

É Autorizada a reprodução integral desta monografia apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Agradecimentos.

À minha família e amigos mais próximos que acompanharam o processo de elaboração deste trabalho;

A todo o pessoal técnico e administrativo do laboratório de análises clínicas Dra. Susana Pinto; em especial à sua directora técnica, Dra. Susana Pinto, pela oportunidade de estágio e pelos ensinamentos; à Dra. Inês Ribeiro pela atenta supervisão e paciência; e aos Drs. Miguel e Mariana pela atenção e companheirismo;

À Prof^a Doutora Alice Santos-Silva, orientadora desta monografia, agradeço a atenção, disponibilidade e orientação.

Resumo:

O eritrócito humano tem um tempo médio de vida de cerca de 120 dias. Ao longo desse tempo, vai sofrendo agressões físico-químicas que se acumulam e se acentuam com o envelhecimento. Devido à ausência de organelos, o glóbulo rubro apresenta uma capacidade biossintética limitada, o que leva à incapacidade de recuperação e à acumulação de lesões. Estas lesões são reconhecidas pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial que procede à sua remoção ou ao sequestro e destruição dos eritrócitos envelhecidos através de eritrofagocitose dos macrófagos. Vários investigadores têm estudado o processo de envelhecimento eritrocitário a nível celular e molecular, sendo este estudo apoiado por técnicas cada vez mais eficientes na separação de eritrócitos de diferentes idades. Neste trabalho são revistos os processos fisiológicos de envelhecimento e de remoção do glóbulo vermelho e os avanços recentes nas técnicas para estudo da senescência eritrocitária.

Palavras-chave: eritrócito, senescência eritrocitária, remoção eritrocitária.

Abstract:

The human erythrocyte has a lifetime of 120 days in average. Throughout its life, the erythrocyte suffers physicochemical damage that are enhanced with aging. Due to lack of organelles, the red blood cell has a limited biosynthetic capacity, which leads to the inability of recover and to an accumulation of those lesions. The damage is subsequently recognized by the immune system that proceeds to the physiological removal of aged erythrocytes through erythrophagocytosis effected by macrophages. Given the physiological importance of the red cell in the body, several groups of investigation have targeted the study of erythrocyte aging and senescence not only by presenting new findings about the molecular and physiological process per se, but also suggesting new and more efficient techniques/methodologies of the erythrocyte senescence study. So, the aims of this work are the approach on the erythrocyte ageing processes and removal, and to present new breakthroughs on the erythrocyte senescent study techniques.

Key words: erythrocyte, erythrocyte senescence, erythrocyte removal.

Índice de conteúdos

CAPÍTULO I - O Eritrócito

1 – Características estruturais	1
2 – Composição da membrana	2
2.1 – Lípidos da membrana	4
2.2 – Proteínas de membrana	5
3 – Composição do citoplasma	9
3.1 – Hemoglobina e tipos de hemoglobina fisiológicos	9
3.2 – Função da hemoglobina	12
4 – Metabolismo	15
4.1 – Via de Embden-Meyerhof	15
4.2 – Via das pentoses-fosfato	16
5 – Envelhecimento eritrocitário	19

CAPÍTULO II - Metodologias para estudo dos mecanismos de senescência e remoção

1 – Marcadores de stress oxidativo e senescência	24
2 – Estudo dos mecanismos de senescência	25
2.1 – Técnicas mais utilizadas	25
1.2.2 - <i>Human Erythrocyte Microchannel Analyser</i>	25
1.2.3 – Estudos <i>in-vitro</i> e <i>in-vivo</i> do mecanismo de eritrofagocitose	28
1.2.4 – Novos Marcadores de Senescência	32
2 – Conclusão	36
3 – Bibliografia	37
Relatório de estágio	44

Índice de Figuras:

Figura 1 – Eritrócito maduro	1
Figura 2 – Complexos proteicos de ancoragem à membrana.	3
Figura 3 – Representação esquemática da interacção das proteínas da membrana eritrocitária.	3
Figura 4 – Modelo do Mosaico Fluido proposto por Singer e Nicolson.	5
Figura 5 – Principais vias de transporte iónico do eritrócito humano.	8
Figura 6 – Estrutura molecular do heme.	11
Figura 7 – Curvas de saturação da hemoglobina A.	14
Figura 8 – Esquema da via de Embden-Meyerhof e do desvio de Rapoport-Luebering.	17
Figura 9 – Esquema da Via das Pentoses Fosfato.	18
Figura 10 – Esquema do <i>Human Erythrocyte Microchannel Analyser</i>	26
Figura 11 – Eritrócitos no HEMA	27
Figura 12 – Representação esquemática do protocolo de hiper-transfusão.	29
Figura 13 – Os níveis de ROS dos eritrócitos senescentes.	30
Figura 14 – Os níveis de marcação de fosfatidilserina exteriorizada	31
Figura 15 – Eritrofagocitose <i>in-vivo</i> e <i>in-vitro</i>	32
Figura 16 – Marcação fluorescente da Apolipoproteína J/Clusterina	33
Figura 17 - Apolipoproteína J/Clusterina como marcador de Senescência	34
Figura 18 - Apolipoproteína J/Clusterina diminui em fumadores.	34

Índice de tabelas:

Tabela 1 – Principais proteínas de membrana no eritrócito.	6
Tabela 2 – Diferentes tipos de hemoglobina ao longo da vida do indivíduo.	10

Lista de abreviaturas

2,3-DPG	2,3 difosfoglicerato
AQP1	Aquaporina 1
ATP	adenosina tri-fosfato
BHP	butil-hidroperóxido
CO ₂	dióxido de carbono
EFC	eritrofagocitose
EPO	eritropoietina
G6PD	glucose 6-fosfato desidrogenase
GLUT1	transportador de glucose 1
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
H ₂ CO ₃	ácido carbónico
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogénio
Hb	hemoglobina
HCO ₃ ⁻	ião bicarbonato
HEMA	<i>Human Erythrocyte Microchannel Analyser</i>
MDA	malonildialdeído
Met-Hb	metahemoglobina
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reduzida
NADP ⁺	nicotinamida adeninda dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	nicotinamida adeninda dinucleótido fosfato reduzido
oxi-Hb	oxihemoglobina
RhAG	glicoproteína associada ao Rh
RNA	acido ribunocleico
RNS	espécies reactivas de azoto
ROS	espécies reactivas de oxigénio
sCLU	Apolipoproteína J/Clusterina

I - O Eritrócito

1 - Características Estruturais

Os eritrócitos têm uma estrutura única que lhes permite executar eficientemente a sua função na manutenção da oxigenação do organismo. (Antonelou *et al*, 2011) Têm a forma de disco bicôncavo, um diâmetro de 7 a 8 μm , uma espessura de aproximadamente 2,5 μm , um volume médio de 90 fl e uma área de superfície de $135\mu\text{m}^2$ (Figura 1). (Palomo *et al*, 2005) Estas características conferem ao eritrócito uma grande capacidade de deformação e permitem que circule em capilares com um lúmen inferior ao seu próprio diâmetro. Este facto torna-se fundamental, considerando que a principal função do eritrócito é o transporte de oxigénio para os tecidos e é na microcirculação que se verifica maior difusão de O_2 e onde o eritrócito passa a maior parte dos seus cerca de 120 dias de vida. (Serroukh *et al*, 2012)

O eritrócito tem uma capacidade biossintética limitada, o que impede a recuperação de alterações físico-químicas decorrentes do processo de envelhecimento. Estas lesões decorrentes do envelhecimento, constituem, por isso, marcadores de envelhecimento eritrocitário.

Ao longo da vida do eritrócito, observa-se uma redução na actividade metabólica da via de Embden-Meyerhof, que leva a uma diminuição dos processos dependentes de energia, por depleção de ATP e de NADH, e da via das Pentoses-fosfato, reduzindo-se a capacidade de resposta a situações de stress oxidativo. As lesões físico-químicas acumuladas poderão determinar a perda de integridade da membrana, diminuição da capacidade de deformabilidade e remoção do eritrócito de circulação. (Santos Silva *et al*, 1995; Gallagher *et al*, 2008)

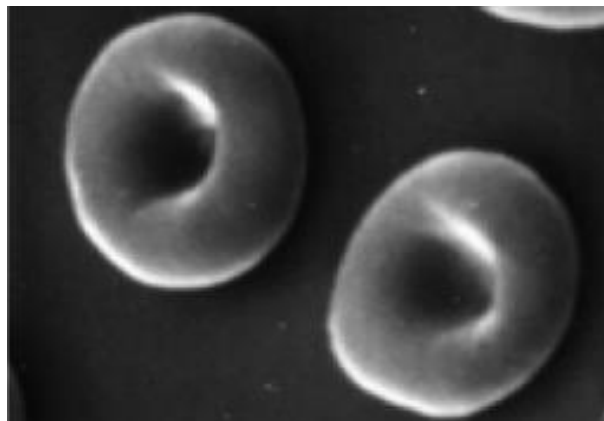


Figura 1 – Eritrócito maduro. Adaptado de Gallagher *et al*, 2008

2 - Composição da membrana

A membrana eritrocitária é o elemento de maior importância na reologia do glóbulo vermelho, uma vez que é a principal responsável pela capacidade de deformabilidade da célula. É composta por proteínas (cerca de 52%), lípidos (40%) e hidratos de carbono (8%) (Serroukh *et al*, 2012) e é responsável pelas características mecânicas, antigénicas e de transporte. (Gallagher *et al*, 2008)

A membrana eritrocitária tem propriedades físicas únicas. É altamente elástica, mantém a integridade sob altas pressões de fluido, sendo capaz de sofrer extensões lineares até 250%. No entanto, um aumento de volume de 3 a 4% resulta em lise celular. Ou seja, a membrana reage bem a deformações, desde que estas não impliquem uma alteração da área de superfície da membrana. (Gallagher *et al*, 2008). Este comportamento é devido a uma arquitectura única entre os lípidos e as proteínas de membrana. Estruturalmente, a membrana é composta por colesterol e fosfolípidos dispostos em bicamada, ancorada numa estrutura proteica elástica designada por citoesqueleto. Esta estrutura (Figura 2), tem uma elevada importância na manutenção das propriedades reológicas do eritrócito. Para manter a área de superfície constante e a integridade celular, 2 complexos moleculares do citoesqueleto, um com base na anquirina e outro com base na proteína 4.1R, ligam-se à membrana por intermédio da proteína banda 3 e da glicoforina C, respectivamente. A banda 3 e a glicoforina c são proteínas intrínsecas da membrana constituindo pontos de ligação para as proteínas do citoesqueleto. Existem interações directas entre as proteínas do citoesqueleto e as proteínas da membrana, que oferecem pontos de ancoragem adicionais. (Mohandas *et al*, 1994; Gallagher *et al*, 2008) As proporções entre as proteínas extrínsecas e transmembranares têm uma relação directa com a estabilidade da membrana, assim como com a capacidade de deformabilidade, sendo que a alteração destas proporções e o aumento do rácio proteína banda 3/espectrina levam à instabilidade membranar e à perda de deformabilidade. (Serroukh *et al*, 2012)

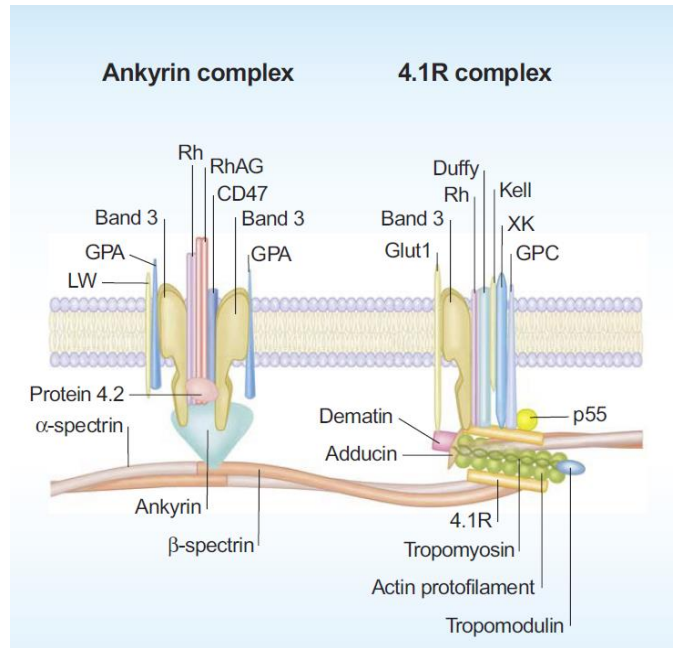


Figura 2 – Complexos proteicos de ancoragem à membrana. Adaptado de Gallagher *et al*, 2008

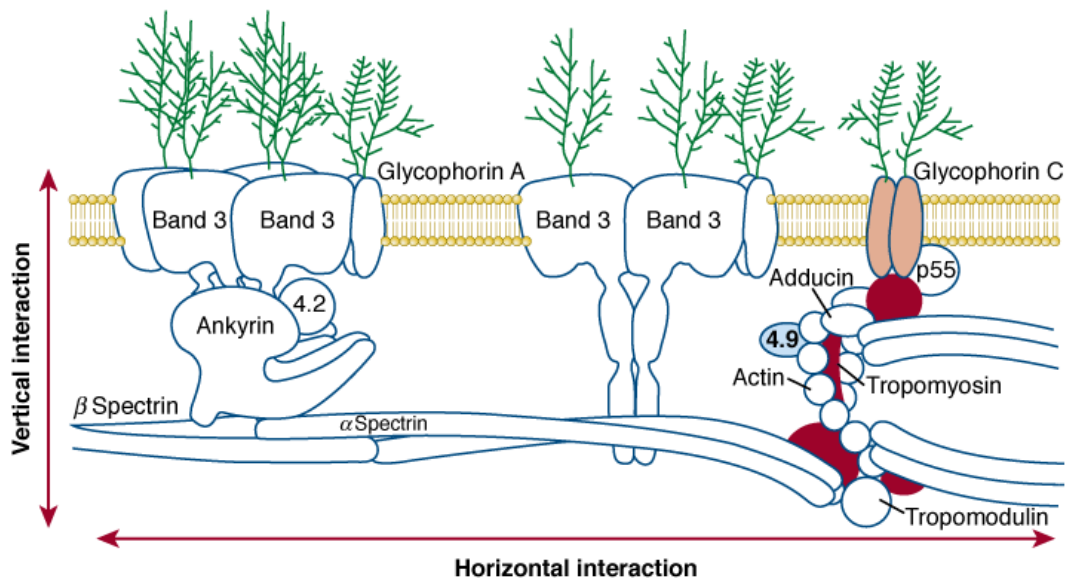


Figura 3 – Representação esquemática da interação das proteínas da membrana eritrocitária. Adaptado de Beutler *et al*, 2010

2.1 - Lípidos da Membrana

A fracção lipídica da membrana é constituída por colesterol e fosfolípidos em proporções semelhantes. (Walensky *et al*, 2003; Gallagher *et al*, 2008). Segundo a teoria proposta por Singer e Nicolson em 1972 (figura 4), os fosfolípidos da membrana estão dispostos em bicamada, ou seja, cada molécula de fosfolípido é constituída por uma “cabeça” hidrofílica e uma “cauda” hidrofóbica. As cabeças hidrofílicas dispõem-se no folheto exterior, e as caudas hidrofóbicas, encontram-se na porção interior da bicamada. Os 4 principais tipos de fosfolípidos estão distribuídos assimetricamente, embora a quantidade de fosfolípidos seja igual nos dois folhetos lipídicos. Assim, a fosfatilcolina e a esfingomiélna estão localizados predominantemente na face externa, enquanto a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilserina estão na camada interior da bicamada. Já o colesterol está uniformemente distribuído pelas duas faces da bicamada. (Zwaal *et al*, 1997).

A assimetria da bicamada é mantida por diferentes transportadores, como as *flippases* que fazem mover os fosfolípidos da camada exterior para a camada interior, as *floppases* que fazem o oposto contra o gradiente de concentração, com custos energéticos, e as *scramblases* que movimentam os fosfolípidos em ambas as direcções de acordo com o gradiente de concentração e sem custos energéticos. (Daleke D.L., 2008; Gallagher *et al*, 2008) A exteriorização da fosfatidilserina contribui para a remoção do eritrócito, pelos macrófagos no sistema reticuloendotelial. (Wood *et al*, 1996; de Porto *et al*, 2010) A manutenção dos resíduos de fosfatidilserina na face interior, inibe a agregação dos glóbulos vermelhos, permitindo maior fluidez de circulação especialmente a nível da microvasculatura. (Setty *et al*, 2002, Fens *et al*, 2012) Estudos recentes sugerem que a ligação entre a fosfatidilserina e a espectrina melhora a estabilidade mecânica da membrana (Manno *et al*, 2002; Gallagher *et al*, 2008), atestando a importância das *floppases*, *flippases* e *scramblases* na membrana eritrocitária, assim como da manutenção do perfil e arquitectura correctos da bicamada lipídica.

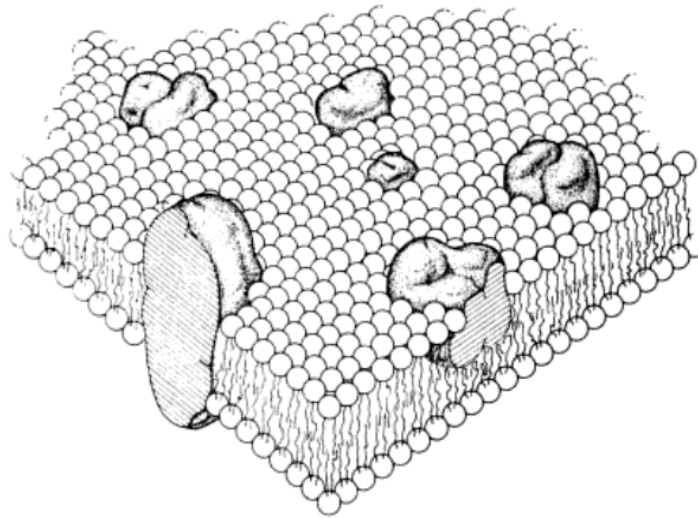


Figura 4 – Modelo do Mosaico Fluido proposto por Singer e Nicolson em 1972. Do lado esquerdo do corte pode ver-se esquematizada uma proteína integral e no lado direito uma proteína periférica. Adaptado de Singer e Nicolson, 1972

2.2 - Proteínas de membrana

Existem dois tipos de proteínas na membrana, proteínas transmembranares e proteínas periféricas. As proteínas transmembranares atravessam a bicamada lipídica, enquanto que as proteínas periféricas contactam apenas com um dos folhetos e incluem as proteínas do citoesqueleto (figura 3). (Palomo *et al*, 2005). As proteínas da membrana do glóbulo vermelho apresentam grande heterogeneidade funcional estando envolvidas em vários processos, nomeadamente funções de transporte iónico, função enzimática e de apresentação de moléculas antigénicas de superfície. Contudo, para cerca de 23,8% das proteínas do eritrócito, a sua função é ainda desconhecida. As proteínas com uma função melhor conhecida, são as proteínas do citoesqueleto e algumas proteínas transmembranares (Kakhniashvili *et al*, 2004).

As proteínas mais representativas da membrana do glóbulo vermelho estão descritas na tabela 1.

<u>Proteína</u>	<u>Porcentagem</u>
α -Espectrina	16
β -Espectrina	14
Anquirina	4.5
α -Aducina	2
β -Aducina	2
<i>Anion exchanger 1</i>	27
Proteína 4.1	5
Proteína 4.2	5
Dematina	1
p55	-
β -Actina	5.5
Tropomodulina	-
G-3P-D	3.5
Estomatina	2.5
Tropomiosina	1
Glicoforina A	9.8
Glicoforina C	0.4
Glicoforina B	1.1
Glicoforina D	0.1
Glicoforina E	-

Tabela 1 – Principais proteínas de membrana no eritrócito. Adaptado de Beutler *et al*, 2010

A espectrina constitui a proteína mais importante do citoesqueleto, tanto pela sua abundância – cerca de 75% - como pela sua importante contribuição para a capacidade de deformabilidade da membrana (Santos-Silva A, 1995; Sikorski *et al*, 2000). Esta é formada por duas cadeias, α e β , enroladas antiparalelamente formando dímeros $\alpha\beta$, que se ligam entre si formando tetrâmeros, constituindo uma rede de espectrina (Di Stasi *et al*, 1988; Sikorski *et al*, 2000). As ligações entre as proteínas do citoesqueleto e os domínios citoplasmáticos das proteínas transmembranares são fundamentais para a estabilidade estrutural da membrana e da célula. (Gallagher *et al*,

2008) Estruturalmente, (figura 3) a proteína banda 3 e a proteína 4.2 proporcionam ancoragem à anquirina, que por sua vez se liga à espectrina. A proteína 4.2 liga-se à banda 3 e à anquirina regulando a ligação entre essas duas proteínas. A glicoforina C liga-se à proteína 4.1R, que faz parte de um complexo ternário juntamente com a actina e espectrina formando assim o segundo nó de ligação membrana-citoesqueleto. (Sikorski *et al*, 2000; Salomao *et al*, 2008). Recentemente alguns autores descreveram que a proteína banda 3 e o transportador da glucose 1 (GLUT1) efectuavam igualmente ligações com o citoesqueleto através da interacção com as proteínas aducina e dematina, respectivamente (Gallagher *et al*, 2008; Khan *et al*, 2008; Salomao *et al*, 2008)

Das ligações citoesqueleto-membrana, as que envolvem a banda 3 foram descritas como sendo as mais determinantes para a coesão estrutural da membrana. (Gallagher *et al*, 2008)

O transporte de iões é feito através de canais, de transportadores passivos e transportadores dependentes de energia (ATPases), que são de natureza proteica. As proteínas de membrana com função de transporte iónico incluem a proteína Banda 3 – transportador de aniões, a Aquaporina 1 (transportador de água), Glut1 (transportador de glucose e de ácido L-desidroascórbico), antigénio Kidd (transportador de ureia), RhAG (transportador de gases e provavelmente CO₂), Na⁺-K⁺ ATPase (transportador de Na⁺ e K⁺), Ca²⁺ ATPase (transportador de Ca²⁺), os cotransportadores Na⁺-K⁺-2Cl⁻, K⁺-Cl⁻, Na⁺-K⁺, Na⁺-Cl⁻ e canal de Gardos (canal de K⁺ dependente de Ca²⁺). (figura 5)

O eritrócito tem capacidade para manter o seu volume, no entanto os mecanismos pelos quais o eritrócito detecta alterações de volume e activa os devidos mecanismos para manutenção do volume são ainda pouco conhecidos. (Beutler *et al*, 2010).

