

Volume

3

CONCEITOS E
MÉTODOS
para formação
de profissionais
em laboratórios
DE SAÚDE

Organização
Etelcia Molinaro
Luzia Caputo
Regina Amendoeira

IOC
Instituto Oswaldo Cruz


ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

 Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Presidente

Paulo Ernani Gadelha Vieira

ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO

Diretor

Paulo César de Castro Ribeiro

Vice-diretora de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Marcela Alejandra Pronko

Vice-diretora de Ensino e Informação

Páulea Zaquini Monteiro Lima

Vice-diretor de Gestão e Desenvolvimento Institucional

José Orbílio de Souza Abreu

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Diretor

Wilson Savino

Vice-diretor de Pesquisa, Desenvolvimento Tecnológico e Inovação

Hugo Caire de Castro Faria Neto

Vice-diretora de Ensino, Informação e Comunicação

Elisa Cupolillo

Vice-diretora de Serviços de Referência e Coleções Científicas

Eliane Veiga Costa

Vice-diretor de Desenvolvimento Institucional e Gestão

Valber da Silva Frutuoso

CONCEITOS E
MÉTODOS
para formação
de profissionais
em laboratórios
DE SAÚDE

Volume 3

ORGANIZADORAS
Etelcia Molinaro
Luzia Caputo
Regina Amendoeira

2013
Rio de Janeiro
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio
Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

Copyright © 2013 das organizadoras
Todos os direitos desta edição reservados à
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz

Conselho Editorial

Dr.^a. Maria Regina Reis Amendoeira (presidente)
Dr.^a. Ana Luiza Lauria Filgueiras
Dr.^a. Clarissa Menezes Maya Monteiro
Dr.^a. Fátima Conceição Silva
Dr. Herman Gonçalves Schatzmayr (*in memoriam*)
Dr.^a. Léa Camillo-Coura
Especialista Luzia Fátima Gonçalves Caputo
Dr.^a. Lycia de Brito Gitirana
Dr.^a. Marcia Cristina Ferrão Alexandre
Dr. Marco Antonio Ferreira da Costa
Dr.^a. Margareth Maria de Carvalho Queiroz
Dr.^a. Maria Helena Miguez da Rocha Leão
Dr. Otílio Machado Pereira Bastos
Dr. Paulo Roberto Soares Stephens

Edição de Texto

Lisa Stuart

Projeto Gráfico e Editoração

Marcelo Paixão

Capa

Zé Luiz Fonseca

Fotos

Rodrigo Mexas

Desenhos

Luzia Fátima Gonçalves Caputo
Newton Marinho da Costa Junior

Catálogo na fonte

Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio
Biblioteca Emilia Bustamante

M722c Molinaro, Etelcia Moraes

Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 3 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2013.

306 p. : il. , tab. , graf.

ISBN: 978-85-98768-41-0

1. Técnicas e Procedimentos de Laboratório. 2. Pessoal de Laboratório. 3. Laboratórios. 4. Formação de Técnicos. 5. Saúde e Educação. I. Título. II. Caputo, Luzia Fátima Gonçalves. III. Amendoeira, Maria Regina Reis.

CDD 542.1

Autores

Daniel Santos Souza

Biólogo, mestre em Saúde Pública pela Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (Ensp/Fiocruz), especialista em Políticas Públicas em Saúde, técnico em Saúde Pública da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV/Fiocruz) e egresso do Curso Técnico de Laboratório de Biotecnologia em Saúde da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV/Fiocruz).

Elisângela de Souza Santos

Farmacêutica, mestre em Ciências/Química pela Universidade Federal Fluminense (UFF), doutoranda do Curso de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), perita legista em Toxicologia da Secretaria de Estado de Segurança Pública do Estado do Rio de Janeiro.

Emanuele Amorim Alves

Farmacêutica industrial, especialista em Perícia Criminal pela Universidade Castelo Branco, mestre em Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), doutoranda em Ciências Forenses pela Universidade do Porto, técnica em Saúde Pública da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV/Fiocruz).

Jurandy Susana Patrícia Ocampo Lyra

Médica, mestre em Ciências pelo Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), doutora em Ciências pelo Instituto de Bioquímica da UFRJ, professora associada da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (Unirio), pesquisadora colaboradora do Laboratório de Imunologia Clínica do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

Liliane Rosa Alves

Farmacêutica, mestre e doutora em Química Biológica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), tecnóloga em Farmácia do Instituto Nacional do Câncer (Inca).

Marcella Martins de Vasconcelos Vaena

Médica hematologista, mestre em Saúde da Criança e da Mulher pelo Instituto Fernandes Figueira (IFF/Fiocruz), chefe da Hemoterapia do Hospital do Câncer II (Inca), médica do Instituto Fernandes Figueira (IFF/Fiocruz).

Marcelo Pelajo Machado

Médico, doutor em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), pós-doutor em Biociências pelo Centro Alemão de Pesquisas sobre o Câncer DKFZ (Heidelberg, Alemanha), pesquisador titular da Fundação Oswaldo Cruz, chefe do Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

Mônica Mendes Caminha Murito

Engenheira química, mestre em Biociências e Saúde pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), pesquisadora visitante da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV/Fiocruz).

Paulo Marcelo T. Cotias

Imuno-hematologista do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (Ipec/Fiocruz), chefe do Laboratório de Imuno-hematologia e da Agência Transfusional do Ipec/Fiocruz.

Paulo Roberto Soares Stephens

Biólogo, mestre em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), doutorando Universidade Federal Fluminense (UFF), tecnologista sênior em Saúde Pública do Laboratório de Imunologia Clínica do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz,) coordenador dos cursos Técnico em Biotecnologia e de Especialização de Nível Técnico em Biologia Parasitária e Biotecnologia do Instituto Oswaldo Cruz.

Virgínia de Lourdes Mendes Finete

Química, mestre em Química Analítica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ), técnica em Saúde Pública da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV/Fiocruz).

Sumário

Prefácio.....	17
Apresentação da coleção	21
Apresentação das organizadoras	23
Capítulo 1. Bioquímica	27
<i>1.1 Introdução às biomoléculas</i>	<i>27</i>
<i>1.2 Biomoléculas</i>	<i>29</i>
1.2.1 Água	29
1.2.2 Sais minerais	30
1.2.3 Proteínas	31
1.2.4 Glicídios	42
1.2.5 Lipídios	45
1.2.6 Hormônios	52
1.2.7 Vitaminas	53

1.3 Metabolismo	56
1.3.1 Introdução ao metabolismo.....	56
1.3.2 O ATP como moeda energética.....	57
1.3.3 Metabolismo dos carboidratos.....	58
1.3.4 Metabolismo dos ácidos graxos	77
1.3.5 Metabolismo das proteínas.....	84
1.3.6 Integração do metabolismo.....	85
1.4 Bioquímica clínica.....	89
1.4.1 Análise de componentes glicídicos.....	93
1.4.2 Análise de componentes lipídicos.....	97
1.4.3 Análise de componentes nitrogenados.....	102
1.4.4 Eletrólitos.....	121
Referência bibliográfica.....	130
Bibliografia complementar.....	131
Capítulo 2. Biologia molecular.....	133
2.1 História da biologia molecular.....	133
2.1.1 A descoberta do DNA.....	133
2.1.2 A estrutura dos ácidos nucleicos.....	137
2.1.3 Características físicas da molécula de DNA.....	141
2.2 Duplicação da molécula de DNA.....	142
2.2.1 A duplicação do DNA e o ciclo celular.....	143

2.3	Transcrição.....	146
2.3.1	Tipos de RNA.....	149
2.3.2	Regulação da expressão gênica.....	151
2.4	Tradução.....	153
2.4.1	O código genético.....	153
2.4.2	Síntese proteica.....	155
2.5	Métodos de extração de DNA.....	156
2.5.1	Extração de DNA genômico de sangue humano.....	158
2.5.2	Extração do DNA genômico.....	158
2.6	Métodos de análise e quantificação de DNA.....	159
2.6.1	Eletroforese.....	159
2.6.2	Espectrofotometria.....	161
2.7	Endonucleases de restrição.....	163
2.8	Hibridação molecular.....	165
2.8.1	Técnicas de hibridação.....	165
2.9	Clonagem de DNA	166
2.9.1	Clonagem.....	166
2.9.2	Clonagem de DNA.....	167
2.10	Transformação bacteriana.....	169
2.11	Biblioteca genômica.....	169
2.12	A reação em cadeia da polimerase (PCR)	170
2.13	Sequenciamento de DNA.....	172
2.13.1	Sequenciamento de Sanger.....	173
2.13.2	Exemplo de processo metodológico de análise de ácidos nucleicos.....	174

2.14 O DNA e as ciências forenses.....	177
2.15 Utilizações complementares do DNA.....	181
2.15.1 Transgênicos.....	181
2.15.2 Projeto Genoma Humano.....	182
Referência bibliográfica.....	185
Bibliografia complementar.....	185
Capítulo 3. Hematologia.....	187
3.1 A hematopoese.....	187
3.1.1 A eritropoese.....	192
3.1.2 A leucopoese.....	194
3.2 O sangue.....	197
3.2.1 As células sanguíneas.....	197
3.3 A coleta de sangue.....	202
3.3.1 Material a ser checado antes de proceder à venopunção.....	202
3.3.2 Procedimentos para a venopunção.....	204
3.3.3 Cuidados com a amostra coletada.....	207
3.4 O hemograma.....	209
3.4.1 Avaliação automatizada.....	211
3.4.2 Análise morfológica das células sanguíneas.....	214
3.5 O hemograma alterado.....	215
3.5.1 Alterações da série vermelha.....	216
3.5.2 Alterações da série branca.....	224
3.5.3 Alterações das plaquetas.....	226

3.6 Hemostasia e coagulação.....	227
3.6.1 Componentes principais.....	227
3.6.2 Fisiologia.....	230
3.6.3 Avaliação laboratorial.....	234
Bibliografia complementar.....	237

Capítulo 4. Hemoterapia básica na prática transfusional.....239

4.1 Histórico.....	239
4.2 Imuno-hematologia: conceitos básicos.....	241
4.3 O sistema ABO.....	243
4.3.1 Estrutura dos antígenos do sistema ABO.....	244
4.3.2 Herança dos grupos sanguíneos ABO.....	244
4.3.3 Antígenos do sistema ABO.....	245
4.3.4 Fenótipo de Bombaim.....	246
4.3.5 Interação dos genes Hh e ABO.....	246
4.3.6 Formação dos antígenos solúveis A, B e H	247
4.3.7 Interação de genes Sese, Zz e ABH.....	247
4.3.8 Subgrupos de ABO.....	248
4.3.9 Anticorpos do sistema ABO.....	249
4.4 Sistema RH	250
4.4.1 Variantes fenotípicas do antígeno D.....	251
4.4.2 Recomendação transfusional.....	252
4.4.3 Anticorpos do sistema Rh.....	253

4.5 Outros sistemas de grupos sanguíneos.....	254
4.5.1 O sistema Lewis.....	254
4.5.2 O sistema MNS.....	255
4.5.3 O sistema P.....	257
4.5.4 O sistema I.....	257
4.5.5 O sistema Kell.....	259
4.5.6 O sistema Duffy.....	262
4.5.7 O sistema Kidd.....	264
4.5.8 O sistema Lutheran.....	265
4.5.9 O sistema Diego.....	267
4.5.10 O sistema Cartwright.....	267
4.5.11 O sistema Colton.....	267
4.5.12 O sistema Scianna.....	267
4.5.13 O sistema Dombrock.....	267
4.5.14 O sistema Xg.....	268
4.6 Doenças associadas aos grupos sanguíneos.....	269
4.6.1 DHPN ou DHRN por Rh(D).....	269
4.6.2 DHRN/DHPN por ABO.....	274
4.7 Prática imuno-hematológica.....	275
4.7.1 Classificação direta do sistema ABO (teste de Beth-Vincent).....	275
4.7.2 Classificação reversa do sistema ABO (ou prova de Simonin).....	277
4.7.3 Pesquisa de subgrupos do sistema ABO.....	281

4.7.4 Classificação RhD.....	281
4.7.5 Pesquisa de D fraco	283
4.7.6 Fenotipagem CDE.....	285
4.7.7 Teste de antiglobulina humana ou teste de Coombs.....	285
4.7.8 Teste indireto de antiglobulina humana ou técnica de Coombs indireto.....	288
4.7.9 Testes de compatibilidade.....	290
4.7.10 Técnicas de separação de anticorpos.....	295
4.8 Controle de qualidade de reagentes usados em imuno-hematologia.....	297
4.9 Controle das hemácias fenotipadas.....	300
4.10 Controle da albumina bovina a 22%.....	300
4.11 Hemocomponentes usados em hemoterapia.....	301
4.11.1 Principais hemocomponentes utilizados em hemoterapia.....	301
Bibliografia consultada.....	303

Prefácio

O Chico Trombone costumava me dizer:

– Isso eu sei fazer, dr. Luiz Fernando, aprendi com Joaquim Venâncio.

