

ESPECIE ☒ CANINA ☐ FELINA ☐ EQUINA ☐ AVES ☐ EXÓTICOS

MATERIAL RECOLHIDO ☒ SANGUE ☐ URINA ☐ FEZES ☐ OUTROS

Nome do animal: _____ Sexo: ☐ M ☐ F
Raça: _____ Idade: _____
Tutor: _____ Microchip: _____

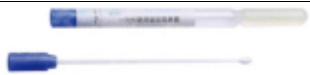
Data da Colheita: _____ Hora da Colheita: _____
Código de Identificação: _____

História Clínica * (inclui resultados do exame físico e medicação atual)

Figura 2- Cabeçalho das requisições padronizadas INNO

As amostras devem ser bem-acondicionadas nos recipientes corretos (tabela 1) e, nalguns casos, refrigeradas/congeladas. Uma das grandes dificuldades das análises laboratoriais veterinárias é o baixo volume das amostras colhidas. É por isso importante o correto acondicionamento e manuseamento das amostras de modo a não comprometer a fiabilidade dos resultados obtidos.

Tabela 1- Material para colheita de amostras

Material	Secção	Imagem
Tubo de citrato	Coagulação	
Tubo seco	Bioquímica	
Tubo de gel separador	Bioquímica	
Tubo com ativador de coagulação	Endocrinologia, imunologia, doseamento de fármacos	
Tubo de EDTA	Hematologia	
Tubo para cultura urinária (aditivado com ácido bórico)	Microbiologia	
Tubo de lítio heparina	Hematologia	
Caixa de transporte de lâminas	Esfregaços sanguíneos, citologias	
Zaragatoa com meio de cultura	Microbiologia	
Zaragatoa seca estéril	Citologia PCR (do inglês, polimerase chain reaction)	

Frasco estéril (grande) (com formol)	Histopatologia	
Frasco estéril (pequeno)	Microbiologia, parasitologia	
Frascos com meio de cultura (aeróbios + anaeróbios)	Hemoculturas	
Contentor	Transporte de tubos	

Procedimento interno de controlo e manutenção dos aparelhos.

Todos os equipamentos do laboratório têm um plano estipulado de controlos e calibrações periódicos com vista à manutenção do seu bom funcionamento e da qualidade dos resultados.

Manutenção Semanal

A manutenção semanal é, por norma, mais pormenorizada e demorada que as restantes manutenções diárias. Por esse motivo, é realizada em períodos de menor afluência de serviço de modo a garantir a realização de todos os pontos necessários sem prejuízo da dinâmica de trabalho.

Manutenção diária

Todos os dias são colocados controlos, e alguns calibradores, nos três equipamentos principais (antes de iniciarem o processamento de amostras diário), e outros procedimentos importantes para o bom funcionamento do aparelho:

- **Cobas 501** (bioquímica)

1. Verificar o volume da solução NaOH;

2. Verificar as leituras óticas da lâmpada de absorvância;
3. Calibração diária obrigatória: ionograma (soro), ISE standard Low, ISE standard High x2

No Cobas 501 (figura 3), são utilizados diferentes controlos ao longo da semana, conforme estipulado para cada dia. Os controlos incluem o multiparamétrico (sempre colocado), assim como a proteína urinária, a fructosamina, a amónia, o fenobarbital, entre outros, que são inseridos conforme surgem pedidos específicos para estas análises.

Em relação aos calibradores, diariamente são colocados os calibradores dos iões, conforme mencionado anteriormente, e outros sempre que se instala uma nova cassette de reagente. Quando a cassette é de um lote diferente do que está a bordo do equipamento, é necessária uma calibração, assim como quando a mesma expira. Exemplos disso incluem o CFAS, CFAS PUC, precimat fruct, entre outros.



Figura 3- Cobas c 501 module (roche.com)

- **Immulite 2000**

1. Diariamente são feitas as purgas do aparelho, do substrato e da água.
2. Executa-se, também, a lavagem das pipetas com a solução específica.

No Immulite 2000 (Figura 4), são realizados controlos diariamente, sendo estes diferentes ao longo da semana. Exemplos de controlos incluem o Biorad (colocado diariamente) e o controlo multiparamétrico (que abrange cortisol, digoxina, folatos, cobalaminas, progesterona, entre outros). O controlo TK9 é realizado às segundas, quartas e sextas-feiras para monitorizar TSH, T4 livre e T4 total.

Sempre que se introduz um novo lote de reagente, é necessário proceder à calibração.



Figura 4- IMMULITE 2000 - Siemens Healthineers Portugal (siemens-healthineers.com)

- **Sysmex XT-2000iV (Figura 5)**

1. Colocado controlo 1, 2 (diariamente), 3. Colocados à temperatura ambiente 20 minutos antes da utilização.



Figura 5- XT-2000-Hematology-Analyzer (sysmex.com)

- **Sysmex CA- 560 (Figura 6)**

1. Calibração e controlos deste equipamento apenas são realizados semanalmente ou sempre que é necessário mudar algum dos reagentes do equipamento.



Figura 6- CA-560-Hemostasis-Analyzer (sysmex.com)

- **Sebia Mini Cap (Figura 7)**

Ligado apenas às terças e sextas, exclusivamente utilizado para proteinogramas

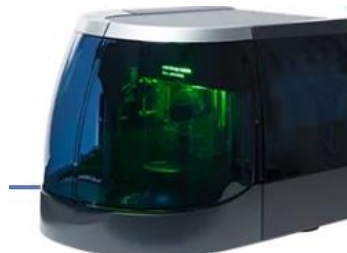


Figura 7- MINICAP FLEX-PIERCING | Sebia | PT

Hematologia

A hematologia é a ciência que estuda o sangue e os elementos figurados nele existente, como por exemplo, eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Para isso faz-se um hemograma, muitas vezes acompanhado por esfregaço de sangue periférico (ESP).

O hemograma e o ESP, constituem dois dos testes laboratoriais fundamentais na deteção, avaliação e monitorização de muitas patologias. Trata-se da ferramenta mais simples e útil disponível para todos os médicos e especialidades, pois permitem uma aproximação ao diagnóstico.(3)

Os diferentes parâmetros hematológicos avaliados poderão demonstrar pequenas alterações que podem orientar a lista de diagnósticos diferenciais dos médicos veterinários.(3)

O ESP (Figura 8) é uma análise essencial para a determinação das concentrações individuais dos tipos de leucócitos (ou seja, contagem diferencial) e para a avaliação de importantes patologias envolvendo leucócitos, eritrócitos e plaquetas (4). Sempre que é detetada alguma alteração nas linhagens hematológicas, deve proceder-se à visualização de um ESP, com coloração de Romanowsky (Figura 9), que utiliza uma mistura de eosina Y e azul de metileno modificado (também pode usar a coloração de Giemsa modificada).(5)

Técnica para a realização de um esfregaço sanguíneo:

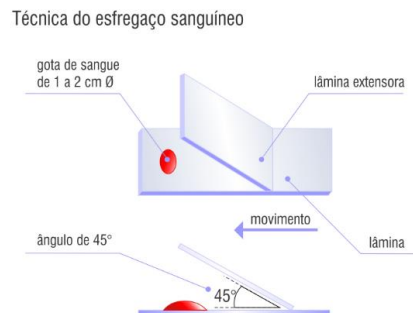


Figura 8- Técnica de esfregaço
(vidrariadelaboratorio.com.br)



- Identificar a amostra a lápis no bordo esmerilhado da lâmina
- Colocar uma gota de sangue com um capilar na zona próxima ao bordo esmerilhado da lâmina
- Usando outra lâmina extensora, colocar num ângulo de 45 graus com relação à lâmina de sangue, e deixar a gota espalhar-se.
- Arrastar a gota ao longo da lâmina, formando um esfregaço com corpo e cauda. Depois da secagem, prossegue-se com a coloração.

Figura 9- Colorador automático- RAL STAINER (biomerieux.it)

Hemogramas ou CBC

O CBC representa um meio de diagnóstico através do qual os componentes celulares sanguíneos são avaliados quantitativa e qualitativamente no seu todo, permitindo ao médico veterinário, aferir a mensuração analítica de forma automatizada de um conjunto específico de parâmetros hematológicos, de entre os quais, os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas em circulação sanguínea.(6)

É importante salientar que, na patologia clínica veterinária, os valores de referência e a morfologia das células variam de espécie para espécie e, dentro da mesma espécie, podem também diferir consoante a raça. Por isso, é essencial que as fichas de requisição sejam preenchidas de forma completa, incluindo todas as informações relevantes sobre o animal.

Este perfil hematológico possibilita a deteção de algumas anomalias nas linhas celulares eritrocitárias e leucocitárias, bem como de alterações plaquetárias associadas, muitas vezes, de patologias ao nível da medula óssea.

Para além de permitir diagnosticar condições patológicas como é o caso de anemias, leucemias, entre outras doenças sistémicas.

Esta análise pode indicar alterações sugestivas de neoplasia subjacente, de um processo inflamatório em curso, de stress, de uma reação de hipersensibilidade, bem como de uma infeção parasitária ou de origem infecciosa. Assim, constitui uma importante ferramenta de avaliação da saúde do animal.

Leucograma

Do ponto de vista funcional, os leucócitos circulantes são divididos em dois sistemas: o sistema fagocítico e o sistema imunocítico. Esses dois sistemas imunológicos são interdependentes em termos de função.

O sistema fagocítico é composto por granulócitos e pelo sistema monócito/macrófago. O sistema imunocítico inclui linfócitos circulantes T e B.

Os fagócitos, ou seja, os granulócitos e o sistema monócito/macrófago, são a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores. Eles são atraídos (quimiotaxia) e por meio do processo de fagocitose, fagocitam e destroem bactérias e outros agentes presentes.

Em contraste, o sistema imunocítico é responsável pela imunidade específica. Os linfócitos B desempenham papéis cruciais na produção de imunidade humoral através de anticorpos direcionados a antígenos específicos.(7)

No leucograma existem cinco variedades de leucócitos:

- Neutrófilos- primeira linha de defesa, atividade citotóxica antiparasitária e anti tumoral, pode causar dano tecidular (ex.: inflamação (neutrofilia), FeLV e PIF (neutropenia)).
- Linfócitos- principais na resposta imunológica do organismo (ex.: linfocitose após inoculação de vacinas, esgana (linfopenia)).
- Monócitos- segunda linha de defesa do organismo, diferenciam-se em macrófagos nos tecidos (ex.: babesiose (monocitose)).
- Eosinófilos- regulação de reações alérgicas e inflamatórias, controlo e eliminação de infestações por parasitas, principalmente aquelas que possuem fases migratórias (ex.: parasitoses (neutrofilia), corticoterapia (neutropenia)).
- Basófilos- inicia reação de hipersensibilidade imediata (ex.: dirofilária (basofilia)).(8)

Eritrograma

As principais funções dos eritrócitos são: armazenar oxigénio na superfície alveolar dos pulmões, transportar e libertar oxigénio para todas as células do corpo.(7)

A eritrocitose é definida como o aumento dos valores de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos, ultrapassando os limites normais para a espécie. Isso ocorre quando há um aumento do número de eritrócitos no sangue periférico, geralmente em resultado da diminuição do volume plasmático.(8)

Sinais clínicos:

- poliúria,
- polidipsia,
- sangramento por rutura de pequenos capilares sanguíneos
- distúrbios neurológicos devido ao aumento da viscosidade do sangue.

Classificação da eritrocitose:

1. Eritrocitose relativa
 - desidratação
 - eritrocitose por stresse (transitória)
2. Eritrocitose verdadeira com eritropoietina aumentada:
 - resposta fisiológica à altitude excessiva
 - hipoxia
 - cardiopatia congénita
 - doença pulmonar
 - doença renal
 - doença do sistema nervoso central com hipoventilação
 - hemoglobinas anormais com maior afinidade pelo oxigénio
 - medicamentos
 - entre outros.(4,7,8)

Plaquetas

As plaquetas, também conhecidas como trombócitos, são morfologicamente muito semelhantes em canídeos e felídeos, e como todas as células sanguíneas circulantes, as plaquetas originam-se na medula óssea.

As plaquetas são células pequenas, discóides e o primeiro precursor reconhecível das plaquetas é o megacarioblasto. Os megacarioblastos sofrem endomitose (divisão nuclear sem divisão citoplasmática) e formam megacariócitos. (7,9)

Quando ocorre uma lesão, o endotélio desencadeia uma série de mecanismos cuja finalidade é obstruir a lesão com tampão hemostático, inicialmente gerado pelas plaquetas e posteriormente estabilizado pelo polímero de fibrina durante o processo de coagulação.

Os mecanismos desencadeiam-se da seguinte forma:

1. adesão plaquetária ao subendotélio exposto ao dano vascular;
2. agregação plaquetária primária;
3. libertação de compostos intraplaquetários;
4. agregação secundária de novas plaquetas ao tampão hemostático;
5. consolidação e retração do coágulo;
6. formação do tampão hemostático definitivo com formação de polímero de fibrina e paragem da hemorragia.(8)

Além de pedidos de hemogramas, também chegam ao laboratório tubos de EDTA para valor de reticulócitos e ESP apenas, neste último faz-se microhematócrito (Figura 10), sempre que o médico veterinário o solicite.

O hematócrito (Hct) manual é estimado através de uma escala de medição, após realização de centrifugação da amostra de sangue em anticoagulante, contida num tubo capilar de vidro, por forma a permitir a separação do plasma dos elementos figurados do sangue.(10)

Também são enviadas lâminas já preparadas para que se faça apenas a contagem celular. As lâminas preparadas a fresco nas clínicas (quando bem feitas) preservam melhor a morfologia das células do que aquelas que são feitas a partir de amostras de EDTA que chegam ao laboratório, as quais já têm algumas horas de pós-colheita.



Figura 10- Escala de leitura de Microhematócrito

O conjunto de atividades alusivas à área da hematologia clínica, não só abrange a realização e interpretação de hemogramas, esfregaços sanguíneos, contagem plaquetária,

estudo de efusões, como também a execução de testes rápidos de tipificação sanguínea, maioritariamente, em canídeos e felídeos.

Os hemogramas mais comuns no laboratório INNO, são de animais domésticos, como felídeos e canídeos, mas também são rececionadas outras espécies, como cavalos, gorilas, chimpanzés, furões, entre outros. No caso das aves e répteis, o hemograma não pode ser feito no contador automático, uma vez que as suas células denotam particularidades peculiares quanto à morfologia dos eritrócitos, dos leucócitos e das plaquetas (ex. apresentam nucleação dos eritrócitos e das plaquetas).(11)(12) No entanto, no novo Sysmex (veterinário), é possível personalizar as definições livremente para diferentes espécies com uma atualização do sistema.