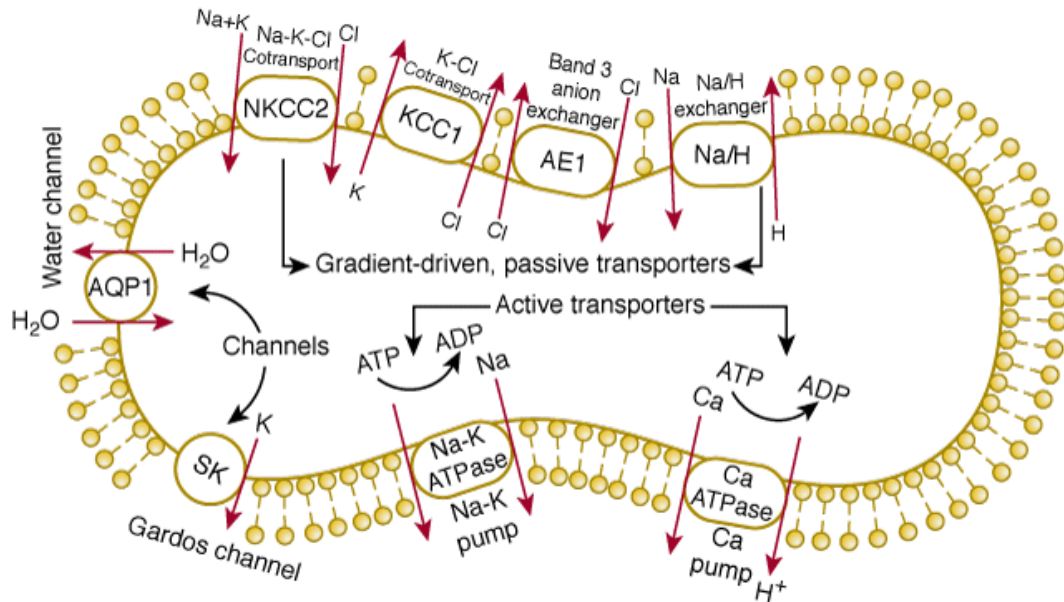


Figura 5 – Principais vias de transporte iônico do eritrócito humano. A glicose entra no eritrócito com o auxílio de um transportador, mas sem gasto energético. Os quatro transportadores esquematizados na parte superior do eritrócito dizem respeito a transportadores passivos que funcionam de acordo com os gradientes de concentração. À esquerda encontram-se dois canais, o AQP1 – aquaporina 1 que é um canal de água e o SK que é um canal de potássio. Na parte inferior do eritrócito encontram-se duas ATPases, bomba sódio potássio e bomba de cálcio, que transportam esses íons de forma activa com gasto energético. Adaptado de Beutler *et al*, 2010

3 - Composição do citoplasma

O citoplasma do eritrócito maduro, ao contrário da maior parte das células do nosso organismo, é totalmente desprovido de organelos e de núcleo, tendo, portanto, a sua capacidade biossintética limitada. (Santos-Silva A, 1995; Wijk *et al*, 2012) Assim, o citoplasma eritrócitário é composto por uma solução aquosa de electrólitos e proteínas, sendo que a hemoglobina representa cerca de 95% dos solutos. No que diz respeito aos electrólitos, a composição do citoplasma é diferente da composição do plasma, onde o eritrócito circula; enquanto no plasma as concentrações dos catiões Ca^{2+} e Na^+ são superiores às do citoplasma do GV, o ião K^+ está mais concentrado no citoplasma do GV do que no plasma. No balanço aniónico, encontramos concentrações de Cl^- e HCO_3^- mais elevados no plasma, uma vez que a hemoglobina, a pH fisiológico, se comporta como um anião. A elevada concentração de hemoglobina no interior do eritrócito impede o aporte de aniões e, devido à pressão oncótica, mantém a concentração de aniões baixa no interior. Isto impede que a água entre na célula por osmose e lise o eritrócito.

A composição do citoplasma eritrocitário tem igualmente um papel importante na capacidade de deformação do eritrócito. Como já foi abordado anteriormente, a rede de proteínas do citoesqueleto/membrana confere ao eritrócito uma elevada elasticidade, no entanto a viscosidade do citoplasma desempenha, igualmente, um papel importante na capacidade de deformabilidade da célula. A viscosidade interna depende da concentração e volume da solução aquosa de hemoglobina (Hb). Se houver formação de pseudo-cristais de Hb-S ou oxidação e desnaturação da hemoglobina haverá também um aumento da viscosidade interna e/ou redução da elasticidade/deformabilidade do eritrócito. (Santos-Silva A, 1995; Palomo *et al*, 2005)

3.1 – Hemoglobina e tipos fisiológicos de hemoglobina

A hemoglobina humana (Hb) apresenta as características ideais para desempenhar a sua tarefa de forma exímia - transportar o O_2 dos pulmões para os tecidos e mediar o transporte de CO_2 no sentido inverso. Ao contrário da maior parte dos invertebrados, onde a molécula transportadora de O_2 se encontra livre no plasma, a Hb humana circula dentro dos glóbulos vermelhos, o que representa uma grande vantagem evolutiva, uma vez que permite manter a viscosidade plasmática constante e não provoca desidratação dos tecidos, por perda de água para o plasma devido à pressão osmótica.

Em cada eritrócito existem cerca de 280 milhões de moléculas de Hb, cada uma com um peso molecular de 64.458 daltons e com 64x55x60 Ångström de dimensão.

A molécula de Hb é um tetrâmero constituído por 4 cadeias globínicas, iguais duas a duas e por quatro grupos heme. O grupo heme, consiste num ião ferro no estado ferroso (Fe^{2+}) no centro de um anel de porfirina.

Existem vários tipos de hemoglobina, que variam conforme a etapa da vida do indivíduo (tabela 2). As diferentes formas fisiológicas de hemoglobina são constituídas por cadeias globínicas de dois tipos, α ou β . Duas são do tipo α (α e ζ) e quatro do tipo β (β , δ , ϵ e γ). (Palomo *et al*, 2005)

Hemoglobina	Origem	Obs
$(\zeta_2 \epsilon_2)$ Gower 1	Período embrionário	Elevada afinidade para o O_2
$(\alpha_2 \epsilon_2)$ Gower 2		
$(\zeta_2 \gamma_2)$ Portland		
$(\alpha_2 \gamma_2)$ Fetal	Período fetal	Presente vestigialmente após o nascimento
$(\alpha_2 \beta_2)$ A ₁	Período fetal e após o nascimento	No adulto saudável a percentagem de HbA ₁ é de cerca de 97%, HbA ₂ cerca de 2,5% e HbF 0,5%
$(\alpha_2 \delta_2)$ A ₂	Após o nascimento	

Tabela 2 – Diferentes tipos de hemoglobina ao longo da vida do indivíduo. Adaptado de Palomo *et al*, 2005

Estruturalmente as proteínas podem ter até 4 tipos de arranjos denominados de estruturas primária, secundária, terciária e quaternária.

Cada tipo de cadeia globínica - α , β , γ , δ , ϵ e ζ - possui uma sequência de aminoácidos diferente. As cadeias α apresentam 141 aminoácidos lineares, sendo que o contacto com o grupo heme se faz por intermédio de um grupo imidazol (R) de um resíduo de histidina na posição 87 denominada de histidina proximal.

As cadeias β apresentam 146 aminoácidos e a ligação ao heme é feita por intermédio da histidina 92.

As cadeias γ , δ e ϵ apresentam uma elevada homologia com as cadeias β , devido ao facto de os seus genes codificantes estarem no mesmo cromossoma, o

cromossoma 11. Igualmente, a cadeia ζ apresenta elevada homologia com a cadeia α visto terem origem genética no cromossoma 16.

O heme (figura 6) é o grupo prostético da Hb e é fundamental, pois é este complexo tetrapirrólico ferroso que liga o oxigénio para a oxigenação dos tecidos. (Beutler *et al*, 2010)

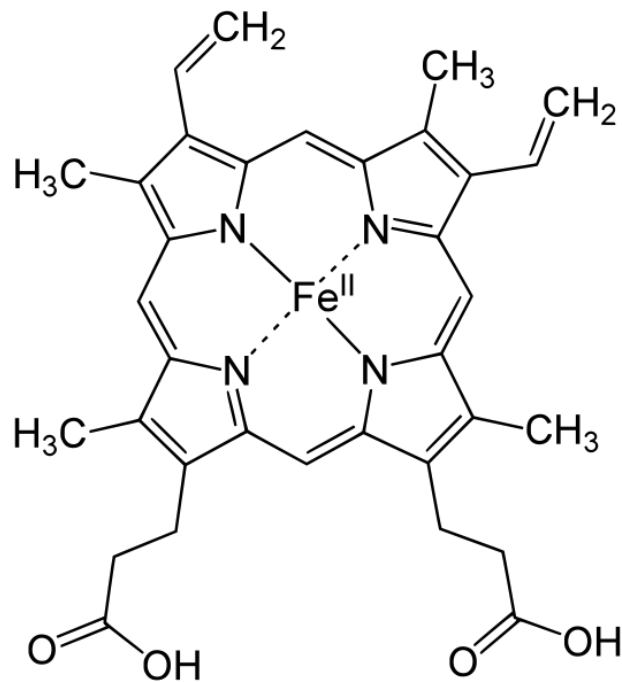


Figura 6 – Estrutura molecular do heme. Adaptado de Beutler *et al*, 2010

As hemoglobinas normais no adulto, incluem a HbA (ou HbA₁), a HbA₂ e a Hb fetal (HbF). A HbA constitui cerca de 97% de toda a hemoglobina no adulto. A HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) representa entre 0,3% e 2,6% do total de Hb e a HbF observa-se em quantidades vestigiais. A estrutura da HbA₂ é análoga à da HbA, uma vez que a cadeia δ apenas difere em 10 aminoácidos da cadeia β . Assim, apresenta uma afinidade para o O₂ semelhante à da HbA; também a interacção das cadeias globínicas, o efeito de Bohr e a resposta ao 2-3 difosfoglicerato são semelhantes aos apresentados pela HbA. A única divergência é na estabilidade térmica, que é superior para a HbA₂, o que se deve à diferença em aminoácidos que conferem uma maior

estabilidade ao dímero $\alpha\delta$. Os níveis de HbA₂ podem estar aumentados em estados patológicos tais como a β -talassemia. Encontra-se diminuída em estados de α , $\delta\beta$ e δ -talassemia, deficiência de ferro e anemias sideroblásticas. As cadeias α ligam-se preferencialmente às cadeias β , pelo que nas β -talassemias há maior formação de dímeros $\alpha\delta$ por deficiência de cadeias β . Já no caso das α -talassemias há diminuição da HbA₂ por carência da cadeia α . (Palomo *et al*, 2009; Gutierrez-Salinas *et al*, 2007)

Para além das hemoglobinas já referidas, existem outros tipos de hemoglobinas fisiológicas, tais como a metahemoglobina, a sulfohemoglobina, a carbaminohemoglobina e a hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), normalmente presentes no adulto. A metahemoglobina está presente em quantidades vestigiais e o seu valor aumenta quando há um maior potencial oxidativo. Caracteriza-se por apresentar o ferro dos grupos heme no estado férrico (Fe³⁺), cancelando a afinidade do heme pelo oxigénio e anulando portanto a capacidade de transporte de oxigénio aos tecidos. (Gutierrez-Salinas *et al*, 2007). A metahemoglobina liga-se à membrana podendo formar inclusões eritrocitárias, denominadas de corpos de Heinz. (Pandey *et al*, 2009) A sulfohemoglobina, forma-se pela substituição de um ou mais oxigénios do anel porfirínico por enxofre, (Burtis *et al*, 2008) o que pode acontecer por exposição a compostos sulfúricos ou a drogas oxidantes. (Beutler *et al*, 2010) A hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) é uma hemoglobina fisiológica que representa entre 3 e 6% da Hb e que se forma pela glicolização não enzimática dos grupos amino-terminais dos aminoácidos da cadeia peptídica. (Petrescu, 2012) A determinação da HbA_{1c} é útil na monitorização dos níveis de glicemia dos diabéticos, uma vez que o seu valor espelha o valor médio da concentração de glicose no sangue, não sendo afectado pelas flutuações naturais dos valores de glicemia ao longo do tempo. (Burtis *et al*, 2008). A carbaminoHb forma-se pela ligação de CO₂ à hemoglobina.

3.2 - Função da Hemoglobina

A Hb tem como função principal o transporte de O₂ para oxigenação dos tecidos, sendo também capaz de mediar o transporte de CO₂ dos tecidos para os alvéolos pulmonares e actuar como um eficaz sistema tampão.

O efeito Bohr é um processo funcional de elevada importância, regulável pelas concentrações gasosas e pelo pH do sangue. (Beutler *et al*, 2010). A afinidade da Hb pelo O₂ depende do pH; assim, quando o pH diminui ao nível dos capilares dos tecidos

devido ao aumento das concentrações de CO_2 na célula ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$), a Hb capta o próton e liberta o O_2 . Já ao nível dos alvéolos pulmonares, onde o pH é superior, a Hb liberta o próton e liga-se ao O_2 . (Beutler *et al*, 2010). A acção da anidrase carbónica do eritrócito, neste processo é importante, uma vez que catalisa a reacção atrás descrita, contribuindo para o transporte plasmático do CO_2 sob a forma de ião bicarbonato (HCO_3^-). (Beutler *et al*, 2010). Apenas cerca de 10% do CO_2 é transportado na forma de carbaminoHb, complexado com a Hb. O restante é transportado maioritariamente sob a forma de HCO_3^- no plasma (cerca de 85%) e uma pequena parte dissolvido no plasma (cerca de 5%).

A libertação de oxigénio ao nível dos tecidos é mais elevada em caso de aumento da temperatura e da concentração de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). Em ambas as situações há uma diminuição da afinidade da Hb pelo oxigénio, ou seja, há um desvio à direita da curva de saturação da hemoglobina (Figura 7). O 2,3-DPG é um produto da via de Luebering-Rapoport, um desvio ao ciclo de Embden-Meyerhof, exclusivo do eritrócito. (Stryer *et al*, 2007) Inversamente, quando existe uma situação de hipotermia com redução da temperatura, as exigências metabólicas são menores, sendo que a libertação de O_2 ao nível dos tecidos é menor, ocorrendo um desvio à esquerda da curva de dissociação da Hb. (Figura 7)

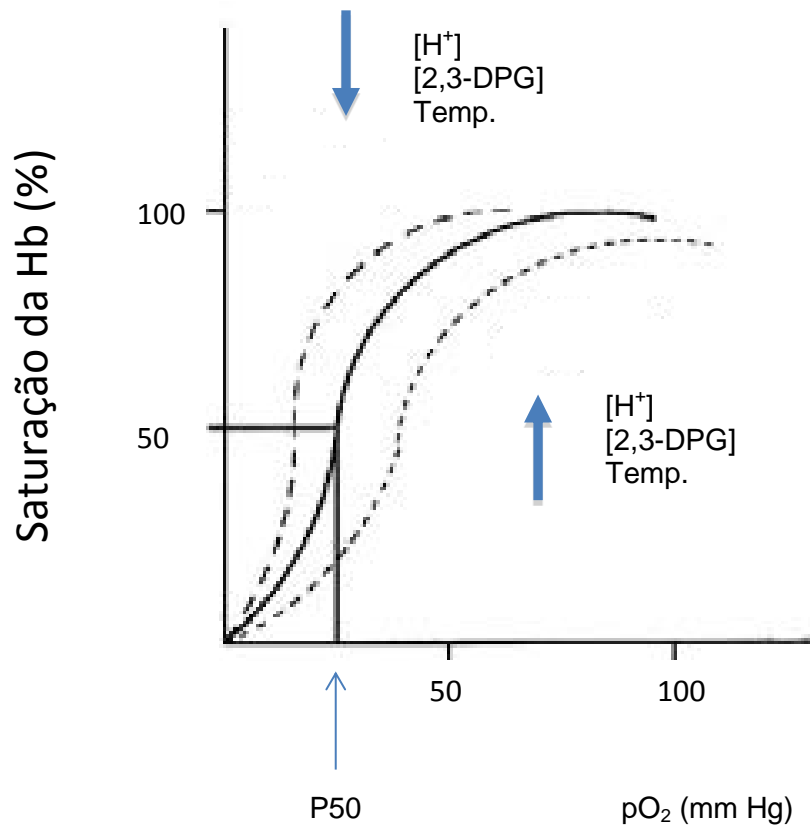


Figura 7 – Curvas de saturação da hemoglobina A. A tracejado encontram-se as curvas de dissociação no caso de alteração nos parâmetros de temperatura, pH e concentração de 2,3-DPG. A linha tracejada superior indica a curva de saturação da Hb com a diminuição dos parâmetros de concentração intraeritrocitária de 2,3-DPG e temperatura e aumento do pH. A linha de tracejada inferior indica a situação inversa, ou seja, com o aumento dos parâmetros temperatura, concentração de 2,3-DPG e diminuição do pH. A curva contínua diz respeito à curva de dissociação da Hb em condições “standard”, ou seja temperatura de 37°, pH de 7,4 e concentração de 2,3-DPG de 15 μ mol/g de Hb.

4 - Metabolismo

O metabolismo eritrocitário tem como principais objectivos manter a hemoglobina no estado reduzido, ou seja, funcional e manter a integridade da membrana. (Santos-Silva A, 1995) O eritrócito maduro, como já se referiu, não tem capacidade de síntese proteica nem mecanismos de reparação de proteínas no caso de estas serem alteradas. No entanto, é dotado de um eficaz sistema de protecção enzimática anti-oxidante. (Arese *et al*, 2005)

Do ponto de vista energético, o eritrócito é totalmente dependente da glicólise para converter glicose em energia. O glóbulo vermelho necessita de energia para vários processos vitais, tais como para a manutenção do ferro da Hb no estado ferroso (Fe^{2+}), das concentrações iónicas, que são diferentes das do plasma, manutenção de um ambiente reduzido para a total funcionalidade das proteínas e manutenção da forma e integridade da célula (Beutler *et al*, 2010)

A glicose é fosforilada a glicose-6-fosfato que vai ser o substrato para a glicólise anaeróbia pela via de Embden-Meyerhof e para a glicólise oxidativa pela via das Pentoses-monofosfato. (McMullin MF, 1999; Castagnola *et al*, 2010) Estas duas vias estão intrinsecamente ligadas, sendo que a primeira é importante do ponto de vista energético e a segunda tem um papel fundamental como única fonte de NADPH. O NADPH mantém a glutatona no estado reduzido e funcional para protecção de danos oxidativos. (McMullin MF, 1999)

A via de Embden-Meyerhof é designada de via metabólica principal por representar cerca de 90% do metabolismo eritrocitário, sendo que a via das pentoses-fosfato, representa apenas 10%, e é designada de via acessória. (Santos-Silva A, 1995)

4.1 - Via de Embden-Meyerhof

A via de Embden-Meyerhof é o único caminho metabólico possível para a produção e armazenamento de ATP. (Darghouth *et al*, 2012; Wijk *et al*, 2012) A Figura 8 esquematiza a via de Embden-Meyerhof e todos os passos metabólicos na transformação da glicose em piruvato e lactato.

O balanço energético total é de 4 moléculas de ATP formados por cada 2 moléculas de ATP gastos, resultando num lucro energético de 2 moléculas de ATP. Adicionalmente é produzido um potencial redutor na forma de NADH, que é utilizado na redução da meta-hemoglobina em hemoglobina, pela enzima NADH citocromo b5

redutase. O restante NADH, que não é utilizado nesta reacção, é utilizado na conversão do piruvato em lactato pela enzima lactato desidrogenase – ultimo passo da via de Embden-Meyerhof. (Wijk *et al*, 2012)

Além da via das pentoses fosfato, cujos produtos inicial e final são intermediários da via de Embden-Meyerhof, a via de Rapoport-Luebering é também um desvio de elevada importância no decorrer da glicólise. Este desvio, que se dá unicamente no eritrócito, não é energeticamente interessante uma vez que não há qualquer ganho de ATP, no entanto é a única via de formação de 2,3-DPG, um importante regulador da afinidade do O₂ para a hemoglobina.