E era com orgulho que se referia a seu mestre.

Vimos, portanto, que a formação de técnicos já vem dos tempos de Oswaldo. É claro que não era institucionalizada como hoje. Eram outros tempos.

Joaquim Venâncio nasceu na fazenda Bela Vista, Minas Gerais. Era a fazenda da mãe de Carlos Chagas, pai. Em 1916, veio trabalhar no Instituto Oswaldo Cruz. Veio e deu certo. O dr. Lutz teria dito certa vez:

– Não troco o Venâncio por nenhum doutor de Oxford ou de Cambridge.

Se não disse, pensou.

Eficiência nos processos de seleção de pessoal? Competência do serviço de recursos humanos? Evidentemente que não. Não havia nada disso nessa época. As coisas eram muito mais simples, e davam certo. Veio porque era amigo do velho Carlos Chagas. Amigos de infância. Brincaram juntos na fazenda.

Quando Joaquim Venâncio faleceu em 27 de agosto de 1955, teve seu necrológico publicado na Revista Brasileira de Biologia – lugar de necrológico de cientista famoso. Cito textual: “Joaquim Venâncio conseguiu durante cerca de 35 anos que trabalhou ativamente, aprender zoologia, que conhecia de modo invejável. Como decorrência das contingências da vida, não teve oportunidade de instruir-se, mas sua mentalidade era de um homem culto. Pela convivência com o dr. Lutz, pela observação direta do que via nas excursões e no laboratório, adquiriu conhecimento detalhado de vários grupos zoológicos, principalmente, anfíbios, moluscos fluviais e trematódeos. Chegou a conhecer muito bem os anfíbios e, com grande facilidade, os classificava nas excursões pela voz. Dadas as indicações feitas pelo dr. Lutz em seus trabalhos, há casos em que foi citado na literatura como colaborador direto.”

Joaquim Venâncio era, sem dúvida, um naturalista. Era competente, tinha o domínio do ofício, a maestria da arte.

E gostava de ensinar. Ensinou muita gente.

Certa vez, o Venancinho me disse:

– Era a Escola do Venâncio, né? Foi muito boa, né?

* * *

Na presidência de Sérgio Arouca, resolvemos atualizar a “Escola de Venâncio”. E foi assim que surgiu a Escola Politécnica, com o nome do seu patrono. Cresceu e abriu várias frentes, desde a vocação científica aos cursos de nível médio, complementados pela formação de técnicos. Foi um êxito, como a antiga. Aparece sempre nos primeiros lugares nas avaliações e já se estendeu a outras instituições.

* * *

E agora surgem os livros didáticos: organizada por Etelcia Molinaro, Luzia Caputo e Regina Amendoeira, vem à luz a coleção Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde, reunindo professores de várias unidades da Fiocruz.

Os capítulos oferecem a história da técnica, os seus fundamentos, a maneira moderna de realizá-la, as suas aplicações, a organização do laboratório etc.

É útil para os cursos da Fundação Oswaldo Cruz e para outros externos. Mostra, também, o quanto as unidades da Fiocruz estão integradas na realização de suas tarefas.

Ensino é questão primordial. Sem ele, o país não se desenvolve.

Está de parabéns a Fiocruz pela realização de mais uma tarefa de primordial importância.

Oswaldo Cruz está orgulhoso dos seus continuadores.

Luiz Fernando Ferreira

Pesquisador emérito da Fundação Oswaldo Cruz

Apresentação

A coletânea de livros intitulada **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**, organizada por Etelcia Molinaro, Luzia Caputo e Regina Amendoeira, é, antes de tudo, uma obra original, importante e necessária. Original porque não existe na literatura técnica em saúde, na área biomédica brasileira e internacional, ao menos que eu saiba, algo semelhante em abrangência, profundidade e seleção dos temas abordados; importante pelo público-alvo a que se destina, muito além da “formação de técnicos de laboratórios”, abrangendo certamente todos os profissionais de saúde; e necessária porque servirá como obra de referência para a formação dos mencionados técnicos e como consulta obrigatória para todos os profissionais de saúde que necessitem de esclarecimento dos aspectos técnicos ali abordados.

Versada em cinco volumes e 23 capítulos, organizados em sequência lógica, desde a biossegurança e as boas práticas de laboratório, passando por todos os fundamentos das técnicas laboratoriais – bioquímica básica, biologia celular e molecular, histologia e ultraestrutura –, até atingir o cerne da prática laboratorial, da imunologia à infectoparasitologia – virologia, bacteriologia,

micologia, protozoologia e helmintologia e seus vetores, com a entomologia médica e a malacologia. Os autores dos respectivos capítulos são do melhor nível intelectual e científico, com titulação de mestres, doutores e especialistas, e com grande experiência prática nos assuntos de que tratam.

Parabenizo o Instituto Oswaldo Cruz e a Escola Politécnica Joaquim Venâncio, que patrocinaram esta obra de referência, e que, desde os seus primórdios, valorizaram a qualidade da formação dos seus técnicos e com eles povoaram e estão povoando o Brasil de Norte a Sul e de Leste a Oeste com o que temos de melhor – os fundamentos para uma boa pesquisa. Aproveito esta oportunidade para homenagear a figura de Henry Willcox, que, no início da década de 1980, quando o convidei para me ajudar na coordenação dos cursos de Pós-graduação em Biologia Parasitária e Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, foi o grande incentivador para criarmos paralelamente o Curso de Técnico em Pesquisa, do qual foi o seu primeiro coordenador.

Igualmente parabenizo as organizadoras desta coletânea, e a Fiocruz como um todo, pelo lançamento desta obra pioneira.

José Rodrigues Coura

Pesquisador titular emérito da Fundação Oswaldo Cruz
Chefe do Laboratório de Doenças Parasitárias
do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Apresentação das organizadoras

“Um sonho quase realizado”

Oswaldo Cruz, 1872-1917

As alterações pelas quais passa o mundo com a globalização trazem como consequência o surgimento de novos paradigmas tecnológicos, fazendo-se necessário que o ensino na área da saúde atenda às exigências do mundo moderno, do trabalho e do atual perfil do técnico da área.

Os cursos para a formação de técnicos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) buscam demonstrar os princípios científicos envolvidos com as técnicas laboratoriais, preparando os alunos para as transformações no mundo do trabalho em saúde decorrentes do desenvolvimento tecnológico e científico. Nesse contexto, duas unidades técnico-científicas da instituição – o Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e a Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV) – são historicamente as responsáveis pela coordenação de cursos e especializações técnicas que se firmaram como modelos desses princípios. Essas unidades sempre estiveram intrinsecamente ligadas na área de ensino técnico,

e os professores realizam permanentemente parcerias entre si. Muitos de nós, egressos desses cursos, somos hoje docentes e autores desta coleção.

Além da formação técnica de profissionais em nível regional e nacional, intensificou-se a demanda pelo estabelecimento de cooperações técnicas internacionais na Fiocruz, que, por sua expertise e capacidade de produzir, passou a divulgar conhecimentos, elaborando cursos, metodologias e tecnologias educacionais. A Escola Politécnica Joaquim Venâncio, desde 2004, é um centro colaborador da Organização Mundial da Saúde (OMS) para a educação de técnicos em saúde.

A ideia da publicação desta coleção surgiu da necessidade conjunta das duas unidades citadas da Fiocruz de produzir material didático que atendesse aos alunos dos cursos de nível técnico em Saúde da Fiocruz e de outros locais. Desse modo, o nosso principal desafio é oferecer um conteúdo que abarque todos os temas da área técnica da saúde tratados nos principais cursos de nível médio e que, ao mesmo tempo, possa manter-se suficientemente atualizado.

Dada a complexidade da estrutura instrumental e pedagógica dos cursos técnicos, fez-se necessário publicar uma coleção escolhendo-se tópicos de importância básica. Para tanto, foram convidados pesquisadores e professores com experiência de ensino em cursos de nível técnico e com destacado conhecimento nos temas abordados nos 23 capítulos que integram os cinco volumes da coleção.

A coleção **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde** tem como objetivo integrar conhecimentos teóricos e práticos, proporcionando ao aluno informações que possibilitem uma permanente reflexão de seu papel como agente transformador dos processos e atividades de ensino, pesquisa científica e desenvolvimento tecnológico. Outro objetivo inconteste destes livros é servir aos professores, como norteadores da definição curricular de seus cursos.

Visando garantir a autonomia dos autores, e respectivas responsabilidades, foi mantida a formatação original dos textos, inclusive as fotos, figuras, diagramas.

Podem ocorrer, também, repetições de conteúdo em alguns capítulos, mas, a nosso ver, a retirada de partes já abordadas em capítulos anteriores, poderia descontextualizar o texto.

O pontapé inicial deste sonho só foi possível pelo incondicional apoio dado pelo professor André Paulo da Silva Malhão, pela dra. Isabel Brasil Pereira, pessoa-chave desencadeadora do processo, e a dra. Tânia Cremonini de Araújo Jorge, que apoiaram e incentivaram institucionalmente o projeto. Agradecemos especialmente aos autores que abraçaram este trabalho com muito entusiasmo e que possibilitaram a sua concretização. É um carinho especial para Josane Ferreira Filho pela organização paciente de nossas reuniões e textos, a gratidão das organizadoras e dos autores.

Agradecemos em especial aos renomados cientistas eméritos da Fundação Oswaldo Cruz, doutores Luiz Fernando Ferreira – patrono da EPSJV – e José Rodrigues Coura, que nos deram a honra de apresentar esta coleção.

Esperamos, assim, contribuir para a sistematização do conhecimento dos leitores sobre os diferentes tópicos abordados nos capítulos, apresentando cada assunto de forma didática e sintética, e recomendando a consulta à literatura especializada sempre que houver necessidade de aprofundamento do conhecimento em determinados temas.

**Etelcia Molinaro
Luzia Caputo
Regina Amendoeira**

Capítulo 1

Bioquímica

Emanuele Amorim Alves

Elisângela de Souza Santos

Mônica Mendes Caminha Murito

Virgínia de Lourdes Finete

Liliane Rosa Alves

1.1 Introdução às biomoléculas

A bioquímica é a ciência que congrega o estudo da química e da biologia. Seu principal objetivo é o estudo das interações que ocorrem nos seres vivos no nível molecular, mediante a descrição dos seus processos químicos e biológicos. Apesar de os seres vivos serem muito diferentes macroscopicamente, existe muita semelhança molecular entre eles. Por exemplo, acompanhando as homologias proteicas, a transmissão da informação genética pelo DNA ocorre da mesma forma, assim como as reações que produzem ou utilizam energia.

As principais **biomoléculas** encontradas nos tecidos e nas células humanas são os **ácidos nucleicos**, as **proteínas**, os **carboidratos** e os **lipídios**. A maioria das biomoléculas é derivada de hidrocarbonetos, pois a química do organismo vivo está organizada ao redor do elemento carbono, que representa mais

da metade do peso seco das células. Os ácidos nucleicos são os responsáveis pela transmissão da informação genética. As proteínas participam da estrutura das células e, entre outras funções, catalisam reações químicas. Os carboidratos, assim como os lipídios, são importantes fontes de energia para as células. Os lipídios possuem também papel estrutural fundamental, como principal componente das membranas celulares. Além das biomoléculas, também estão presentes nas células **substâncias inorgânicas**, essenciais para o seu perfeito funcionamento. São elas a água, os sais minerais, o oxigênio e o gás carbônico.

Os avanços no campo da bioquímica foram possíveis pelo isolamento das biomoléculas, com a determinação de suas estruturas e a análise de suas funções e do seu metabolismo. O estudo da estrutura das biomoléculas é realizado utilizando-se diferentes métodos, como a espectrometria de massa, a ressonância nuclear magnética, a espectroscopia ultravioleta e visível e a cristalografia por difração de raios X.

Quadro 1.1. Métodos de análise de biomoléculas.

Métodos para separação e purificação de biomoléculas	Métodos para determinação da estrutura das biomoléculas
Fracionamento	Análise elementar
<ul style="list-style-type: none"> • cromatografia: papel, troca iônica, afinidade, camada fina, gel filtração, gás líquida e líquida de alta pressão 	<ul style="list-style-type: none"> • espectroscopia em ultravioleta e no visível • infravermelho • ressonância nuclear magnética • espectrometria de massas
<ul style="list-style-type: none"> • centrifugação diferencial 	<ul style="list-style-type: none"> • uso de hidrólise ácida ou alcalina para degradação da biomolécula
<ul style="list-style-type: none"> • eletroforese: papel, alta-voltagem, agarose, acetato de celulose, gel de amido, gel de poliacrilamida 	<ul style="list-style-type: none"> • sequenciamento por reação de degradação de Edman • espectrometria de massas
<ul style="list-style-type: none"> • ultracentrifugação 	<ul style="list-style-type: none"> • cristalografia por difração de raios X

1.2 Biomoléculas

1.2.1 Água

A água é uma substância fundamental para a vida no planeta. As inúmeras reações químicas que ocorrem a cada momento no interior dos organismos vivos têm a água como **solvente**. Por meio da água, são transportadas substâncias interna e externamente, nas células e entre os tecidos. A manutenção da temperatura corpórea também é feita com o auxílio da água, que atua como protetor térmico contra variações da temperatura ambiente. Isso resulta do elevado valor do calor específico da água, $1 \text{ cal/g}^\circ\text{C}$, o que significa que a energia varia em uma caloria por grama, quando a alteração na temperatura é de 1°C . Assim, mesmo que ocorram variações bruscas de temperatura no ambiente externo, no interior do organismo a água mantém a temperatura estável. Outro aspecto físico-químico importante da água é a sua **neutralidade**: seu valor de **pH** é igual a 7,0. Isso influencia na regulação do valor do pH em cada órgão ou tecido do organismo e na ocorrência de diversas reações químicas.