No caso dos répteis, muitas são as causas que podem causar anormalidades no hemograma como: local de punção venosa, estação, estado de hibernação, estado de cativeiro e fatores ambientais.(11) Alguns exemplos desses valores anormais no hemograma podem começar logo pela colheita, onde se faz a contenção do animal, o que lhe aumenta o nível de stress, elevando o número de heterófilos e diminuindo os linfócitos. Numa contenção química com o uso de tranquilizantes, pode ocorrer relaxamento esplénico, e conseqüentemente, haverá redução dos eritrócitos e do volume globular médio.

Nestes casos, recorre-se à execução de um hemograma manual para avaliação quantitativa do número de leucócitos e de eritrócitos por campo observados microscopicamente, utilizando a câmara de Neubauer.

A câmara de Neubauer encontra-se dividida em duas partes, as quais deverão ser preenchidas com uma porção da amostra diluída. (Figura 11)



Figura 11- Câmara de Neubauer, representação esquemática: L - leucócitos; E- eritrócitos.(13)

Para a realização deste protocolo começa-se por adicionar 5 µl da amostra de sangue total num microtubo com reagente de Natt Henrick (aproximadamente 1,5 ml – este reagente funciona como corante e permite visualizar todos os tipos celulares presentes no

sangue) e colocar no agitador durante 15 minutos. Após este tempo, encher a câmara de Neubauer, por capilaridade, com uma gota desta solução. Depois de completa, colocar a câmara na camara húmida (caixa de petri fechada com papel humedecido com água no fundo) e deixar repousar, para que as células fiquem no mesmo plano. Por fim, observar ao microscópio e fazer a contagem celular.

Contagem de leucócitos: número total de leucócitos = número de células x 1.1 x 200 ou 10 campos x 40x X200

Contagem de eritrócitos: número total de eritrócitos = número de células x 10000.

Para os reticulócitos (ret) também se faz contagem manual, quando não é possível obter o valor através do equipamento, mas em esfregaço, após se fazer a seguinte preparação:

- juntar igual quantidade de sangue e corante Novo Azul de Metileno a 0.5% num eppendorf.
- homogeneizar no agitador durante 15 minutos.
- fazer um esfregaço, a partir da solução do eppendorf e proceder à contagem de reticulócitos no esfregaço.
- devem ser contados no mínimo 1000 eritrócitos/reticulócitos.

O resultado da contagem de reticulócitos é dado em percentagem:

Ex: contagem de 20 reticulócitos em 1000 eritrócitos => 2% ret.

A proporção de reticulócitos corrigida permite avaliar o grau de anemia, relacionando o hematócrito do animal com o hematócrito da espécie:

Proporção de reticulócitos corrigida= Hct do animal x % Ret/ Htc da espécie

Imagens de exemplos visualizados (Figuras 12 a 16) em lâminas do dia e lâminas de arquivo cedidas pelo laboratório:

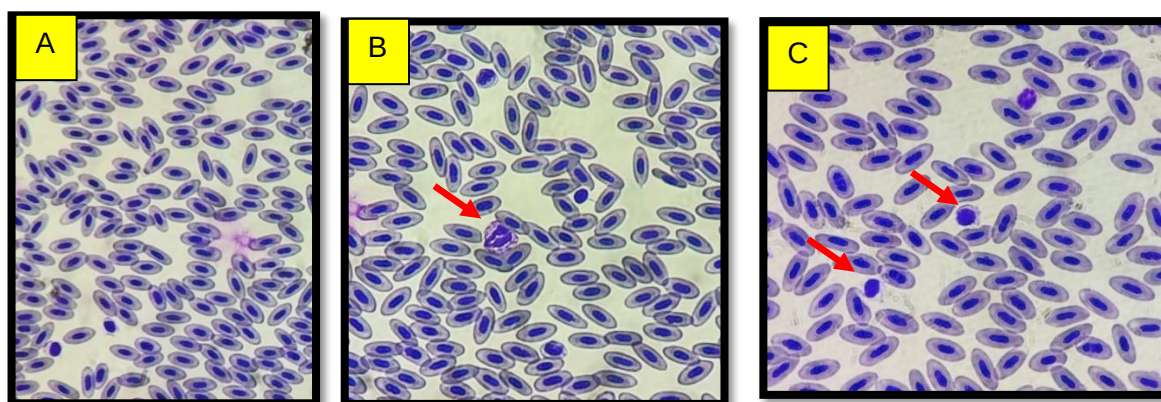


Figura 12- Lâmina com amostra de sangue de papagaio cinzento, coloração de Romanowsky, 100X . A- Eritrócitos; B- Neutrófilo (na seta a vermelho); C- Trombócitos (nas setas a vermelho)

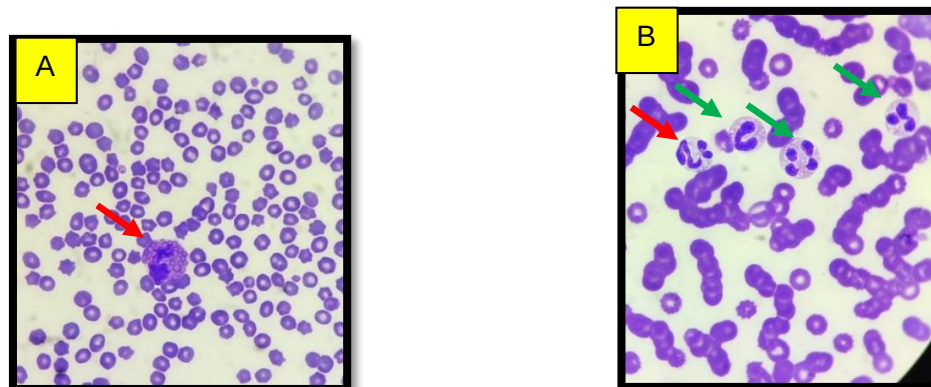


Figura 13- Eosinófilos de diferentes espécies, coloração de Romanowsky, 100X. A- Eosinófilo de cavalo (seta vermelha); B- Eosinófilos cão (seta verde), basófilos cão (seta vermelha)

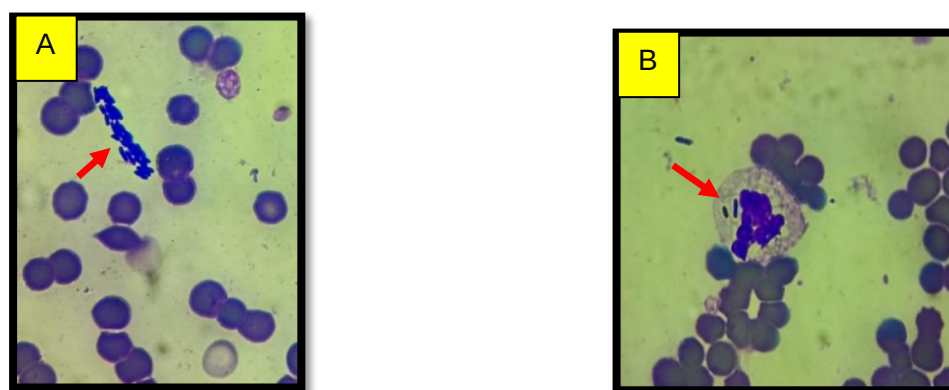


Figura 14- Bacilos (considerado contaminação da amostra), coloração de Romanowsky, 100X. A- Bacilos (seta vermelha); B- Bacilos a serem fagocitados por um neutrófilo (seta vermelha)

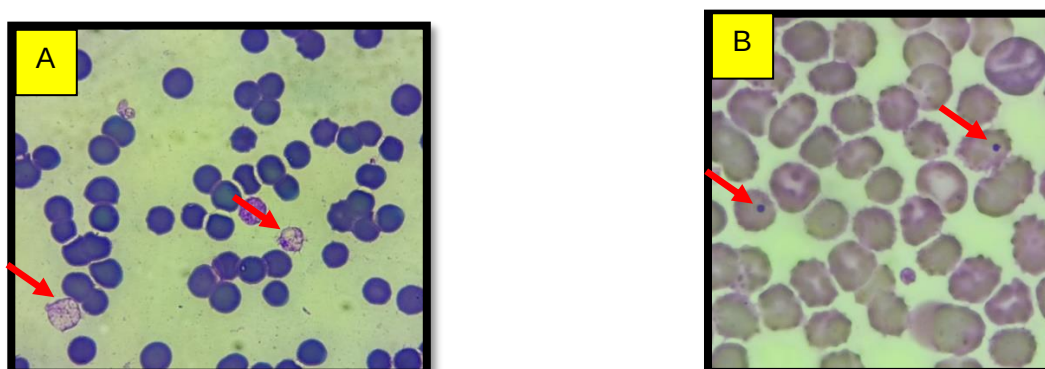


Figura 15- Coloração de Romanowsky, 100X A- Plaquetas granulares em gatos (nestes casos vêm o valor das plaquetas óticas por ser mais fiável) (seta vermelha); B- Corpos de Holly-Jolly (seta vermelha)

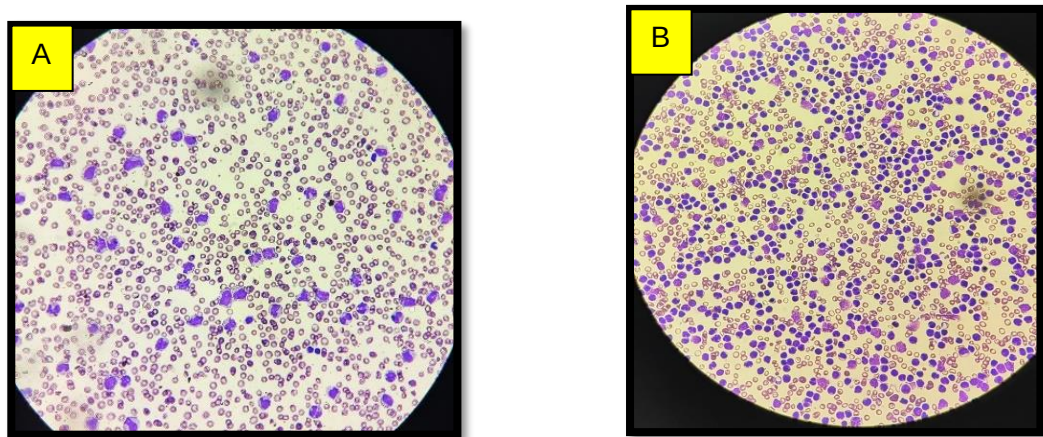


Figura 16- Leucemias, coloração de Romanowsky, 100X. A- Aspeto de uma possível leucemia monocítica (a confirmar por biologia molecular); B- Aspeto de uma possível leucemia linfocítica num cão (a confirmar por biologia molecular)

Estudos de efusão

A efusão no animal, refere-se a um acúmulo anormal de fluido em diferentes cavidades corporais, e o mecanismo fisiológico para a formação destas efusões pode variar, mas geralmente está associado a distúrbios no equilíbrio entre a produção e a absorção de fluidos nessas mesmas cavidades. Pode estar presente nas cavidades pleural, peritoneal e pericárdica, geralmente em volume inferior a 15 ml na cavidade peritoneal de cães e 3 ml na cavidade pleural de cães.

Quando esse volume aumenta, o animal apresenta derrame cavitário, que pode ser causado por uma variedade de etiologias metabólicas, inflamatórias, infecciosas e neoplásicas.(14)

Existem, portanto, diferentes tipos de efusões, e a sua composição baseia-se na composição do fluídos e na causa subjacente. Tipos mais comuns:

- Transudato (distúrbio do equilíbrio hidrostático, ex.: insuficiência cardíaca ou cirrose hepática)
- Exsudato (inflamação local com aumento da permeabilidade capilar, ex.: infeções, neoplasias ou condições autoimunes)
- Hemorrágico (contem sangue, provável lesão vascular, ex.: trauma ou doença dos vasos sanguíneos)
- Quilotórax (acumulo de linfa nas cavidades pleurais ou peritoneais (quiloteritónio)).

Procedimento (tabela2):

- Verificar em que contentores foram submetidos os líquidos efusivos, indicando na ficha de requisição se era tubo de EDTA, tubo de bioquímica ou seringa.
- Anotar na ficha de requisição as características do líquido (cor e turvação), presença de coágulo e algumas informações que possam ser importantes na avaliação do líquido.
- Efetuar a contagem celular com o tubo de EDTA no aparelho de hemogramas. (Sysmex)
- Indicar o valor total das células nucleadas.