A formação de 2,3-DPG é altamente dependente da concentração de iões H⁺ uma vez que estes inibem a DPG-mutase e estimulam a DPG-fosfatase. Isto significa que um aumento do pH provoca um aumento da concentração de 2,3-DPG e este, por sua vez, uma diminuição da afinidade do oxigénio pela hemoglobina. (Beutler *et al*, 2010)

4.2 - Via das pentoses fosfato e metabolismo do glutationa

Ao contrário da glicólise anaeróbia, esta via oxidativa não produz ATP. A sua principal função é a redução de NADP⁺ a NADPH (Figura 9). A quantidade de glicose que passa nesta via alternativa é regulada pela quantidade de NADP⁺ disponível para redução, sendo que, o NADPH é posteriormente utilizado na redução da glutatona a glutatona reduzida (GSSG → 2GSH) formando-se novamente NADP⁺. (Beutler *et al*, 2012; Von Lohneysen *et al*, 2012). Grande parte da glutatona do eritrócito é mantida na sua forma reduzida pelo NADPH, por intermédio da glutatona redutase. (Figura 9) O metabolismo do glutationa permite manter o ambiente reduzido na célula, sendo que a glutatona reduzida é o composto antioxidante mais importante na célula. (Pandey *et al*, 2009) Em ambientes oxidativos, o GSH é reversivelmente oxidado a GSSG protegendo as células contra espécies reactivas de oxigénio. A capacidade protectora é devida à elevada nucleofilicidade dos seus grupos –SH e à elevada reactividade entre os grupos tiol e os radicais livres. O GSH é substrato ou cofactor de várias enzimas anti-oxidantes, das quais se destaca a GSH peroxidase que tem igualmente um efeito protector, na conversão do peróxido de hidrogénio em água. (figura 9) (McMullin *et al*, 1999; Pandey *et al*, 2009)

Em suma, o metabolismo eritrocitário é um mecanismo glicolítico complexo, intrincado, de estímulos e inibições enzimáticas. Se alguma das onze enzimas da via glicolítica falhar, pode determinar a inviabilidade do eritrócito e patologia hemolítica. (Greer *et al*, 2009; Von Lohneysen *et al*, 2012)

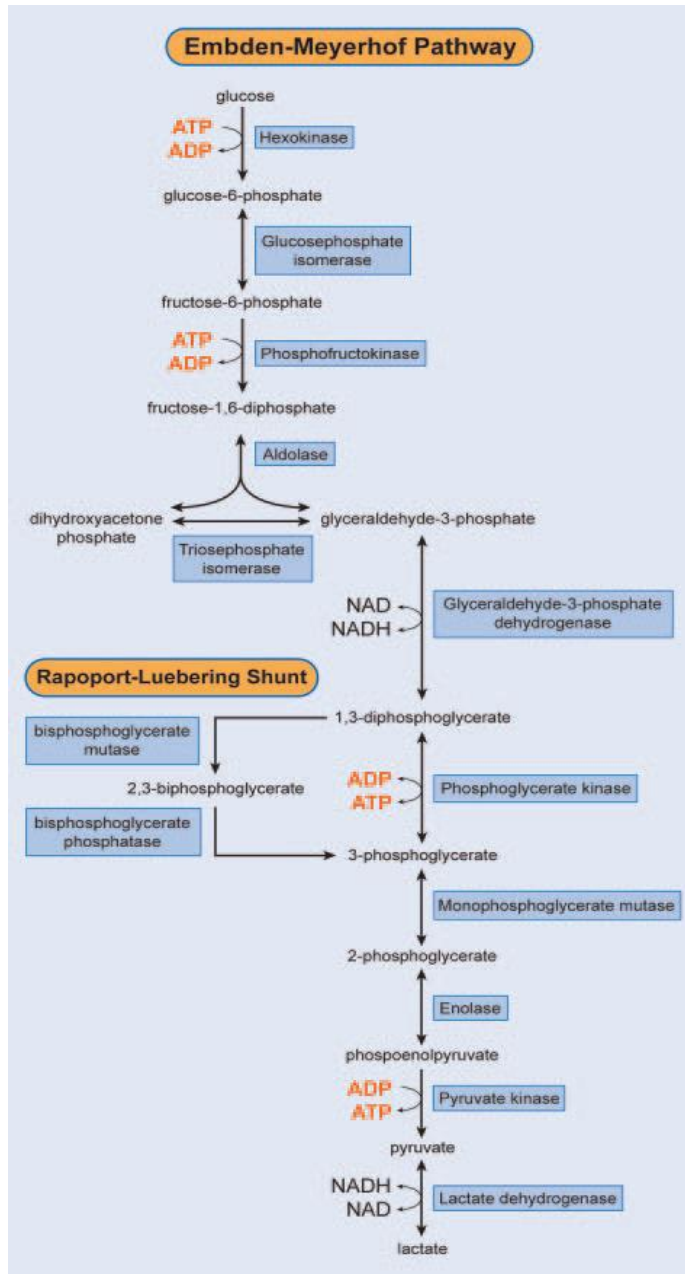


Figura 8 – Esquema da via de Embden-Meyerhof e do desvio de Rapoport-Luebering. Adaptado de Wijk *et al*, 2012

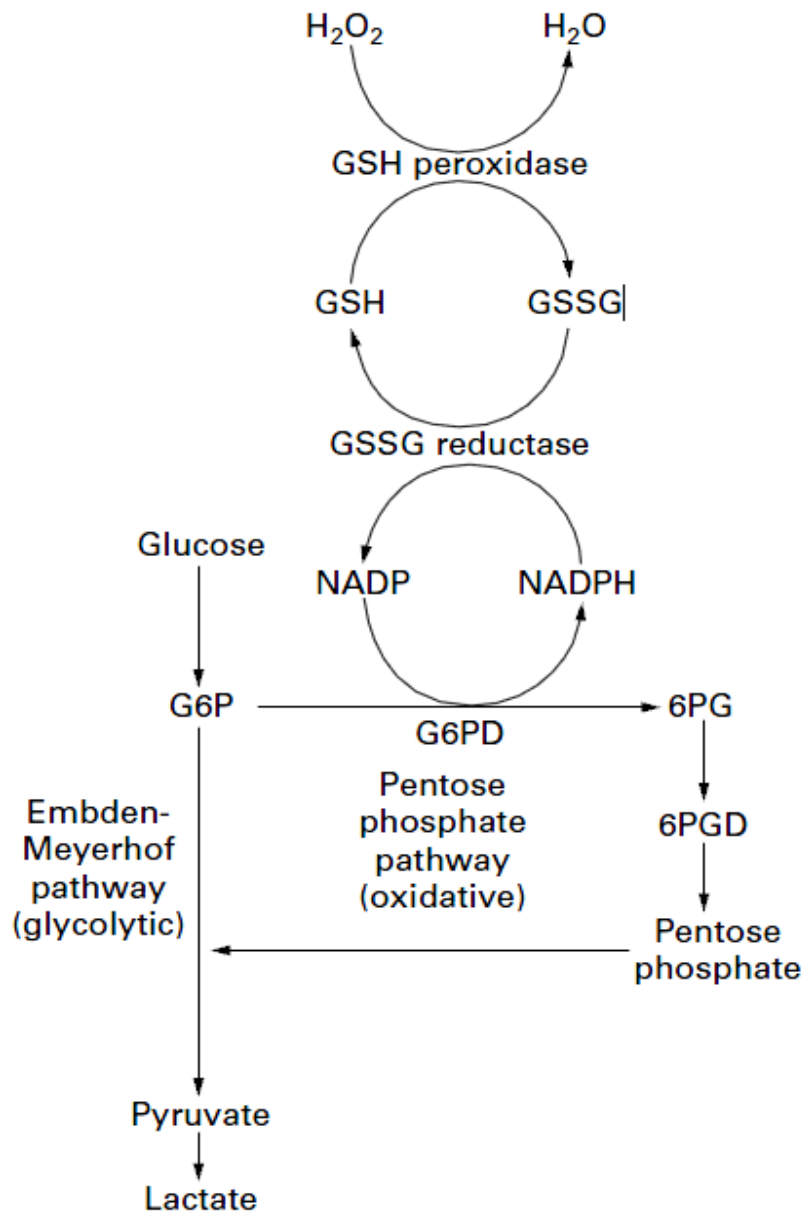


Figura 9 – Esquema da Via das Pentoses fosfato. Adaptado de McMullin HF, 1999

5 - Envelhecimento eritrocitário

O eritrócito humano tem um tempo de vida de cerca de 120 dias, sendo depois removido da circulação. A remoção do eritrócito senescente é feita por eritrofagocitose, maioritariamente pelos macrófagos do baço, mas também do fígado e da medula óssea. (Wang *et al*, 2010; Gottlieb *et al*, 2012; Delaby *et al*, 2012)

A remoção fisiológica, dependente da idade dos eritrócitos, é um processo eficiente e bem regulado. (Dinkla *et al*, 2012) É caracterizado pela diminuição do volume da célula, alterações estruturais da membrana, que conduzem à vesiculação da membrana, exposição de fosfatidilserina no folheto lipídico plasmático e redução do ácido siálico na superfície membrana. (Antonelou *et al*, 2011) Há também uma diminuição da actividade metabólica, que leva ao aumento de danos oxidativos, por depleção da via das pentoses fosfato e redução da actividade da via de Embden-Meyerhof. Os níveis de ATP disponível diminuem, levando a uma deficiência energética, que resulta na diminuição das actividades dependentes de ATP. (Santos-Silva A, 1995; Gottlieb *et al*, 2012).

Apesar de a degradação metabólica significar uma perda de eficiência do eritrócito, é de referir que, quando o eritrócito é fisiologicamente removido da circulação, os baixos níveis de ATP, metabolitos e actividades enzimáticas não justificam a sua remoção. O que determina a remoção e morte do glóbulo vermelho é a sua transformação numa célula imunologicamente *non-self*, por alterações na membrana e/ou exposição de determinantes antigénicos que são reconhecidos como *non-self* pelo sistema fagocítico. (Arese *et al*, 2005)

Do ponto de vista metabólico, o envelhecimento eritrocitário é acompanhado de variações na glicólise, tanto pela via de Embden-Meyerhof como pela via das pentoses fosfato. A redução da actividade da via de Embden-Meyerhof resulta na diminuição do ATP disponível, com diminuição de actividade das ATPases e, portanto, redução da actividade bomba de sódio/potássio, de transporte de Ca^{2+} e Mg^{2+} e de transporte de GSSG. (Santos-Silva A, 1995) A diminuição da actividade desta via traduz-se também na diminuição da concentração de 2,3-DPG, uma vez que o desvio de Rapoport-Luebering será igualmente afectado. Como já foi anteriormente referido, a diminuição de 2,3-DPG compromete a função da hemoglobina, de distribuição do oxigénio pelos tecidos. (Beutler *et al*, 2010)

Com o envelhecimento da célula, a protecção contra espécies reactivas de oxigénio vai diminuindo, uma vez que há uma diminuição da síntese de GSH pela via gutatíon sintetase e gama glutamil cisteína sintetase (enzimas dependentes de ATP) e

que há um aumento de GSSG. A diminuição da actividade da GSH leva à formação de dissulfuretos mistos provenientes de grupos sulfridrilo oxidados que a GSH não teve capacidade para reduzir. Tanto a GSSG como os dissulfuretos mistos formados têm capacidade de inibir a hexocinase limitando a via glicolítica. (Beutler *et al*, 2010; Santos-Silva A, 1995; Imanishi *et al*, 1985)

A via das pentoses fosfato, apesar de apenas representar 10% do metabolismo, constitui a única fonte de NADPH (Figura 9) sendo fulcral na defesa antioxidante. É de referir, igualmente, que além da diminuição da actividade enzimática da célula por perda de conteúdo devido à vesiculação da membrana (Willekens *et al*, 2008), a actividade da glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) na célula senescente está naturalmente reduzida, diminuindo os níveis de NADPH e a eficácia do sistema de protecção antioxidante do glóbulo vermelho. (Arese *et al*, 2005) A defesa antioxidante é fulcral para a sobrevivência do eritrócito, tendo em conta que as espécies reactivas de oxigénio (ROS) se formam continuamente na célula por autoxidação da Hb. Na ligação do O₂ à hemoglobina, formando-se a oxi-Hb, um electrão do Fe²⁺ é partilhado com o O₂, formando-se um anião superóxido. Este electrão partilhado retorna para o ferro quando o oxigénio é libertado. No entanto, há uma fracção de electrões que não retornam ao ferro, formando-se ião O₂⁻ (Arese *et al*, 2005), que é facilmente transformado em H₂O₂ pela enzima superóxido dismutase; (Gaetani *et al*, 1996; Arese *et al*, 2005)

A formação de hemicromos ou subprodutos do heme, levam igualmente à produção de espécies oxidantes lesivas para a célula. A formação de espécies reactivas de oxigénio pode ocorrer pelas reacções de Fenton e Haber-Weiss. A redução do Fe³⁺ do hemicromo pelo O₂⁻ a Fe²⁺ (O₂⁻ + Fe³⁺ → O₂ + Fe²⁺) catalisa a reacção de Fenton (H₂O₂ + Fe²⁺ → OH⁻ + OH[·] + Fe³⁺). A reacção de Haber-Weiss é igualmente catalisada pelo hemicromo férrico resultando, de forma semelhante à reacção de Fenton, na formação do radical hidroxilo (O²⁻ + H₂O₂ → OH⁻ + OH[·]). (Arese *et al*, 2005)

Vários tipos de espécies oxidantes (espécies reactivas de oxigénio (ROS) e espécies reactivas de azoto (RNS)) são produzidos endogenamente pela linha granulocítica, tais como NO e OH[·]. (Rice-Evans *et al*, 1987) Outros oxidantes exógenos, tais como drogas e fármacos podem contribuir, ainda que de forma menos extensa, para a formação e acumulação de agentes oxidantes que podem ter uma acção oxidativa sobre os GV.

Todos estes factores oxidantes tornam-se determinantes se houver diminuição da produção de NADPH, como acontece por envelhecimento do eritrócito. A diminuição da actividade da catalase, favorece a acumulação de H_2O_2 na célula; a redução da actividade da enzima glutatona redutase, conduz a um menor potencial redutor na forma de glutatona reduzida. (Winterbourn *et al*, 1990)

Em suma, com a senescência do eritrocito e no que ao desvio das pentoses fosfato diz respeito, o glóbulo vermelho perde poder na luta anti-oxidante devido a uma actividade enzimática mais baixa de G6PD e a uma menor produção de NADPH, que estão directamente ligados com a diminuição de eficácia do metabolismo do glutatião.

A diminuição da actividade metabólica por senescência também é sentida fisicamente a nível da membrana. A vesiculação, que segundo Willekens e colaboradores (2008) determina a perda de cerca de 15 a 20% de membrana, é acompanhada por uma redução nos níveis de ATP, que levam à falência dos transportadores de electrólitos, que necessitam de energia para o seu funcionamento. A perda de volume e desajuste hídrico, resulta num aumento da densidade citoplasmática do eritrócito, sendo que a perda de porções de membrana é acompanhada de, essencialmente, perda de fosfolípidos e colesterol. (Willekens *et al*, 2008; Pandey *et al*, 2010) O aumento da densidade citoplasmática significa perda de deformabilidade da célula, favorecendo a sua remoção a nível do baço. (Beutler *et al*, 2010)

Os lípidos membranares, à semelhança de outros tipos de moléculas existentes no eritrócito, são um alvo das espécies reactivas de oxigénio. A reacção destas com os lípidos membranares resulta na formação de lipoperóxidos, tais como o malonildialdeído (MDA) (Santos-Silva A, 1995), o produto final da peroxidação lipídica, subprodutos como o 4-hidroxi-2,3-trans-nonenal (HNE), isoprostanos e oxisterois. O MDA reage com os grupos amina dos fosfolípidos, proteínas e ácidos nucleicos, promovendo a sua desestruturação, o que pode contribuir para a identificação destas pelo sistema imune e para a sua remoção. (Pandey *et al*, 2010)

Os hemicromos, atrás referidos como sendo fontes de ROS, podem, de forma semelhante aos ROS, serem uma fonte de elementos agressivos para a membrana. As heminas, grupos heme livres na forma oxidada, que são facilmente libertados pela met-Hb ou hemicromos, ligam-se à membrana eritrocitária provocando depleção de potássio, desequilíbrio osmótico, intumescimento celular, dissociação da espectrina, actina e proteína 4.1, agregação da banda 3, desestabilizando a estrutura celular.

Provoca igualmente a exteriorização dos resíduos de fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, promovendo o seu reconhecimento pelo sistema imune. (Arese *et al*, 2005)

As lesões oxidativas não se limitam aos constituintes lipídicos, pelo contrário, uma das características do envelhecimento das células do organismo é o ataque oxidativo a todas as macromoléculas e consequente acumulação de danos. (Pandey *et al*, 2010) As proteínas são os elementos celulares mais afectados por compostos oxidantes, reagindo rápida e extensivamente com ROS e outros radicais oxidantes. Os ROS podem oxidar as cadeias laterais de aminoácidos, com formação de ligações entre os resíduos proteicos, ou determinar a fragmentação das proteínas. (Berlett *et al*, 1997; Pandey *et al*, 2010) Os eritrócitos podem também sofrer a acção de enzimas proteolíticas a nível dos sinusóides do baço, fígado e medula óssea. Estas alterações tornam-se importantes no processo de senescência e remoção do eritrócito, uma vez que as enzimas proteolíticas podem favorecer a formação de antigénios de senescência.

O domínio citoplasmático da banda 3 é considerado um local de ancoragem de várias proteínas, tais como a proteína 4.2, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, fosfofrutocinase, hemoglobina e tirosina cinase, sendo, por isso, considerada um local importante de organização da célula. (Arese *et al*, 2005) A associação de hemicromos e/ou met-Hb com o domínio citoplasmático da proteína banda 3 leva à formação de polímeros de banda 3 de alto peso molecular, que são reconhecidos por auto-anticorpos anti-banda 3. (Waugh *et al*, 1985).

Vários autores tentaram clarificar de que forma se processa o reconhecimento e fagocitose de eritrócitos senescentes ou danificados por fagócitos circulantes. Kay e seus colaboradores, (1988) sugeriram que há formação de um neoantigénio de senescência pela agregação e proteólise da banda 3, enquanto outros (Low *et al*, 1981, 1991; Lutz *et al*, 1987, 1988) defendem que a exposição do neoantigénio de senescência surge da agregação da banda 3 resultante da lesão oxidativa e subsequente opsonização. Contudo, são de opinião unânime que os agregados de banda 3 ligam anticorpos natural anti-banda 3 do tipo IgG, promovendo a fixação do complemento e levando assim à sua remoção por fagocitose pelos fagócitos do SRE. (Lutz *et al*, 1987; Kay *et al*, 1988; Lutz *et al*, 1988; Low, 1991; Arese *et al*, 2005)

A redução do ácido siálico da membrana e o envelhecimento eritrocitário estão também relacionados, uma vez que os eritrócitos mais velhos apresentam menor conteúdo deste na membrana levando redução da carga negativa dos eritrócitos. (Vaysse *et al*, 1986). A redução da carga negativa dos eritrócitos, favorece a

agregação e adesão eritrocitária, nomeadamente a nível do SRE, promovendo o reconhecimento das células senescentes pelos macrófagos. (Kolb *et al*, 1978; Vaysse *et al*, 1986; Dhermy *et al*, 1987)

Em suma, a depleção metabólica do eritrócito, a perda de deformabilidade da membrana, com exposição da fosfatidilserina, a lesão oxidativa de vários componentes proteicos e lipídicos e a formação de polímeros de alto peso molecular que se vão formando ao longo do tempo de vida dos eritrócitos, fazem com que o sistema imune os reconheça como senescentes, eliminando-os da circulação.

CAPITULO II - Metodologias para o estudo do mecanismo de senescência e remoção.

1 – Marcadores de senescência do eritrócito

Condiderando que os eritrócitos mais velhos experimentaram maiores perdas de membrana, tornando-se menos volumosos e mais densos, a separação dos eritrócitos com diferentes idades pode ser efectuada por centrifugação em gradientes de densidade. (McMullin, 1999; Fucharoen *et al*, 2011)

As alterações físicas e químicas a que o eritrócito é sujeito, fornecem bons marcadores e bons alvos de estudo de senescência. Vários métodos têm sido sugeridos para o estudo da senescência eritrócitária e do envelhecimento celular de diferentes tipos celulares do organismo. (Pandey *et al*, 2010). Existem marcadores fiáveis e reprodutíveis que permitem avaliar se o glóbulo vermelho se encontra em processo de senescência, tais como a exteriorização da fosfatidilserina, diminuição da expressão de CD47 na membrana, actividade da esterase diminuída, aumento dos níveis de espécies reactivas de oxigénio (Gottlieb *et al*, 2012) e consequente aumento de produtos da peroxidação lipídica, tais como o MDA e HNE (Pandey *et al*, 2010), entre outros. Estudos recentes têm revelado novas moléculas como biomarcadores de senescência, como a apolipoproteína J/Clusterina que se encontra reduzida em eritrócitos senescentes. (Antonelou *et al*, 2011).