A capacidade que a água tem de dissolver as diversas substâncias que compõem as células pode ser explicada por sua estrutura química. A presença de dois polos na molécula da água, um positivo e outro negativo, decorre da repulsão dos elétrons desemparelhados (não ligados) e do fato de o oxigênio ser mais eletronegativo¹ que o hidrogênio, atraindo os elétrons presentes nas duas ligações covalentes. Essa atração é tão forte que promove a ocorrência de interações intermoleculares entre oxigênio e hidrogênio, chamadas **ligações de hidrogênio**.

Por esse motivo, a água apresenta propriedades físico-químicas peculiares, como ponto de ebulição elevado, igual a 100°C , e ponto de fusão igual a 0°C . É preciso energia para romper as ligações de hidrogênio e, com isso, fazer a água mudar de estado físico. Assim, a água se mantém no estado líquido na maioria dos ambientes do planeta.

¹ A eletronegatividade, uma propriedade periódica dos elementos, é a capacidade de um átomo atrair elétrons.

Em termos percentuais, aproximadamente 75% da massa de um indivíduo adulto é constituída de água.

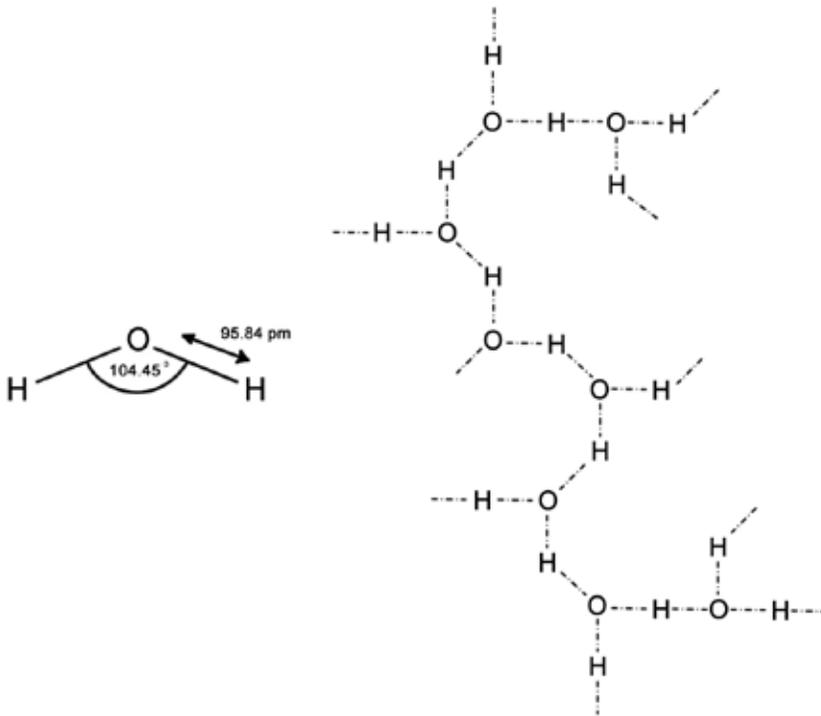


Figura 1.1. Estrutura química da molécula da água e ligações de hidrogênio entre as moléculas de água.

1.2.2 Sais minerais

Os sais minerais participam de inúmeras reações químicas que ocorrem no organismo. O bom funcionamento das células dependerá dos íons provenientes dos sais minerais, que são unidades eletricamente carregadas, por perda ou ganho de elétrons. O quadro 1.2 relaciona alguns íons e suas principais funções bioquímicas.

Quadro 1.2 – Principais funções bioquímicas dos íons.

ÍONS	
Cátions (perda de elétrons – carga positiva)	Ânions (ganho de elétrons – carga negativa)
<ul style="list-style-type: none"> • Na⁺ e K⁺ (cátion sódio e cátion potássio): funcionamento das células nervosas. • Ca²⁺ (cátion cálcio): contração muscular, coagulação do sangue, estrutura óssea, motilidade dos espermatozoides e transmissão nervosa. • Fe²⁺ e Fe³⁺ (cátion ferro): constituição da hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de O₂ no sangue dos pulmões até os tecidos. • Mg²⁺ (cátion magnésio): componente da clorofila das plantas e cofator de diversas enzimas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cl⁻ (ânion cloreto): regulação da osmolaridade² de tecidos e células, controlando a entrada e a saída de água nessas estruturas, e equilíbrio do pH no suco gástrico. • PO₄²⁻ (ânion fosfato): envolvido no processo de fosforilação das biomoléculas e no equilíbrio e manutenção do pH. • HCO₃⁻ (ânion bicarbonato): equilíbrio e manutenção do pH, reduzindo a acidez excessiva.

1.2.3 Proteínas

As proteínas, substâncias essenciais para os seres vivos, são constituídas por **sequências de aminoácidos**. Os aminoácidos são formados por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio; alguns deles contêm enxofre. Existem vinte aminoácidos diferentes que possuem algo em comum em sua estrutura: um átomo de carbono central, chamado carbono alfa (C_α), ao qual se ligam quatro grupos de átomos, de acordo com a figura abaixo. O grupo **amino**, a **carboxila** e o **hidrogênio** estão sempre nas mesmas posições em todos os vinte aminoácidos, que são diferenciados somente pelo **grupo R** (grupo radical ou

² Osmolaridade é a medida da pressão osmótica exercida por partículas de soluto contidas em uma solução.

cadeia lateral). Todas as proteínas existentes são formadas pela combinação desses vinte aminoácidos.

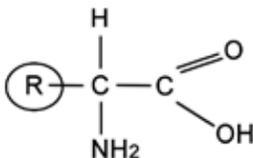


Figura 1.2. Fórmula geral de um aminoácido.

Quadro 1.3. Classificação dos aminoácidos segundo a sua necessidade.

Aminoácidos naturais: são fabricados pelo próprio organismo a partir de outras substâncias químicas	Aminoácidos essenciais: o organismo não consegue produzi-los; precisam ser obtidos através dos alimentos
<p>Ácido aspártico (Asp) Ácido glutâmico (Glu) Alanina (Ala) Arginina (Arg) Asparagina (Asn) Cisteína (Cis) Glutamina (Gln) Glicina (Gly) Prolina (Pro) Serina (Ser) Tirosina (Tyr)</p>	<p>Histidina (His) Isoleucina (Iso) Leucina (Leu) Lisina (Lis) Metionina (Met) Fenilalanina (Fen) Treonina (Tre) Triptofano (Tri) Valina (Val)</p>

De acordo com as suas cadeias laterais, os aminoácidos podem ser classificados como **polares, apolares, carregados e aromáticos**. Os aminoácidos polares formam ligações de hidrogênio com a água por meio de suas cadeias laterais. Os aminoácidos apolares possuem cadeias laterais alifáticas (ricas em hidrocarbonetos), o que os torna hidrofóbicos; por isso, geralmente voltam suas cadeias laterais para o interior das proteínas, uma vez que não interagem com o meio aquoso. Os aminoácidos carregados podem ter carga negativa ou positiva e são assim classificados de acordo com a sua carga em pH 7,0. Os aminoácidos aromáticos são aqueles que possuem um anel aromático em sua cadeia lateral.

Em soluções aquosas, os aminoácidos estão ionizados, podendo agir como ácidos ou bases. Quando os aminoácidos se encontram em um pH no qual as cargas dos grupos ionizáveis se anulam, formam os chamados **zwitteríons**, sendo, nessa forma, eletricamente neutros.

Os aminoácidos podem ser identificados com base em uma **curva de titulação**. Como possuem, considerando a glicina como exemplo, uma carboxila e um grupo amino, esses, em pH ácido, estarão protonados, e o aminoácido terá carga positiva. No momento em que se adiciona uma base, o pH aumenta até que a carboxila doe o seu próton. A carboxila doa o próton primeiro, pois possui uma característica ácida, o que não é o caso do grupo amino. O pH continua a aumentar, com a adição de mais base, até que o hidrogênio do grupo amino também seja perdido.

O pH com 50% das carboxilas protonadas e 50% desprotonadas é chamado **pK**. O **pK** se encontra na zona de tamponamento pois, nesse momento, o hidrogênio pode sair de uma carboxila e ser captado por outra; com isso, o aumento de pH fica difícil, gerando uma faixa de pH tamporada. O mesmo ocorre para as faixas de pH onde o pK do grupamento amino se encontra; no caso dos aminoácidos com cadeia lateral, ocorre uma terceira região de pK.

Existe uma faixa de pH na qual todas as moléculas estão na forma de zwitteríons, e, por isso, a solução não tem carga e é chamada **ponto isoelétrico (pI)**. Em um aminoácido sem cadeia lateral, o pI é um valor equidistante dos dois pKs, o do grupamento amino e o da carboxila. Nessa faixa, o pH varia muito por causa da quantidade crescente de próton liberada, pois não há carboxila protonada nem amino desprotonado para que ele seja captado.

As curvas de titulação dos aminoácidos podem ser influenciadas pelos grupos presentes nas cadeias laterais, como mencionado acima. Caso o grupo possa sofrer desprotonação, é possível que a sua participação aumente as zonas de tamponamento da curva daquele aminoácido. Numa titulação pode haver no máximo três e no mínimo dois pKs. É importante destacar que, como a água é polar, se a reação estiver acontecendo em meio aquoso, ao atingir o seu pI e ficar neutro, o aminoácido se tornará insolúvel, precipitando.

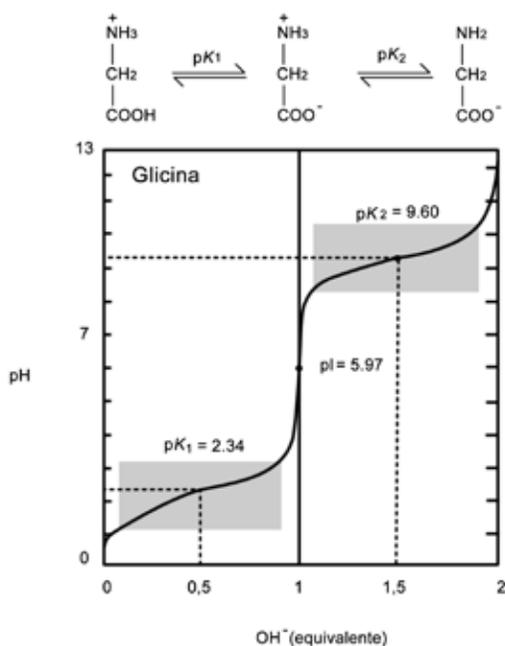


Figura 1.3. Curva de titulação da glicina.

Os aminoácidos ligam-se entre si por meio das **ligações peptídicas**, formando moléculas chamadas peptídeos. A ligação ocorre entre o grupo amino de um aminoácido e a carboxila do outro, em decorrência da atração entre as suas cargas opostas. Essa reação libera uma molécula de água. O grupo amino livre e a carboxila livre para efetuar essa ligação são chamados, respectivamente, amino-terminal e carboxi-terminal.

A estrutura primária das proteínas é formada pela **sequência de aminoácidos** que as compõem, que estão unidos pelas ligações peptídicas. As proteínas estão presentes em todas as células e executam importantes funções, tais como estrutura, transporte, sinalização, adesão, motilidade, catálise e defesa. Apesar de diferentes entre si, todas as proteínas são formadas por cadeias de aminoácidos. Algumas proteínas podem ter mais de uma cadeia, e diz-se que elas possuem multissubunidades. A hemoglobina, por exemplo, é um tetrâmero, pois possui quatro cadeias: duas cadeias α idênticas entre si e duas cadeias β também idênticas entre si.