Tabela 2- Procedimento a seguir mediante valor de WBC

WBC < 0.5 cel/ μ l	WBC <1.0 cel/ μ l	WBC >1.0 cel/ μ l
- Identificar uma lâmina com o número interno da citologia - Pipetar cerca de 0.5 ml de efusão para o sistema de citocentrifugação - Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos - Secar a lâmina durante 1 hora na estufa a 37°C - Corar a lâmina com a coloração citológica (Romanowsky)	- Identificar duas lâminas com o número interno da citologia. - Pipetar cerca de 0.5ml de efusão para um eppendorf - Centrifugar o eppendorf a 1000 rpm durante 5 minutos - Rejeitar o sobrenadante e ressuspender o sedimento. - Realizar dois esfregaços e deixar secar. - Pipetar cerca de 0.5 ml de efusão para o sistema de citocentrifugação - Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos - Secar a lâmina durante 1 hora na estufa a 37°C - Corar a lâmina com a coloração citológica	- Identificar duas lâminas com o número interno da citologia - Realizar dois esfregaços diretamente da efusão, deixar secar - Pipetar cerca de 0.5 ml de efusão para o sistema de citocentrifugação - Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos - Secar a lâmina durante 1 hora na estufa a 37°C - Corar a lâmina com a coloração citológica

Valores de referência e exemplos de resultados:

A				
Análises	Resultados / Unidades	Val. Referência	Resultados Anteriores	
HEMOGRAMA				
LEUCOGRAMA				
Leucócitos totais (WBC)	12.63 $\times 10^3/\mu\text{L}$	6.0 - 17.0	12.13	
Neutrófilos	72.30 %	60.0 - 80.0	69.00	
Linfócitos	16.10 %	12.0 - 30.0	21.30	
Monócitos	2.10 %	3.0 - 14.0	2.10	
Eosinófilos	9.40 %	2.0 - 10.0	7.50	
Basófilos	0.10 %	0.0 - 2.5	0.10	
Neutrófilos	9.14 $\times 10^3/\mu\text{L}$	3.0 - 11.8	8.37	
Linfócitos	2.03 $\times 10^3/\mu\text{L}$	1.0 - 4.8	2.58	
Monócitos	0.26 $\times 10^3/\mu\text{L}$	0.2 - 2.0	0.26	
Eosinófilos	1.19 $\times 10^3/\mu\text{L}$	0.1 - 1.3	0.91	
Basófilos	0.01 $\times 10^3/\mu\text{L}$	0.0 - 0.5	0.01	
ERITROGRAMA				
Eritrócitos totais (RBC)	7.16 $\times 10^6/\mu\text{L}$	5.50 - 8.50	7.01	
Hemoglobina	17.2 g/dL	12.0 - 18.0	15.4	
Hematócrito	50.1 %	37.0 - 55.0	46.8	
MCV	70.0 fL	60.0 - 74.0	68.8	
MCH	24.0 pg	19.5 - 24.5	23.4	
MCHC	34.3 g/dL	31.0 - 36.0	35.0	
RDW	15.3 %	12.0 - 18.0	15.6	
Plaquetas totais (PLT)	416 $\times 10^3/\mu\text{L}$	200 - 500	308	
MPV	11.2 fL	5.0 - 15.0	10.4	

B				
Análises	Resultados / Unidades	Val. Referência	Resultados Anteriores	
HEMOGRAMA				
LEUCOGRAMA				
Leucócitos totais (WBC)	25.92 $\times 10^3/\mu\text{L}$	5.5 - 19.5		
Neutrófilos	91.60 %	35.0 - 78.0		
Linfócitos	6.90 %	20.0 - 55.0		
Monócitos	0.20 %	0.0 - 14.0		
Eosinófilos	1.20 %	2.0 - 12.0		
Basófilos	0.10 %	0.0 - 2.5		
Neutrófilos	23.74 $\times 10^3/\mu\text{L}$	2.5 - 12.8		
Linfócitos	1.79 $\times 10^3/\mu\text{L}$	1.5 - 7.0		
Monócitos	0.05 $\times 10^3/\mu\text{L}$	0.0 - 1.4		
Eosinófilos	0.32 $\times 10^3/\mu\text{L}$	0.0 - 1.5		
Basófilos	0.02 $\times 10^3/\mu\text{L}$	0.0 - 0.5		
ERITROGRAMA				
Eritrócitos totais (RBC)	4.05 $\times 10^6/\mu\text{L}$	5.00 - 11.00		
Hemoglobina	6.7 g/dL	8.0 - 15.0		
Hematócrito	21.0 %	24.0 - 45.0		
MCV	51.9 fL	38.0 - 52.0		
MCH	16.5 pg	12.5 - 17.5		
MCHC	31.9 g/dL	30.0 - 37.0		
RDW	23.5 %	17.0 - 23.0		
Plaquetas totais (PLT)	69 $\times 10^3/\mu\text{L}$	150 - 500		
Considerações				
Leucocitose com neutrofilia moderada. Anemia ligeira normocítica normocrômica. Recomenda-se a realização de contagem de reticulócitos. A presença de agregados plaquetários no esfregaço sanguíneo de rotina impediu a confirmação da contagem emitida pelo equipamento automático.				

Figura 17- A- Valores de referência de um hemograma para caninos (seta amarela); B- Valores de referência no felino (seta amarela)

Hematologia		
Análises	Resultados / Unidades	Val. Referência
ESFREGAÇO		
Leucócitos		
Contagens Celulares		
- Contagem Leucocitária Total Estimada (WBC): 10.400/ μL		
Diferencial Leucocitário		
- Heterófilos: 64%		
- Linfócitos: 21%		
- Monócitos: 14%		
- Eosinófilos: 1%		
Sem alterações morfológicas assinaláveis.		
Eritrócitos	Hto=39%	
Trombócitos	Ocasionais policromatófilos	
Média de 2/campo 100x		
Presença de agregados trombocitários		
Pesquisa de hemoparasitas	Negativa, o que não exclui o diagnóstico.	

Figura 18- Exemplo de relatório de avaliação de esfregaço sanguíneo para um papagaio cinzento (*Psittacus erithacus*)

Nas aves (Figura 18), os heterófilos são leucócitos polimorfonucleares equivalentes aos neutrófilos dos mamíferos, e são essenciais para o funcionamento do sistema imunológico inato. Sob estímulo, expressam recetores de membrana responsáveis pela aderência e migração pelo endotélio vascular, dirigindo-se por quimiotaxia ao sítio de infeção. Após fagocitose, há a morte do agente infeccioso por meio de enzimas líticas e agentes oxidantes.(15)

Hematologia		
Análises	Resultados / Unidades	
HEMOGRAMA		
LEUCOGRAMA		
Leucócitos totais (WBC)	10.41	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Neutrófilos	39.70	%
Linfócitos	49.20	%
Monócitos	2.70	%
Eosinófilos	8.30	%
Basófilos	0.10	%
Neutrófilos	4.13	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Linfócitos	5.12	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Monócitos	0.28	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Eosinófilos	0.86	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Basófilos	0.01	$\times 10^3/\mu\text{L}$
ERITROGRAMA		
Eritrócitos totais (RBC)	5.04	$\times 10^6/\mu\text{L}$
Hemoglobina	12.2	g/dL
Hematócrito	36.8	%
MCV	73.0	fL
MCH	24.2	pg
MCHC	33.2	g/dL
RDW	15.4	%
Plaquetas totais (PLT)	249	$\times 10^3/\mu\text{L}$
MPV	12.8	fL

Figura 19- Hemograma de Chimpanzé-comum (*Pan troglodytes*)

Para determinadas espécies, como o caso dos Chimpanzés (Figura 19), ainda não existem valores de referência disponíveis na literatura.

Citologia	Análises	Resultados / Unidades	Val. Referência	Resultados Anteriores
Estudo da Efusão	Proteína Total	4.74	g/dL	
	Albumina	1.78	g/dL	
	Globulinas	2.96	g/dL	
	Rácio A/G	0.60		
	Contagem celular	6435	Células/ μL	
	dTCN	33.80		
	Teste de Rivalta	Positivo		
Classificação da Efusão				
Cinologia				
Observam-se neutrófilos não degenerados, macrófagos e raros linfócitos pequenos sobre um fundo granular eosinofílico proteináceo. Não se evidenciam agentes infecciosos.				
Os diagnósticos diferenciais para transudados modificados incluem PIF, tecido inflamatório crônico, neoplasia não esfoliativa, doença cardiovascular, doença hepática, hérnia diafragmática, torção pulmonar e glomerulonefrite.				
Não existem características citológicas que permitam o diagnóstico definitivo de PIF. No entanto, o diagnóstico torna-se mais provável quando as efusões classificadas como transudados modificados apresentam características inflamatórias e, além disso, conteúdos proteicos superiores a 4g/dL, rácios A/G inferiores a 0,9 e percentagens de globulinas superiores a 50%.				
Interpretação do Diferencial TCN (dTCN):				
dTCN < 1.7 - Não sugestivo de PIF				
dTCN > 1.7 - Sugestivo de PIF				

Figura 20- Estudo de efusão abdominal de um felídeo (exemplo de resultado)

No estudo das efusões são determinados os seguintes parâmetros:

- Proteína total- o seu aumento pode ser indicador de inflamação, infeção, entre outros
- Albumina- a sua diminuição pode sugerir perda de proteínas ou problemas hepáticos
- Globulinas- o seu aumento pode ser indicador de infeções ou doenças autoimunes.
- Rácio Albumina/Globulina- um valor normal deste rácio é muito importante para garantir que as funções imunológicas decorrem de forma adequada.
- TCN- contagem total de células nucleadas, avalia a presença e a quantidade de células inflamatórias ou neoplásicas no fluído.(16)
- Teste da Rivalta- auxilia o diagnóstico de PIF (peritonite infecciosa felina) em efusões de gatos.

Tipificação sanguínea

Os testes de tipificação sanguínea são normalmente usados para determinar o grupo sanguíneo de um possível recetor ou dador de sangue, permitindo proceder a transfusões sanguíneas seguras em animais que sejam compatíveis, em felídeos e canídeos.

Os tipos sanguíneos nos gatos são do sistema AB e dos tipos A, B e AB. Ao contrário dos cães, os gatos têm anticorpos naturais contra tipos sanguíneos estranhos e estes aloanticorpos são responsáveis por reações transfusionais. (8,17)

Por outro lado, nos cães, este sistema é mais complexo, o principal sistema é o DEA (do inglês, dog erythrocyte antigen), que inclui vários tipos como por exemplo: DEA 1.1, DEA 1.2, entre outros. A incompatibilidade sanguínea é menos em cães do que em gatos, mas mesmo assim, é importante, considerar durante as transfusões.

No laboratório INNO, usam-se kits de tipificação constituídos por cartões teste, onde são realizados ensaios de aglutinação, uma solução de controlo positivo (apenas no kit destinado a cães) e uma solução diluente.

Na presença de autoaglutinação é recomendada a lavagem de eritrócitos para evitar interferências nos resultados. Depois de excluída a autoaglutinação, testa-se, no cartão para cão, o controlo positivo, o qual deverá aglutinar quando misturado com o diluente no poço específico. Por fim, no último (s) poço (s) do cartão, testa-se o tipo de sangue do paciente misturando uma gota do seu sangue com uma gota de diluente.



Figura 21- Representação de um sangue canino DEA 1.1 positivo (cartão verde) e de um sangue felino do tipo B (cartão vermelho). Estes kits rápidos permitem testar apenas o tipo DEA 1.1, o mais comum em cães, e os tipos A, B e AB em gatos.

Este tipo de teste é maioritariamente utilizado para uma terapia transfusional, que utiliza componentes sanguíneos para o tratamento de doentes com problemas hematológicos e intoxicações que alteram os fatores de coagulação plasmática.(8)(18)

Endocrinologia

Como em muitas áreas da medicina veterinária, a endocrinologia clínica tem experimentado avanços significativos no conhecimento da fisiologia, fisiopatologia e diagnóstico de doenças em animais domésticos. As análises de endocrinologia veterinária têm vários propósitos: diagnosticar problemas de pele, doenças endócrinas e metabólicas, como hipotireoidismo, hiperadrenocorticismos, desequilíbrios gonadais, infertilidade, etc.(19)

O conhecimento dos fatores etiológicos e epidemiológicos envolvidos ajudará na compreensão da ocorrência e incidência das várias doenças metabólicas.(20)

As análises feitas nesta área são: hormona tiroxina T4 total, TSH, hormona tiroxina T4 livre, cortisol, folato, cobalamina, progesterona, digoxina, estradiol, TLI canina, troponina, dexametasona.

A T4 e a TSH são de grande utilidade no diagnóstico de hipotireoidismo, especialmente em canídeos. O aumento de peso, sem um aumento correspondente na ingestão calórica, é um dos primeiros sinais da condição. No entanto, o diagnóstico definitivo da doença deve ser baseado nas análises, complementadas pela anamnese e por outros exames, como cintigrafia, ecografia tiroideia, entre outros.(21)

O cortisol e ACTH são frequentemente utilizados para estudos de hipoadrenocorticismos. O hipoadrenocorticismos primário, ocorre devido à destruição bilateral da glândula adrenal, que é responsável pela maioria dos casos da doença em caninos. É tipicamente causada pela destruição imunomediada das três camadas das duas zonas corticais das adrenais. As queixas mais comuns são perda de peso, fraqueza, anorexia, vômitos, diarreia. Para um resultado melhor, faz-se o teste de estímulo com ACTH, e mede-se nos diferentes tempos.(22)

A dexametasona, juntamente com o cortisol e ACTH, serve para avaliação de hiperadrenocorticismos espontâneos, que é uma endocrinopatia que se caracteriza por um excesso de glucocorticoides endógenos, produzidos pela glândula adrenal. Para um diagnóstico mais eficiente, faz-se um teste de estimulação com ACTH e o teste de supressão com dexametasona em baixa dose.(23)

No teste de supressão à dexametasona (um corticosteroide sintético), é administrado o fármaco ao animal e, em seguida, mede-se o nível de cortisol. No teste de estimulação com ACTH, é realizada uma colheita de sangue antes e após a administração do ACTH.

O folato e a cobalamina (são vitaminas provenientes da dieta) podem usar-se para estudo de disbiose intestinal, uma vez que as bactérias produzem ácido fólico e competem com o hospedeiro pela cobalamina ingerida na dieta, logo irão ter hiperfolatemia e

hipocobalaminemia, ambas são marcadoras de doença gastrointestinal e pode ser sugestivo de disbiose intestinal. (24).

A deficiência de cobalamina em espécies de mamíferos leva a alterações na atividade de enzimas dependentes de cobalamina e acúmulo de substratos ou produtos do metabolismo.(25)

A medição dos valores séricos de progesterona, estradiol e cortisol, também podem ser usados para estudo do ciclo éstrico de um canídeo fêmea, assim como na gestação. (26) Sendo assim útil, também para os criadores, para saber qual a melhor altura para o acasalamento ou inseminação.

A TLI é um imunoensaio que determina a tripsina sérica, para estudo da insuficiência pancreática exócrina, que é uma inaptidão do pâncreas exócrino em produzir enzimas digestivas que auxiliam na digestão dos alimentos, que é causada por uma atrofia acinar das células pancreáticas. É uma doença consideravelmente comum em cães jovens entre 2 e 6 anos de idade, mas também pode acometer gatos.(27)

A PLI (do inglês, pancreas specific lipase), é um marcador sanguíneo para avaliar a função pancreática do cão, uma elevação no seu valor, pode ser indicativo de inflamação pancreática.(28)

A troponina é utilizada para avaliação de lesão cardíaca pois é considerada um biomarcador altamente específico e sensível para lesões cardíacas de mamíferos, pois logo após a lesão do músculo cardíaco, grandes quantidades da proteína são libertadas na corrente sanguínea e permanecem elevadas por até duas semanas.(29) A vigilância da digoxina é importante no tratamento de lesões cardíacas, uma vez que, além de inibir a bomba $\text{Na}^+(\text{sódio})/\text{K}^+(\text{potássio})$ -ATPase, apresenta um efeito inotrópico positivo.(30)

Bioquímica

A área da bioquímica tem vindo a crescer na patologia veterinária, pois permite ao médico veterinário obter os valores bioquímicos do soro, que fornecem informações sobre o estado clínico do animal, o balanço nutricional, situações deficitárias, a monitorização de tratamentos e prognósticos.(31) Podem ser rececionadas amostras de soro, plasma e urina (ex.: proteínas urinárias e creatinina)

Nesta área, são efetuadas várias determinações: ionograma (sódio, potássio e cloreto), colesterol, fósforo, glicose, triglicerídeos, ALT, AST, cálcio, bilirrubina total, fosfatase alcalina, ureia, amónia, índices séricos, UIBC, bilirrubina direta, ferro, lípase, ácido úrico, LDH, gama glutamil transferase, fenobarbital, albumina, proteínas totais, proteínas urinárias, creatinina, fructosamina, ácidos biliares, entre outros.