O estudo de marcadores de stress oxidativo e de senescência *in-vivo*, como os referidos anteriormente, são acompanhados pelo estudo dos processos de remoção do eritrócito, tanto *in-vivo* como *in-vitro*, que podem fornecer informações importantes acerca do comportamento do eritrócito senescente, dos mecanismos fagocíticos de remoção e em que condições acontecem. (Antonelou *et al*, 2011; Gottlieb *et al*, 2012) Neste tipo de estudos são utilizados modelos animais, cujos eritrócitos são processados e/ou danificados de maneira a exhibir comportamento e características de eritrócitos senescentes. Gottlieb e seus colaboradores, simularam a senescência eritrocitária em ratos, por hipertransfusão, que inibe a eritropoiese, e estimularam a eritrofagocitose com o objectivo de avaliar o tipo de sinais que desencadeia a actividade fagocítica dos macrófagos. (Gottlieb *et al*, 2012)

2 – Estudos dos mecanismos de senescência

2.1 – Técnicas mais utilizadas

Um dos obstáculos ao estudo da senescência eritrocitária advém da dificuldade em separar as células de diferentes idades numa população circulante. A maior parte das metodologias de separação que têm vindo a ser utilizadas baseiam-se no facto de o envelhecimento eritrocitário levar a um aumento de densidade e a uma redução do volume do eritrócito. (Santos-Silva *et al*, 1995) Grande parte dos trabalhos desenvolvidos nesta área utilizam processos de separação por centrifugação, separando as células de acordo com a sua densidade. Métodos de centrifugação simples, assim como a utilização de gradientes de densidade preparados com albumina, stractan, dextrans, ficol e percoll têm vindo a ser largamente utilizados. (Bosch *et al*, 1992; Santos-Silva *et al*, 1995) O gradiente de percoll tem vindo a revelar-se o método mais eficiente (Bosch *et al*, 1992) apresentando várias vantagens sobre as restantes técnicas. O Percoll é constituído por partículas de sílica coloidal revestidas com polivinilpirrolidona o que lhe confere baixa viscosidade, pressão oncótica e atoxicidade. Estas características permitem um fácil ajustamento às condições fisiológicas, assim como a formação de gradientes lineares e descontínuos. (Santos-Silva *et al*, 1995)

Contudo, o advento de novas tecnologias, tais como a citometria de fluxo, os avanços na nanotecnologia e a descoberta de novos marcadores de senescência, vieram munir os investigadores de novas ferramentas no estudo do envelhecimento do glóbulo vermelho. (Bosch *et al*, 1992; Santos-Silva *et al*, 1995; Gifford *et al*, 2006; Antonelou *et al*, 2011) Algumas dessas técnicas serão abordadas seguidamente.

2.1.1 – HEMA *Human Erythrocyte Microchannel Analyser*

Os desenvolvimentos tecnológicos conseguidos nas últimas décadas, permitem ao investigador possuir mais e melhores condições de estudo nas mais variadas áreas, incluindo a hematologia. Assim, o uso de micro-dispositivos no estudo de sistemas biológicos tem vindo a aumentar, uma vez que estes permitem medições de vários parâmetros e de alto rendimento em células individuais. (Gifford *et al*, 2006) Gifford *et al* (2003) desenvolveram um dispositivo denominado de *Human Erythrocyte*

Microchannel Analyser (HEMA) (Figura 10) que permite a avaliação de vários parâmetros em eritrócitos individuais com o auxílio de marcação fluorescente. Com este dispositivo de silicone faz-se passar um fluxo da suspensão eritrocitária pelos seus canais, (Figura 10), ficando alguns eritrócitos presos em canais específicos, onde serão efectuados os estudos pretendidos. (Gifford *et al*, 2003)

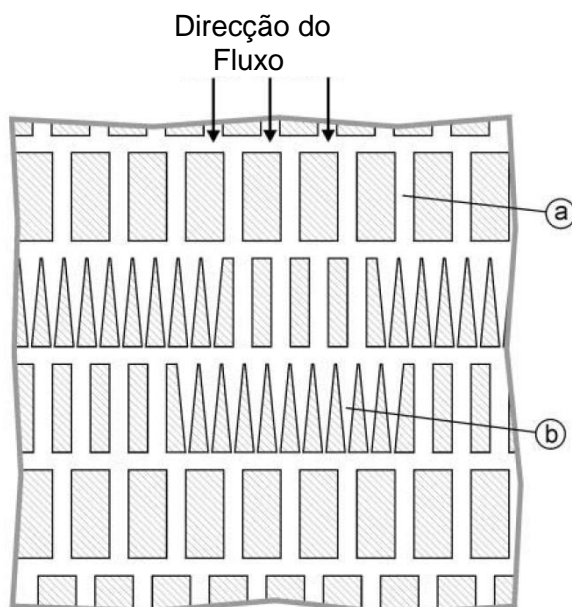


Figura 10 – Esquema do HEMA, um dispositivo com 10 mm X 5 mm, (neste esquema apenas está representada a parte central.) Os canais (a) apresentam 6 μm de largura em que os eritrócitos passam facilmente. Já os canais (b) apresentam uma forma de cunha com a terminação afunilada para que possam prender as células no seu interior. Em todas as colunas de canais existem canais abertos para que o fluxo de eritrócitos não pare. Adaptado de (Gifford *et al*, 2003).

Com o auxílio deste dispositivo (Figura 11), Gifford *et al* (2006) efectuaram um estudo sobre as modificações eritrocitárias ao longo do tempo de vida do eritrócito, desde o mais novo reticulócito até ao mais velho eritrócito senescente. Com o auxílio de marcação fluorescente do ácido ribonucleico (RNA) (Figura 11B), aumentada no reticulócito, e a marcação da fosfatidilserina à superfície, marcando a exteriorização da fosfatidilserina, que é um sinal de senescência, conseguiram identificar os reticulócitos, eritrócitos lançados recentemente na circulação, e os glóbulos vermelhos que estão próximos da remoção. Foi também possível medir o volume e a concentração de hemoglobina com o auxílio do HEMA. A área e volume eritrocitários

são obtidos pela posição do eritrócito no canal (Figura 11A) em cunha do dispositivo, cujas, dimensões se conhecem. A concentração relativa de hemoglobina foi determinada pela análise da percentagem de luz transmitida pela célula em relação a uma porção vazia do canal. Avaliando a concentração média de Hb, medida por outro aparelho, transformaram os valores relativos em valores absolutos.

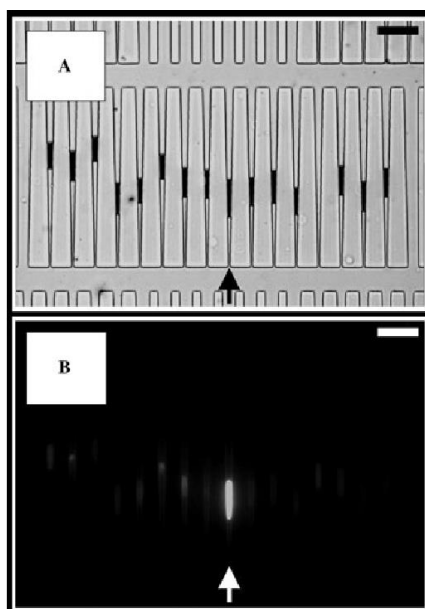


Figura 11 – A – Eritrócitos “presos” no interior dos canais em cunha. É possível medir a sua área e volume pelo espaço que ocupam dentro do canal. B – A marcação fluorescente do RNA permite visualizar o reticulócito assinalado com a seta.

Segundo os autores, a grande vantagem da utilização deste dispositivo é a possibilidade de trabalhar com sangue total sem modificações uma vez que, outras técnicas utilizadas no estudo do processo de senescência eritrocitária tais como administração de eritropoietina (EPO) e sangramento em massa alteram a composição sanguínea. (Waugh *et al*, 1997; Mairlbaur *et al*, 2000; Waugh *et al*, 2001)

No que diz respeito aos mecanismos de senescência, este trabalho aponta para que cerca de 17% de área de membrana e 15% de Hb são perdidos durante o envelhecimento eritrocitário e que cerca de 12% da área de membrana é perdida durante a maturação do reticulócito. Assim, a perda total de membrana é de cerca de 25%, o que está de acordo com o proposto por outros investigadores. (Linderkamp *et al*, 1982) De forma semelhante, os resultados relativos à Hb perdida durante a vida do glóbulo vermelho não está em desacordo com outros investigadores (Bosch *et al*, 1992; Willekens *et al*, 1997). Outro resultado importante foi a concordância da

exteriorização da fosfatidilserina com a remoção a curto prazo do eritrócito, estando de acordo com outros estudos que revelam a exteriorização da fosfatidilserina como sinal de senescência. (Low *et al*, 1985; Kuypers *et al*, 1998)

Em suma, o HEMA é um instrumento importante para os investigadores na área da senescência do eritrócito, uma vez que apresenta resultados fiáveis, de alto rendimento e permite a avaliação de vários parâmetros em simultâneo. (Gifford *et al*, 2006)

2.2 – Estudos *in vivo* e *in vitro* do mecanismo de eritrofagocitose

O envelhecimento eritrocitário, como já foi referido, é acompanhado de várias alterações físico-químicas da célula. Depleção metabólica com diminuição da actividade enzimática nomeadamente da aspartato amino-transferase e da esterase, exteriorização da fosfatidilserina, diminuição da deformabilidade da membrana, níveis decrescidos de ácido siálico membranar, ligação de auto-anticorpos anti banda 3 e do determinante antigénico CD47 (Bratosin *et al*, 1998) e danos oxidativos são algumas das alterações físico-químicas sentidas pelo eritrócito ao longo da vida. Contudo, a contribuição relativa de cada uma destas alterações para a eritrofagocitose (EFC) não são ainda conhecidas. (Gottlieb *et al*, 2012)

Com o objectivo de clarificar esta questão, vários estudos *in vitro* com gluteraldeído (Fens *et al*, 2010), ribavirina (Homma *et al*, 2009), cálcio (Shapiro *et al*, 1993), longas incubações com agentes oxidantes (Jang *et al*, 2011), permitiram verificar que, efectivamente, estes agentes agressores simulavam estados de senescência eritrocitária, uma vez que despoletavam uma grande resposta eritrofagocítica nos macrófagos em cultura celular, provenientes de sangue periférico, peritoneu ou de medula óssea.

Em 2012, foi lançada a hipótese (Gottlieb *et al*) de que os mecanismos de EFC de eritrócitos danificados *in vitro* poderiam ser diferentes dos mecanismos de EFC de eritrócitos fisiologicamente envelhecidos *in vivo*, sugerindo que a EFC depende de determinantes de senescência eritrocitária e do ambiente fisiológico dos macrófagos. Estes autores realizaram um estudo com eritrócitos envelhecidos fisiologicamente, e estudaram a EFC *in vivo* e *in vitro*. Para a obtenção de eritrócitos fisiologicamente envelhecidos *in vivo*, utilizaram eritrócitos de ratinho hiper-transfundidos (Figura 12). A hipertransfusão inibe a produção de eritropoietina e, portanto, a produção de novos eritrócitos, aumentando, por consequência, a quantidade de eritrócitos envelhecidos em circulação. Para a avaliação da idade eritrocitária, os eritrócitos foram biotinilados

no início e posteriormente marcados com fluoróforos para a fosfatidilserina e para o CD47. Com o mesmo objectivo, foi avaliada a actividade da esterase e os níveis de espécies reactivas de oxigénio, também por intermédio de marcadores fluorescentes. Assim foi possível avaliar a quantidade de células mais “velhas”, uma vez que estas estavam biotililadas. As células foram depois analisadas por citometria de fluxo e comparadas com um grupo controlo. (Figura 12)

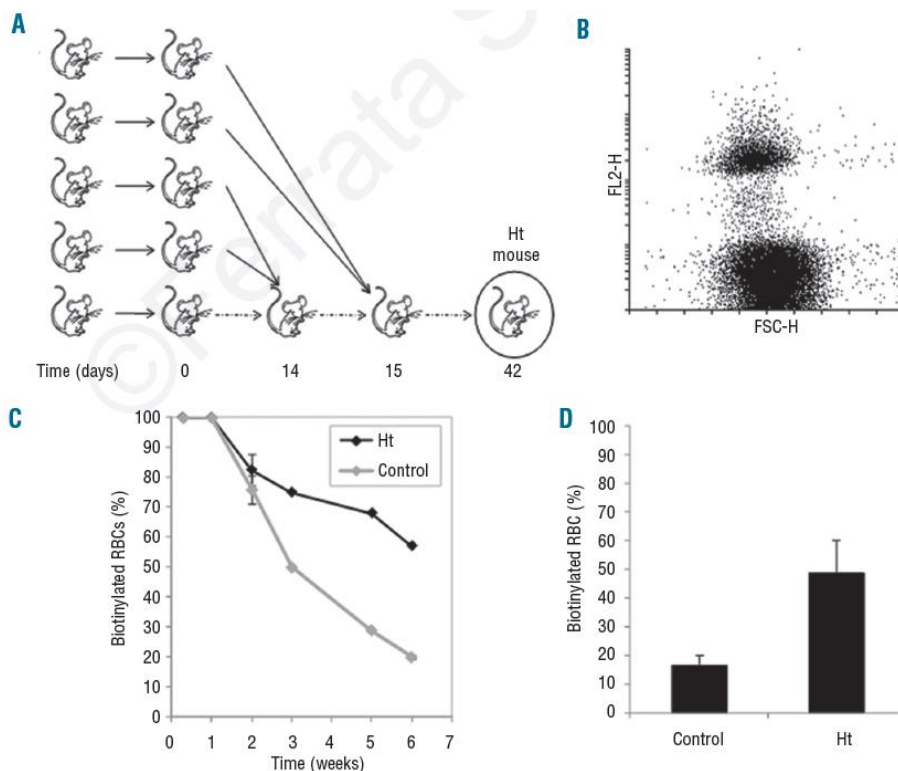


Figura 12 – (A) Representação esquemática do protocolo de hiper-transusão. (B) Células sanguíneas de ratinhos controlo (não hiper-transfundidos) biotililadas e analisadas por fluorescência após 6 dias (C) Percentagem de células biotililadas ao longo do tempo de ratinhos híper-transfundidos (ht) e ratinhos controlo (D) Percentagem de células sanguíneas biotililadas após 6 semanas de ratinhos ht e controlo. Adaptado de Gottlieb *et al*, 2012

Com este material, obtido em condições fisiológicas, foram avaliar a EFC *in vivo* e *in vitro*.

Para a EFC *in-vivo* os eritrócitos provenientes de ratinhos hiper-transfundidos e de ratinhos controlo foram marcados com o fluorocromo PKH26 injectado intraperitonealmente. Quatro dias após a injeção, os baços dos ratinhos foram

retirados, foram feitos cortes com a espessura de 12 μ m e visualizados no microscópio de fluorescência.

Os eritrócitos utilizados para avaliação *in vitro* provenientes de ratinhos hiper-transfundidos e controlo não sofreram qualquer tipo de marcação, no entanto os eritrócitos controlo foram tratados com butil-hidroperóxido (BHP) e ionóforo de cálcio para exteriorização da fosfatidilserina. Os macrófagos provenientes de culturas primárias de macrófagos de medula óssea e do baço, foram cultivados até ao número de 1 milhão de células por mililitro. Os eritrócitos de ambos os grupos foram, então, adicionados às culturas dos macrófagos e incubados a 37^o (30 minutos no caso dos macrófagos esplénicos e 90 minutos no caso dos macrófagos da medula). Os eritrócitos não fagocitados foram lisados com um tampão hipotónico e os macrófagos foram lavados e corados com Giemsa. Os macrófagos com pelo menos um eritrócito fagocitado foram contados.

O enriquecimento com células senescentes por hiper-transfusão foi bem sucedido, uma vez que às 6 semanas as células enriquecidas apresentavam cerca de 49% de células biotiniladas (senescentes), e os controlos apenas apresentavam cerca de 14%. Assim, pelo menos 49% das células enriquecidas tinham 6 semanas. No que diz respeito aos parâmetros de envelhecimento, estes foram avaliados, comparando a fosfatidilserina exteriorizada, a expressão de CD47, a actividade da esterase do citoplasma e a concentração de ROS dos eritrócitos biotinilados (senescentes) das populações hiper-transfundidas e controlo. Concluíram que os parâmetros de envelhecimento eram semelhantes, ou seja, os eritrócitos senescentes dos ratinhos hiper-transfundidos e os eritrócitos senescentes dos ratinhos controlo eram semelhantes. (Figura 13 e 14)

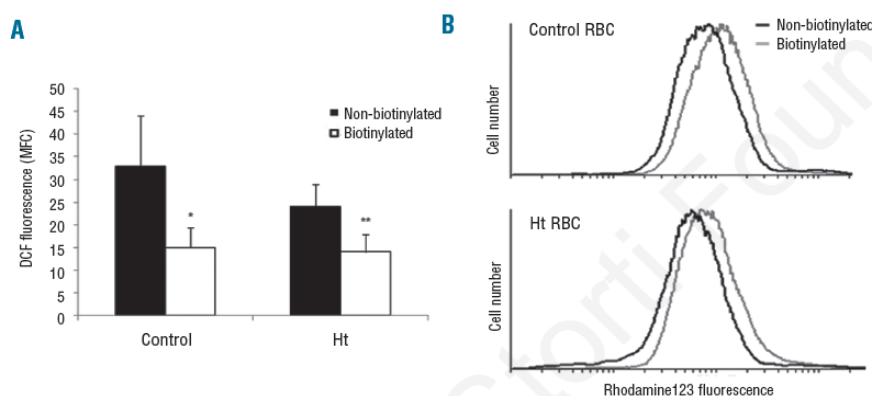


Figura 13 – Os níveis de ROS dos eritrócitos senescentes (na imagem os *biotinylated*) são semelhantes. (A) Marcação fluorescente elaborada com diclorofluoresceína (DCF) e (B) com rodamina 123 para o mesmo parâmetro. Adaptado de Gottlieb *et al*, 2012

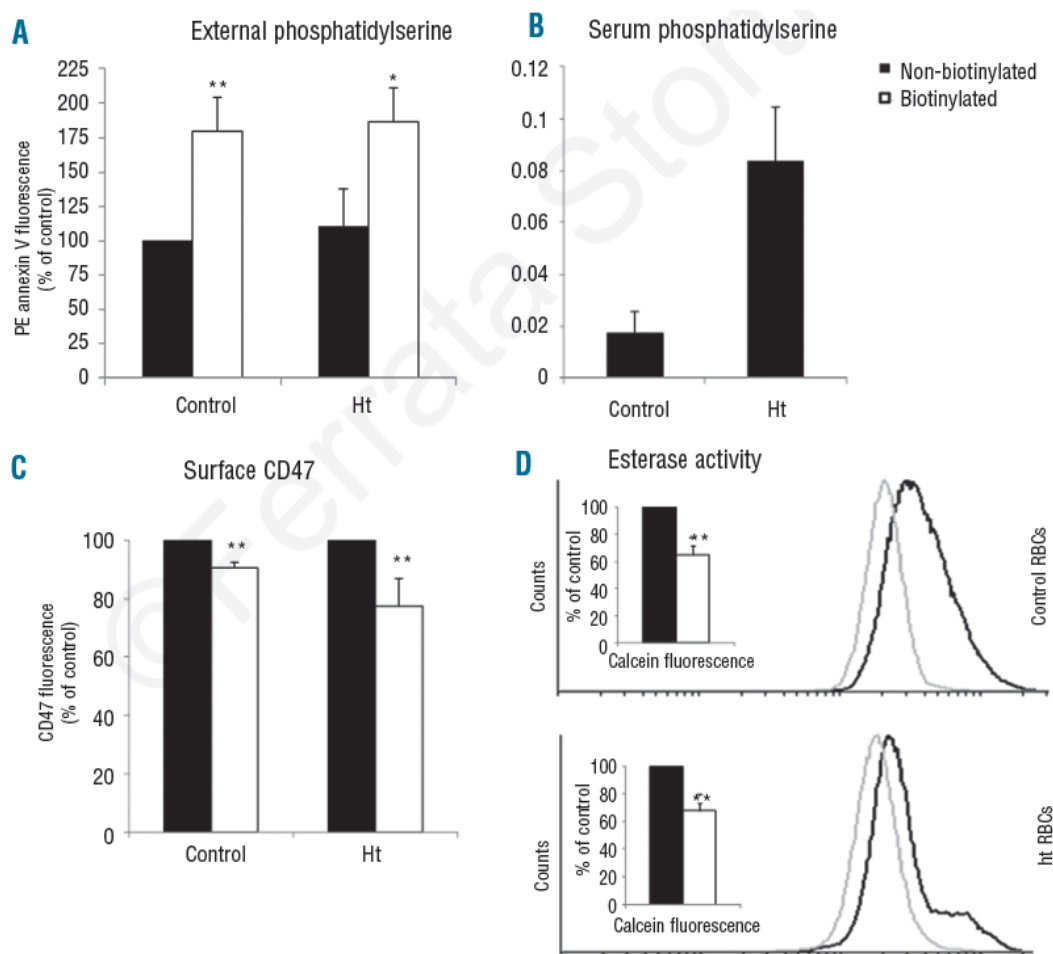


Figura 14 – Os níveis de marcação de fosfatidilserina exteriorizada (A, B), CD47 (C) e actividade da esterase (D) são semelhantes entre os eritrócitos senescentes (na imagem os *Biotinylated*). O desnível de fosfatidilserina do soro é cerca de 5 vezes maior no soro dos eritrócitos enriquecidos do que no controlo. Os autores sugerem que esta diferença reflecte a maior quantidade de eritrócitos senescentes no sangue hiper-transfundido. Adaptado Gottlieb *et al*, 2012

Finalmente, os resultados mais interessantes estão relacionados com a EFC *in-vivo* e *in-vitro*. Dada a semelhança entre os eritrócitos senescentes hiper-transfundidos e os eritrócitos controlo era de esperar que a EFC dos eritrócitos senescentes provenientes de ratinhos hiper-transfundidos fosse bem sucedida e isso verificou-se. É

igualmente de referir que a EFC se dá maioritariamente na periferia da polpa vermelha do baço adjacente à polpa branca.