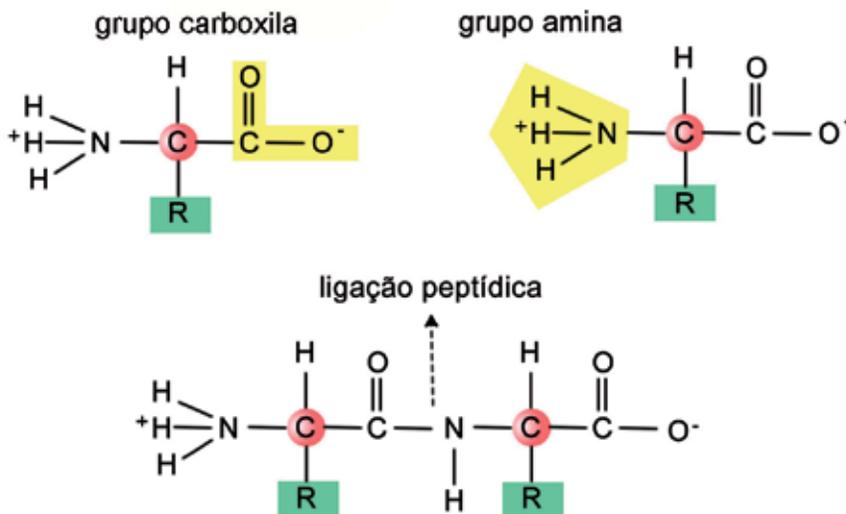


Figura 1.4. Ligação peptídica.

A maioria das proteínas contém apenas aminoácidos em sua estrutura, porém muitas delas, chamadas **proteínas conjugadas**, podem possuir grupamentos químicos diferentes. Chama-se **grupo prostético** a parte da proteína que não é formada por aminoácidos. Um exemplo disso é o **grupo heme**, grupo prostético da hemoglobina. É no átomo de ferro desse grupo que ocorre a ligação do oxigênio, permitindo seu transporte pela proteína. Na maioria das vezes, o grupo prostético desempenha importante papel na função da proteína, como é o caso da hemoglobina. As proteínas que possuem em sua composição moléculas de lipídios ou carboidratos são denominadas, respectivamente, lipoproteínas e glicoproteínas. Da mesma forma, as proteínas que possuem um metal em sua estrutura são classificadas como metaloproteínas.

Todas as funções de uma proteína determinada são dependentes de sua estrutura primária. A forma e a ordem como seus aminoácidos estão ligados definirão qual a estrutura secundária da proteína, e, conseqüentemente, a sua função.

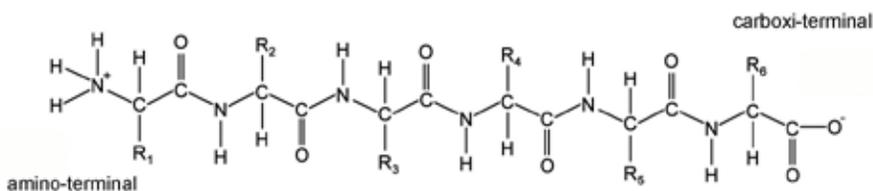


Figura 1.5. Estrutura primária de uma proteína.

A estrutura secundária é uma estrutura tridimensional formada mediante a interação dos aminoácidos da cadeia primária entre si. As cadeias laterais dos aminoácidos interagem, dando à proteína uma forma tridimensional. Essas interações são ligações fracas, como as ligações de hidrogênio. As proteínas podem apresentar mais de uma estrutura secundária ao longo de sua cadeia. As estruturas secundárias organizadas são a α -hélice, a folha- β -pregueada e a hélice do colágeno.

Na **α -hélice**, as ligações de hidrogênio são feitas a cada quatro aminoácidos da sequência, ficando as cadeias laterais para fora. Essa ligação sequencial confere à proteína uma conformação de hélice. A queratina é uma proteína formada por essa estrutura secundária, e a diferença entre os tipos de cabelo se dá pelas interações das cadeias laterais da cisteína, que formam pontes dissulfeto. Em cabelos lisos, as ligações dissulfeto são paralelas, ao passo que nos cabelos cacheados as ligações são oblíquas. Isso depende da localização da cisteína na sequência da queratina, informação contida no DNA do indivíduo.

Na **folha- β -pregueada**, a cadeia de aminoácidos se organiza em várias dobras consecutivas nas quais as ligações de hidrogênio são feitas entre segmentos adjacentes da cadeia. Esse tipo de ligação faz a proteína ficar achatada e ter menos elasticidade do que a apresentada pelas proteínas com estrutura α -hélice. A fibroína é uma proteína rica nesse tipo de estrutura, o que a torna rígida. É encontrada na teia de aranha e na seda.

Como o nome já diz, a **hélice do colágeno** só é encontrada no colágeno. Ela consiste em três cadeias polipeptídicas entrelaçadas. Essa estrutura aparece no tecido conjuntivo, cuja função é suportar tensão e dar proteção mecânica.

Uma fibra de colágeno contém várias hélices unidas, oferecendo maior resistência. O colágeno possui em sua cadeia primária, basicamente, três aminoácidos: a glicina, a alanina e a hidroxiprolina, esse último aminoácido é o responsável pelas ligações de hidrogênio dessa estrutura.

O enovelamento proteico determina a estrutura terciária. As **proteínas fibrosas**, em geral, não formam estruturas terciárias, pois sua forma alongada favorece sua função de sustentação e proteção.

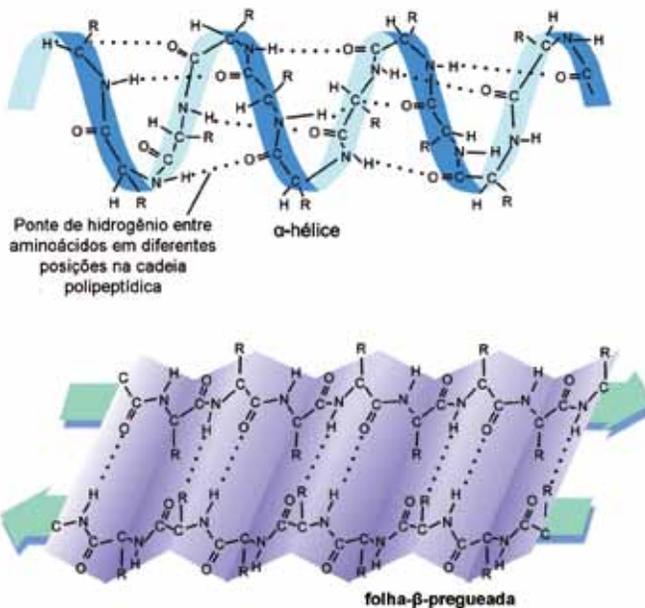


Figura 1.6. Estruturas secundárias organizadas das proteínas.

As **proteínas globulares** são proteínas com estrutura terciária bem definida. Em geral, elas se enovelam para ocupar menos espaço e para trazer para dentro de sua estrutura os aminoácidos apolares, pois eles são incapazes de interagir com o meio celular, que é aquoso. A solubilização de proteínas globulares em meio aquoso se dá pela interação dos aminoácidos polares com a água por meio das ligações de hidrogênio. A forma da proteína globular também é estabilizada pelas interações hidrofóbicas na parte interna da proteína.

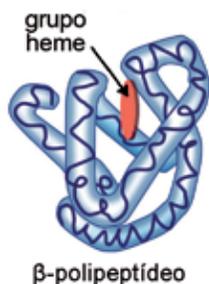


Figura 1.7. Estrutura terciária da cadeia de globina mostrando grupamento heme.

Quando a proteína se encontra em sua conformação mais estável – ou seja, naquela conformação em que existe menor gasto de energia –, diz-se que ela se encontra em sua forma nativa. A estrutura quaternária ocorre quando há mais de uma cadeia polipeptídica ligada entre si. A hemoglobina é uma proteína com estrutura quaternária, apresentando quatro cadeias globulares unidas entre si. Essa conformação específica permite que a hemoglobina tenha a função de carrear gases.

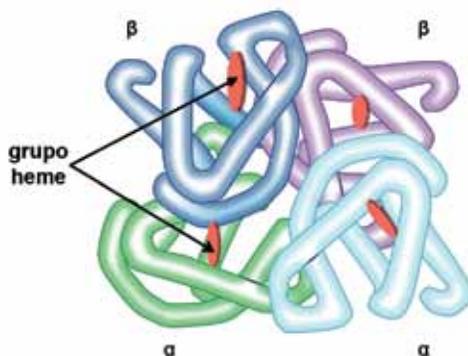


Figura 1.8. Estrutura quaternária da hemoglobina mostrando os grupos hemes.

A grande variedade de funções exercidas pelas proteínas no organismo é resultado da possibilidade de geração de inúmeras sequências que irão proporcionar diversas estruturas secundárias, terciárias e quaternárias, oriundas de um mesmo grupo de aminoácidos.



Figura 1.9. Principais funções biológicas das proteínas.

A **sequência da cadeia primária** fornece a identificação básica da proteína a partir da qual serão formadas as cadeias secundária, terciária e quaternária. Quando submetida a variações de temperatura, pH ou concentração de outras substâncias presentes, uma proteína pode sofrer uma reação química chamada **desnaturação**, uma alteração nas estruturas da proteína que ocasiona a inativação ou a modificação das mesmas. A única estrutura que não é afetada pela desnaturação é a estrutura primária. O fato de a desnaturação não afetar a cadeia primária serviu para provar que a cadeia primária é a responsável pela estrutura básica da proteína.

1.2.3.1 Enzimas

As enzimas são proteínas que possuem a capacidade de aumentar a velocidade de determinada reação química, atuando, portanto, como **catalisadores**³ das reações que ocorrem em células e tecidos vivos. As enzimas são proteínas com estrutura globular que apresentam uma região onde ocorre a ligação do substrato. Esse local é denominado sítio catalítico ou sítio ativo. Substrato é a molécula que é reconhecida pela enzima e que será modificada por ela. Com isso, forma-se o complexo enzima-substrato (ES). Nesse processo, as enzimas catalisam as reações com o substrato ligado e, em geral, podem atuar seguidamente em novas moléculas do substrato. Existem dois modelos teóricos principais para explicar a formação do complexo ES: **chave-fechadura** (fig. 1.10) e **encaixe induzido** (fig. 1.11).

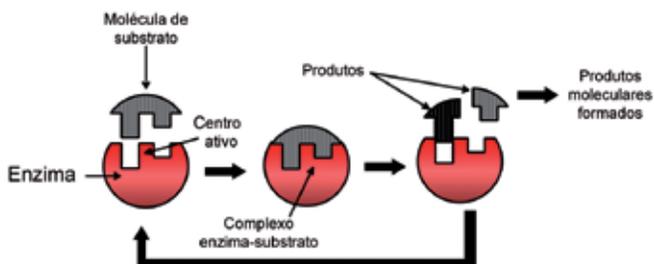


Figura 1.10. Modelo chave-fechadura para explicação da formação do complexo ES.

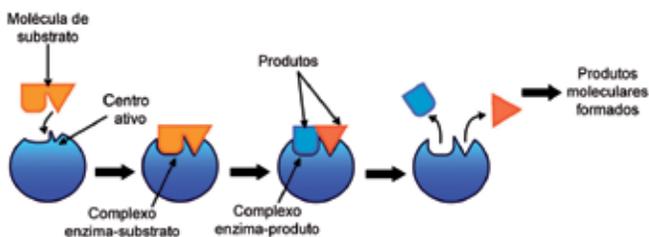


Figura 1.11. Modelo encaixe induzido para explicação da formação do complexo ES.

³ Catalisadores são substâncias químicas capazes de reduzir a energia de ativação em uma reação química, aumentando a sua velocidade.

No modelo chave-fechadura, a enzima já possui um local específico para se ligar ao substrato, ao passo que, no modelo do encaixe induzido, a própria ligação do substrato induz a formação desse local específico, pela mudança na organização molecular da enzima. Em alguns casos, as enzimas são bastante específicas para determinado substrato. É importante destacar que os centros de ativação da enzima dependem diretamente das estruturas terciária ou quaternária da proteína.

Existem moléculas orgânicas ou inorgânicas, denominadas **cofatores**, que são necessárias para o funcionamento da enzima. A fração da enzima sem o cofator é chamada apoenzima; quando o cofator está presente, a enzima é denominada holoenzima. Os cofatores podem ser íons inorgânicos (Fe^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , por exemplo), grupos prostéticos (heme, por exemplo) ou coenzimas (vitaminas, por exemplo). Existem alguns fatores que podem afetar a atividade das enzimas, como a desnaturação e a saturação. A desnaturação provoca alteração na estrutura da enzima, modificando seu centro de ativação; a saturação ocorre quando a enzima atua em sua capacidade máxima. Em ambas as situações, a enzima tem sua “atividade catalítica” reduzida.

As enzimas podem ser classificadas da seguinte maneira:

- **oxidorreduzases:** catalisam reações de oxidorredução;
- **transferases:** transferem uma molécula e adicionam outra;
- **hidrolases:** fazem reagir determinado substrato com a água;
- **liases:** participam de quebras moleculares;
- **isomerases:** transformam um isômero em outro.
- **ligases:** fazem reagir dois substratos, formando um único produto.