Indicadores de lesão hepática

A doença hepática é frequentemente tratável e apresenta um bom prognóstico quando o diagnóstico é feito precocemente. O fígado desempenha muitas funções complexas, refletindo-se numa variedade de perturbações associadas à doença hepática. Compreender esses desarranjos, é essencial para a interpretação precisa dos testes laboratoriais, dedicados ao estudo da condição.(32)

Para desempenhar as suas muitas funções, o hepatócito (células encontradas no fígado) produz e utiliza uma variedade de enzimas, algumas delas específicas. O aumento da atividade destas várias enzimas é usado como um indicador de integridade celular e necrose hepática (8), como a ALT, que é uma enzima hepatoespecífica em cães e gatos, mas que no caso de cavalos e ruminantes não é específica.(8) A AST também é uma enzima indicadora de danos hepatocelulares, embora seja menos específica do que a ALT, no entanto ambas são utilizadas, juntamente com outros exames de diagnóstico, para possível diagnóstico de necrose hepática, lipidose hepática, pancreatite aguda, entre outras.

A fosfatase alcalina (FA) é um indicador importante dos canais biliares, esta enzima é produzida na membrana das mitocôndrias e canalículos biliares dos hepatócitos. A semi-vida da FA é relativamente curta, nos felídeos tem uma duração de apenas seis horas e nos canídeos cerca de três dias. Numa situação de obstrução biliar, os primeiros aumentos nos níveis de FA são observados após oito horas. Em relação aos valores de referência, os resultados podem aumentar até 15 vezes.(8)

Outra enzima útil para avaliar vias biliares é a gama glutamil transferase pois é uma glicoproteína que está presente nas membranas mitocondriais e nos canalículos biliares. No cão e no gato, quando apresenta ligeiros aumentos, pode sugerir lesão hepática.

Os dois parâmetros, FA e gama GT, são de grande ajuda para diagnóstico de colestase, colelitíase, em canídeos e felídeos.

Indicadores da função hepática

As bilirrubinas são metabolitos resultantes da destruição dos eritrócitos e conferem uma coloração amarelada, geralmente associada à icterícia. A icterícia pode ser indicativa de hiperbilirrubinemia (aumento da bilirrubina) pré-hepática ou hemolítica, por excessiva destruição dos eritrócitos (ex: presença de hemoparasitas), hiperbilirrubinemia hepática devido a danos nos hepatócitos e processo de conjugação diminuído (ex: *Toxoplasma*

gondii nos gatos) e hiperbilirrubinemia pós-hepática ou obstrutiva resultante de patologias, como por exemplo, colelitíase, colecistite e neoplasias.(8)

Os ácidos biliares são o principal constituinte da bÍlis, que têm um papel muito importante na digestão dos lípidos, emulsionando as substâncias gordas presentes nos alimentos e promovendo a sua absorção no intestino.(8)

Em geral, os ácidos biliares são indicadores da função hepática, mas a sua maior utilidade diagnóstica é em casos de hepatite crónica, cirrose hepática, etc., antes do desenvolvimento de icterícia(8). Os ácidos biliares devem ser medidos durante o jejum para uma melhor avaliação da circulação enterohepática.

A avaliação das proteínas séricas e do seu padrão eletroforético (feito no equipamento Sebia Mini Cap) é um método de laboratório bem estabelecido no diagnóstico, monitorização de várias doenças e processos patológicos nos animais.

Na eletroforese de proteínas (figura 22), são avaliadas a albumina e as diferentes frações de globulinas, e quanto à interpretação dos padrões eletroforéticos das proteínas séricas, este sofre variações dependendo das diferentes espécies de animais.(33)

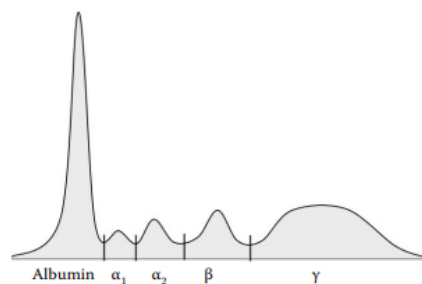


Figura 22- Eletroforese de proteínas séricas normais(33)

O estudo das proteínas totais e da eletroforese das proteínas podem ajudar no diagnóstico de doença hepática, e também para situações de imunodeficiência, mieloma múltiplo, leucemia linfática crónica, linfossarcoma, mieloma plasmático, linfoma maligno, entre outros.(33)

A albumina é uma proteína sintetizada apenas no fígado e a diminuição da sua concentração sérica pode refletir muitas doenças, como por exemplo, desnutrição, ascites, entre outras.(8)

A ureia e a amónia também são parâmetros para avaliação da função hepática, uma vez que o fígado é o único órgão que converte amónia em ureia (figura 23), logo numa disfunção hepática grave a concentração sérica de ureia diminui.(8)

Por outro lado, a amónia é uma das toxinas encefalopáticas mais importantes em doentes com doença hepática, pois quando esta não está a ser convertida em ureia acumula-se em valores tóxicos no cérebro, podendo causar encefalopatias hepáticas.

Outra patologia que pode aumentar os níveis de amónia são os desvios portossistémicos (insuficiência hepática mais comum em cães), onde existe uma conexão anormal entre a circulação portal e sistémica que desvia o fluxo sanguíneo do fígado.(34)

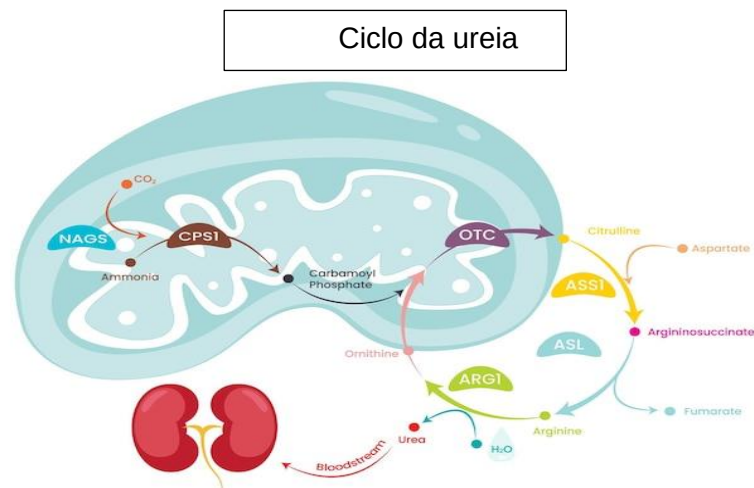


Figura 23- Ciclo da ureia- freepik.com

O fígado desempenha um papel central no metabolismo dos carboidratos (figura 24), sendo o principal órgão responsável pelo armazenamento de glicose. Ele converte a glicose em glicogénio e fornece glicose durante o jejum através da glicogenólise. Por isso, a determinação do nível de glicose nos animais é de grande importância.(32) Outro marcador utilizado é a fructosamina, uma proteína glicada que reflete os níveis de glicose das últimas 2 a 3 semanas. Este parâmetro permite distinguir entre diabetes mellitus (facilitando a sua monitorização) e hiperglicemia ou glicosúria renal induzidas pelo stress.(35)

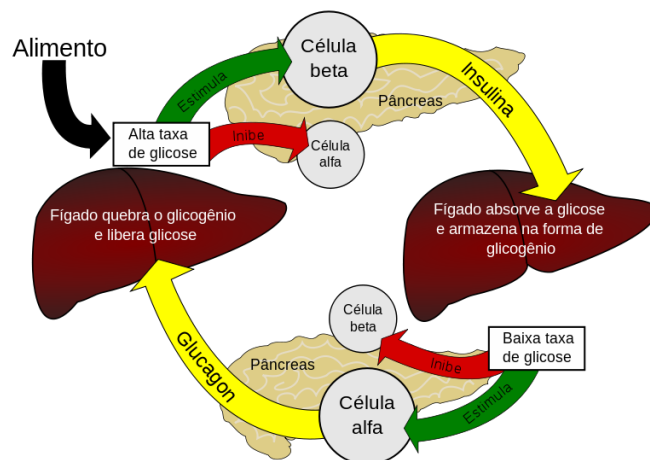


Figura 24- Metabolismo da glicose- commons.wikimedia.org

O fígado também desempenha um papel fundamental no metabolismo lipídico e dependendo da espécie, pode ser o centro da síntese de ácidos gordos e da circulação lipídica através da síntese de lipoproteínas. A acumulação de lípidos nos hepatócitos, resulta em esteatose hepática, que pode resultar em várias disfunções,(36) e para a sua avaliação usamos a determinação do parâmetro do colesterol total.

O colesterol total e os triglicerídeos estão aumentados na obstrução biliar e em qualquer forma de colestase.(8)

Indicadores pancreáticos

A ativação prematura das enzimas pancreáticas leva ao aparecimento de pancreatite, enquanto a resposta inflamatória incentiva a progressão da doença e leva a complicações sistémicas. A TLi canina é um teste de elevada especificidade porque mede a lipase pancreática sérica canina com origem em células acinares pancreáticas, sem atividade cruzada com lípases de outra origem ou proteínas relacionadas.

A amílase e a lipase não são exclusivamente produzidas pelo pâncreas, por isso, a alteração das suas atividades não é específica de alterações neste órgão, mas o seu doseamento conjunto pode ser útil na deteção de pancreatite em cães, através de aumentos mais pronunciados das suas atividades séricas.(8)

Um método muito útil para a medição da atividade da lipase sérica é o método 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-ácido glutárico-(6'-metilresorufina) éster (lipase DGGR), pois é menos moroso e menos dispendioso que o método de referência que é por ELISA (do inglês, enzyme-linked immunosorbent assay).(37)

Indicadores renais e pancreáticos

A doença renal crónica continua a ser uma das anomalias bioquímicas mais comuns diagnosticadas em gatos na prática clínica.

Alguns marcadores indiretos da taxa de filtração glomerular, como creatinina sérica e ureia, são atualmente utilizados para o diagnóstico de insuficiência renal, cada um com as suas próprias limitações. A creatinina também pode ser determinada na urina e a relação proteína/creatinina na urina, também ajuda no diagnóstico e estadiamento da DRC (doença renal crónica).

Mas nos últimos anos, foi desenvolvido um novo marcador indireto para o diagnóstico de DRC, o SDMA (do inglês, symmetric dimethylarginine) que é uma molécula estável que se origina de proteínas intracelulares que desempenham um papel importante

no metabolismo celular básico. SDMA e compostos relacionados são fornecidos pelo núcleo de todas as células, e a sua formação ocorre pela modificação pós-transcricional obrigatória e metilação de resíduos de arginina de várias proteínas e proteólise subsequente.(38)

O SDMA é eliminado principalmente pelos rins, e é um marcador da taxa de filtração glomerular que é mais sensível do que a creatinina. Por isso, permite diagnosticar precocemente a DRC tanto em cães como em gatos. Além disso, o SDMA tem a vantagem de não diminuir em gatos idosos, mesmo com a redução da massa corporal, ao contrário do que ocorre com a creatinina.

Imunologia

O corpo animal contém todos os componentes necessários para sustentar a vida; é quente, húmido e rico em nutrientes. Como resultado, os tecidos animais são extremamente propícios para microrganismos invasores oportunistas, que podem explorar esses recursos em benefício próprio.

Por outro lado, os tecidos de animais vivos e saudáveis são altamente resistentes à invasão, uma vez que a sua sobrevivência depende da prevenção da colonização microbiana.(39)

Para o diagnóstico, podem ser utilizados diversos testes imunológicos que permitem não só a deteção de antígenos (Ag) ou anticorpos (Atc) específicos de microrganismos, mas também fornecer informações sobre o animal, se já esteve em contacto com certos microrganismos ao longo da sua vida.

As principais técnicas utilizadas em pequenos animais, são os métodos de ELISA e de imunofluorescência.

O ELISA difere dos métodos clássicos, pois as interações Ag-ATC específicas são reconhecidas e as suas vantagens em relação aos métodos alternativos de serodiagnóstico incluem alta sensibilidade, rapidez, especificidade, custo e eficiência no uso de antígenos e reagentes.

O ELISA pode ser por método direto ou indireto:

- Direto: Ag em estudo, é detetado diretamente com o Atc específico
- Indireto: o ATC específico não marcado é primeiro ligado ao Ag imobilizado, então o Ag é detetado indiretamente pelo segundo Atc marcado (conjugado).(40)

Neste caso, o laboratório INNO dispõe de um conjunto de kits (tabela 3) para a deteção de diversos Ag ou Atc.

Normalmente, a dimensão de amostras correspondente a cada tipo de teste é muito variável, mas, por exemplo, o teste do kit Leiscan® é realizado praticamente todos os dias, devido à importância da leishmania em Portugal, pois este aparece esporadicamente por todo o país (segundo a Direção geral de alimentação e veterinária).

A Leishmaniose canina é uma doença parasitária causada por um protozoário do género leishmania (*L. infantum*) e transmitida pela picada de mosquitos do género phlebotomus, esta doença não se transmite diretamente de um animal doente ao homem, mas apenas pela picada do inseto.