Nos estudos *in-vitro* os eritrócitos senescentes de ratinhos hiper-transfundidos e os eritrócitos danificados por BHP e ionóforo de cálcio foram colocados em placas com as culturas de macrófagos. Contudo, apenas os eritrócitos danificados *in-vitro* foram fagocitados, sendo que os eritrócitos envelhecidos fisiologicamente não foram fagocitados (Figura 15).

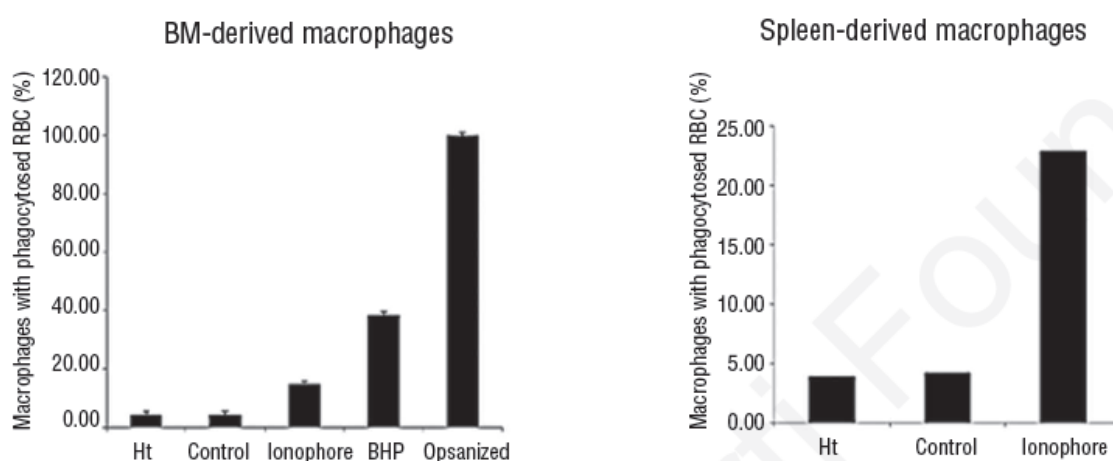


Figura 15 – Os macrófagos provenientes de cultura celular de macrófagos quer da medula óssea, quer do baço, apenas fagocitam eritrócitos tratados *in-vitro* com agentes que simulam senescência (ionóforo de cálcio, BHP e opsonizados). Os gráficos demonstram igualmente que os eritrócitos envelhecidos fisiologicamente por hiper-transfusão (Ht) e normalmente (control) não sofrem EFC *in-vitro*. Adaptado de Gottlieb *et al*, 2012

Em suma, os resultados sugerem que existem ainda factores desconhecidos, essenciais à EFC, que não são providenciados *in-vitro*. Assim, eritrócitos fisiologicamente envelhecidos sofrem eritrofagocitose *in-vivo* mas não *in-vitro*.

2.4 – Novos marcadores de senescência

A Apolipoproteína J/Clusterina (sCLU) é uma lipoproteína de alta densidade que está implicada em várias patologias associadas à idade, tais como, doenças neurodegenerativas, dano vascular, diabetes, senescência celular e tumorigénese. (Chi *et al*, 2008). Além de estarem intrinsecamente ligadas a processos de envelhecimento, estas doenças têm igualmente em comum o facto de terem como

factor etiológico o stress oxidativo. Antonelou e seus colaboradores (2011), propuseram a sCLU como um biosensor de stress oxidativo, devido ao facto de haver uma relação entre a sua concentração no citoplasma e na membrana do eritrócito, com marcadores típicos de senescência e de EFC. (Antonelou *et al*, 2011) Para este estudo foi usado sangue venoso de 45 indivíduos saudáveis, sendo que 37 eram não fumadores e os restantes 8 eram fumadores. Após a colheita do sangue, separaram os eritrócitos dos restantes elementos sanguíneos por filtração. Uma fracção destes eritrócitos foi lavada, e lisada, e a outra fracção foi marcada com biotina e oxidada com BHP. Os eritrócitos jovens e senescentes foram isolados por intermédio de um gradiente de densidade com Percoll. Foram feitas análises por imunoblot e por microscopia confocal, para avaliar e localizar a sCLU. Verificaram que esta se localizava maioritariamente na membrana e, em menor quantidade, no citoplasma (Figura 16); verificaram ainda que a diminuição da sCLU está relacionada com a senescência eritrocitária (Figura 17). Outro dado relevante foi a diminuição de sCLU eritrocitária em fumadores. (Figura 18)

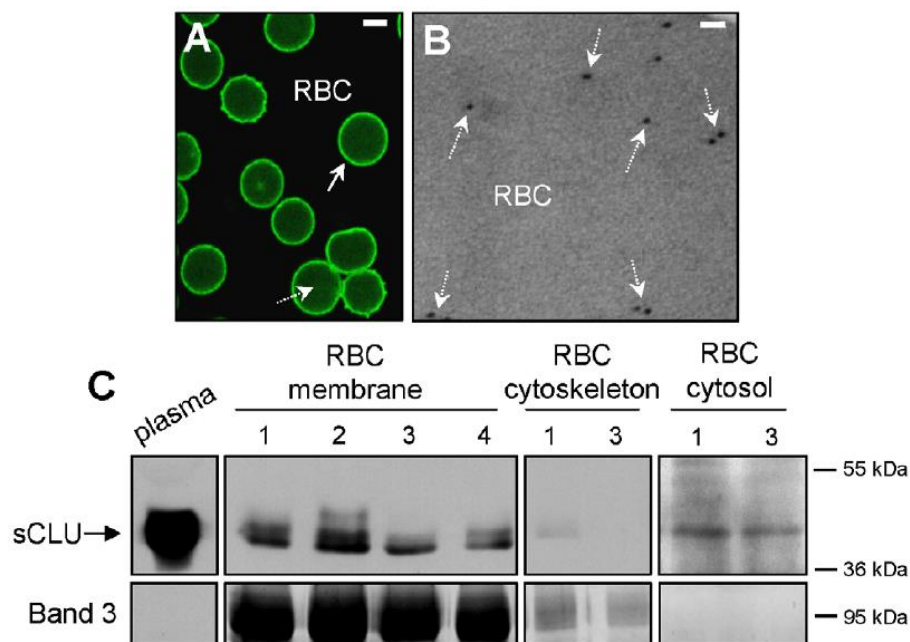


Figura 16 – (A) Como se pode verificar pela fluorescência verde, a sCLU encontra-se em maior concentração na zona da membrana do eritrócito. (B) Existe igualmente no citoplasma, no entanto, em menor quantidade. (C) Os dados de fluorescência são confirmados por imunoblot. Por comparação com a proteína banda 3, verifica-se que a sCLU está presente maioritariamente na membrana do eritrócito e, em menor quantidade, no citoplasma. Adaptado de Antonelou *et al*, 2011

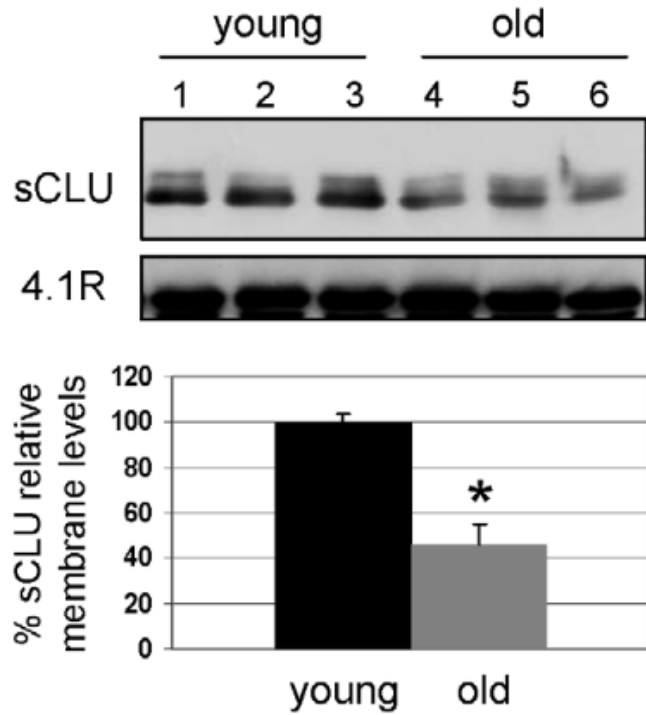


Figura 17 – A sCLU é um marcador de senescência eritrocitária, uma vez que se encontra diminuída nos eritrócitos mais envelhecidos (em cima) e pela percentagem relativa de sCLU nos eritrócitos jovens e envelhecidos (em baixo). Adaptado de Antonelou *et al*, 2011

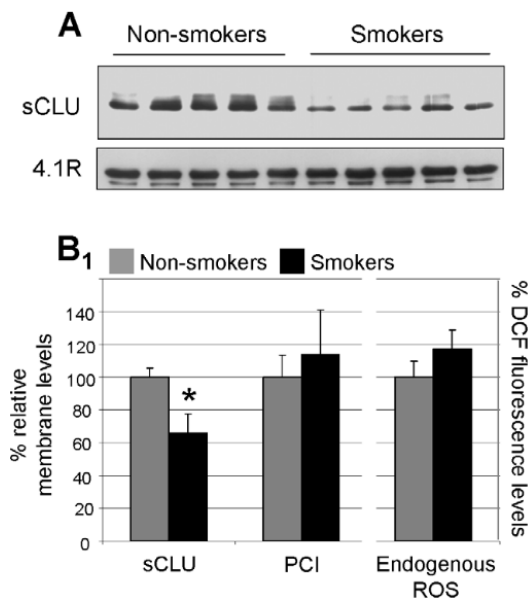


Figura 18 – Quantidades relativas de sCLU membranar em fumadores e não fumadores. Adaptado de Antonelou *et al*, 2011

Em suma, o trabalho de Antonelou e seus colaboradores provou que a sCLU é um novo marcador de senescência, uma vez que está diminuída em situações de envelhecimento eritrocitário e de stress oxidativo. Os resultados obtidos em fumadores sugerem que esta proteína tem funções activas na protecção do organismo contra agressores oxidativos. Assim, a Apolipoproteína J/Clusterina é um novo marcador de senescência eritrocitária.

2 – Conclusão

O eritrócito, devido à sua função de elevada importância no organismo humano, tem vindo a ser, cada vez mais, um alvo preferencial de estudo para os investigadores. Ao mesmo tempo, é um modelo excepcional para estudos metabólicos, uma vez que é um tipo celular fácil de obter não requerendo para isso, métodos invasivos. (Jamshidi *et al*, 2000, Kakhniashvili *et al*, 2004).

Hoje em dia conhecem-se de maneira mais aprofundada vários processos que ocorrem nos diversos tipos de membrana plasmática do organismo humano, graças ao estudo em modelos eritrocitários. Este é apenas um exemplo do vasto reportório de estudos efectuados em modelos eritrocitários que vão desde a genética até à descrição de modelos matemáticos do metabolismo. (Gallagher *et al*, 2008; Wilhelm *et al*, 2004)

Contudo, o elevado significado clínico que as patologias do eritrócito encerram, levam à necessidade de desvendar novas estratégias de estudo e diagnóstico, assim como descobrir novos marcadores e sinais mais sensíveis que assinalem o mau funcionamento do glóbulo vermelho, colocando a ciência em prol da clínica e das populações. Neste sentido, patologias da membrana eritrocitária tais como a esferocitose e eliptocitose hereditárias (Gallagher *et al*, 2008) e processos do envelhecimento eritrocitário, tais como a exteriorização da fosfatidilserina, estão relativamente bem estudadas (Matarrese *et al*, 2005). No entanto, a patobiologia genética e molecular de um grande número de doenças eritrocitárias é ainda desconhecida (Gallagher *et al*, 2008). Assim, apesar de já terem sido dados alguns passos importantes nesta área do saber, podemos antever um longo caminho ainda a percorrer pelos investigadores no sentido de desvendar os segredos da fisiologia do eritrócito, nomeadamente, no processo de envelhecimento e de remoção do eritrócito senescente.

3 – Bibliografia

- A P N A de Porto, Lammers AJJ, Bennink RJ, Berge IJM, Speelman P, Hockstra JBL. Assessment of splenic function. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 1465 – 1473.
- Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Trougakos IP, Papassider IS. Apolipoprotein J/Clusterin is a novel structural component of human erythrocytes and a biomarker of cellular stress and senescence. *PLoS ONE* 2011; 6 (10): e 26032.
- Arese P, Turrini F, Schwarzer E. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 2005; 16: 133-146.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272:20313-6. *Biophys.*, 2003; 84: 6238- 63838.
- Beutler E, Kaushansky K, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT. *Williams Hematology 8ª Edição*. McGraw Hill, 2010; cap. IV, VI
- Bonifácio SL, Novaretti MCZ. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, 2009; 31 (2): 104- 111.
- Bosch, F.H., Werre, J.M., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Huls, T.H., Willekens, F.L. & Halie, M.R. Characteristics of red blood cell populations fractionated with a combination of counterflow centrifugation and Percoll separation. *Blood*, 1992 79, 254–260.
- Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, Estaquier J, Huart JJ, Ameisen JC, et al. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocytes phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie*, 1998; 80(2):173-95
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Sawyer BG. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry Sixth Edition*; Saunders Elsevier, 2008
- Castagnola M, Messana I, Sanna MT, Giardina B. Oxygen-linked modulation of erythrocyte metabolism: state of the art. *Blood Transfus* 2010; 8 Suppl 3:53-58
- Chi KN, Zoubeidi A, Gleave ME Custirsen (OGX-011): a second generation antisense inhibitor of clusterin for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2008, 17: 1955–1962.
- Daleke DL. Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol*, 2008;15:191-195

- Darghouth D, Koehl B, Madalinsky G, Heilier JF, Bovee P, Xu Y, et al. Pathophysiology of sickle cell disease is mirrored by the red blood cell metabolome. *Blood*, 2011;117(6):e57-e66
- Delaby C, Rondeau C, Pouzet C, Willemetz A, Pilard N, Desjardins M, et al. Subcellular localization of iron and heme metabolism related proteins at early stages of erythrophagocytosis. *PLoS ONE*, 2012; 7 (7): e42199.
- Dhermy D, Simeon J, Wautier MP, Boivin P, Wautier JL, Role of membrane sialic acid content in the adhesiveness of aged erythrocytes to human cultured endothelial cells. *Bioch Bioph Acta*, 1987; 904:201-206
- Di Stasi AMM, Forte T, Giorgi M, Grimaldi P. Interactions of skeletal proteins with red blood cell membrane. *Ann Ist Super Sanità*, 1988; 24 (4): 591-59.
- Dinkla S, Novotny VMJ, Joosten I, Bosman GJCGM. Storage- induced changes in erythrocyte membrane proteins promote recognition by autoantibodies. *PLoS ONE*, 2012; 7 (8): e42250.
- Fens MH, Storm G, Pelgrim RC, Ultee A, Byrne AT, Gaillard CA, et al. Erythrophagocytosis by angiogenic endothelial cells is enhanced by loss of erythrocyte deformability. *Exp Hematol*, 2010; 38(4):282-91.
- Fens MHAM, van Wijk R, Andringa G, van Rooijen KJ, Dijkstra HM, Rasmussen JT, et al. A role for activated endothelial cells in red blood cell clearance: implications for vasopathology. *Haematologica*, 2012; 97 (4): 500 – 508.
- Fucharoen S, Winichagoon. Haemoglobinopathies in southeast asia. *Indian J Med Res*, 2011; 134 (4): 498-506.
- Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN: Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 1996;87:1595-1599.
- Gallagher PG, Mohandas N. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 2008; 112: 3939-3928.
- Gifford SC, Derganc J, Shevkopyas SS, Yoshida T, Bitensky. A detailed study of time-dependent changes in human red blood cells: from reticulocyte maturation to erythrocyte senescence. *Brit Haematol*, 2006 ;135:395–404
- Gifford SC, Frank MG, Derganc J, Gabel C, Austin RH, Yoshida T, et al. Parallel Microchannel-based measurements of individual erythrocyte areas and volumes. *Biophys*, 2003; 84:623-633

- Gottlieb Y, Topaz O, Cohen LA, Yakov LD, Haber T, Morgenstern A, et al. Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis in vivo but not in vitro. *Haematologica*, 2012; 97 (7): 994 – 1002.
- Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber Da, et al. *Wintrobe's Clinical Hematology* 12ª Edição. Lippincott Williams & Wikins, 2009 Vol.1
- Gutiérrez-Salinas J, Tovar LC, Méndez SG. Incremento en la concentración de óxido nítrico y metahemoglobina en eritrocitos *Rev Mex Patol Clin*, 2008; 55(1):21-28
- Homma M, Hosono H, Hasegawa Y, Kohda Y. Morphological transformation and phosphatidylserine exposure in erythrocytes treated with ribavirin. *Biol Pharm Bull*, 2009; 32(11):1940-2.
- Imanishi, H., Nakai, T., Abe, T., Takino, T. Glutathione metabolism in red cell aging. *Mech. Ageing Develop*, 1985; 32 :57
- Jang WH, Lim KM, Kim K, Noh JY, Kang S, Chang YK, et al. Low level of lead can induce phosphatidylserine exposure and erythrophagocytosis: a new mechanism underlying lead associated anemia. *Toxicol Sci* 2011; 122(1):177-84.
- Kakhniashvili DG, Bulla LA, Goodman SR. The human erythrocyte proteome. Analysis by ion trap mass spectrometry. *Moll. & Cell. Proteomics*, 2004; 3: 501-509.
- Kay MMB, Bosman GJCG, Johnson GJ, Beth AH: Band-3 polymers and aggregates, and hemoglobin precipitates in red cell aging. *Blood Cells*, 1988;14:275-289.
- Khan AA, Hanada T, Mohseni M, et al. Dematin and adducin provide a novel link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1. *J Biol Chem*, 2008;283:14600- 14609.
- Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. The Function of Catalase-bound NADPH. *The Biol Chem*, 1986; 262(2):660-666
- Kolb H, Schudt C, Kolb-Bachofen V, Kolb HA, Cellular recognition by rat liver cells of neuraminidase treated erythrocytes. *Exp Cell Res*, 1978; 113: 319-325
- Kuypers, F.A., Yuan, J., Lewis, R.A., Snyder, L.M., Kiefer, C.R., Bunyaratvej, A., Funcharoen, S., Ma, L., Styles, L., de Jong, K. & Schrier, S.L. Membrane phospholipid asymmetry in human thalassemia. *Blood*, 1998; 91, 3044–3051.

- Linderkamp, O. & Meiselman, H.J. Geometric, osmotic, and membrane mechanical properties of density-separated human red cells. *Blood*, 1982; 59, 1121–1127.
- Low, P.S., Waugh, S.M., Zinke, K. & Drenckhahn, D. The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science*, 1985; 227, 531–533.
- Lutz HU, Bussolino F, Flepp R, Fasler S, Stammler P, Kazatchkine MD, Arese P: Naturally occurring anti-band 3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987;84:7368-7372.
- Lutz HU, Fasler S, Stammler P, Bussolino F, Arese P: Naturally occurring anti-band 3 antibodies and complement in phagocytosis of oxidatively-stressed and in clearance of senescent red cells. *Blood Cells*, 1988; 14:175-203.
- Mairbaur, H., Schulz, S. & Hoffman, J.F. Cation transport and cell volume changes in maturing rat reticulocytes. *Am Physiol and Cell Physiol*, 2000; 279, C1621–C1630.
- Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002;99:1943-1948.
- McMullin MF. The molecular basis of disorders of red cell enzymes. *J Clin Pathol*, 1999; 52: 241-244.
- Milner JD, Orekov T, Ward JM, Cheng L, Torres-Velez F, Junttila I, et al. Sustained IL-4 exposure leads to a novel pathway for hemophagocytosis, inflammation, and tissue macrophage accumulation. *Blood*, 2010; 116 (14): 2476 – 2483
- Mohandas N, Evans E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1994;23:787-818.
- Palomo I, Pereira J, Palma J. *Hematología, Fisiopatología y Diagnostico*. Editorial Universidad de Talca, 2005
- Pandey KB, Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative Med Cell Longevity*, 2008;3(1):2-12
- Petrescu S, Glycosylation. *InTech*, 2012; 10:223-257

- Rice-Evans C, Baysal E: Iron-mediated oxidative stress in erythrocytes. *Biochem J*, 1987;244:191-196.
- Salomao M, Zhang X, Yang Y, et al. Protein 4.1R dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105:8026-8031.
- Santos-Silva A, Guerra FC, Ribeiro MM, Teixeira N. Deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Estabelecimento de valores de referência da sua actividade no eritrócito. Estudo de dois hemizigotos. *Rev Port de Farm*, 1989 39-84
- Santos-Silva A, Castro EMB, Quintanilha A. Longevidade e senescência do eritrócito humano. *Arq Inst Nac Saúde*, 1994-1995 20-21:63-79
- Santos-Silva A, Castro EMB, Teixeira N, Guerra FC, Quintanilha A. Altered erythrocyte membran band 3 profile provides a useful marker in patients known to be at risk os Cardiovascular Diseases. *Atherosclerosis*, 1995; 116-199
- Santos-Silva A, Castro EMB, Quintanilha A. O eritrócito humano maduro. *Rev Port Farm*, 1996 XLVI(4):148-155
- Santos-Silva A, Castro EMB, Quintanilha A. Fisiopatologia da Membrana Eritrocitária. *Rev Port de Farm*, 1997, nº1 ; XLVII : 5-10
- Serroukh Y, Djebara S, Lelubre C, Boudjeltia KZ, Biston P, Piagnerelli M. Alterations of the erythrocyte membrane during sepsis. *Critical Care Research and Practice*, 2012; 2012: 1-7.
- Setty BN, Kulkarni S, Stuart MJ. Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion. *Blood*, 2002;99:1564-1571.
- Shapiro S, Kohn D, Gershon H. A role for complement as the major opsonin in the sequestration of erythrocytes from elderly and young donors. *Br J Hematol*, 1993;83(4):648-54.
- Sikorski AF, Hanus-Lorenz B, Jesierski A, Dluzewski AR. Interaction of membrane skeletal proteins with membrane lipid domain. Review. *Acta Bioch Polonica*, 2000; 47 (3): 565-578.
- Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL. *Biochemistry Sixth edition*. W.H. Freeman and Company, 2007.
- Tavazzi B, Di Pierro D, Amorini AM, Fazzina G, Tuttobene M, Giardina B, et al. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *Eur J Biochem*, 2000; 267: 684-689.