As enzimas podem ser inibidas de forma reversível ou de forma irreversível. Na **inibição reversível**, a enzima tem sua capacidade catalítica recuperada quando a inibição se encerra. Na **inibição irreversível**, a enzima é inativada. A inibição reversível pode ser competitiva ou não competitiva. O inibidor competitivo disputa o sítio catalítico da enzima com o substrato. Enquanto o inibidor está ligado ao sítio ativo, a enzima fica inativa, pois ele impede a ligação do substrato no sítio da enzima. De forma geral, o inibidor competitivo possui estrutura semelhante à do substrato da enzima. A inibição não competitiva

ocorre quando o inibidor não compete pelo sítio catalítico com o substrato. Ele simplesmente se liga a outro sítio e, na maioria das vezes, modifica a estrutura da enzima de forma a alterar o sítio catalítico, impedindo a entrada do substrato. Na inibição irreversível, os inibidores se ligam covalentemente à enzima, inativando-a.

1.2.4 Glicídios

Os glicídios, também chamados **carboidratos** (hidratos de carbono)⁴ ou **açúcares**, são substâncias que têm sua estrutura química formada por aldeídos, ou cetonas, poli-hidroxilados: para cada átomo de carbono, existem dois átomos de hidrogênio e um de oxigênio. Podem também conter em sua estrutura átomos de nitrogênio, fósforo ou enxofre. São as biomoléculas mais abundantes no planeta e uma importante fonte de energia dos organismos não fotossintéticos. Além de serem fonte de energia, os carboidratos participam da estrutura de plantas; são fonte de reserva energética tanto em plantas (amido) quanto em animais (glicogênio); e se ligam a proteínas, participando de processos de adesão celular, reconhecimento celular e endereçamento de proteínas. Os **monossacarídeos** podem ser classificados como **aldoses** ou **cetoses**. As aldoses consistem em poli-hidroxialdeídos com três a sete carbonos; as cetoses são poli-hidroxicetonas.

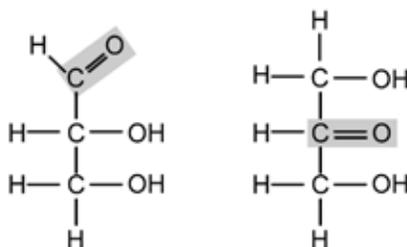


Figura 1.12. A) Estrutura de uma aldose; B) Estrutura de uma cetose.

⁴ Nos glicídios, hidrogênio e oxigênio ocorrem nas moléculas de água na proporção de 2:1, por isso o nome “hidrato”.

Os monossacarídeos podem se unir em cadeias para formar os **oligossacarídeos**, com pequenas cadeias de monossacarídeos, ou os **polissacarídeos**, com grandes cadeias. Os **dissacarídeos** são oligossacarídeos com duas unidades de monossacarídeos e são os mais abundantes. A sacarose e a lactose são os dissacarídeos mais conhecidos.

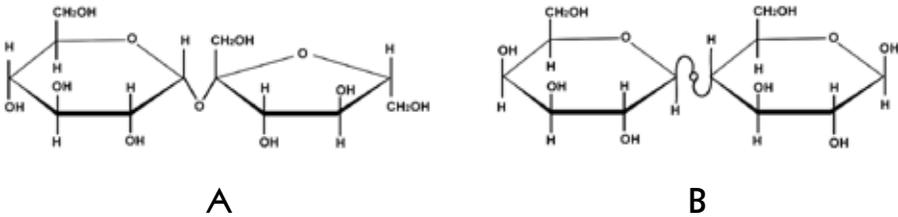


Figura 1.13. A) Estrutura da sacarose; B) Estrutura da lactose.

Os carbonos que contêm a hidroxila em uma molécula de monossacarídeo tornam-se um **centro quiral** (imagens especulares), pois nele são ligados quatro grupos diferentes. Isso leva os monossacarídeos a ocorrerem em formas isoméricas opticamente ativas. Assim, os monossacarídeos possuem formas **destrógeras** (D) e **levógeras** (L). As destrógeras desviam o plano da luz polarizada para a direita e as levógeras, para a esquerda. As formas mais comuns de glicídios na natureza são as formas D. Em todos os monossacarídeos haverá, pelo menos, um carbono quiral. As formas D e L de um monossacarídeo são chamadas enantiômeros. Quando a configuração de um açúcar é diferente da configuração de outro apenas por um átomo de carbono, ele é chamado epímero. Monossacarídeos com cinco ou mais carbonos quando em solução assumem forma cíclica. A ligação para fechamento da estrutura se dá entre o grupo funcional (aldeído ou cetona) e a hidroxila do carbono quiral. Se o grupo funcional é o aldeído, a forma cíclica é denominada hemiacetal; se é uma cetona, chama-se hemicetal.

Quando os carbonos do monossacarídeo se fecham para formar o ciclo, o carbono ligado ao grupo funcional se torna quiral, deixando a molécula com dois centros assimétricos. Esse carbono é agora chamado carbono anomérico.

Há também o aparecimento de uma hidroxila, a hidroxila heterosídica. Quando o ciclo se fecha com cinco carbonos, o açúcar é chamado furanose; quando são seis átomos de carbono, é chamado piranose.

Os açúcares são capazes de sofrer oxidação no carbono da carbonila, transformando-o em ácido carboxílico. Essa oxidação pode ser causada por agentes oxidantes fracos, como os íons metálicos – por exemplo, o íon férrico (Fe^{+3}) e os íons cúpricos (Cu^{+2}). Os açúcares que possuem essa característica são chamados redutores. A glicose possui essa capacidade de redução; por isso, sua dosagem no sangue foi durante muito tempo medida pelo teste de Fischer, que se baseia na característica redutora da glicose.

A formação dos dissacarídeos, dos polissacarídeos e dos oligossacarídeos se dá por meio de uma ligação covalente forte entre o grupo funcional de um monossacarídeo e o carbono anomérico de outro. Essa ligação é denominada **ligação O-glicosídica**. Monossacarídeos redutores podem perder sua capacidade redutora quando fazem uma ligação glicosídica. O carbono anomérico da extremidade de uma cadeia que possui um carbono anomérico livre é denominado extremidade redutora. Os dissacarídeos, os oligossacarídeos e os polissacarídeos podem sofrer hidrólise ácida para liberar suas porções monossacarídicas.

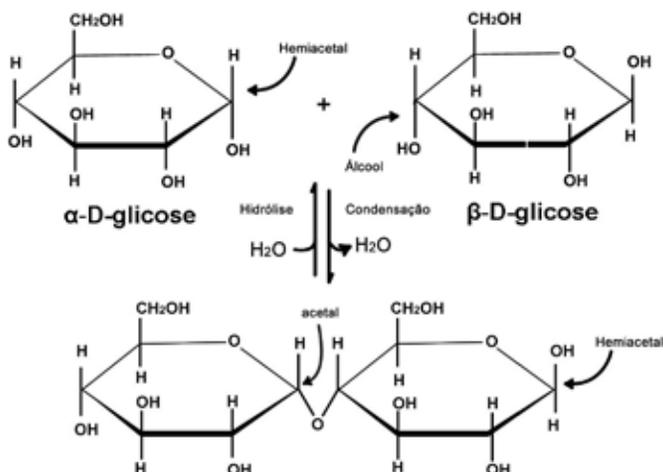


Figura 1.14. Formação da ligação glicosídica na síntese da maltose.

1.2.5 Lipídios

Os lipídios são um grupo de substâncias que se caracteriza pela **baixa solubilidade** em água. Eles desempenham várias funções celulares e representam outra importante forma de estocagem de energia na maioria dos organismos, assim como o constituinte mais abundante das membranas celulares. Além disso, os lipídios estão relacionados com diversas funções biológicas, podendo atuar como cofatores, mensageiros intra e extracelulares ou transportadores. De modo geral, os lipídios são moléculas apolares que apresentam enorme diversidade estrutural. O componente estrutural básico da maioria dos lipídios é a molécula de ácido graxo. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos cuja cadeia de hidrocarboneto pode variar de 4 a 36 carbonos, apresentando níveis diferentes de saturação. A nomenclatura dos ácidos graxos é baseada no número de carbonos que apresentam e na quantidade e na posição das duplas ligações que eles contêm. Considerando que o primeiro carbono é o do grupo carboxílico, a posição das duplas ligações é designada pelo símbolo Δ (delta) seguido do número do carbono em que a dupla ligação está localizada.

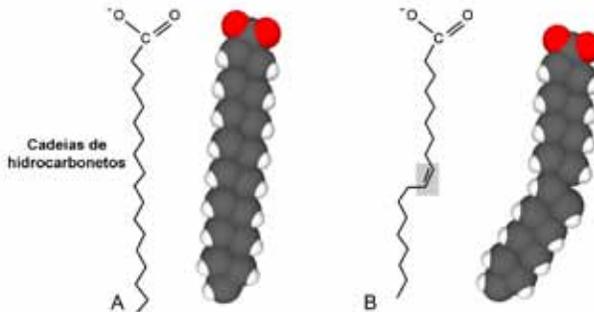


Figura 1.15. A) Estrutura do ácido esteárico; B) Estrutura do ácido oleico.
O ácido esteárico é saturado, ao passo que o oleico é insaturado.

A maioria dos ácidos graxos de ocorrência natural possui um número par de carbonos, que varia de 12 a 24. As insaturações possuem normalmente configuração cis e são intercaladas com ligação simples. Quanto maior e mais saturada for a cadeia carbônica, menor será a solubilidade do ácido graxo

em água. O ponto de fusão também é influenciado pelo grau de saturação dos ácidos graxos, sendo os poli-insaturados líquidos à temperatura ambiente (óleos). A presença do grupo carboxílico na molécula de ácido graxo permite a sua participação em várias reações, gerando ésteres ou amidas como derivados. Essas reações são as responsáveis pela grande diversidade estrutural observada na classe dos lipídios.

1.2.5.1 Triacilgliceróis (triglicerídeos)

Os triacilgliceróis são ésteres formados a partir da reação de três ácidos graxos com uma molécula de glicerol. Eles podem ser compostos por três ácidos graxos iguais ou diferentes. Também conhecidos como triglicerídeos, essas moléculas são os lipídios mais simples gerados a partir dos ácidos graxos.

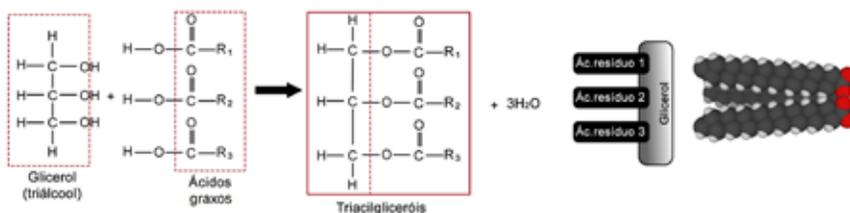


Figura 1.16. Formação dos triacilgliceróis.

Os triacilgliceróis e outros lipídios neutros podem ser estocados no interior das células eucarióticas, em uma organela denominada gota lipídica presente no citoplasma, provendo as demandas energéticas e estruturais, e participando dos processos de sinalização e ativação celular.

Os triglicerídeos provenientes da dieta sofrem digestão no duodeno e no íleo proximal. Os triglicerídeos sofrem hidrólise pela ação de lípases e ácidos biliares, originando glicerol e ácidos graxos livres. Após a absorção, são sintetizados novamente nas células epiteliais do intestino e se combinam com o colesterol e as apolipoproteínas para formar os quilomícrons, que serão transportados pelo ducto torácico para a circulação.

Além de importante fonte de energia, os triglicerídeos, representados pelos óleos e gorduras animais ou vegetais, agem como isolante térmico sob a pele (tecido adiposo), equilibrando e mantendo a temperatura corpórea, uma vez que são maus condutores de calor. Em regiões onde a temperatura é muito baixa, os animais armazenam gordura nos períodos de clima mais quente e a utilizam como fonte de energia nos mais frios. Os óleos presentes em sementes, como as de soja, oliva, milho e girassol, atuam como excelentes fontes de lipídios na alimentação.

1.2.5.2 Fosfolipídios

Os fosfolipídios são os principais componentes das membranas celulares. Eles formam uma barreira com permeabilidade seletiva que delimita o espaço intracelular e gera o arcabouço no qual estão inseridas as demais moléculas que compõem a membrana plasmática, como proteínas e açúcares. Os fosfolipídios têm como característica principal a presença de um grupamento fosfato associado, por meio de uma ligação fosfodiéster, a um esqueleto lipídico. Podem ser classificados em dois grandes grupos: os glicerofosfolipídios e os esfingolipídios.

Os **glicerofosfolipídios** são compostos por uma molécula de glicerol ligada a dois ácidos graxos e a um grupo fosfato. A um dos oxigênios do fosfato podem estar ligados grupos neutros ou carregados, como colina, etanolamina e glicerol, que dão origem, respectivamente, à fosfatidilcolina, à fosfatidiletanolamina e ao fosfatidilglicerol.