Tabela 3- Kits para deteção de Anticorpos (Atc), Antígenos (Ag) e microrganismos, utilizados no laboratório veterinário INNO(1,2)

Kit	Pesquisa	Tipo de Amostra	Espécie
Leiscan®	Atc anti-leishmania infantum	Soro ou Plasma	Cão
FeLV Ag ELISA 96	Ag do vírus da leucemia felina (FeLV)	Soro ou Plasma	Gato
FIV ELISA 96	Atc para o vírus da imunodeficiência felina (FIV)	Soro, Plasma	Gato
FCoV Ab ELISA	Atc para o coronavírus felino	Soro, Plasma	Gato
VetLine Babesia	Atc contra babesia	Soro	Mamíferos
Ehrlichia ELISA 96	Atc contra ehrlichia canis	Soro ou Plasma	Cão
ImmunoComb® Antibody Test Kit Canine	Atc contra o parvovírus canino e o vírus da cinomose/esgana	Soro, Plasma	Cão
ImmunoComb® Feline VacciCheck	Atc contra o vírus da panleucopenia felina, herpes vírus felino e calicivírus felino	Soro, Plasma	Gato
VetLine Leptospira ELISA	Atc contra a leptospira	Soro	Cão
Distemper IgM Ab ELISA	Atc (IgM) contra o vírus da esgana	Soro ou Plasma	Cão
Distemper IgG Ab ELISA	Atc (IgG) contra o vírus da esgana	Soro ou Plasma	Cão

PetChek Heartworm Antigen Test Kit	Ag do parasita <i>Dirofilaria immitis</i>	Soro ou Plasma	Cão e gato
Toxo-Hai Fumouze®	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	Soro	Gato

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um retrovírus imunossupressor e o maior causador de morte entre as doenças infecciosas felinas. Este vírus induz o desenvolvimento de distúrbios degenerativos e/ou mieloproliferativos nos animais infetados, que acabam por sucumbir a infeções oportunistas devido à imunossupressão. A esgana canina é causada por um morbilivírus (CDV), sendo uma das doenças infecciosas mais graves do cão doméstico. O decurso da doença é rápido e a taxa de sobrevivência é baixa se o animal não for hospitalizado e sujeito a cuidados veterinários. Um programa de vacinação adequado pode prevenir a infeção a nível individual e controlar a doença numa população.(41)

Coagulação

O sistema hemostático consiste no mecanismo que conduz a uma resposta efetiva a uma lesão vascular, ao mesmo tempo que regula a fluidez do sangue nos vasos sanguíneos e a perfusão tecidual. Por isso, divide-se em duas etapas, hemostase primária e hemostase secundária.

Na hemostase primária, acontece a interação das plaquetas com as paredes do vaso lesado, onde é formado o tampão plaquetário. Ao mesmo tempo que acontecem uma série de reações na cascata de coagulação, que vai ativar outros fatores, para dissolução destes coágulos, e outros processos.

Na hemostase secundária, há formação de complexos macromoleculares de fibrina pela coagulação de proteínas na superfície do tampão plaquetário primário, e assim forma-se uma rede polimérica insolúvel no local da lesão.(42)

No INNO, faz-se o estudo do TP (tempo de protrombina), TTPA (tempo de tromboplastina parcialmente ativada) e fibrinogénio. O TP que estuda variações da via extrínseca da cascata de coagulação, e o TTPA, que estará alterado se algum fator da via intrínseca estiver alterado. O fibrinogénio está envolvido nas etapas finais da coagulação, e quando este se encontra alterado pode ser indicativo de trombose (fibrinogénio alto), ou de doença hepática grave (fibrinogénio baixo), entre outros.

Parasitologia

A parasitologia dedica-se ao estudo da taxonomia, morfologia, ciclos de vida e necessidades dos vários tipos de parasitas, bem como ao estudo das parasitoses causadas por eles, que podem por sua vez afetar também o ser humano.

No INNO fazem-se diferentes exames parasitológicos (exame macroscópico fecal, técnica de flutuação fecal, técnica de Baerman). As amostras devem vir em frascos apropriados, resistente e fechados corretamente. Podem chegar 1 ou 3 amostras, dependendo do pedido, sendo que as 3 amostras são mais fidedignas, pois há parasitas que não são excretados diariamente.

Exame Macroscópico Fecal

Antes de iniciar qualquer procedimento nas amostras fecais, estas devem sempre ser analisadas macroscopicamente e todas as características ou elementos possíveis de identificar e visualizar a olho nu, devem ser registados nas fichas de trabalho que acompanham as amostras.

Para este registo as amostras devem ser classificadas quanto à sua:

- Consistência: moldáveis, pastosas, diarreicas, etc.
- Presença de elementos anormais: muco, sangue, parasitas, ervas, objetos, linhas, papel, borracha, areias, plástico, ossos e/ou pelos).

Técnica de Flutuação Fecal

O método de flutuação é a técnica coprológica mais utilizada em medicina veterinária para identificar a presença de ovos de helmintas e nematodes, e consiste no princípio que os elementos parasitários são menos densos que a solução e irão flutuar para o topo do tubo de ensaio, onde poderão ser coletados para avaliação microscópica.(43,44)

Procedimento:

1. Colocar com a vareta uma pequena quantidade de fezes (tamanho de uma avelã) no goblet;
2. Juntar cerca 15 ml de sulfato de zinco a 45% e misturar bem as fezes com a ajuda da vareta;

3. Passar o conteúdo do goblet através da compressa aberta no funil, para reter os detritos, para o tubo de fundo cónico;
4. Completar o volume total do tubo de fundo cónico com sulfato de zinco a 45%;
5. Colocar os tubos na centrífuga e centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos;
6. Colocar os tubos num suporte e retirar as tampas;
7. Perfazer com sulfato de zinco a 45% até criar menisco convexo e colocar uma lamela em cima;
8. Deixar em repouso durante 20 a 30 minutos;
9. Identificar a lâmina com o nome e código da amostra;
10. Colocar uma gota de lugol na lâmina e de seguida colocar a lamela;
11. Fazer a observação ao microscópio

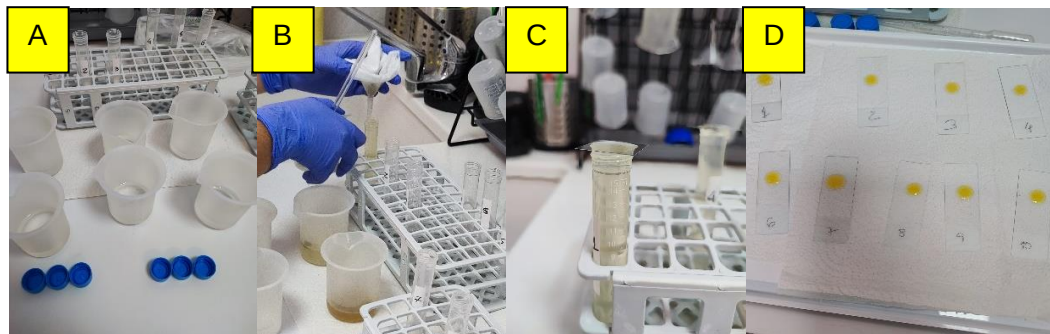


Figura 25- A- Preparação do material necessário pra a técnica de flutuação fecal; B- Colocação da amostra de fezes na compressa com ajuda da vareta; C- Colocação da lamela, onde fica a repousar por 20 a 30 minutos; D- Gota de lugol colocada em todas as lâminas, para de seguida colocar a respetiva lamela correspondente.

Imagens de exemplos visualizados em lâminas resultantes desta técnica:

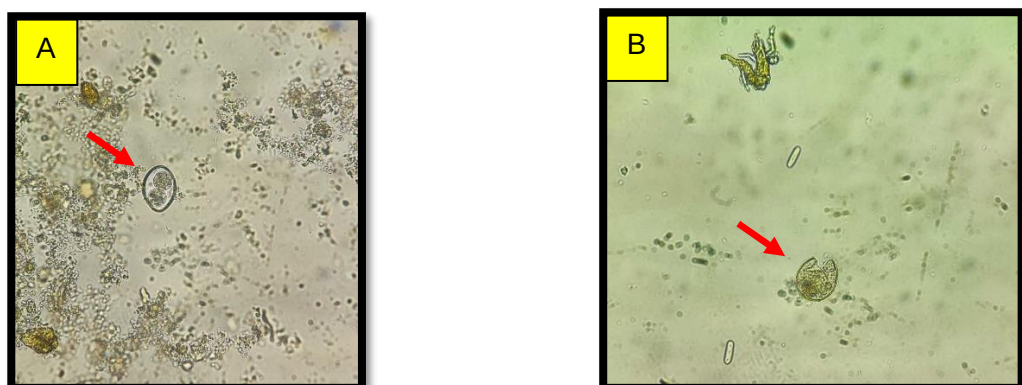


Figura 26- Técnica de flutuação, 40X, A- *Cytoisosporea* spp. Nas fezes de um gato (seta vermelha); B- *Eimeria* spp. nas fezes de um coelho (seta vermelha)

Técnica de Baerman

A técnica de Baermann é um método coprológico utilizado para isolar larvas de primeiro estágio (L1) de nematodes pulmonares a partir de amostras fecais. Devido ao seu ciclo maioritariamente respiratório, à fragilidade dos seus ovos e ao curto período entre a oviposição e a eclosão larvar, os ovos dos nemátodes pulmonares não são habitualmente detetados nos exames fecais comuns. Por esse motivo, a sua deteção deve ser realizada através desta técnica, que permite identificar larvas vivas por meio do hidrotropismo (movimento direcionado pela água).(45)

Procedimento:

1. Colocar uma quantidade de cerca de 10-15 gr de fezes no centro da gaze.
2. Com a ajuda de um elástico, embrulhar as fezes na gaze formando uma bolsa
3. Colocar a bolsa de fezes no funil
4. Colocar na ponta inferior do tubo de borracha uma ponta de micropipeta de 1 ml e clampear
5. Encher o funil com água a 37°C até ao topo do funil
6. Deixar repousar durante 8 a 24 horas, de preferência durante a noite.
7. Retirar cautelosamente o clampeador e aproveitar uma gota do líquido, que se acumulou no fundo do tubo de borracha
8. Drenar 5 ml do líquido que está no tubo de borracha para um tubo de fundo cónico.
9. Centrifugar o tubo de fundo cónico a 1500 rpm durante 5 min. Rejeitar o sobrenadante sem tocar no sedimento,
10. Ressuspender o sedimento e colocar 2 gotas na lâmina com uma lamela e observar ao microscópio (com o diafragma quase fechado) na objetiva de 4x ou 10x.



Figura 27- Técnica de Baermann- www.rvc.ac.uk

As principais parasitoses pulmonares diagnosticadas através desta técnica, em animais de companhia, são por: *Aelurostrongylus abstrusus*, *Angiostrongylus vasorum*, *Strongyloides stercoralis* e *Crenosoma vulpis*. (45)

Amostras de sangue total para detecção de hemoparasitas

Os hemoparasitas têm-se tornado um problema de importância crescente devido ao aumento da sua prevalência e distribuição nos últimos anos. Isso deve-se à maior dispersão dos vetores e dos respetivos agentes, em consequência das alterações climáticas, do aumento das viagens de animais de companhia de zonas endémicas para zonas não endémicas, e ao desenvolvimento de resistência a diversos fármacos por parte dos vetores e agentes. (46,47)

A visualização destes parasitas é avaliada na lâmina de ESP. Na figura 28, são apresentados alguns exemplos de hemoparasitas visualizados durante o estágio, incluindo amostras do dia e do arquivo do laboratório.

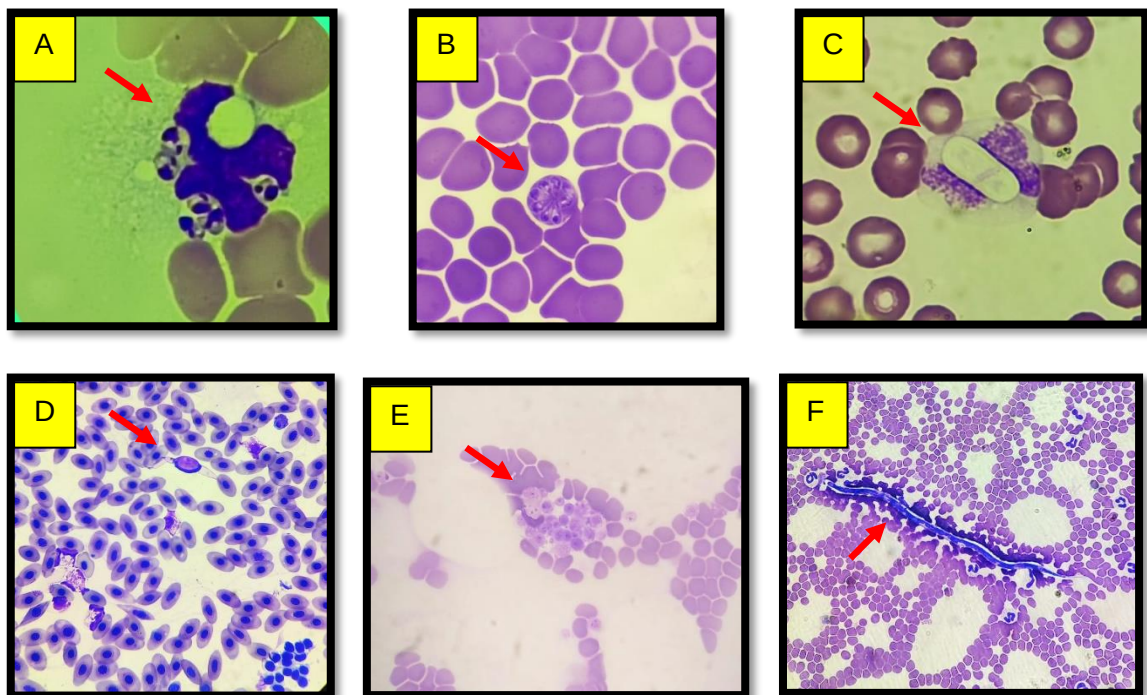


Figura 28- Coloração de Romanowsky, 100X A- Amastigotas da *Leishmania* spp.; B- *Babesia* spp.; C- *Hepatozoon canis*; D- *Leucocytozoon* spp.; E- *Anaplasma platys*; F- Microfilárias.

Para estudo das microfilárias, é possível realizar também o teste de Knott, em sangue total, com o seguinte procedimento:

- Colocar 9 ml de formol a 2% e 1 ml de sangue total num tubo de fundo cónico para provocar a lise dos eritrócitos
- Colocar o tubo de fundo cónico do agitador automático até a solução ficar translúcida
- Colocar o tubo a centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
- Rejeitar o sobrenadante.
- Homogeneizar o sedimento, e com uma pipeta de Pasteur transferir uma gota para uma lâmina devidamente identificada com os dados do animal.
- Colocar uma gota de corante azul de metileno na lâmina e homogeneizar.
- Colocar uma lamela e observar ao microscópio com a objetiva de 10x.