- Valentini G, Chiarelli LR, Fortin R, Dolzan M, Galizzi A, Abraham DJ, et al. Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase. Molecular basis of nonspherocytic hemolytic anemia. *J Biol Chem*, 2002; 277 (26): 23807-23814.
- Vaysse J, Gattegno L, Bladier D, Aminoff D. Adhesion and erythrophagocytosis of human senescent erythrocytes by autologous monocytes and their inhibition by β -galactosyl derivatives *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986; 83: 1339 – 1343.
- Von Lohneysen K, Scott MT, Soldau K, Xu X, Friedman JS. Assessment of the red cell proteome of young patients with unexplained hemolytic anemia by two-dimensional differential in-gel electrophoresis (DIGE). *PLoS ONE*, 2012; 7(4): e34237.
- Walensky LD, Mohandas N, Lux SE. In: Handin RI, Lux SE, Stossel TP, eds. *Blood, Principles and Practice of Hematology* (2nd edition). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 1726-1744.
- Waugh, R.E., Mantalaris, A., Bauserman, R.G., Hwang, W.C. & Wu, J.H. Membrane instability in late-stage erythropoiesis. *Blood*, 2001; 97, 1869–1875.
- Waugh, R.E., McKenney, J.B., Bauserman, R.G., Brooks, D.M., Valeri, C.R. & Snyder, L.M. Surface area and volume changes during maturation of reticulocytes in the circulation of the baboon. *Lab Clin Med*, 1997; 129: 527–535.
- Wijk RV, Solinge WWV. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood*, 2005; 106(13): 4034-4042
- Willekens FLA, Werre JM, Dopp YAMG, Stoelwinder BR, Pauw B, Bosman GJCGM. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Brit Haematol*, 2008; 141:549–556
- Willekens, F.L., Bosch, F.H., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Dopp, Y.A. & Werre, J.M. Quantification of loss of haemoglobin components from the circulating red blood cell in vivo. *European Journal of Haematology*, 1997; 58, 246–250.
- Winterbourn CC: Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: The unstable anemias. *Semin. Hematol*, 1990;27:41-50.
- Wood BL, Gibson DF, Tait JF. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. *Blood*, 1996;88:1873-1880.
- Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 1997; 89:1121-113



Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
2º Ano do mestrado em Análises Clínicas.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Realizado no Laboratório de Análises Clínicas

Dra. Susana Pinto – Vila Nova de Gaia.



Orientadora: Dra. Susana Pinto

Mário Miguel Duarte Moreira

2012

1 – Introdução	49
1.1 – Objectivos	49
1.2 – Laboratório e Colheitas;	49
1.3 - Identificação, Conferência e Separação;	51
1.4 - Recipientes e armazenamento das amostras;	52
2 – Bacteriologia	54
2.1 - Análise Bacteriológica de Urina;	54
2.1.1 - Bacilos Gram –	55
2.1.2 - Cocos Gram +	56
2.1.3 – Antibiogramas	56
2.1.4 - Agentes mais frequentes	57
2.2 - Análise Bacteriológica e Micológica de fezes;	57
2.3 - Análise Bacteriológica de outros produtos;	58
3 – Bioquímica	60
3.1 - Procedimentos automáticos;	60
3.2 - Procedimentos semi-automáticos e manuais;	66
3.2.1 - Urina tipo II	66
3.2.2 - Análise Sedimento Urinário	66
3.2.3 - Teste Imunológico de Gravidez	67
3.2.4 – Microalbuminúria	67
3.2.5 - Hemoglobina Glicosilada	68
3.2.6 – Espermograma	68
3.2.7 - Pesquisa de Sangue oculto nas Fezes	69
3.2.8 - Exame Parasitológico de Fezes	69
4 - Hematologia/Imunohematologia	71
4.1 - Determinação grupo sanguíneo;	71
4.2 - Provas de Coombs;	72
4.3 - Pesquisa de eosinófilos em exsudados nasais e orofaríngeos e expectoração;	73
4.4 – Hemogramas	73
5 – Serologia	75
5.1 - Proteína c-reactiva	75

5.2 - Reacção de Wright	75
5.3 - Reacção de Vidal	76
5.4 . RA teste – Factor reumatóide	76
5.5 - Teste de Paul-Bunnell	76
5.6 - Teste SLE – Lúpus eritematoso sistémico	77
5.7 – VDRL	77
5.7.1 – TPHA	77
6 – Notas Finais e Conclusão	78
7 – Bibliografia	79

Índice de figuras

Figura 1 – Procedimento API ID 32E	55
Figura 2 – Esquema básico de funcionamento do analisador de hematologia	74
Figura 3 – Interpretação da placa de resultados de <i>Treponema pallidum</i> hemagglutination assay (TPHA)	78

Índice de tabelas

Tabela 1 – Diferentes tipos de tubos utilizados na recolha de sangue	53
Tabela 2 – Determinações bioquímicas automáticas de acordo com o analito, método e material biológico utilizado – analisador 1.	61
Tabela 3 - Determinações bioquímicas automáticas de acordo com o analito, método e material biológico utilizado – analisador 2.	63
Tablela 4 - Determinações bioquímicas automáticas de acordo com o analito, método e material biológico utilizado – analisador 3.	64
Tabela 5 – Tabela de interpretação para determinação do grupo sanguíneo	71

1 – Introdução

1.1 – Objectivos

Este estágio, realizado no âmbito do currículo de 2º Ano do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, tem como principal objectivo a aplicação prática das valências teóricas adquiridas durante os 3 semestres lectivos anteriores. Paralelamente, representa a primeira experiência profissional na área das análises clínicas que se revela fundamental, especialmente, para todos aqueles que nunca tinham tido contacto directo com a prática das análises clínicas. Por último, a aquisição de novos conhecimentos, experiências e perspectivas com profissionais mais experientes é também uma finalidade deste projecto.

Este relatório de é relativo ao estágio acima referido, tendo sido realizado no Laboratório de Análises Clínicas Dra. Susana Pinto em Coimbrões – Vila Nova de Gaia.

1.2 – Laboratório e Colheitas

O laboratório de Análises Clínicas Dra. Susana Pinto foi fundado em 1986, tem como directora técnica a Dra. Susana Pinto e está sediado na Rua da Regueira, 20 – Coimbrões – Vila Nova de Gaia. Este apresenta várias valências analíticas, tais como, bacteriologia/microbiologia, bioquímica, hematologia, endocrinologia, imunologia, alergologia e serologia. São executados igualmente testes de monitorização de fármacos e toxicológicos que não serão abordados neste relatório. A lista seguinte apresenta algumas das determinações analíticas que são realizadas mais amiúde:

Bacteriologia

- Pesquisa bacteriológica de Urina
- Pesquisa bacteriológica de Fezes
- Pesquisa bacteriológica de outros produtos (exsudados, expectoração etc.)
- Pesquisa rotavirus nas fezes
- Hemoculturas
- Exame Parasitológico de fezes
- Pesquisa de Micobactérias

- Exame micológico de produtos
- Pesquisa de *Clamydia*
- Pesquisa de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealitycum*
- Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em exsudados vaginais
- Antibiogramas

Bioquímica

- Análise sedimento urinário
- Exame sumario de urina
- Contagem ADDIS/contagem minutada
- Espermograma
- Teste imunológico de gravidez
- Pesquisa de sangue oculto nas fezes
- Crioglobulinas
- Proteína de Bence-Jones

Hematologia

- Velocidade de sedimentação
- Testes de coagulação
 - Tempo Protrombina/Taxa de Protrombina INR
 - Tempo de Tromboplastina parcial activada
 - Fibrinogénio
- Análise de esfregaços sanguíneos
- Anticorpos anti-eritrocitários (Coombs directa)
- Aglutininas irregulares (Coombs indirecta)
- Determinação grupo sanguíneo
- Pesquisa de eosinófilos nasais
- Tempo de sangria
- Retracção do coágulo
- Coloração e contagem de reticulócitos
- Tempo de coagulação

Serologia

- Reacção de Wright
- Reacção de Vidal

- Reacção de Weil-Felix
- Reacção de Waaler-Rose
- Reacção de Paul-Bunnet
- Teste RA (Factor reumatóide)
- Teste Proteína C-reactiva
- VDRL
- Teste LE (Lúpus eritematoso sistémico)

Apresenta igualmente aparelhos de leitura e análise automática que executam análises a vários tipos de moléculas, dentro das áreas já referidas.

Uma vez que a duração deste estágio foi relativamente curta, serão apresentadas no relatório, de forma mais pormenorizada, apenas as técnicas, procedimentos e análises que foram executadas e realizadas na prática. Na duração do estágio, foram realizados procedimentos de bacteriologia, bioquímica e imunohematologia sendo que as técnicas que foram abordadas mais detalhadamente foram aquelas mais solicitadas para a população em geral. Assim, foi maximizada a aquisição de experiência e metodologias na prática da profissão dentro do curto prazo de tempo disponível para o mesmo.

1.3 – Identificação, Conferência e Separação

Sempre que entram no laboratório amostras para analisar, estas têm de ser identificadas, separadas e conferidas. Estes são requisitos pré-analíticos essenciais para que não haja erros na entrega posterior dos resultados.

A cada utente é atribuído um código alfanumérico associado a um código de barras. Assim todas as amostras de todos os produtos são etiquetadas com esses códigos. Após a etapa de identificação seguem-se as etapas de conferência e separação que serão apresentadas de forma sequencial:

- I. Conferir se as colheitas efectuadas coincidem com as análises pedidas na credencial de cada utente;
- II. Colocar as amostras de todos os utentes por ordem crescente de código voltando a conferir, para todos eles, se as amostras e produtos recebidos coincidem com as das credenciais apontando as faltas;

- III. Distribuir as amostras pelos respectivos sectores (bacteriologia, bioquímica, hematologia, imunologia e serologia);
- IV. Centrifugar os tubos de coagulação e bioquímica a 4500 rpm durante 15 minutos;
- V. Separar os produtos de cada sector de acordo com as listas de trabalho e efectuar as análises;
- VI. Após as análises efectuadas, atribuir os resultados. A atribuição dos resultados é efectuada numa ficha analítica que é atribuída a cada utente quando a este é atribuído o código de identificação.

1.4 - Recipientes de armazenamento e transporte das amostras

Os recipientes de armazenamento da amostra estão directamente relacionados com material biológico a analisar que contêm. No caso de produtos para pesquisa bacteriológica os recipientes têm de ser, obviamente, estéreis; assim como, no caso de exsudados, as zaragatoas são mergulhadas num meio nutritivo para que as bactérias que eventualmente se encontrem na amostra se encontrem viáveis na altura da sua identificação. Contudo, é na recolha de amostras sanguíneas que o recipiente assume um papel activo para as análises a realizar uma vez que contêm, de origem, diferentes tipos de moléculas no seu interior que, quando em contacto com a amostra sanguínea, desempenham papéis activos na coagulação e separação dos seus diferentes elementos. Os diversos tipos de tubos utilizados neste laboratório e o seu conteúdo são clarificados na tabela 1. É de referir que as cores das tampas dos tubos de colheita de sangue diferem de marca para marca comercial, no entanto na tabela 1 são apresentadas as cores que são utilizadas neste laboratório.

Cor Tampa	Conteúdo	Função	Análises
Amarelo/ Vermelho	Agente coagulante + Gel	O primeiro promove a coagulação e o segundo separa soro dos restantes elementos.	Análises no soro; mantém componentes do soro inalterados
Roxo	EDTA	Impede agregação plaquetária. Efeito protector das células sanguíneas.	Hematologia; mantém forma e volume sanguíneos inalterados
Azul	Citrato	Estudos de coagulação.	Ideal para tempo de protrombina e de tromboplastina parcial activada.
Verde	Heparina de Litio	Separação plasma dos componentes celulares	Estudos em componentes plasmáticos
Cinzento	NaF e K ₂ Oxalato	Glicémia	
Azul escuro	Heparina sódica	Pesquisa elementos vestigiais no plasma	

Tabela 1 - Diferentes tipos de tubos de recolha de sangue utilizados neste laboratório. Os tubos com agente coagulante + gel, apresentam duas cores uma vez que se utilizam tubos de duas marcas comerciais.

2 – Bacteriologia

2.1 - Análise Bacteriológica de Urina

Após a colheita da urina num recipiente estéril, esta passa por uma série de procedimentos com o propósito de averiguar se existe infecção bacteriológica uma vez que a urina é um produto estéril em indivíduos saudáveis (Burtis *et al*, 2008). Assim, os objectivos da análise bacteriológica da urina são averiguar se há crescimento bacteriológico e se este é valorizável, pois pode tratar-se de contaminação, qual o agente que causa a infecção e a sua susceptibilidade/resistência a uma série de antibióticos. Para avaliar se o crescimento é valorizável num contexto de infecção, contam-se as colónias distintas na placa. Uma vez que a sementeira é efectuada com uma ansa calibrada e que cada inoculação leva a mesma quantidade de urina, pela contagem de colónias na placa auferem-se a quantidade de bactérias na urina. Se se contar apenas 1 colónia o crescimento é de 10^3 , 10 colónias indica um crescimento de 10^4 , crescimento superior a 100 colónias verifica-se um crescimento superior a 10^5 . Estes valores estão largamente expressos na literatura técnica, tendo sido convencionados. Regra geral, só quando se verifica um crescimento bacteriano superior a 10^5 se valoriza este como indicador de infecção. No caso de haver crescimento inferior tratar-se-á, igualmente em regra geral, de contaminação. Em casos especiais, e.g. crianças, será valorizável crescimentos inferiores desde que se tratem de culturas puras.

O primeiro procedimento será a cultura da urina em CLED. O CLED – meio de cistina lactose deficiente em electrólitos – é um meio diferencial que permite o crescimento de agentes patogénicos e contaminantes da urina, no entanto devido à sua deficiência em electrólitos impede o swarming, que é um crescimento característico, de *Proteus spp*. Se houver crescimento bacteriano valorizável procede-se ao isolamento para meio MacConkey e a uma coloração de gram (adaptado da bula do produto). O meio de MacConkey é um meio selectivo e diferencial que impede o crescimento de bactérias gram positivo pela presença de sais biliares e de cristal violeta. Permite igualmente a distinção de bactérias fermentadoras e não fermentadoras da lactose pela adição de vermelho neutro (indicador pH) (adaptado da bula do produto). Assim se houver crescimento em ambos os meios, o agente será uma bactéria Gram negativo, se apenas houver crescimento em CLED trata-se provavelmente de uma bactéria de gram positivo. Com o auxílio da coloração de gram

avalia-se a sua morfologia em, mais frequentemente, bacilos de gram negativo ou cocos gram positivo.

2.1.1 – Bacilos Gram negativo

Quando, após os procedimentos atrás referidos, se suspeita de infecção por um bacilo de gram negativo o objectivo é, agora, confirmar essa suspeita, identificar a espécie do agente e avaliar a sua susceptibilidade a uma série de antibióticos.

O procedimento de identificação é executado com o auxílio de uma galeria API ID 32E, que é um sistema padronizado para a identificação de *Enterobacteriaceae* e outros bacilos de gram negativo utilizando 32 testes bioquímicos (Figura 1) .

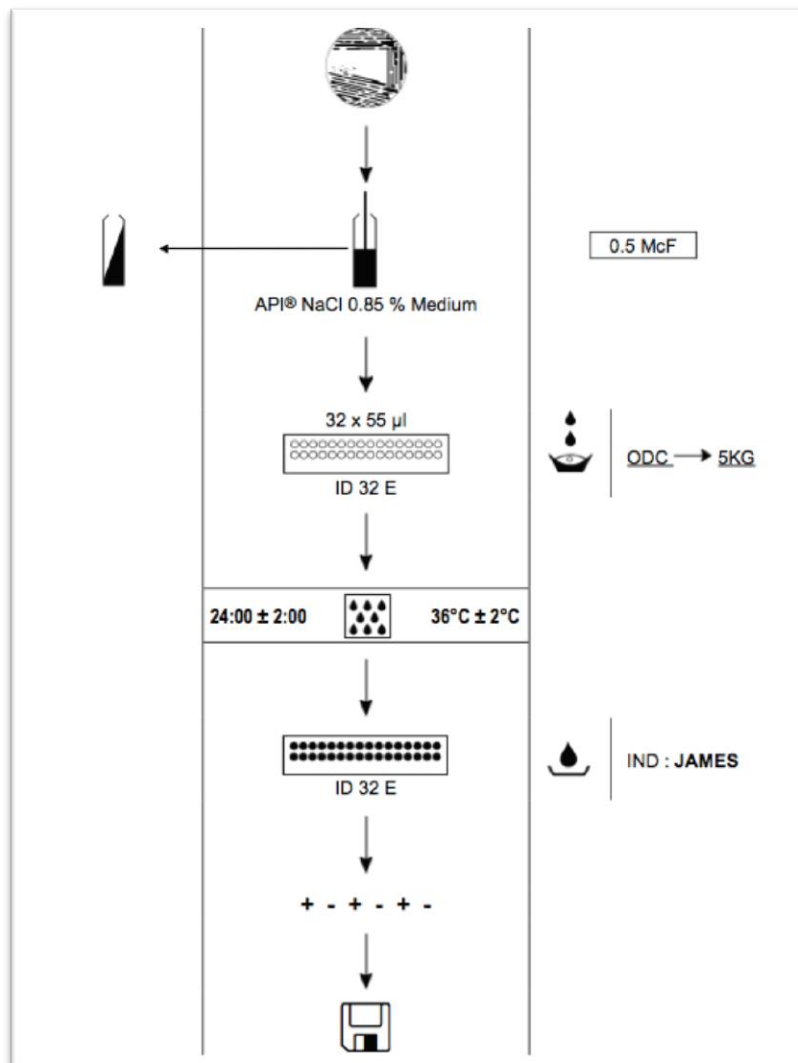


Fig 1 - Procedimento API ID 32 E – Adaptado da bula do produto.

Depois de realizado este procedimento, a galeria é inserida no leitor automático mini-API que nos indica, através da leitura da galeria, qual o bacilo de gram negativo presente na urina testada.

2.1.2 – Cocos Gram Positivo

Quando se suspeita de cocos de gram positivo, os objectivos de identificar e de testar a sua susceptibilidade mantêm-se, no entanto os procedimentos são diferentes. Assim quando, após a cultura em CLED e MacConkey, se verifica apenas crescimento em CLED o agente em causa passa por algumas etapas adicionais tais como cultura nos meios manitol-salt-agar e bÍlis esculina e testes como a catalase e coagulase. No final destes testes, tal como acontecia nos bacilos gram negativo, são efectuados os antibiogramas de acordo com a natureza de cada patogénio.

Os meios manitol-salt-agar (MSA) e bÍlis esculina são selectivos para estafilococos e enterococos respectivamente. O primeiro apresenta uma grande concentração de cloreto de sódio apresentando condições adversas ao crescimento de outras bactérias. Já no caso do meio bÍlis esculina, os enterococcus hidrolizam a esculina e crescem na presença de bÍlis, logo é um meio selectivo para enterococos. Caso se suspeite de estafilococos executa-se um teste de coagulase uma vez que, ao contrario da maioria dos estafilococos com relevância clínica, o *Staphylococcus aureus* é coagulase positivo. Se essa condição não se verificar e o resultado da coagulase for negativo, executa-se uma galeria Api ID Staph, específica para estafilococos, que se processa de maneira semelhante ao ID 32E (Figura 1)

2.1.3 – Antibiogramas

Depois de realizado o procedimento de identificação, avança-se para o processo de avaliação de susceptibilidade a antibióticos. Estes são executados com o auxílio de galerias API próprias de antibiograma (galerias ATB). Existem várias galerias, conforme o agente em causa:

- a galeria ATB-Ur é utilizada para urinas com suspeita de contaminação com *enterobacteriaceae*,
- a galeria ATB-Staph é utilizada para estafilococos,
- a galeria ATB-pseudo é utilizada para *Pseudomonas*,

- Caso a suspeita recaia num enterococos, o procedimento de antibiograma é executado manualmente, numa placa de Mueller-Hinton com recurso a discos impregnados com antibiótico.