Os **esfingolipídios** são formados por um amino álcool (esfingosina), uma molécula de ácido graxo e um grupamento polar contendo fosfato. Um exemplo de esfingolipídio é a esfingomielina, formada pela ligação de uma fosfocolina à cabeça polar alcoólica do esqueleto de esfingosina.

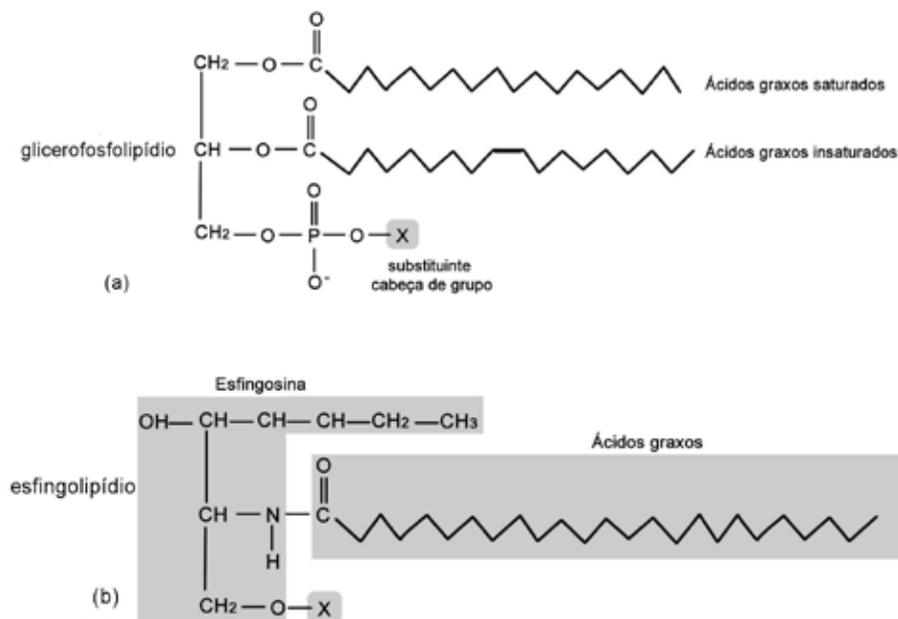


Figura 1.17. Estrutura geral de um glicerofosfolípido (a) e de um esfingolípido (b).

Na estrutura química dos fosfolípidos, podemos observar duas porções distintas: uma região polar ou hidrofílica, representada pelo grupamento fosfato, e outra apolar ou hidrofóbica, gerada pelo longo esqueleto carbônico.

Essa natureza anfipática dos fosfolípidos é essencial para a manutenção da arquitetura de bicamada lipídica observada nas membranas celulares. As porções polares interagem com as moléculas de água no ambiente intra e extracelular, enquanto as regiões apolares interagem entre si na porção interna da membrana.

1.2.5.3 Esteróis

Os esteróis são lípidos que possuem em sua estrutura química um núcleo esteroide, que consiste em quatro anéis carbônicos unidos entre si, três com seis carbonos e um com cinco.

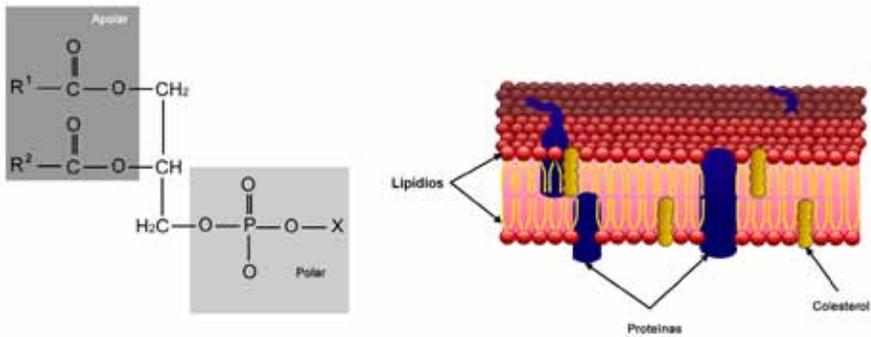


Figura 1.18. Estrutura química do fosfolipídio, composição química principal da membrana celular.

O esteroide mais abundante nos tecidos animais é o **colesterol**; nos fungos, é o **ergosterol**. O colesterol é uma molécula anfipática, com uma porção apolar, formada pelo núcleo esteroide e pela cadeia de hidrocarboneto ligada ao carbono 17, e uma porção polar, decorrente do grupamento hidroxila associado ao carbono 3. Os esteróides possuem diversas funções biológicas: além do seu importante papel estrutural como constituintes das membranas celulares, são também precursores dos hormônios esteróides e dos sais biliares.

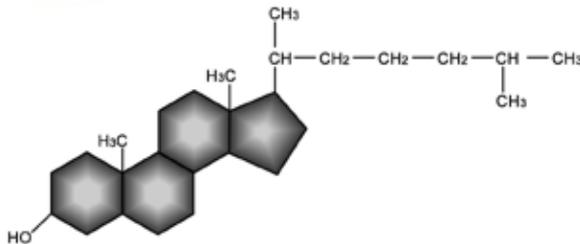


Figura 1.19. Estrutura química do colesterol, um esteroide que faz parte da composição das membranas de células animais, porém não está presente nas células de vegetais ou bactérias.

1.2.5.4 Lipoproteínas

Os lipídios são extremamente importantes do ponto de vista estrutural e energético, mas a natureza hidrofóbica dessas moléculas faz o seu transporte

no organismo ser possível apenas quando associado a proteínas. Em vertebrados, os ácidos graxos livres circulam no plasma associados à albumina, que os transporta do tecido adiposo para os demais tecidos, onde são utilizados como fonte de energia. Existe também uma classe específica de proteínas, as lipoproteínas plasmáticas, responsáveis pela distribuição dos diferentes tipos de lipídios nos vários tecidos do organismo.

As **lipoproteínas** de mamíferos são moléculas que contêm uma região interna hidrofóbica – composta por lipídios neutros, principalmente éster de colesterol e triacilglicerol – e uma porção externa hidrofílica – formada por uma única camada de lipídios anfipáticos (colesteróis e fosfolipídios) e pelas apoproteínas. Possuem composição proteica distinta que depende da natureza, da origem e do destino dos lipídios a serem transportados. Além disso, a relação entre o conteúdo lipídico e proteico faz as lipoproteínas apresentarem densidades diferentes, sendo, por isso, classificadas em quatro grupos principais: quilomícrons, **VLDL** (do inglês *very low density lipoprotein*, ou seja, lipoproteína de muito baixa densidade), **LDL** (do inglês *low density lipoprotein*, ou seja, lipoproteína de baixa densidade) e **HDL** (do inglês *high density lipoprotein*, ou seja, lipoproteína de alta densidade). Quanto maior a proporção de lipídios, menos densa será a lipoproteína.

Para entender os processos fisiológicos de **absorção, síntese e degradação de lipídios**, é preciso conhecer a dinâmica de transporte dessas moléculas através do organismo. Os lipídios provenientes da dieta são emulsificados no intestino com o auxílio dos sais biliares sintetizados no fígado. Os sais biliares atuam como detergentes fisiológicos, favorecendo a ação das lípases intestinais sobre os triacilgliceróis. A hidrólise dos triacilgliceróis pelas lípases intestinais gera ácidos graxos livres e glicerol, que são absorvidos e, ainda na mucosa intestinal, reesterificados a triacilglicerol. Tanto os triacilgliceróis quanto os demais lipídios absorvidos na dieta são incorporados ainda na mucosa intestinal a uma porção proteica (ApoC-II, ApoC-III e Apo B48), gerando uma lipoproteína denominada quilomícron. Os **quilomícrons** são responsáveis pelo transporte dos lipídios provenientes da dieta para o fígado e demais tecidos, sendo a molécula de quilomícron remanescente internalizada pelo fígado. Nesse órgão, são formadas as partículas de VLDL, que carregam os lipídios (principalmen-

te triacilglicerol e colesterol esterificado) do fígado para os outros tecidos. Enquanto percorre a corrente sanguínea, a VLDL sofre a ação de lípases endoteliais, que reduzem o seu conteúdo de triacilgliceróis, assim como da proteína transferidora de éster de colesterol (CETP, do inglês *cholesteryl ester transfer protein*), que incorpora colesterol à partícula de VLDL. Com isso, a densidade da lipoproteína é alterada, e ela passa a ser denominada LDL. A molécula de LDL supre a demanda de colesterol dos tecidos, e a partícula de LDL remanescente é removida pela captação no fígado. Da mesma forma que a VLDL, a HDL também é produzida no fígado e no intestino. Porém, essa lipoproteína é constituída de fosfolipídios, colesterol e colesterol esterificado. Essa partícula assume papel inverso ao da LDL, removendo o colesterol das membranas dos tecidos e transportando-o para o fígado, transporte denominado reverso de colesterol.

Quando a demanda energética do organismo requer a utilização dos triacilgliceróis estocados no tecido adiposo, a liberação de hormônios, como o glucagon e a epinefrina, promove a ativação de lípases sensíveis a hormônios que degradam os triacilgliceróis, gerando ácidos graxos livres, transportados no plasma até os demais tecidos associados à albumina. Essa complexa rede de transporte de lipídios permite que essas moléculas sejam rapidamente estocadas ou mobilizadas, mantendo a homeostasia do organismo.

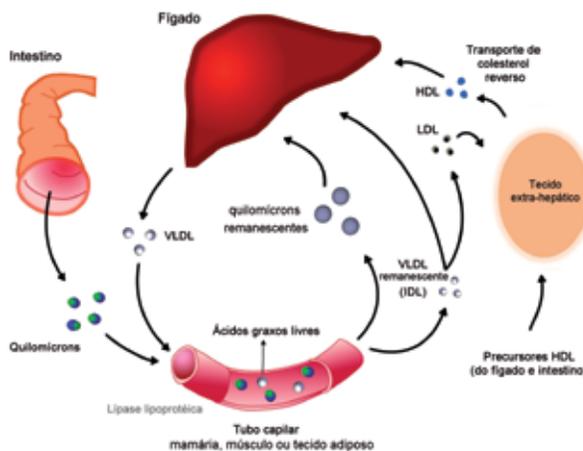


Figura 1.20. Lipoproteínas e transporte de lipídios.

1.2.6 Hormônios

A manutenção da **homeostasia** de organismos multicelulares só é possível por causa da existência de moléculas sinalizadoras que proporcionam a interação intercelular e entre os tecidos. Esses sinalizadores são os hormônios. Os **mecanismos de sinalização** intercelular podem ser classificados em **autócrinos** (quando a célula secreta substâncias que vão atuar sobre seus próprios receptores), **parácrinos** (quando os mediadores secretados sensibilizam células adjacentes), ou **endócrinos** (quando as células-alvo estão distantes do local onde a molécula sinalizadora foi sintetizada).

Os hormônios têm atividade **autócrina**, **parácrina** ou **endócrina** e estão envolvidos na regulação de todos os processos essenciais para a manutenção da vida: crescimento, maturação, reprodução, senescência e comportamento. Eles podem ser secretados por diversos tipos celulares, possuem grande variedade molecular e é possível agrupá-los em duas classes gerais: proteicos – insulina e hormônio folículo estimulante (FSH, do inglês *follicle-stimulating hormone*), por exemplo – e lipídicos – testosterona e progesterona, por exemplo.

Os **hormônios proteicos** em geral são reconhecidos por receptores específicos na membrana plasmática da célula-alvo. Com isso, o complexo hormônio-receptor dispara uma cascata de sinalização intracelular que culmina na geração de um segundo mensageiro, o qual desencadeará as alterações intracelulares decorrentes do estímulo inicial. Os hormônios lipídicos, por sua vez, podem atravessar a membrana plasmática e interagem com receptores nucleares específicos.

Alguns hormônios são secretados na corrente sanguínea na sua forma ativa, ao passo que outros são liberados na forma de pré-pró-hormônio e precisam ser metabolizados antes de atuar na célula-alvo. De modo geral, a **secreção dos hormônios** é controlada por retroalimentação negativa, ou seja, é inibida pelo aumento da concentração do hormônio ou de outra substância que esteja sendo secretada em resposta à sua ação. O principal centro regulador da secreção hormonal em mamíferos é o **hipotálamo**, situado no cérebro. É ele que recebe os impulsos nervosos e, em resposta a esses estímulos, produz vários hormônios regulatórios, que passam pela glândula hipófise, estimulando

(ou inibindo) a liberação de hormônios em diversos órgãos endócrinos. A compreensão dos efeitos fisiológicos e bioquímicos dos hormônios permite o entendimento de algumas doenças endócrinas e o desenvolvimento de terapias efetivas.

Os **hormônios esteroides** são sintetizados a partir do colesterol em vários tecidos endócrinos e são levados pela corrente sanguínea, ligados a proteínas carreadoras, até as suas células-alvo. Eles afetam o desenvolvimento e o comportamento sexual, além de muitas outras funções reprodutivas e não reprodutivas.