Sobre os hemoparasitas visualizados, pode dizer-se que a *Babesia* spp. e o *Hepatozoon* spp são protozoários, do grupo apicomplexa, amplamente transmitidos por artrópodes durante o processo de alimentação no caso da *Babesia* spp., e por ingestão de vetores infetados (artrópodes) no caso de *Hepatozoon* spp.(48)

A infeção por *Babesia* spp pode causar síndromes hemolíticas graves, mas infeções latentes também são possíveis, e sua virulência varia entre as espécies e a suscetibilidade de seus diferentes hospedeiros. A infeção por *Hepatozoon* spp às vezes é leve ou assintomática, mas também tem sido relatada doença grave.(49)

Por outro lado, *Leishmania* é um protozoário cinetoplastídeo, que infecta macrófagos e monócitos, transmitido por flebótomos, apenas nas zonas mais quentes do planeta, apesar de Portugal ter uma grande incidência deste parasita.

Embora a maioria dos animais infetados por *Leishmania* permaneça assintomática, a infeção pode ser fatal, particularmente para cães e pessoas(48)

Análise de urina

Os resultados da urinálise são influenciados pela variabilidade biológica dos animais, o método de colheita de urina, o momento da colheita de urina, a administração de agentes terapêuticos ou de diagnóstico antes da colheita, e o método de manipulação da amostra antes da análise.(50)

A urina deve ser recolhida num recipiente estéril de utilização única para evitar potenciais contaminações por resíduos de produtos de limpeza e microrganismos. Há diferentes tipos de amostra que chegam ao laboratório INNO:

- Colheita por micção espontânea, que como o próprio nome indica, consiste numa forma livre de colheita, que pode ser feita com uma seringa no local onde o animal urinou (ex.: chão) ou diretamente da caixa de areia (mais comum em gatos). Tem como vantagem a facilidade da colheita de urina quando nenhum dos outros métodos é possível realizar, mas como desvantagem tem o risco de contaminação das amostras de urina com bactérias, detritos, ou desinfetantes da superfície ou tabuleiro de onde são colhidas;
- Colheita com o método da compressão manual da bexiga, que como o próprio nome indica, consiste na compressão manual da bexiga de forma a estimular a libertação da urina. Tem como principal vantagem a obtenção de uma amostra de urina de fluxo intermédio que é o fluxo preferencial. Como principais desvantagens, tem associado o risco de trauma da bexiga devido a compressão excessiva, o risco de hematúria ou proteinúria iatrogénica, é também contraindicado em pacientes pós-operatórios de cistotomia e apresenta o mesmo risco de contaminação das amostras que a colheita de micção espontânea.
- Colheita através de cateterização ou algaliação uretral, que consiste na colheita de urina através da introdução de um cateter estéril e maleável no orifício uretral até à bexiga. Tem como vantagens o facto de não requerer que a bexiga esteja grande ou distendida para colher urina e geralmente é uma colheita realizada facilmente em cães machos sem contenção excessiva. Como desvantagens, tem o facto de as colheitas em gatos serem muito difíceis e geralmente, requerem sedação para cadelas e gatas e anestesia para gatos, tem também associado um risco de trauma na uretra e na bexiga, risco de proteinúria iatrogénica e contaminação do sedimento urinário (com eritrócitos ou células epiteliais), risco de contaminação da amostra de urina (com bactérias, detritos, entre outros), e o risco de provocar infeções no trato urinário
- Colheita por cistocentese é o método de colheita de urina preferencial, quer para urinálise, quer para urocultura, e é o mais utilizado pelos clínicos. Este método consiste na recolha de urina através de uma seringa que é inserida diretamente no abdómen do animal. Tem como principais vantagens, o facto de haver pouca ou nenhuma contaminação da amostra do trato urinário inferior, permite localizar a origem do sedimento

urinário (ureteres, bexiga ou rins), requer contenção mínima e não requer sedação, e há menor risco de infeção iatrogénica. Como desvantagens, tem o problema de requerer experiência do clínico, pois normalmente é autoguiada, requer que a bexiga esteja suficientemente distendida com urina para ser palpada e estabilizada, há risco de trauma ou laceração da bexiga (mas é muito raro), o trato intestinal e os principais vasos abdominais podem ser danificados (quando ocorre redirecionamento da agulha).

A análise de urina subdivide-se em dois tipos: Análise de urina tipo I e tipo II. A análise de urina tipo I, é conhecida como análise sumária da urina, é um procedimento laboratorial simples, com baixo custo e oferece grande quantidade de informações sobre condições gerais de saúde e patologias apresentadas pelo animal.

Numa primeira fase, é feita a avaliação macroscópica da turvação/opacidade e da cor da urina. Em seguida, mergulha-se uma tira-teste reativa na urina, que será lida pelo equipamento Siemens Clinitek Status®+ (figura 29). Este aparelho permite a leitura de tiras-teste (Clinitek Multistix 10 SG) que permitem a medição dos seguintes parâmetros presentes na urina: Glicose, Bilirrubina, Cetonas, Densidade, Sangue, pH, Proteínas, Urobilinogénio, Nitritos e Leucócitos.

Apesar de medir também a densidade, esta leitura não é fiável, e deve ser utilizado um refratómetro (figura 29) para medir o seu valor.

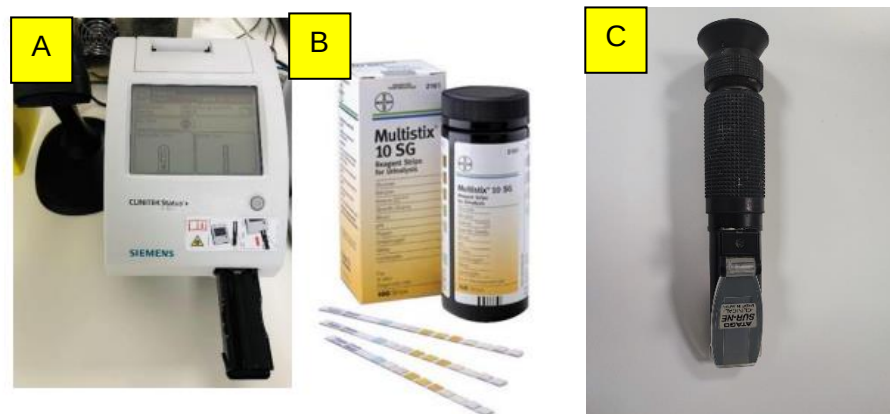


Figura 29- A- Equipamento de Análise de Urina Siemens Clinitek Status®, B- Tiras Reagentes Multistix 10 SG, C- Refratómetro.

Na análise de urina tipo II, ou sedimento urinário, avaliam-se diferentes elementos como leucócitos, eritrócitos, cilindros, etc., com diferentes utilidades diagnósticas. A análise do sedimento urinário pode ser avaliada por métodos manuais e automatizados(51). As

urinas são centrifugadas em tubos de fundo cônico, e após rejeição do sobrenadante, prossegue-se à análise microscópica do sedimento.

Imagens de algumas visualizações microscópicas de urina (figura 30):

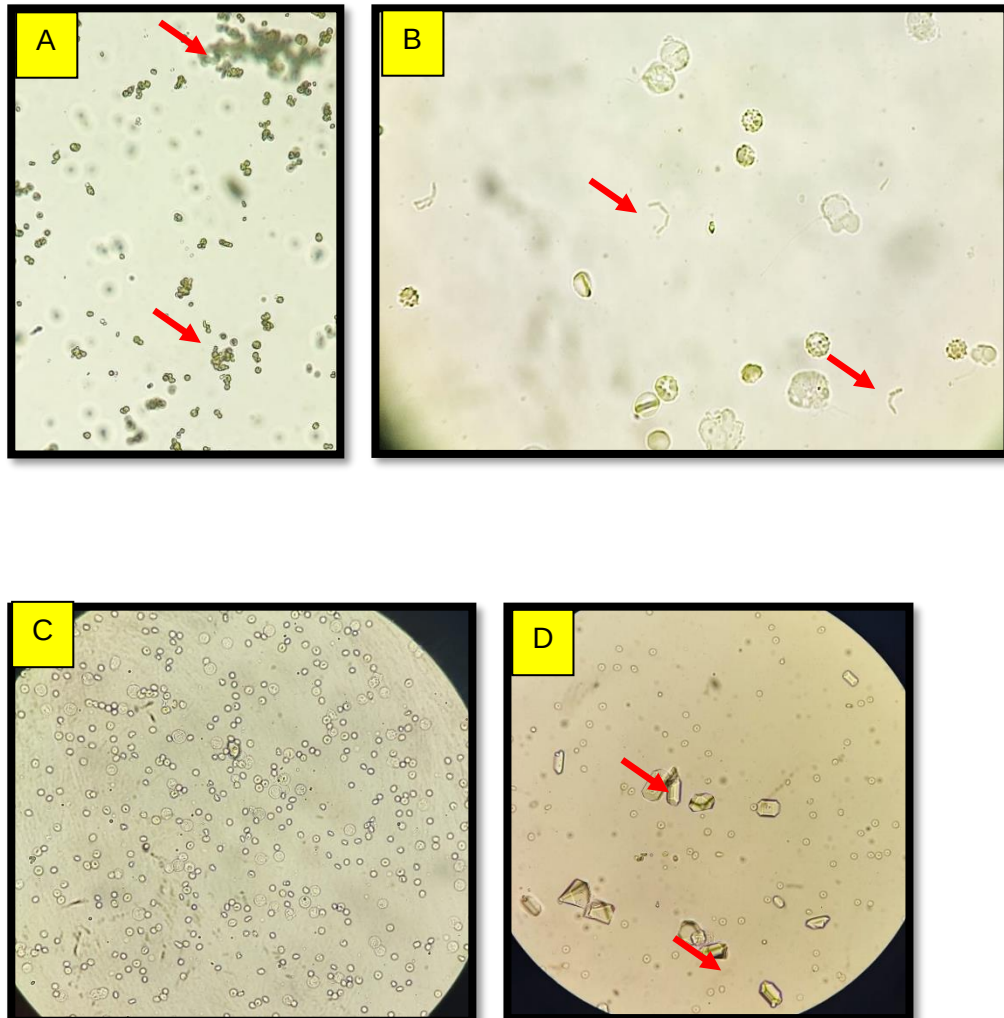


Figura 30- Urina, 40X A- Cristais de uratos de amónia (setas vermelhas); B- Bacilos na urina (setas vermelhas); C- Células epiteliais e eritrócitos; D- Urólitos de estruvita e eritrócitos (setas vermelhas).

Dentre as causas mais comuns de obstrução do trato urinário inferior está a urolitíase, que é definida como a formação de sedimento, consistindo de um ou mais cristalóides pouco solúveis no trato urinário. Os urólitos podem ser formados em qualquer órgão do trato urinário dos animais, e altas concentrações de solutos (principalmente minerais) supersaturam a urina. Esse fator, aliado à diminuição na frequência de micção, são as causas principais da formação de cristais e urólitos, e consequentemente a urolitíase.(52)

A estruvite, que é dos mais frequentes, é um composto de minerais encontrado nos urólitos de cães e gatos, sendo formada por magnésio, amónia e fosfato.

Microbiologia

A microbiologia é a área que estuda os microrganismos, entre eles os vírus, fungos, bactérias, entre outros. Estudando os mais variados aspetos dos microrganismos, como morfologia, fisiologia, genética, reprodução, taxonomia e até suas atividades e interações com outros seres e com o meio ambiente.

O principal objetivo da microbiologia é identificar os agentes microbianos individuais que causam ou estão frequentemente associados a doenças infecciosas em animais. A contribuição do laboratório de microbiologia para a identificação e caracterização destes microrganismos, bem como para a seleção de tratamentos adequados, pode ser influenciada por uma variedade de fatores relacionados tanto com a amostra quanto com o próprio laboratório.(53)

Alguns destes fatores incluem:

- Tipo e a qualidade da amostra enviada para análise
- Estado de desenvolvimento da doença
- Assepsia na hora da colheita
- Manuseamento e armazenamento das amostras (conservar refrigerado ou temperatura ambiente, mediante o produto)
- Preenchimento completo das informações disponibilizadas sobre o histórico do animal.

Outros fatores incluem as características (instalações e recursos) do próprio laboratório, como experiência técnica e médica.

No laboratório INNO as amostras são inseridas e separadas para transporte. Quando chegam ao laboratório de microbiologia são conferidas as amostras pelas listagens e segue-se o seu processamento.

Amostras de Urina

As amostras de urina que chegam ao laboratório para análise microbiológica constituem a maior parte do número total de amostras processadas diariamente na Microbiologia. Este tipo de amostras devem ser colhidas, preferencialmente, pelo método

de cistocentese, uma vez que é o método que permite obter amostras com menor risco de contaminações.(53)

Para uma fiabilidade maior de resultados, estas amostras devem ser enviadas em tubos de urina ou frascos esterilizados para o efeito, e enviadas até um período de 12 horas após a colheita. Se não for possível, a amostra deve ser refrigerada e, durante o transporte, deve ser mantida à temperatura ambiente.

A sementeira deste tipo de amostra é realizada no meio Chromid® CPS® Elite, este meio é um ágar cromagénico concebido especificamente para utilização em culturas de amostras de urina que tem a capacidade de identificar diretamente *Escherichia coli* e presumivelmente identificar *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, e membros do grupo *Proteeae* (agora *Morganellaceae*). (54)

No caso das urinas, com este meio, faz-se então leitura direta de resultados, procedendo depois, quando há crescimento, para a realização do antibiograma feito no aparelho Vitek.

Alguns exemplos de possíveis resultados (figura 31):

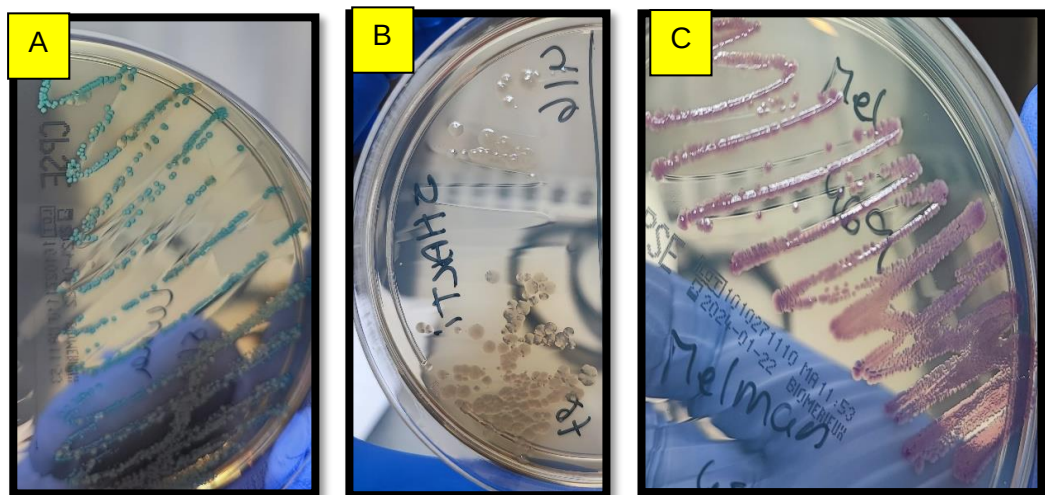


Figura 31- A- *Enterococcus faecalis*; B- *Proteus*; C- *Escherichia coli*.