Os procedimentos das galerias API-ATB são semelhantes ao indicado na Figura 1, apresentando um passo adicional de cultura em Muller-Hinton líquido após a execução da suspensão bacteriana a 0,5 McF. Quando a técnica automática não é possível, executam-se os antibiogramas manualmente colocando discos impregnados com antibiótico em meio Muller-Hinton sólido. Os antibióticos são escolhidos e os halos de inibição são interpretados de acordo com uma tabela adaptada das normas da EUCAST – agência europeia para os antibióticos.

2.1.4 – Agentes mais frequentes

O agente mais frequente é a *Escherichia coli*, no entanto agentes como a *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* e *Pseudomonas spp.* (bacilos de gram negativo) e *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus* (cocos de gram positivo) se identificam com alguma frequência.

2.2 – Análise Bacteriológica e Micológica de Fezes

O objectivo da análise bacteriológica de fezes é, à semelhança da análise bacteriológica de urina, avaliar a existência infecção e se esta tem significado clínico. No entanto, tendo em conta que as fezes de um individuo saudável contêm normalmente uma grande quantidade de bactérias, esta análise recorre a meios de cultura selectivos e diferenciais para que as bactérias comensais não interfiram na análise.

O procedimento consiste na recolha de uma amostra de fezes com uma ansa estéril e na cultura em placa pelo método de espalhamento. Como os agentes infecciosos bacterianos mais frequentes nas fezes são a *Shigella* e a *Salmonella*, utilizam-se os meios de SS (Agar Salmonella e Shigella) e XLD (Agar xilose-lisina-desoxicolato) assim como o meio de tetracionato que é um meio de enriquecimento. O primeiro é um meio específico de isolamento primário de *Salmonella* uma vez que a inclusão de tiosulfato de sódio no meio leva a bactéria a formar sulfuretos, que resulta num crescimento característico com pontos pretos nas colónias. O segundo é um meio de isolamento primário de *Shigella* que aparece vermelha no meio devido à utilização

da xilose (Apaptado da bula do produto). Em ambos são incluídos sais biliares que impedem a proliferação de bactérias comensais da flora intestinal que iriam interferir na análise.

Alem destes 3 meios, as fezes são normalmente semeadas em meio de mycobiotic para averiguar a presença de fungos patológicos.

2.3 – Análise Bacteriológica de outros produtos

Na análise de outros produtos estão incluídos expectoração, exsudados de ferida, uretrais e vaginais. Nestes, o objectivo do exame bacteriológico/micológico mantém-se: verificar o crescimento microbiano, auferir se este é valorizável e avaliar a sua susceptibilidade a antimicrobianos.

No caso da expectoração, esta deve ser colhida de manhã, antes da ingestão de alimentos, para um recipiente estéril evitando a colheita de apenas saliva. Já no caso dos exsudados, qualquer um dos uretral, vaginal ou de ferida, devem ser colhidos com uma zaragatoa estéril nos respectivos locais e, em adição, deve ser feita uma lâmina com produto para exame posterior. No que diz respeito a exames culturais, todos os produtos referidos são semeados em geloses de sangue e chocolate, MacConkey, manitol salt agar e mycobiotic agar, sendo que este último verificará o crescimento micológico. No caso dos exsudados vaginais, em adição aos meios já referidos, são semeados em meio específico para o género *Gardnerella*, bactérias comensais que causam vaginite quando há uma alteração da flora polibacteriana da vagina. As lâminas dos exsudados são coradas pela técnica de gram e examinadas. Nas lâminas de exsudado vaginal devemos valorizar todos os elementos anormais tais como leucócitos. Caso se verifique a presença de leucócitos devemos proceder á despistagem de GNID's (*gram negative intracellular diplococcus*) que se encontram no interior dos mesmos. A presença de *Lactobacillus*, provenientes da flora vaginal normal, não deve ser confundida com infecções patológicas, contudo e de forma oposta, deve ser valorizada a ausência deste género de bactérias cuja depleção poderá ter significado clínico. Ainda no âmbito da bacteriologia, utilizando lâminas com produto a fresco de exsudados vaginais e uretrais, é realizada uma pesquisa parasitológica de *Trichomonas vaginalis*. Esta pesquisa é, normalmente, executada após a cultura das placas para pesquisa bacteriana cujo produto da preparação é proveniente da colheita com a zaragatoa.

Nos casos de pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e de *Treponema pallidum* utilizam-se testes específicos. No caso da *Chlamydia trachomatis* utiliza-se um kit com

um teste imunocromatográfico. Este exame compreende um tratamento prévio uma vez que se trata de uma bactéria intracelular sendo que todos os reagentes são fornecidos no *kit*. Já no caso de pesquisa de *Treponema pallidum* é utilizado um teste sorológico que será abordado na área da bioquímica.

Para pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis*, utilizam-se duas lâminas com expectoração. Uma será corada pela técnica de Ziehl-Neelsen e examinada, outra passará por um processo de eliminação da matriz mucopolissacárida para que haja uma densidade maior de bactérias resultando numa mais fácil visualização após a coloração de Ziehl-Neelsen. Assim, como o *Mycobacterium tuberculosis* é uma bactéria álcool-ácido resistente, aparece corada de rosa e todas as outras bactérias não álcool-ácido resistente aparecem coradas de azul.

3 – Bioquímica

Os procedimentos da bioquímica iniciam-se na área de conferência do laboratório. Os tubos com as amostras fornecidas têm de coincidir com o que o clínico pede na credencial. Assim, após a conferência, os tubos são distribuídos de acordo com as análises pedidas e de acordo com o aparelho que as vai executar; quando os procedimentos são automáticos.

3.1 – Procedimentos automáticos

Além dos procedimentos manuais, que serão clarificados mais à frente neste relatório, existem 3 aparelhos que fazem, automaticamente, diferentes análises nas diferentes áreas da prática clínica e nas tabelas seguintes encontram-se todos os analitos possíveis para cada um dos aparelhos (Tabelas 2, 3 e 4). O primeiro executa essencialmente enzimas, metabolitos, proteínas específicas (complemento e fase aguda) e ionograma (íões Na^+ , K^+ e Cl^-) (Tabela 2), o segundo executa análises a algumas hormonas e anticorpos específicos e o terceiro analisa fármacos, marcadores tumorais, hormonas e anticorpos específicos (Tabela 3). Já o terceiro aparelho está vocacionado para monitorização e análise de fármacos, drogas e toxicologia (Tabela 4)

De acordo com as normas da qualidade implementadas no laboratório e de acordo com os requisitos legais, ao início de cada dia e antes do início das análises, todos os aparelhos passam por passos de calibração e controlo.

A calibração é executada por intermédio de calibradores fornecidos pelo fabricante dos aparelhos e reagentes. Estes têm valores de concentração conhecidos dos vários analitos que o aparelho conhece, fazendo coincidir o sinal analítico com o valor de concentração correcto. Em suma, a calibração tem como objectivo fazer coincidir o sinal analítico com o valor correcto de concentração.

Já o controlo é executado por intermédio de 2 soluções com concentração conhecida de cada analito, um com um valor normal e outro com um valor patológico. Os valores analíticos obtidos a partir dos controlos têm de estar dentro da média ± 1 desvio padrão, senão terá de ser executada uma etapa superveniente de calibração. Assim, o controlo tem como objectivo verificar se a calibração está correcta e se os valores de concentração analítica coincidem com os valores reais fornecidos pelos controlos.

ANALITO	MÉTODO	MATERIAL BIOLÓGICO
ENZIMAS		
ACP – Fosfatase Ácida	Cinético Colorimétrico	Soro humano
ALP – Fosfatase Alcalina	Cinético Colorimétrico	Soro e plasma humanos
ALT – Alanina Aminotransferase	Cinético UV	Soro e plasma humanos
α - Amilase	Cinético Colorimétrico	Soro, plasma e urina humanos
AST – Aspartato Aminotransferase	Cinético UV	Soro e plasma humanos
Colinesterase	Cinético Colorimétrico	Soro e plasma humanos
CK – Creatina Cinase	Cinético UV	Soro e plasma humanos
CK – MB Cretina Cinase (Músculo e cérebro)	Ensaio de imuno-inibição	Soro e plasma humanos
GGT – Gama-glutamil transferase	Cinético Colorimétrico	Soro e plasma humanos
HBDTH – Hidroxibutirato Desidrogenase	Cinético UV	Soro e plasma humanos
LDH – Lactato Desidrogenase	Cinético UV	Soro e plasma humanos
Lipase	Cinético Colorimétrico	Soro e plasma humanos
METABOLITOS		
Albumina	Espectrofotométrico	Soro e plasma humanos
Bilirrubina Directa	Espectrofotométrico	Soro e plasma humanos
Bilirrubina Total	Espectrofotométrico	Soro e plasma humanos
Cálcio oCPC	Espectrofotométrico	Soro, plasma e urina humanos
Cálcio Arsenazo III	Espectrofotométrico	Soro, plasma e urina humanos
Colesterol	Cor enzimático	Soro e plasma humanos
Creatinina	Cor Cinético	Soro, plasma e urina humanos
Glucose	UV Enzimático (método de hexoquinase)	Soro, plasma, urina, hemolisato e fluido cérebro-espinal.

Glucose - STAT	UV Enzimático (método de hexoquinase)	Soro e plasma humanos
HDL - Colesterol	Cor Enzimático	Soro e plasma humanos
Fosfatos Inorgânicos	UV Fotométrico	Soro, plasma e urina humanos
Ferro	Cor Fotométrico	Soro e plasma humanos
Lactato	Cor Enzimático	Soro e LCR humanos
LDL - Colesterol	Cor Enzimático	Soro e plasma humanos
Magnésio	Cor Fotométrico	Soro, plasma e urina humanos
Proteínas Totais	Cor Fotométrico	Soro e plasma humanos
Triglicerídeos	Cor Enzimático	Soro e plasma humanos
Ureia	UV Cinético	Soro, plasma e urina humanos
Ureia STAT	UV Cinético	Soro e plasma humanos
Ácido Úrico	Cor Enzimático	Soro, plasma e urina humanos
Proteínas totais Urina/LCR	Cor Fotométrico	Urina e LCR humanos
PROTEÍNAS ESPECÍFICAS		
α – 1 Antitripsina	Ensaio imuno-turbidimétrico	Soro e plasma humanos
ASO – Anti-corpos Anti-estreptolisina O)	Ensaio imuno-turbidimétrico	Soro humano
C3 – Proteína Complemento 3	Ensaio imuno-turbidimétrico	Soro e plasma humanos
C4 – Proteína Complemento 4	Ensaio imuno-turbidimétrico	Soro e plasma humanos
CRP – Proteína C reactiva	Ensaio imuno-turbidimétrico	Soro e plasma humanos
Ferritina	Ensaio imuno-turbidimétrico	Soro e plasma humanos
HbA1c – Hemoglobina A1c	Ensaio de imunoinibição	Sangue humano
IgA – Imunoglobulina A	Ensaio imuno-turbidimétrico	Soro e plasma humanos
IgG – Imunoglobulina G	Ensaio imuno-turbidimétrico	Soro, plasma, e LCR humanos
IgM – Imunoglobulina M	Ensaio imuno-turbidimétrico	Soro e plasma humanos
Microalbuminúria	Ensaio imuno-turbidimétrico	Urina e LCR humanos
Transferrina	Ensaio imuno-turbidimétrico	Soro e plasma humanos

ISE – Iões Sódio, Potássio e Cloro	Electrodo Selectivo de Iões	Soro, plasma e urina humanos
------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

Tabela 2 – Determinações automáticas efectuadas no analisador 1. Adaptado das bulas dos respectivos reagentes.

ANALITO	MÉTODO	MATERIAL BIOLÓGICO
Prolactina	Ensaio de eletroquimioluminescência (ECLIA)	Soro e plasma humanos
Cortisol	ECLIA	Soro, plasma e urina humanos
Progesterona	ECLIA	Soro e plasma humanos
Testosterona	ECLIA	Soro e plasma humanos
Tg - Tiroglobulina	ECLIA	Soro e plasma humanos
Folatos	ECLIA	Soro e plasma humanos
Vitamina B ₁₂	ECLIA	Soro e plasma humanos
Peptideo C	ECLIA	Soro plasma e urina humanos
Mioglobina	ECLIA	Soro e plasma humanos
FT ₄ – Tiroxina livre	ECLIA	Soro e plasma humanos
T ₃ - Triiodotiroxina	ECLIA	Soro e plasma humanos
TSH – Tirotropina (estimulante da tiroide)	ECLIA	Soro e plasma humanos
DHEA-S – sulfato de dehidroepiandrosterona	ECLIA	Soro e plasma humanos
Estradiol	ECLIA	Soro e plasma humanos
LH – hormona luteinizante	ECLIA	Soro e plasma humanos
FSH – hormona folículo-estimulante	ECLIA	Soro e plasma humanos
PSA total	ECLIA	Soro e plasma humanos
CEA – antigénio carcinoembrionário	ECLIA	Soro e plasma humanos
PSA livre	ECLIA	Soro e plasma humanos
Anticorpo anti-HCV	ECLIA	Soro e plasma humanos

HIV	ECLIA	Soro e plasma humanos
Antigénio HBs – superfície hepatite B	ECLIA	Soro e plasma humanos
Anti-HBs – anticorpo anti-HBs	ECLIA	Soro e plasma humanos
Anti-HAV – anticorpos totais anti-hepatite A	ECLIA	Soro e plasma humanos
Anticorpos IgG anti <i>Toxoplasma gondii</i>	ECLIA	Soro e plasma humanos
Anticorpos IgM anti <i>Toxoplasma gondii</i>	ECLIA	Soro e plasma humanos
Anticorpos IgG anti vírus rubéola	ECLIA	Soro e plasma humanos
Anticorpos IgM anti vírus rubéola	ECLIA	Soro e plasma humanos
HCG+ β - Gonadotrofina coriónica humana intacta + subunidade β	ECLIA	Soro e plasma humanos
Anticorpos IgG anti-citomegalovirus	ECLIA	Soro e plasma humanos
Anticorpos IgM anti-citomegalovirus	ECLIA	Soro e plasma humanos

Tabela 3 – Determinações automáticas efectuadas no analisador 2. Adaptado das bulas dos respectivos reagentes.

ANALITO	MÉTODO	MATERIAL BIOLÓGICO
Carbamazepina	Fluorescência Polarizada (FPIA)	Soro ou Plasma Humanos
Fenobarbital	FPIA	Soro ou Plasma Humanos
Ácido Valpróico	FPIA	Soro ou Plasma Humanos
Fenantoína	FPIA	Soro ou Plasma Humanos
AFP – Alfafetoproteína	Imunoensaio enzimático de micropartículas (MEIA)	Soro ou Plasma Humanos
Digoxina	MEIA	Soro ou Plasma Humanos
IgM anti HAV	MEIA	Soro ou Plasma Humanos
Insulina	MEIA	Soro ou Plasma Humanos

CA125 – antígeno cancerígeno 125	MEIA	Soro Humano
CA 19-9 – antígeno carboidrato 19-9	MEIA	Soro Humano
T ₃ livre	MEIA	Soro ou Plasma Humanos
Anti-TPO – autoanticorpos IgG anti peroxidase da tiróide	MEIA	Soro ou Plasma Humanos
IgG Anti-tiroglobulina	MEIA	Soro ou Plasma Humanos
Anti - HCV	MEIA	Soro ou Plasma Humanos
Prolactina	MEIA	Soro ou Plasma Humanos
Progesterona	MEIA	Soro ou Plasma Humanos
Testosterona	MEIA	Soro ou Plasma Humanos
Anticorpo IgM Toxoplasmose	MEIA	Soro ou Plasma Humanos
T ₄ total	FPIA	Soro ou Plasma Humanos
FSH	MEIA	Soro ou Plasma Humanos
PSA livre	MEIA	Soro Humano

Tabela 4 – Determinações automáticas efectuadas no analisador 3. Adaptado das bulas dos respectivos reagentes.

3.2 – Procedimentos semi-automáticos e manuais

3.2.1 – Urina Tipo II

Estes testes permitem a determinação semi-quantitativa de pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilogeno, bilirrubina e sangue na urina. Estas informações tornam-se importantes uma vez que alterações nestes parâmetros, podem fornecer informações acerca de eventuais desregulações e/ou patologias. Sendo uma análise com custos relativamente baixos é uma das análises mais solicitadas pelos clínicos e das que mais se realizam no laboratório.

As amostras de urina são geralmente colhidas em casa pelo utente num recipiente estéril, uma vez que contaminações bacterianas podem alterar os resultados. São colhidas as primeiras urinas da manhã. Após a recolha e conferência das amostras, as urinas são vertidas para tubos de fundo em V, por sua vez estes tubos são inseridos em “racks” específicas e colocadas no aparelho utilizado para este fim.

Assim, o aparelho coloca uma pequena quantidade de urina em cada compartimento das tiras, cada um relativo a uma determinação, promovendo a reacção dos reagentes contidos na tira com a urina. Esta reacção resulta em alterações de cor que é medida por reflectância. A reflectância medida é proporcional à concentração do analito na amostra e assim é dado o resultado.

Este teste contém uma zona de compensação, funcionando como um branco, com o objectivo de compensar a cor intrínseca da urina quando avalia os parâmetros, uma vez que urinas escuras podem alterar a reflectância por si só. Os valores de reflectância dos compartimentos de análise das tiras são depois compensados pelo valor da reflectância da urina.

3.2.2 – Análise de sedimento urinário

A análise microscópica do sedimento urinário é executada numa amostra de urina centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação rejeita-se o sobrenadante, coloca-se uma gota do sedimento que fica no fundo do tubo numa lâmina, coloca-se a lamela e observa-se ao microscópio (40x10). No sedimento urinário devemos valorizar a presença de elementos que sejam anormais, uma vez que o sedimento urinário do individuo deverá ser estéril e límpido. Então teremos de valorizar a presença de cilindros, eritrócitos, leucócitos, alguns tipos de cristais, células

do epitélio renal superior, filamentos de muco e parasitas tais como *Trichomonas*. A presença de cristais de oxalato de cálcio e de ácido úrico em pequena quantidade, assim como a presença de células epiteliais de descamação, normalmente não têm relevância clínica. No entanto cristais de ácido úrico em abundância assim como cristais de cistina, magnésio-amónio-fosfato, tirosina, cristais de bilirrubina e de colesterol devem ser indicados.

3.2.3 – Teste imunológico de Gravidez

O teste imunológico de gravidez tem um procedimento muito simples, que consiste em colocar uma gota de urina ou soro a analisar numa placa de cromatografia própria para o efeito. Trata-se de um teste imunocromatográfico em placa para a determinação da hCG (gonadotrofina coriónica humana). Esta hormona encontra-se aumentada em grávidas, sendo excretada na urina 20 dias após o último período menstrual.

Após a deposição da gota de urina/soro na placa e à medida que esta vai avançando na membrana da placa, a hCG contida na amostra vai sendo complexada por um conjugado coloidal contido na membrana. Na região teste encontram-se anticorpos monoclonais anti-hCG que ligam o conjugado de hCG formando uma linha rosa. Assim, se estiver presente a linha rosa na zona de teste, este é positivo e se a amostra for negativa para hCG não se forma o conjugado nem surge a linha rosa na região teste. Com o objectivo de validar o resultado, existe uma região de controlo que liga todo o conjugado que não reagiu. Para um teste válido, quer este seja positivo ou negativo, terá de aparecer uma linha rosa na região controlo.

Em suma, se aparecerem duas linhas rosa, uma na região teste e outra na região controlo, o teste é positivo. Se aparecer apenas uma linha rosa na região controlo o teste é negativo para hCG. Se aparecer apenas uma linha na região teste, ou se não aparecer linha em nenhuma das zonas o teste é considerado inválido e terá de ser repetido.

3.2.4 – Microalbuminúria

A pesquisa de microalbuminúria, isto é, de pequenas quantidades de albumina excretada na urina, é um procedimento que se efectua em urina de 24h, ou seja, toda a urina que se expele no prazo de 24h. Normalmente, no indivíduo saudável, a albumina está presente na urina vestigialmente uma vez que é filtrada ao nível renal.

Assim esta análise é muito frequente uma vez que a albumina presente na urina, poderá significar deficiências ao nível da função renal. Detecta, assim valores de proteínas inferiores ao que as tiras reactivas são capazes de detectar, mas superiores à excreção fisiológica.

O procedimento desta análise começa com o apontamento do volume de urina excretado nas 24h. O volume normal de urina produzida em 24h está situado entre os 800 ml e os 2000 ml dependendo a ingestão de líquidos. Assim, com a leitura de volume, podemos indicar ao clínico casos de poliúria (> 2500 ml), oligúria (< 800 ml) ou anúria (<100 ml) (Burtis *et al*, 2008)

Após a leitura do volume é retirada uma amostra de urina de cerca de 5 ml para um tubo próprio que é levado a centrifugar a 4500 rpm por 5 minutos. Esta etapa permite a deposição de detritos presentes na urina que poderiam alterar as leituras dando valores anormalmente altos.

A etapa final, será a verificação das concentrações de albumina, caso esta esteja presente, que é efectuada por um aparelho de forma automática.