Os **hormônios retinoides** regulam o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência celular. Os hormônios tireoidianos T4 (tiroxina) e T3 (triiodotironina) são sintetizados na glândula tireoide a partir da proteína precursora tiroglobulina (pró-hormônio). Esses hormônios necessitam do iodo para suas atividades biológicas e estimulam o metabolismo energético, especialmente no fígado e no músculo, ativando a expressão de genes que codificam enzimas-chave catabólicas. O **córtex adrenal** sintetiza os glicocorticoides, os mineralocorticoides e os andrógenos. Esses hormônios compartilham da estrutura básica do ciclopentanoperidrofenantreno. O cortisol é o principal glicocorticoide produzido no córtex adrenal. Essa produção é regulada pelo mecanismo de retroalimentação inibitória do hormônio liberador de corticotrofina (CRH, do inglês *corticotropin-releasing hormone*) no hipotálamo e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês *Adrenocorticotropic hormone*) na pituitária anterior. Os hormônios da adrenal são fundamentais na homeostase da glicose, na retenção de sódio, na regulação da pressão sanguínea, nos mecanismos de defesa, na resposta ao estresse e no anabolismo proteico geral.

1.2.7 Vitaminas

As vitaminas, moléculas essenciais à vida, não são sintetizadas pelos animais superiores e precisam ser obtidas pela alimentação. Atuando como cofatores enzimáticos, podem ser agrupadas, de acordo com a sua solubilidade, em hidrossolúveis e lipossolúveis.

Como integrantes da família das **vitaminas hidrossolúveis**, podemos citar as vitaminas do complexo B e a vitamina C; já nas **vitaminas lipossolúveis** estão compreendidas as vitaminas A, D, E e K. Os quadros 4 e 5 trazem a relação das fontes e das funções das vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis, respectivamente.

Quadro 1.4. Resumo das vitaminas lipossolúveis.

Vitaminas lipossolúveis	Fontes	Funções
Vitamina A (retinol)	<ul style="list-style-type: none"> • fígado, gordura do leite, margarina, gema de ovo, folhas verdes e amarelas, damascos e pêssegos. 	<ul style="list-style-type: none"> • crescimento, desenvolvimento e manutenção do tecido epitelial e visão noturna.
Vitamina D (calciferol)	<ul style="list-style-type: none"> • peixes gordurosos, gema de ovo e fígado. 	<ul style="list-style-type: none"> • formação de ossos e dentes, absorção e metabolismo do fósforo e do cálcio.
Vitamina E (tocoferol)	<ul style="list-style-type: none"> • germe de trigo, óleos vegetais, vegetais de folhas verdes, gordura do leite, gema de ovo e nozes. 	<ul style="list-style-type: none"> • potente antioxidante.
Vitamina K (filoquinona)	<ul style="list-style-type: none"> • fígado, óleo de soja, óleo de outros vegetais, vegetais de folhas verdes e farelo de farinha. 	<ul style="list-style-type: none"> • auxilia na produção de protrombina, necessário para a coagulação sanguínea normal.

Quadro 1.5. Resumo das vitaminas hidrossolúveis.

Vitaminas hidrossolúveis	Fontes	Funções
Tiamina	<ul style="list-style-type: none"> • carne de porco, fígado, vísceras, legumes, grãos integrais e cereais enriquecidos, germe de trigo e batatas. 	<ul style="list-style-type: none"> • auxilia na remoção do CO_2 dos alfa-cetoácidos durante a oxidação dos carboidratos.

cont.

Riboflavina	<ul style="list-style-type: none"> • leite e seus derivados, vísceras, vegetais de folhas verdes, cereais enriquecidos, pães e ovos. 	<ul style="list-style-type: none"> • exerce importante papel enzimático na respiração dos tecidos e age como transportador de íons hidrogênio.
Niacina	<ul style="list-style-type: none"> • peixe, fígado, carne, aves, grãos, ovos, amendoim, leite e legumes. 	<ul style="list-style-type: none"> • cofator enzimático, auxilia na transferência de hidrogênio e age no metabolismo de carboidratos e aminoácidos.
Vitamina B6	<ul style="list-style-type: none"> • porco, vísceras, farelo e germe de cereais, leite, gema de ovo, farinha de aveia e legumes. 	<ul style="list-style-type: none"> • auxilia na síntese e na quebra de aminoácidos e na síntese de ácidos graxos insaturados a partir de ácidos graxos essenciais.
Vitamina B12	<ul style="list-style-type: none"> • fígado, rim, leite e derivados, carne e ovos. 	<ul style="list-style-type: none"> • fundamental para a biossíntese de ácidos nucleicos; exerce importante papel no metabolismo do tecido nervoso e no crescimento.
Ácido pantotênico	<ul style="list-style-type: none"> • presente em todos os alimentos vegetais e animais; ovos, rim, fígado, salmão e levedura são as melhores fontes. 	<ul style="list-style-type: none"> • essencial no metabolismo intermediário de carboidratos, gorduras e proteínas.
Ácido fólico ou folato	<ul style="list-style-type: none"> • vegetais de folhas verdes, fígado, bife magro, trigo, ovos, peixes, lentilha, feijão de corda, aspargo, brócolis, couves e levedura. 	<ul style="list-style-type: none"> • essencial para a biossíntese de ácidos nucleicos e para a maturação normal das hemácias; sintetizado no intestino.

cont.

Biotina	<ul style="list-style-type: none"> • fígado, cogumelos, amendoim, levedura, leite, carne, gema de ovo, a maioria dos vegetais, banana, melão e morango. 	<ul style="list-style-type: none"> • componente essencial de enzimas, atua na síntese e na quebra de ácidos graxos e de aminoácidos, auxiliando na remoção de gás carbônico.
Vitamina C (ácido ascórbico)	<ul style="list-style-type: none"> • acerola, frutas cítricas, tomate, melão, pimentão verde, repolho cru, morango, abacaxi, goiaba e batata. 	<ul style="list-style-type: none"> • importante na resposta imune, na cicatrização de feridas e em reações alérgicas; aumenta a absorção de ferro.

1.3 Metabolismo

1.3.1 Introdução ao metabolismo

Para que nos alimentamos? Dizemos que nos alimentamos de modo a obter a energia suficiente para manter nossas funções. Consideramos alimento os **carboidratos**, as **proteínas** e os **lipídios**, que são macromoléculas constituídas basicamente de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio.

Os **seres autotróficos**, como as plantas, são capazes de transformar CO_2 e água em fontes de carbono reduzido. A reação pela qual eles efetuam essa transformação é chamada fotossíntese. Os **seres heterotróficos** não são capazes de efetuar tal reação; por isso, devem obter as moléculas com carbono reduzido de uma fonte, por meio da ingestão desses alimentos. Eles fornecem macromoléculas importantes para a síntese de novas moléculas e para a obtenção de energia, por meio das reações que acontecem no metabolismo.

O metabolismo compreende uma série de reações químicas efetuadas pelas células na conversão de uma molécula em outra. As reações do metabolismo podem gerar energia (reações exergônicas) ou podem absorver energia (reações endergônicas). As reações de **catabolismo** (quebra de moléculas combustíveis) são exergônicas e sempre estão acopladas a reações de **anabolismo** (síntese de

macromoléculas), que são endergônicas. Esse conjunto de reações anabólicas e catabólicas é denominado metabolismo. Os tipos de reação que podem ocorrer no metabolismo celular são reações de oxido-redução – que participam da transferência de elétrons geradores de energia; reações de ligação – que formam ligações covalentes por meio da hidrólise de um ATP; isomerização – quando os átomos são rearrumados, formando isômeros; transferência de grupos – quando um grupo funcional é transferido de uma molécula para outra; hidrólise – quando ocorre a quebra de ligações pela adição de água; e adição ou remoção de grupos funcionais – quando grupos funcionais são adicionados ou retirados da molécula, transformando-a. As reações metabólicas são reguladas pelo controle da quantidade de enzimas que participam das reações, por suas atividades catalíticas e pelo acesso da enzima ao substrato.

O metabolismo é imprescindível para a sobrevivência do organismo. É por meio das reações que o compõem que o indivíduo é capaz de obter energia dos alimentos, produzir macromoléculas e sustentar o seu desenvolvimento.

1.3.2 O ATP como moeda energética

As reações químicas são classificadas como endotérmicas e exotérmicas. As reações exotérmicas liberam energia no ambiente na forma de calor; já as reações endotérmicas necessitam de energia para que possam ocorrer. Em sistemas não biológicos, é fácil a manipulação da energia, sob a forma de calor, para acelerar uma reação, ou para fazer uma reação que normalmente não aconteceria ocorrer. Para inibirmos uma reação basta diminuirmos sua temperatura; para acelerá-la, basta aquecermos o meio reacional.

Nos organismos vivos isso não é possível, pois esses são sistemas isotérmicos e, por isso, necessitam de energia química para ocorrer. Nos organismos, as reações que necessitam de energia são chamadas endergônicas e aquelas espontâneas, que geram energia livre, são denominadas exergônicas. Para que reações endergônicas possam ocorrer, é preciso que, ao mesmo tempo, também ocorra uma reação exergônica, a qual fornecerá a energia necessária. Nos seres vivos, esse mecanismo é denominado **acoplamento**.

A forma mais fácil de acoplamento de reações é a formação de uma molécula energética em uma reação exergônica a ser utilizada como fonte de energia em uma reação endergônica, que será a responsável pela transferência de energia. Em todos os organismos, essa molécula é o ATP. O ATP é um nucleosídeo trifosfato que contém a base nitrogenada adenina, uma ribose e seus três grupos fosfatos.

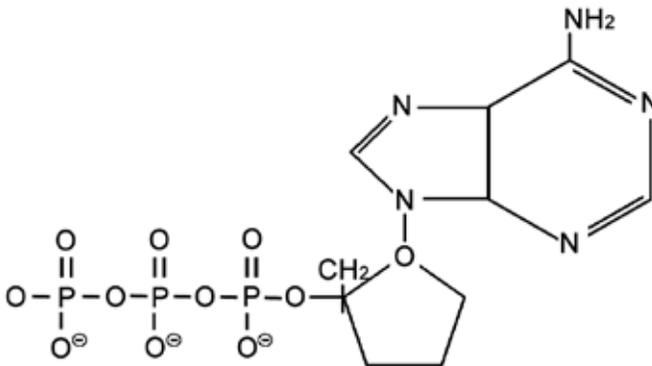


Figura 1.21. Molécula de ATP.

O ATP é capaz de produzir um ciclo de hidrólise e fosforilação entre ele e seu análogo, a adenosina difosfato (**ADP**). A hidrólise do ATP gera energia e ADP; por conseguinte, a fosforilação do ADP consome energia e produz ATP. Esse ciclo é o processo fundamental de troca de energia entre sistemas biológicos.

O ATP é formado em três grandes processos metabólicos: na fosforilação oxidativa, na glicólise e no ciclo de Krebs.

1.3.3 Metabolismo dos carboidratos

A glicose é capaz de atender a todas as demandas energéticas de algumas células. Apesar de a glicose não ser consumida diretamente, pode ser obtida em nossa dieta mediante a quebra de outros açúcares maiores, como

o amido e a sacarose. Os animais e o homem se enquadram no grupo dos **organismos quimiotróficos**, aqueles que obtêm energia por intermédio de reações químicas. A energia é produzida pela oxidação de moléculas para a geração final de ATP, importante moeda energética para o organismo, como mencionado. Existem organismos, porém, que não obtêm energia dessa forma. São os chamados **organismos fototróficos**, que produzem ATP utilizando energia luminosa. Esses organismos fazem **fotossíntese**, realizada por bactérias verdes e púrpuras – as cianobactérias –, algas e plantas, e seu nome decorre da capacidade dessa reação de produzir carboidratos, pela adição de CO_2 a moléculas orgânicas, mediante a catálise da luz.

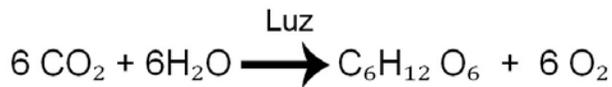


Figura 1.22. Reação da fotossíntese.

1.3.3.1 Glicólise

A glicólise é a via metabólica que transforma glicose em **piruvato**. É uma via anaeróbica responsável pela produção de duas moléculas de piruvato e de duas moléculas de ATP. Nos mamíferos, a glicose é fonte de energia utilizada pelas células do cérebro e pelas hemácias. O piruvato formado nessa via pode ser metabolizado de forma anaeróbia, a partir das fermentações láctica e alcoólica, ou de forma aeróbia, no caso da fosforilação oxidativa, quando haverá formação de um número maior de ATPs. A glicólise é uma via comum tanto em organismos procariotos quanto em organismos eucariotos e ocorre no citoplasma da célula.

A glicólise se inicia com a entrada da glicose na célula através de receptores específicos para ela, denominados **glut**. Os receptores glut 1 e 3 são independentes de insulina e responsáveis pela captação basal de glicose na maior parte das células. O receptor glut 2 está presente no fígado e no pâncreas,

e só transporta glicose em concentrações muito altas. O receptor glut 4, que está presente no tecido adiposo e muscular, depende de insulina para ser colocado na membrana plasmática. Já o cérebro é independente de insulina, necessitando de uma entrada constante de glicose.