Amostras de Fezes

As amostras de fezes para análise microbiológica devem ser recolhidas e analisadas o mais frescas possível, e preferencialmente num frasco estéril.

Os problemas intestinais nos animais são a causa comum para a realização deste exame por veterinários e os agentes patogénicos bacterianos entéricos, neste exame

pesquisados, são frequentemente consideradas como potenciais causadores de toxicidade aguda e doença crónica.(55)

O processamento deste tipo de amostras destina-se então à pesquisa e isolamento de agentes causadores de enterites, ou outras doenças do sistema digestivo, causadas por *Salmonella* spp., *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp, e para isso utilizam-se vários meios de cultura:

1. Agar Sólido Yersinia CIN (Novobiocina-Irgasan-Cefsulodina), meio seletivo para o isolamento de *Yersinia* spp.;
2. Agar Sólido Chrom ID® *Salmonella*, meio cromogénico para o isolamento seletivo e identificação de *Salmonella* spp;
3. Hektoen, isolamento seletivo de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.;
4. Agar Sólido Gelose *Campylo*sel, meio seletivo para o isolamento de *Campylobacter* spp. (colocado em microaerobiose a 37° C)

Ao mesmo tempo que se semeia o produto nestes quatro meios, também se realiza uma lâmina do produto para Gram, onde procuramos cocos, bacilos, etc. Se, ao fim de 24 horas não houver crescimento, volta-se a incubar por mais 24 horas, e depois procede-se à leitura das placas. Se houver crescimento, faz-se nova lâmina para Gram, mas a partir de uma das colónias.

Amostras de Exsudados

Estas amostras que chegam diariamente à microbiologia representam uma porção significativa do volume total das amostras processadas nesta área. Este tipo de amostra pode ser colhida em diversas partes do corpo do animal, o que significa que diferentes tipos de exsudados podem chegar ao laboratório: auriculares, oculares, abscessos, pele, entre outros. Para o envio dessas amostras, muitas vezes são utilizados tubos com meio de transporte Amies, o que permite a preservação de microrganismos que possam estar presentes na amostra até a inoculação.

O exsudado mais frequente é o auricular, já que as otites são bastante presentes, principalmente no cão, e os principais agentes causadores são a levedura *Malassezia* e a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.(56)

De forma a isolar o(s) agente(s) patogénico(s) presente(s) nas amostras provenientes de exsudados, normalmente, são realizadas sementeiras em três tipos de meio:

1. Agar Sólido MacConkey (MCK) – permite o isolamento seletivo de bactérias gram-Negativo como *Enterobacteriaceae* spp.;

2. CNA- (Agar sólido Columbia + 5% sheep blood)- permite o isolamento seletivo de gram-positivos;
3. COS- (Agar sólido Columbia + 5% sheep blood)

Estes dois últimos permitem o isolamento seletivo de bactérias fastidiosas e a deteção de hemólise, embora o CNA seja ligeiramente mais seletivo que o COS.

Nestas amostras, também pode ser feito a pesquisa de leveduras, quando assim é pedido, e para isso semeia-se por técnica de esgotamento no meio CAN2/SGC2 (Chromid® Candida/Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 agar), que é um meio cromogénico para isolamento seletivo de leveduras e para identificação direta de *Candida albicans*, serve para isolamento seletivo de leveduras e bolores.-[bioMérieux - Culture Media | product - CHROMID® Candida / Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 agar \(biomerieux-culturemedia.com\)](http://bioMérieux-CultureMedia-product-CHROMID%C3%A0-Candida-Sabouraud-Gentamicin-Chloramphenicol-2-agar)

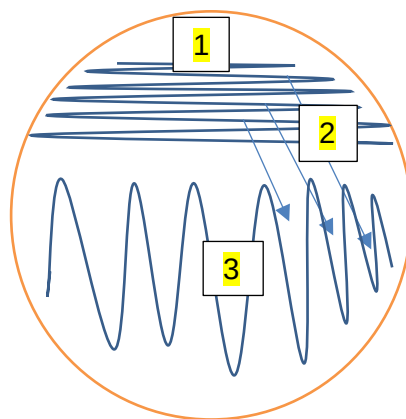


Figura 32- Sementeira por método de esgotamento

Processamento de Anaeróbios

Nas amostras de exsudados para a pesquisa e identificação de microrganismos anaeróbios, utilizamos o meio de cultura SCS (Schaedler Agar + 5% Sheep Blood), que é um meio altamente nutritivo, seletivo para anaeróbios estritos Gram-negativos.

Posteriormente, as placas são colocadas na jarra de anaerobiose com a técnica da vela acesa, para esgotar o oxigénio (O₂) (figura 33).

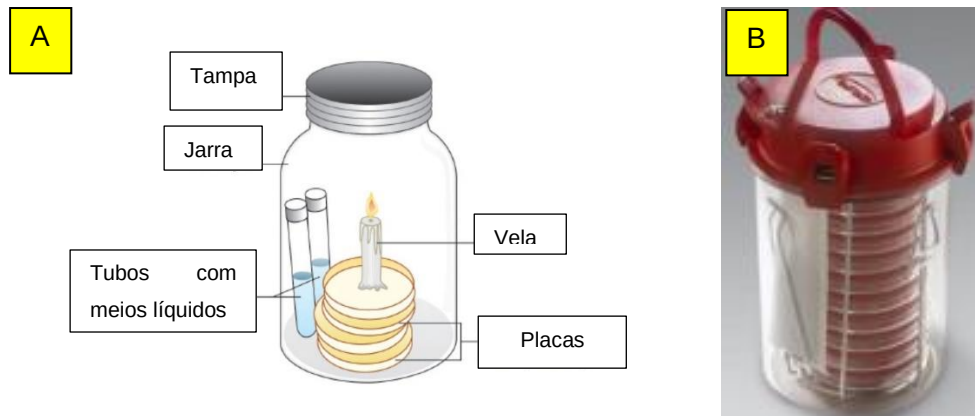


Figura 33- A- Frasco de anaerobiose, a chama da vela queima até extinguir o O₂ presente no frasco adaptado de (57); B- Frascos utilizados no INNO.

Amostras de Pelos, Pedacos de Pele/Crostras ou Unhas

Apesar da amostra ser superficial, deve tentar-se manter a zona de colheita o mais estéril possível. Quando a amostra chega ao laboratório, é semeada em agar sólido Dermatophyte com uma pinça estéril. De seguida incubar em atmosfera de aerobiose a 25°C e faz-se o registo semanal das alterações da cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura.



Figura 34-Sementeira de amostras de pelos, agar Dermatophyte

Quanto aos resultados, a interpretação é feita da seguinte forma:

- Ao fim de 4 semanas se não houver crescimento de colónias na placa indicar resultado negativo.
- Quando existir crescimento de colónias na placa:
 1. Descrever cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura.
 2. Colocar um pedaço de fita transparente na superfície da colónia com o auxílio de uma pinça e fazer alguma pressão para as estruturas aderirem à superfície da fita cola.
 3. Colar a fita cola na superfície de uma lâmina, à qual foi adicionada uma gota de Lactophenol cotton blue stain.
 4. Observar a lâmina ao microscópio.

Resultados de lâminas observadas (figura 35):

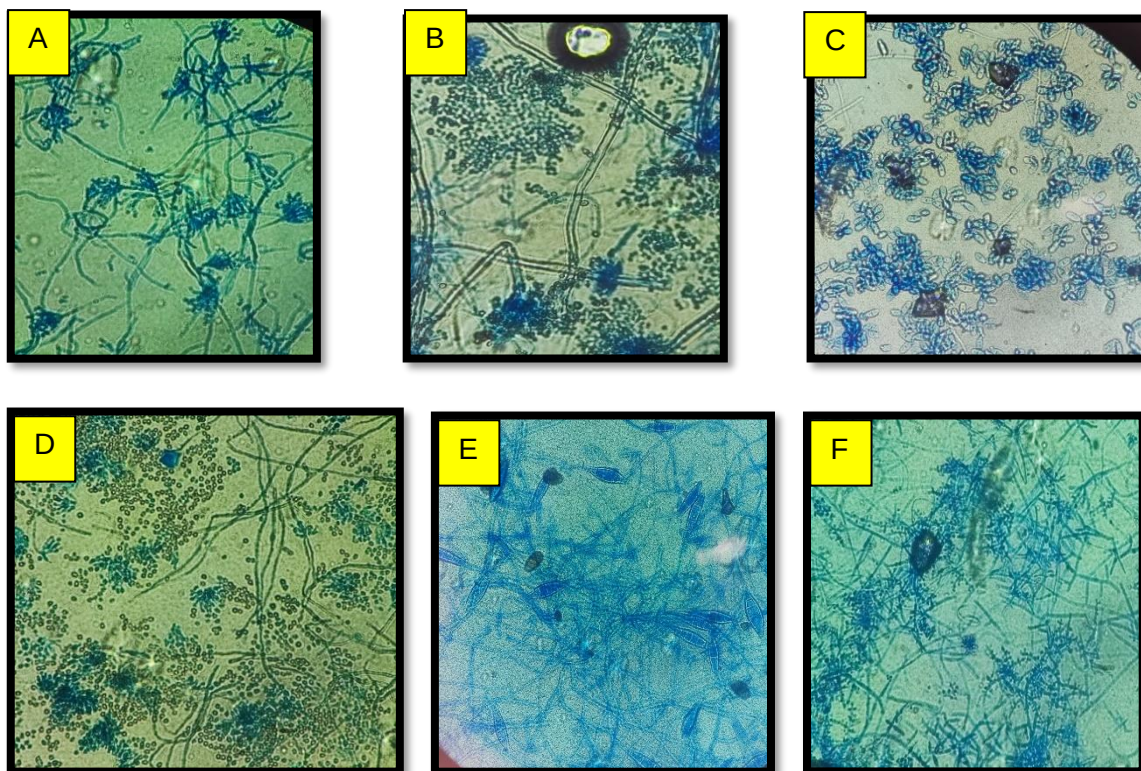


Figura 35- Lâminas de fita cola com Lactophenol cotton blue stain, 40X. A e B- *Aspergillus* spp; C- *Malassezia*; D- *Beauveria* spp; E- *Microsporum canis*; F- *Trichophyton mentagrophytes*

Amostras de Sangue para Hemocultura

As hemoculturas devem ser solicitadas sempre que existe a suspeita de uma de uma septicemia, e deve ser colhida idealmente nos picos de febre para os frascos com meio para hemocultura (Oxoid SIGNAL Blood Culture System). Os frascos de hemocultura têm um meio nutritivo para todo o tipo de microrganismos, nomeadamente aeróbios, anaeróbios e microaerófilos.



**Figura 36- Exemplo de frascos de hemoculturas utilizados na INNO-[Sistema de Hemocultivo](#)
- Bioartis SRL v2**

Depois de inserir o sangue venoso no frasco, o dispositivo indicador é ativado e quando o crescimento microbiano começa, existe a produção de gases (resultado da atividade bacteriana), criando pressão no interior do frasco. Esta pressão empurra parte da mistura do caldo de sangue através da agulha para o sistema indicador. Na figura 36 podemos observar uma amostra negativa à esquerda e uma positiva à direita.

Quando a amostra é positiva, procedemos à sementeira nos meios de COS, CNA, MCK e SCS pelo método de espalhamento.

Resultados e interpretações:

Após as sementeiras feitas, e decorridos os tempos específicos das incubações é feita leitura visual das placas, onde se decide o seu seguimento e regista-se na folha de trabalho, como por exemplo a contagem de colónias.

Multiplicando o grau de diluição da solução do meio pelo número de colónias observáveis, obtém-se o valor de UFC/mL (a sigla UFC corresponde à unidade utilizada em microbiologia para quantificar o número de microrganismos presentes numa determinada solução ou placa com meio de cultura, que se determina como unidades formadoras de colónias). Assim sendo, os valores estipulados pela equipa técnica do laboratório de microbiologia são:

- 1 a 9 colónias – 10^3 UFC/ml
- 10 a 99 colónias – 10^4 UFC/ml
- Mais de 100 colónias – 10^5 UFC/ml

Posteriormente realiza-se a identificação dos microrganismos presentes nas colónias, através do Gram realizado a partir das colónias, e de posterior identificação no Vitek.

As lâminas são coradas pela coloração de Gram num colorador automático, como se vê na figura 37.



Figura 37- Previcolor Biomerieux-[bioMérieux Portugal | Pioneering diagnostics \(biomerieux.pt\)](http://bioMérieux_Portugal_|_Pioneering_diagnostics_(biomerieux.pt))

Identificação Microbiana e Antibiógrama

O Laboratório de microbiologia dispõe de um equipamento que permite realizar a identificação de bactérias e leveduras de forma automatizada e também determinar a sua sensibilidade a antibióticos (AST), o VITEK® 2 Compact.



Figura 38- VITEK® 2 Compact e Cartas de Identificação VITEK® 2 ID Cards-[bioMérieux Portugal | Pioneering diagnostics \(biomerieux.pt\)](http://bioMérieux_Portugal_|_Pioneering_diagnostics_(biomerieux.pt)).

Deste modo, este equipamento permite não só o refinamento do sucesso terapêutico, como também da emissão de resultados por parte do laboratório de forma mais rápida e eficiente.

Após visualização das lâminas e das placas, e verificação de que se tratam de cocos ou bacilos, leveduras, Gram-positivos ou Gram-negativos, decide-se a carta do Vitek a utilizar.