3.2.5 – Hemoglobina glicosilada (HbA1c)

A hemoglobina glicosilada é uma análise importante uma vez que permite a monitorização dos valores de glicemia. O valor desta análise tem uma relação intrínseca com a média da concentração de glicose no sangue dos últimos 2 a 3 meses sendo que picos de concentração momentâneos de glicose não se reflectem no seu valor. Os valores considerados de referencia são cerca de 5% a 6% de hemoglobina glicosilada no sangue de um individuo saudável, sendo que valores superiores poderão indicar situações de intolerância à glicose ou diabetes em indivíduos não diagnosticados (Caquet, 2004). O procedimento desta análise é relativamente simples, uma vez que passa por colocar uma gota de sangue, provenientes de um tubo com anticoagulante, num tubo com uma solução que promove a lise dos eritrócitos libertando a hemoglobina para o meio. A aferição dos valores de concentração são feitos por intermédio de um aparelho que o faz de modo automático, conforme consta nas tabelas atrás indicadas.

3.2.6 – Espermograma

O espermograma consiste em, após a recolha da amostra, observar e anotar o tempo de liquefacção, medir o volume da amostra e o seu pH. A medição de volume

deve ser executada com o auxílio de um recipiente semelhante ao que continha a mostra inicial ao qual é adicionada água perfazer a quantidade semelhante à quantidade da amostra. Assim podemos medir o volume de água, que é semelhante ao volume da amostra. Após este passo de medição do volume, passa-se à observação da morfologia, viabilidade e mobilidade. Numa preparação, sem coloração, coloca-se uma gota de amostra numa lâmina e observa-se ao microscópio apontando a percentagem aproximada de espermatozóides viáveis assim como a sua mobilidade (rápidos, lentos, *in situ* ou imóveis). Numa outra preparação com coloração de gram, observam-se novamente os espermatozóides ao microscópio valorizando a sua morfologia (microcéfalos, cabeça e/ou cauda irregular). O passo final é efectuar a contagem em câmara de Neubauer e dar o resultado em número de espermatozóides por mililitro.

3.2.7 – Pesquisa de sangue oculto nas Fezes

O procedimento deste teste é relativamente simples, sendo que consiste em retirar estilete do tubo fornecido no kit, retirar amostra de fezes e introduzir novamente no tubo. Este já contém um tampão salino de diluição das fezes. Posteriormente colocar 3 gotas da solução de fezes na placa previamente fornecida pelo kit.

O dispositivo baseia-se num método imunocromatográfico. No caso de a amostra conter sangue, anticorpos monoclonais específicos que estão vinculados a partículas de ouro reagem com a hemoglobina formando um complexo. A linha de teste da placa está revestida com anticorpos anti-hemoglobina que quando entram em contacto com o complexo contido na solução de fezes, reagem tornando a linha teste de cor rosa. Se o resultado for negativo, a ausência de moléculas de hemoglobina complexadas faz com que a linha teste não se torne rosa. Para certificar o bom desempenho do teste, este contém uma linha controlo. Quando o teste é bem-sucedido esta torna-se rosa. Em suma, quando aparecem a rosa as linhas de teste e controlo o resultado é positivo, quando aparece apenas a linha controlo rosa o teste é negativo. Sempre que a linha controlo não apareça rosa, independentemente de a linha teste aparecer rosa ou não, o teste é inválido tendo de ser descartado e repetido.

3.2.8 – Exame parasitológico de Fezes

O exame parasitológico de fezes é, à semelhança da pesquisa de sangue oculto, composto por um kit comercial cujo objectivo é concentrar ovos de helmintas e

cistos/oocistos de protozoários a partir de amostras fecais humanas pelo método de sedimentação. O kit é composto por uma unidade de recolha/filtração e um tubo com uma solução de formalina, triton x-100 (detergente) e acetato de etilo. Assim após a recolha da amostra de fezes, a unidade de recolha/filtração é inserida no tubo com a solução. Após homogeneização ao vórtex, o tubo é invertido e vai a centrifugar a 1000 rpm durante um minuto. O objectivo desta centrifugação é fazer passar o homogeneizado fecal pelo filtro e sedimentar os elementos parasitológicos no fundo do tubo. Após estes passos, rejeita-se o sobrenadante e observa-se o sedimento ao microscópio.

4 – Hematologia e Imunohematologia

Uma vez que, no âmbito deste estágio, executei poucos procedimentos na área da imunologia e, aqueles que realizei, estavam directamente ligados a pesquisas de antígenos/anticorpos eritrocitários decidi aglomerar estes procedimentos num campo de Imunohematologia.

4.1 – Determinação do grupo Sanguíneo

A determinação do grupo sanguíneo é efectuado com recurso a aglutininas anti-A, anti-B e anti-D, portanto pesquisam-se os antígenos eritrocitários. As amostras sanguíneas devem ser retiradas dos tubos de hemograma. Assim, o procedimento consiste em diluir uma gota de sangue (cerca de 50µl) em 1mL de soro fisiológico, de seguida adicionar uma gota de cada reagente a 3 tubos e a estes uma gota da diluição sanguínea anteriormente preparada. Deixar reagir durante 5 minutos. Para que não haja falsos resultados, é importante que os reagentes estejam à temperatura ambiente. A interpretação dos resultados está apresentada na tabela 4

	Anti-A	Anti-B	Anti-D	Tipo Sanguíneo
AGLUTINAÇÃO	+	+	+	AB Rh +
			-	AB Rh ?
	+	-	+	A Rh +
			-	A Rh ?
	-	+	+	B Rh +
			-	B Rh ?
	-	-	+	O Rh +
			-	O Rh ?

Tabela 5 – Tabela de interpretação dos resultados para a determinação do grupo sanguíneo

Caso não exista aglutinação no anti-D, faz-se uma pesquisa posterior uma vez que o determinante antigénico D pode ser fraco e com pouca avidéz, dando origem a

um falso negativo. Assim, a partir de uma nova amostra de sangue retirado do tubo de hemograma, adiciona-se uma gota de reagente anti-D a uma gota de sangue e executam-se 3 lavagens. As lavagens executam-se adicionando cerca de 5 ml de soro fisiológico ao tubo referido, levando este a centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm. Repete-se o procedimento até à terceira centrifugação rejeitando o sobrenadante entre cada centrifugação. Após a última centrifugação rejeita-se novamente o soro de lavagem e ao sangue depositado adiciona-se uma gota de soro de Coombs para determinação de determinante D fraco (D_u). A pesquisa do factor Rhesus é em tudo semelhante à prova de Coombs abordada em baixo, contudo trata-se de uma prova de Coombs indirecta, uma vez que, além do soro de Coombs, adicionamos uma IgG anti-D que vai sensibilizar o eritrócito. Quando o determinante antigénico D é fraco (D_u), há uma fraca ligação do anticorpo anti-D do reagente ao eritrócito. Contudo existe ligação apesar desta ser fraca sem aglutinação visível. Neste caso o soro de Coombs vai ligar-se às IgG anti-D do reagente anti-D e promover uma maior aglutinação que passa a ser visível, no pior cenário, ao microscópio. Após agitação do soro de Coombs juntamente com o sangue depositado da última lavagem, monta-se uma gota entre lamina e lamela observa-se ao microscópio e verifica-se a ausência ou presença de aglutinação. Caso haja aglutinação, o resultado deve ser dado como sendo Rh positivo, uma vez que, apesar de pouco ávido, apresenta o determinante D. Caso não haja aglutinação, confirma-se o resultado dado pelo soro anti-D, Rh negativo.

4.2 – Provas de Coombs directa e indirecta – Anticorpos anti-eritrocitários

O procedimento das provas de Coombs inicia-se com 3 lavagens com soro fisiológico de uma gota de sangue. As lavagens são executadas de maneira semelhante às lavagens referidas no procedimento anterior. Após as lavagens, junta-se uma gota de soro de Coombs ao sangue depositado no fundo.

A prova de Coombs consiste na pesquisa de anticorpos anti-eritrocitários que podem levar a patologias hemolíticas. O soro de Coombs utilizado nesta prova é constituído por um anticorpo anti-imunoglobulina, que no caso do utilizado neste laboratório é um anticorpo de coelho anti-IgG humana. Assim, quando existem IgG anti-eritrocitárias no soro humano, estas ligam-se à superfície do eritrócito sensibilizando-o. Por sua vez o anticorpo anti-IgG do soro de Coombs vai ligar-se a às IgG ligadas ao eritrócito provocando aglutinação. Esta prova é uma prova de Coombs directa uma vez que se pesquisam IgG directamente ligadas a eritrócitos sensibilizados.

4.3 – Pesquisa de eosinófilos em exsudados nasais e orofaríngeos e expectoração

Após a colheita do produto faz-se um esfregaço em duas lâminas que são posteriormente coradas com a coloração de esfregaço sanguíneo. Após a coloração faz-se a observação ao microscópio onde se valoriza a presença de eosinófilos.

4.4 - Hemogramas

Os hemogramas são analisados automaticamente por um aparelho próprio para o efeito, sendo que o procedimento consiste na agitação prévia dos tubos de hemograma e inclusão destes em racks próprias que são inseridas e analisadas pelo equipamento. Como acontece com muitos outros no mercado, o analisador de hemogramas associa dois princípios:

- Princípio de Coulter: Wallace Coulter postulou que, quando uma partícula atravessa um orifício sujeito a uma corrente eléctrica, esta provoca uma impedância eléctrica proporcional ao seu volume.
- Citometria de fluxo: Quando um fluxo de células, suspensas num eluente, passa à frente de um feixe de luz ou laser, cada célula que passa provoca uma dispersão no feixe dependendo do seu volume (dispersão frontal) e complexidade (dispersão lateral). A quantidade de luz dispersa e não dispersa é medida por detectores. Assim, e com a ajuda de marcação fluorescente de epítomos específicos para cada célula, é possível separar as células sanguíneas de acordo com o seu volume, complexidade interna (granulações) e marcação fluorescente.

Estas duas tecnologias aliadas permitem fazer a separação dos vários tipos de células sanguíneas, assim como a avaliação da sua morfologia. Adicionalmente, a lise dos eritrócitos permite fornecer informações acerca da concentração de hemoglobina.

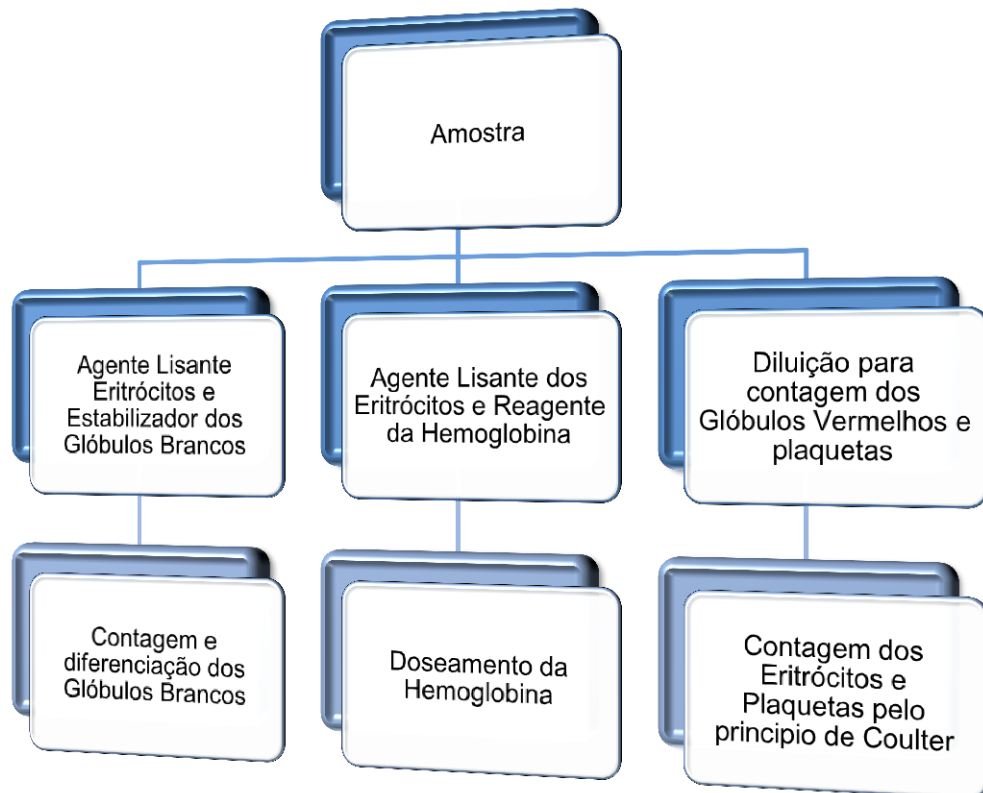


Figura 2 – Esquema de funcionamento básico do analisador de hematologia.

5 - Serologia

Os procedimentos dos testes serológicos realizados são relativamente simples. Consiste em juntar 50 μ L de soro com uma gota de reagente. O reagente consiste, à excepção de apenas um dos testes executados neste laboratório, em partículas de látex revestidas com moléculas, geralmente antigénios ou anticorpos, específicos para cada analito. O soro deve ser retirado de uma amostra de sangue colhida para um tubo de vácuo que se deixou coagular totalmente e centrifugar. As amostras de soro devem ser frescas para uma boa resposta do teste.

5.1 – Pesquisa de Proteína C-reactiva

A proteína c-reactiva é uma proteína de fase aguda que está aumentada nas mais variadas situações de inflamação.

O teste serológico da proteína c-reactiva é um teste de aglutinação com partículas de látex revestidas com anticorpos humanos anti-proteína c-reactiva. Quando o soro e o reagente entram em contacto, se a amostra for positiva para a proteína c-reactiva, acontece aglutinação em 2 minutos. Após esse tempo verifica-se a positividade ou negatividade do teste.

5.2 - Reacção de Wright – pesquisa de *Brucella abortus*

A *Brucella abortus* é uma bactéria cujo hospedeiro principal é o gado no entanto, sendo zoonótica, pode passar para os humanos dando origem à Brucelose. Esta infecção causa febre, dor generalizada no corpo e fadiga.

O primeiro passo deste teste é colocar numa placa de 5 cavidades 0,08ml; 0,04ml; 0,02ml; 0,01ml e 0,005ml de soro do paciente em cada uma das cavidades. De seguida adiciona-se uma gota de reagente a cada uma das cavidades e, em 1 minuto, surge o resultado. O resultado é dado em forma de título, sendo que se não houver aglutinação em nenhum dos poços o título é <1/20 se houver aglutinação no primeiro poço será 1/20, no segundo 1/40, no terceiro 1/80, no quarto 1/160 e no quinto 1/320.

5.3 - Reacção de Vidal – Pesquisa de *Salmonella typhi* e *S. Paratyphi*

As espécies de *Salmonella typhi* e *S. Paratyphi* são bactérias que causam a febre tifóide, patologia epidémica conhecida pelo seu grau de mortalidade.

Para este teste são necessárias 4 placas de 5 poços onde se colocam, à semelhança do teste anterior, 0,08ml; 0,04ml; 0,02ml; 0,01ml e 0,005ml de soro do paciente em cada uma das cavidades das 4 placas. Na primeira placa coloca-se em cada poço uma gota do reagente O (*S. typhi* antigénio O), na segunda placa utiliza-se da mesma maneira o reagente H (*S. typhi* antigénio H), na terceira utiliza-se o reagente A (*S. paratyphi* grupo A antigénio H) e na última placa coloca-se em cada poço uma gota do reagente B (*S. paratyphi* grupo B antigénio H). Na ausência de aglutinação dá-se um título <1/20, caso haja aglutinação em alguma das placas e em alguma das diluições (1/20, 1/40; 1/80, 1/160, 1/320) indica-se o título positivo e a sua titulação.

5.4 – RA teste – Pesquisa de Factor reumatóide

O factor reumatóide foi descrito como sendo uma IgM dirigida contra as imunoglobulinas do doente. Portanto trata-se de um marcador de doença auto-imune.

O procedimento do teste serológico do factor reumatóide é em tudo semelhante ao teste anteriormente descrito, no entanto, as partículas de látex neste caso estão revestidas com uma gama globulina humana purificada conforme descrito por Singer *et al* em 1974.

5.5 - Mononucleose infecciosa – Reacção de Paul-Bunel

A mononucleose infecciosa é uma patologia que está relacionada com diversos sintomas tais como fadiga, dores de cabeça, náusea entre outros e é descrito como sendo causado pelo Epstein Barr (EB) vírus provocando implicações ao nível do tecido reticuloendotelial.

Neste teste, as partículas de látex estão revestidas com antigénios bovinos de EB vírus que, quando entram em contacto com o soro positivo para anticorpos anti-EB vírus, causam aglutinação. Um resultado positivo surge ao fim de 2 minutos de reacção.

5.6 - Lúpus eritematoso sistémico (SLE)

O Lúpus eritematoso sistémico é uma doença auto-imune que pode atacar qualquer parte do corpo causando inflamação e danos nos tecidos afectados.

O teste serológico de SLE consiste num reagente com partículas de látex revestidas com DNA cadeia dupla ($_{ds}$ DNA). Se o no soro do paciente estiverem presentes anticorpos anti- $_{ds}$ DNA então há aglutinação e o teste é positivo em 3 minutos.

5.7 - VDRL – *Venereal Disease Research Laboratory* – identificação Sífilis

A sífilis é uma doença infecciosa e sexualmente transmissível causada pela bactéria *Treponema pallidum*.

O teste serológico de identificação de sífilis consiste num reagente que resulta combinação de lectina, colesterol e cardiolipina que possui semelhança com antigénios do *T. pallidum*. Assim, um soro do paciente que possua anticorpos para o dito agente, aglutina com o reagente. Obtém-se um resultado positivo ao fim de 8 minutos se o paciente possuir anticorpos no seu soro. Quando o resultado é positivo faz-se uma titulação que consiste em testar várias diluições do soro e o título resulta da última diluição positiva.

Este teste é susceptível a falsos positivos, assim os resultados positivos devem ser confirmados através de TPHA (*Treponema pallidum hemagglutination assay*).

5.7.1 - TPHA – *Treponema pallidum* hemagglutination assay

A sífilis é uma doença crónica que apresenta várias fases de infecção: primária, secundária, terciária e quaternária sendo que cada uma das fases produz sintomas diferentes que vão desde urticária até a chagas provocadas pela espiroqueta. Intercaladamente apresenta fases de dormência.

O TPHA é um teste que detecta anticorpos específicos para *T. pallidum* no soro humano pelo que o reagente é constituído por eritrócitos de origem aviária revestidos com antigénios da bactéria.

O teste é realizado em placas de poços de fundo redondo que, ao longo de cada fila, vão contendo sucessivas diluições do reagente. Após a adição do soro humano a testar e após a incubação durante pelo menos 45 minutos, verifica-se a aglutinação e define-se um ponto a partir do qual o soro é positivo (figura 3).

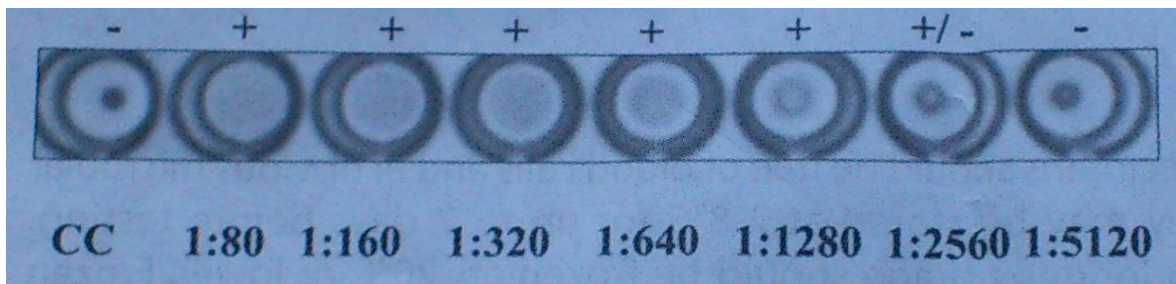


Figura 3 – Interpretação da placa de ensaio para determinação de TPHA. Ensaio positivo para sífilis na diluição 1:1280. Os resultados negativos apresentam-se na forma de um pequeno anel ou botão e nos resultados positivos verifica-se aglutinação.

6 – Notas Finais e Conclusão

Após os conhecimentos teóricos adquiridos durante os 3 semestres anteriores, este estágio revelou-se um complemento importante a essas aprendizagens. Apesar do currículo deste mestrado compreender algumas aulas de carácter prático que dão uma perspectiva daquilo que se passa na prática clínica, o contacto directo com a rotina de um laboratório de análises clínicas proporciona uma experiência de aprendizagem mais completa. Além disto, revelou que o exercício desta profissão requer altos níveis de concentração e responsabilidade sendo que obriga, tanto o estagiário como o profissional mais experiente, a desenvolver técnicas e metodologias de prevenção do erro assim como aptidões técnicas de execução mais eficazes.

Tendo em conta todos os pressupostos anteriores, conclui-se que os objectivos traçados para este estágio foram alcançados, sendo que a experiência foi bastante enriquecedora e útil para a prática da profissão num futuro, que se espera que seja, próximo.

7 – Bibliografia

- Bulas dos Reagentes utilizados na prática das Análises Clínicas, elaborados pelas marcas comerciais.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Sawyer BG. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry Sixth Edition; Saunders Elsevier, 2008
- Caquet R. Guia Prático Climepsi de Análises Clínicas. Climepsi Editores; 2004
- Singer JM. Standardization of the latex test for Rheumatoid Arthritis Serology. Rheumatic Diseases, 1974; 24:762-769