Procedimento do Vitek:

- Transfere-se 3 ml de solução salina estéril (0,45% NaCl, pH 5) para um tubo de polistireno

- Com auxílio de uma zaragatoa estéril, recolhe-se um número suficiente de colónias de uma cultura pura e suspende-se na solução salina de forma a obter a densidade desejada.
- Esta densidade é numerada de acordo com a escala de McFarland (escala de turbidez), com o equipamento DensiChek™ e varia consoante o tipo de microrganismo presente na amostra.
- Para preparar o segundo tubo com 3 ml de solução salina:
 1. Transferir 145 µl da suspensão previamente preparada no caso de bactérias Gram-negativas.
 2. Transferir 280 µl da suspensão previamente preparada no caso de bactérias Gram-positivas ou leveduras.

No final deve ter-se então dois tubos:

1. Um com uma solução menos diluída, que servirá para a identificação da espécie do microrganismo;
2. Outro com uma solução mais diluída, que servirá para a realização dos testes de sensibilidade antimicrobiana.

Em seguida, coloca-se os tubos no carrossel, acopla-se as cartas de identificação (capilar azul) e de antibiograma (capilar cinza), aos respetivos tubos e introduz-se o carrossel no equipamento.

Conclusão

A título de conclusão, posso já expor, que este estágio superou, e muito, todas as minhas expectativas. Quando optei pelo laboratório INNO, foi para poder sair da minha zona de conforto (área humana) e aprender algo novo, tendo as bases que aprendi no meu trabalho, mas também no Mestrado que me levou a esta experiência tão gratificante e enriquecedora.

As grandes diferenças que consegui apreender da área humana para a veterinária são:

- Complexidade das diferentes raças/espécies em relação a visualização de hemogramas.
- Dificuldade nas quantidades das amostras e hemólises, a quantidade é sempre diminuta e a hemólise é sempre grande, pela dificuldade da colheita, e pelo tempo do transporte.
- Grande número de hemoparasitas (atualmente é muito raro no humano).
- Métodos de ELISA totalmente manuais, devido à dificuldade dos equipamentos em processarem amostras de volumes tão reduzidos.
- Não existirem estudos comprovados para algumas espécies de animais, para obtenção de valores de referência.
- Na parte humana é tudo mais automatizado, rápido e de fácil acesso, como reagentes específicos, técnica standard, aparelhos, etc.

Toda a dinâmica do laboratório, técnicos, veterinários, administrativos, estafetas, etc., visam ao processamento mais rápido e eficiente das amostras, com rotas predefinidas e transportadoras de correios, onde as amostras chegam de todo o Portugal continental e ilhas.

Toda a equipa trabalha em conjunto de forma a garantir o melhor diagnóstico e auxiliar os médicos veterinários das várias clínicas, com as quais trabalham, na decisão do melhor tratamento do animal. Esta mesma equipa, não mede esforços para ensinar, corrigir e melhorar os estagiários que por lá passam, como pude constatar na minha própria pessoa.

Apenas desta forma, é possível cumprirem o seu compromisso primordial: fazer a diferença no cuidado e saúde animal.

Da minha parte, considero que atingi todos os meus objetivos pessoais, aos quais me tinha proposto, mas também aos objetivos deste estágio, que era colocar as aprendizagens retidas do Mestrado em prática e sentir-me envolvida numa nova rotina laboratorial diferente da que estava habituada.

Bibliografia

1. NovaTec Immundiagnostica GmbH. Leptospira.
2. Biogal Galed Labs.
3. Duarte Romero M. Manual_del_hemograma_y_el_frotis_de_sang. 2013 Jan;1.
4. Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW. Hematologia_e_Bioquimica_Clinica_Veterin.
5. Horobin RW. How Romanowsky stains work and why they remain valuable - Including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. Biotechnic and Histochemistry. 2011 Feb;86(1):36–51.
6. Rosenfeld AJ, Dial Sharon. Clinical pathology for the veterinary team. 2010 [cited 2023 Aug 25];284. Available from: https://books.google.com/books/about/Clinical_Pathology_for_the_Veterinary_Te.html?hl=pt-PT&id=v79kBItTRUoC
7. Rebar AH. Interpretación del hemograma Canino y Felino.
8. Luis •, Ochoa N. Patología clínica veterinaria FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
9. Reagan WJ, Sanders TG, Denicofa DB. HEMATOLOGÍA VETERINARIA Atlas de Especies Domésticas Comunes.
10. Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods 5th Edition PDF | Vet eBooks [Internet]. [cited 2023 Aug 22]. Available from: <https://www.vet-ebooks.com/small-animal-clinical-diagnosis-by-laboratory-methods-5th-edition/>
11. Sykes JM, Klaphake E. Reptile Hematology. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice [Internet]. 2008 Sep [cited 2023 Aug 22];11(3):481–500. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1094919408000236>
12. Nardini G, Leopardi S, Bielli M. Clinical Hematology in Reptilian Species. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice. 2013 Jan 1;16(1):1–30.
13. De D, Veterinária M, Margarida J, Isidoro B. ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA.
14. Alonso FH, Bulla C, Paes PRO. Canine cavitory effusion: A retrospective study of 304 cases in Brazil. Arq Bras Med Vet Zootec. 2019 May 1;71(3):869–77.
15. Silvia Cellone Trevelin, Tatiana de Sousa Barbosa, Valéria Maria Savoya da Silva, Paulo César Ciarlini. Metabolismo oxidativo de heterófilos de avestruzes jovens.
16. Cagle LA, Epstein SE, Owens SD, Mellema MS, Hopper K, Burton AG. Diagnostic yield of cytologic analysis of pericardial effusion in dogs. J Vet Intern Med. 2014;28(1):66–71.

17. Reagan WJ, Sanders TG, Denicola DB. Feline Focus BOOK REVIEWS Veterinary Hematology Atlas of Common Domestic Species.
18. Davidow EB, Blois SL, Goy-Thollot I, Harris L, Humm K, Musulin S, et al. Association of Veterinary Hematology and Transfusion Medicine (AVHTM) Transfusion Reaction Small Animal Consensus Statement (TRACS) Part 2: Prevention and monitoring. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2021 Mar 1;31(2):167–88.
19. Matamoros R, Gomez C, Andaur M. Hormonas de utilidade diagnóstica en Medicina Veterinaria Hormones of diagnostic value in Veterinary Medicine. Vol. 2, *Arch. Med. Vet.* XXXIV, No. 2002.
20. Veterinary Medicine 11th Edition PDF Free Download | Vet eBooks [Internet]. [cited 2023 Aug 22]. Available from: <https://www.vet-ebooks.com/veterinary-medicine-11th-edition/>
21. Pedro Almeida Seita R DE, ORIENTADOR Doutor José Henrique Duarte Correia CO-ORIENTADORA Dra Joana Vidal Pontes L, José Manuel Antunes Ferreira da Silva Vogais D, José Henrique Duarte Correia Doutora Maria Teresa da Costa Mendes Vítor Villa de Brito Dra Joana Vidal Pontes D. UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA Faculdade de Medicina Veterinária HIPOTIROIDISMO CANINO Presidente.
22. Fenner BB, Duarte K de O, Almeida LG de, Andrade É, Guidolin LL. Hipoadrenocorticismo canino. *Pubvet*. 2020 Feb;14(2):1–4.
23. Leal RO. UNIVERSIDADE DE LISBOA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA FECAL EM CÃES COM HIPERADRENOCORTICISMO ESPONTÂNEO ALEXANDRE CARVALHO GOMES ORIENTADORA: Professora Doutora MARIA CONSTANÇA MATIAS FERREIRA POMBA COORIENTADOR.
24. Duarte R. Disbiose Intestinal Canina: diagnóstico e tratamento.
25. Ruaux CG. Cobalamin in companion animals: Diagnostic marker, deficiency states and therapeutic implications. Vol. 196, *Veterinary Journal*. 2013. p. 145–52.
26. Helena Benetti A, Hélio Toniollo G, Ademir de Oliveira J. Concentrações séricas de progesterona, 17 β -estradiol e cortisol durante o final do próestro, estro e diestro gestacional em cadelas. *Ciência Rural*. 2004;34(2):471–8.
27. Gama-DF. Insuficiência pancreática exócrina em cães: Relato de caso. 2022.
28. Akol KG, Washabau RJ, Saunders HM, Hendrick MJ. Acute Pancreatitis in Cats With Hepatic Lipidosis. *J Vet Intern Med*. 1993 Jul 5;7(4):205–9.

29. Assis AR de, Godoy KC da S, Antunes TR, Braz PH, Oliveira GG de, Silva PMP da, et al. Troponina, biomarcador de injúria cardíaca, na medicina veterinária: Revisão. Pubvet. 2017 Sep;11(9):928–34.
30. Da R, Ferreira S, Horizonte B. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS EFEITOS DA OLEANDRINA, OUABAÍNA E DIGOXINA NO TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CAUSADA PELA DOXORRUBICINA. 2021;
31. González FHD, Carvalho V, Möller VA, Duarte & FR. PERFIL BIOQUÍMICO SANGUÍNEO DE CÃES E GATOS NA CIDADE DE PORTO ALEGRE, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL BLOOD BIOCHEMICAL PROFILE IN DOGS AND CATS FROM THE CITY OF PORTO ALEGRE, RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL.
32. Richter KP. Diseases of the Liver and Hepatobiliary System. In: Handbook of Small Animal Gastroenterology: Second Edition. Elsevier Inc.; 2003. p. 286–352.
33. Tothova C, Nagy O, Kovac G. Serum proteins and their diagnostic utility in veterinary medicine: A review. Vol. 61, Veterinarni Medicina. Czech Academy of Agricultural Sciences; 2016. p. 475–96.
34. Kamikawa L, Bombonato PP. Avaliação morfométrica e hemodinâmica comparativa dos vasos envolvidos no shunt portossistêmico congênito em cães. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2012 Sep;32(9):941–6.
35. Zeugswetter FK, Beer R, Schwendenwein I. Evaluation of fructosamine concentration as an index marker for glycaemic control in diabetic dogs. Veterinary Record. 2022 Jan 1;190(2):no.
36. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'H J, Siliart B, et al. Liver lipid metabolism. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2008;92(3):272–83.
37. Willard MD, Tvedten H. Small animal clinical diagnosis by laboratory methods. 418 p.
38. Grelová S, Karasová M, Tóthová C, Kisková T, Baranová D, Lukáč B, et al. Relationship between FGF 23, SDMA, Urea, Creatinine and Phosphate in Relation to Feline Chronic Kidney Disease. Animals. 2022 Sep 1;12(17).
39. Tizard IanR. Veterinary Immunology. 10th ed. 2018.
40. Clark MF, Lister RM, Bar-Joseph M. ELISA techniques. In 1986. p. 742–66.
41. Luís D, Morgado M, Doutor T, Da V, Almeida S, Maria D, et al. Faculdade de Medicina Veterinária CORE View metadata, citation and similar papers at core.
42. González FHD, Campos R. ANAIS DO I SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL EDITORES. 2003.

43. Bricarello PA, Magagnin EA, de OLIVEIRA T, da SILVA A, Lima LM. Contamination by parasites of zoonotic importance in fecal samples from Florianópolis Beaches, Santa Catarina State, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2018;55(1):1–10.
44. Filipa Barroca Fernandes Lagares A, Rui Manuel Horta Caldeira Dra Ana Lúcia Palinhos Catarino Profa Doutora Isabel Pereira da Fonseca Doutor D. UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA Faculdade de Medicina Veterinária PARASITÓSES DE PEQUENOS RUMINANTES NA REGIÃO DA COVA DA BEIRA.
45. Alho AM, Madeira De Carvalho LM. A importância da Técnica de Baermann na clínica de pequenos animais Characterization of malaria parasites infections in penguins housed in zoological collections View project [Internet]. 2013. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/247777497>
46. Luís Madeira de Carvalho Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca de Sampaio Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte Gonçalo Eduardo Vítor Vicente ORIENTADOR D, Eduardo Vítor Vicente G. UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA Faculdade de Medicina Veterinária DETECÇÃO DE BABESIA SPP. E DE OUTROS HEMOPARASITAS EM CÃES, POR TÉCNICAS MORFOLÓGICAS, SEROLÓGICAS E MOLECULARES, NO DISTRITO DE LISBOA, PORTUGAL ANA PATRÍCIA DA SILVA CAEIROS CONSTITUIÇÃO DO JÚRI.
47. Filipa A, Silva B, Pereira RJ, Marcos C, Doutora P, Amaro MS, et al. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O ESFREGAÇO SANGUÍNEO E DE BUFFY-COAT NO DIAGNÓSTICO DE HEMOPARASITAS. 2017.
48. Pantchev N, Schnyder M, Vrhovec MG, Schaper R, Tsachev I. Current Surveys of the Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Angiostrongylus vasorum* and *Dirofilaria immitis* in Dogs in Bulgaria. *Parasitol Res.* 2015 Aug 24;114:117–30.
49. Gonçalves T, De Fonseca Honório¹ A, Kelly E, Araújo¹ D, Tupinambar L, Lima¹ R, et al. Infecção por Hepatozoon sp. em canino doméstico: Relato de caso.
50. Wamsley HL. Examination of the Urine Sediment.
51. Baños-Laredo ME, Núñez-Álvarez CA, Cabiedes J. Análisis de sedimento urinario. *Reumatol Clin.* 2010 Sep;6(5):268–72.
52. Pacheco Monferdini R, De Oliveira² J. MANEJO NUTRICIONAL PARA CÃES E GATOS COM UROLITÍASE-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA [Nutritional management of dogs and cats with urolithiasis-review]. *Acta Veterinaria Brasilica.* 2009.
53. Veterinary Microbiology and Microbial Disease 2nd Edition PDF PDF | Vet eBooks [Internet]. [cited 2023 Aug 22]. Available from: <https://www.vet-ebooks.com/veterinary-microbiology-and-microbial-disease-pdf/>

54. Faron ML, Buchan BW, Samra H, Ledebøer NA. Evaluation of WASPLab Software To Automatically Read chromID CPS Elite Agar for Reporting of Urine Cultures [Internet]. 2019. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jcm>
55. Nicholas J. Cave, BVSc Mvs, Stanley L. Marks BVSPDD, Philip H. Kass DP, Ann C. Melli B, Melissa A. Brophy B. Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea.
56. Mestre C., Oliveira A. MARTA DOS SANTOS CRUZ TRATAMENTO DE OTITES EXTERNAS CANINAS COM MEL MANUKA 40%: ESTUDO DE CASOS Orientadora: Doutora Rute Noiva. 2018.
57. Cultivation-of-anaerobic-bacteria [Internet]. [cited 2024 Feb 10]. Available from: <https://biologynotesonline.com/cultivation-of-anaerobic-bacteria/>