Após a entrada da glicose na célula, ela deve ser modificada para que não possa sair. Para isso, é fosforilada pelo ATP, formando o composto glicose-6-fosfato. Essa reação é catalisada pela enzima **hexoquinase**. O fosfato adicionado à glicose não permite que ela passe pela membrana plasmática, pois confere à glicose carga negativa.

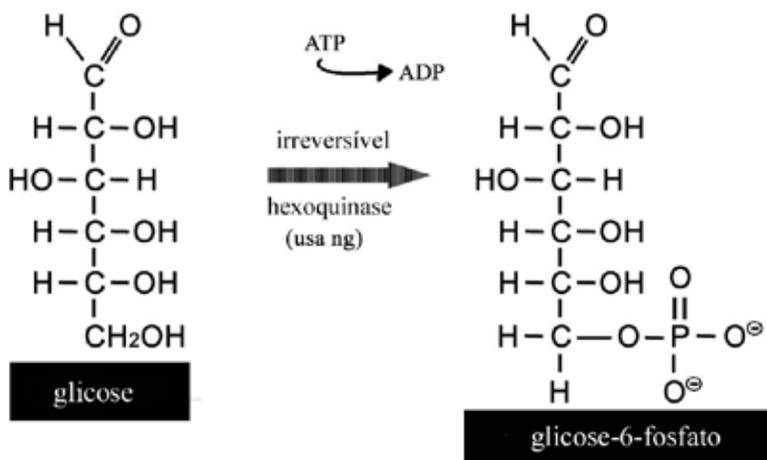


Figura 1.23. Fosforilação da glicose pela hexoquinase.

A próxima reação consiste na isomerização da glicose à **frutose**. Para isso, a enzima responsável pela reação necessita abrir o anel, transformar a aldose da glicose em uma cetose e novamente fechar o anel glicosídico. A enzima responsável por essa etapa é a **fosfoglicose isomerase**. A frutose-6-fosfato é então novamente fosforilada pelo ATP para formar a frutose-1,6-bisfosfato com o auxílio da **fosfofrutoquinase do tipo 1 (PFK-1)**. Por ser uma enzima alostérica, essa reação é um dos pontos de regulação da glicólise.

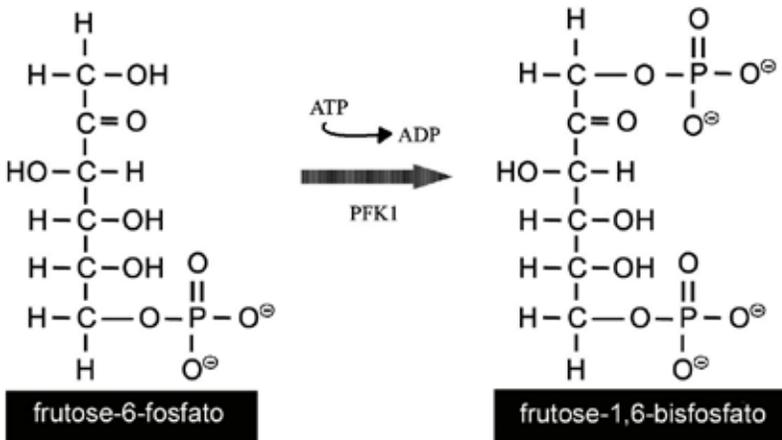


Figura 1.24. Fosforilação da frutose-6-fosfato para a formação da frutose-1,6-bisfosfato.

A partir dessa fase, a glicólise envolverá reações com compostos de três carbonos; por isso, a frutose-1,6-bisfosfato deve ser clivada em duas moléculas. Essa reação é catalisada pela **aldolase**, ocorrendo então a formação da diidroxicetona fosfato e do gliceraldeído-3-fosfato.

Após a ação da aldolase, dois fragmentos de três carbonos são formados para sua pronta utilização na obtenção de ATP. O único problema é que a diidroxicetona não é utilizada na glicólise; por isso, é necessário que seja interconvertida a gliceraldeído-3-fosfato. Essa isomerização é catalisada pela enzima **triose fosfato isomerase**, numa reação rápida e reversível. Assim, são formadas duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato também pode ser convertido em diidroxicetona; para que isso não ocorra, ele é logo consumido, e a conversão da diidroxicetona para aldeído é favorecida.

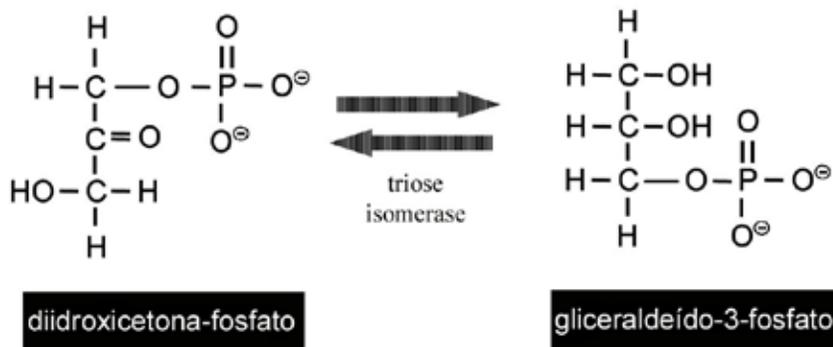


Figura 1.25. Isomerização da diidroxicetona-fosfato ao gliceraldeído-3-fosfato.

Até agora, nenhuma molécula de ATP foi sintetizada, tendo sido apenas consumidas duas moléculas. As próximas reações fazem parte da etapa de obtenção de energia. As duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato são transformadas em 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG), em uma reação catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

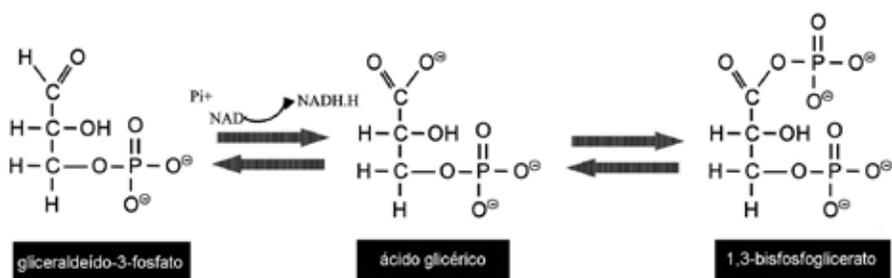


Figura 1.26. Formação do 1,3-bisfosfoglicerato.

A partir do 1,3-bisfosfoglicerato, ocorre a formação de um ATP, em uma reação catalisada pela **fosfoglicerato quinase**. Essa é a primeira reação da glicólise, quando ocorre a formação de ATP. Essa reação tem como produto, além do ATP, o 3-fosfoglicerato.

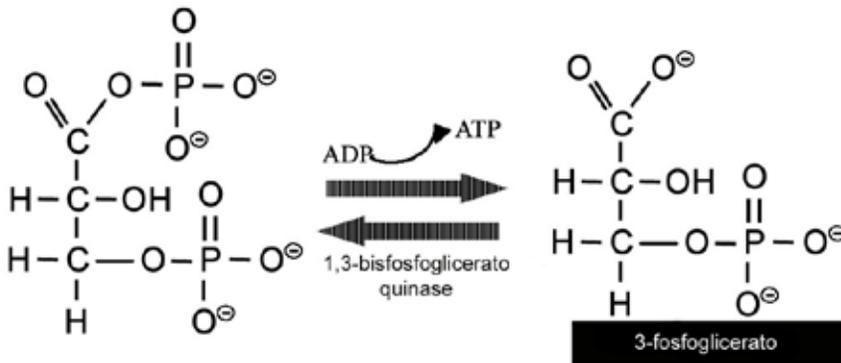


Figura 1.27. Primeira reação com produção de ATP.

Para a formação de ATP, ainda ocorrerão outras reações. A primeira é uma reação de rearranjo, catalisada pela **fosfoglicerato mutase**, quando o fosfato do 3-fosfoglicerato é transferido do carbono três para o carbono dois, formando o 2-fosfoglicerato.

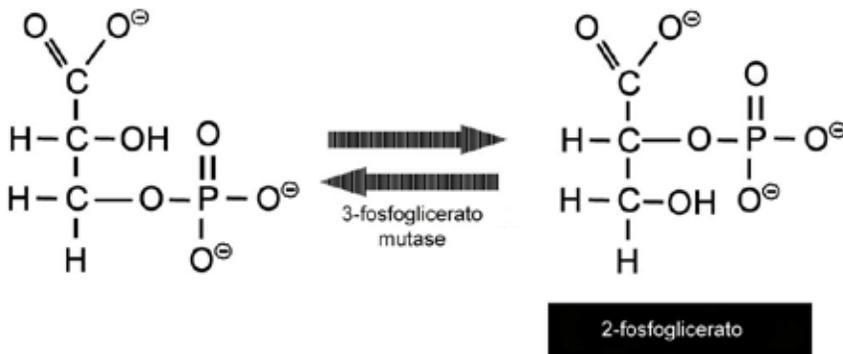


Figura 1.28. Formação do 2-fosfoglicerato.

Em seguida, uma desidratação catalisada pela **enolase** forma o fosfoenolpiruvato, no qual o grupo fosfato fica localizado no carbono do enol.

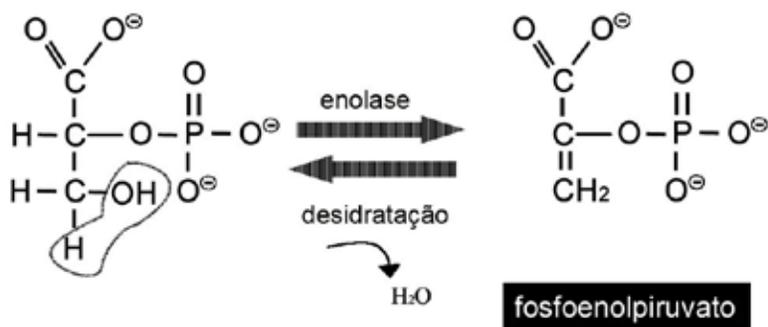


Figura 1.29. Formação do fosfoenolpiruvato por desidratação catalisada pela enolase.

O grupo fosfato do fosfoenolpiruvato é finalmente transferido para uma molécula de ADP, com concomitante formação de ATP. Essa reação é catalisada pela **piruvato quinase**. Em condições celulares, essa reação é irreversível e possui participação na regulação dessa via.

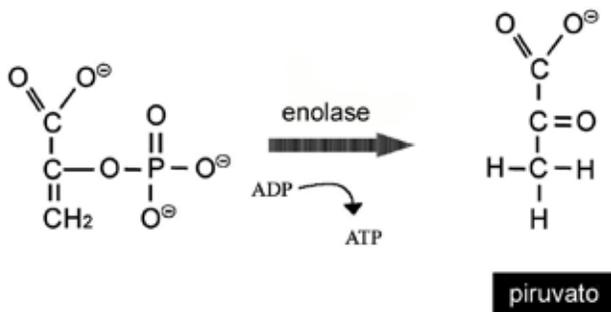


Figura 1.30. Formação do piruvato e de ATP.

Os ATPs formados são quatro, sendo dois consumidos nas etapas iniciais da glicólise, tendo um balanço final positivo de duas moléculas de ATP na glicólise. Essa via também produz duas moléculas de piruvato, que serão os substratos iniciais para as próximas vias metabólicas. Durante a glicólise, também são reduzidas duas moléculas de NAD^+ , formando nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). O NADH é um aceptor intermediário dos elétrons formados nas reações de oxidação da via. Sua quantidade

limita a via e, por isso, o NADH deve ser constantemente regenerado. A regeneração dos aceptores intermediários de elétrons (NAD^+ , FAD^+ e, nas vias biossintéticas, NADP^+) ocorre nas próximas etapas de metabolização do piruvato.

O piruvato possui três caminhos finais distintos: etanol, ácido láctico (nas reações anaeróbicas) e dióxido de carbono (nas reações aeróbicas). O balanço energético final da glicólise é dado por:



Na via glicolítica, são as enzimas irreversíveis que controlam a velocidade da via. São elas **hexoquinase**, **fosfofrutoquinase** (PFK-1) e **piruvato quinase**.

Uma enzima pode ser controlada pelo seu produto, e a via, pela inibição da primeira reação pelo produto da última, evitando a formação de intermediários desnecessários.

O ATP é um grande inibidor da via glicolítica, pois é inibidor alostérico da PFK-1. Da mesma forma, ADP e a adenosina monofosfato (AMP) são reguladores positivos da via, pois aumentam a velocidade da enzima. O íon H^+ também é um inibidor da via, pois é formado na reação final de produção de piruvato. Se essa via não fosse inibida pela concentração de H^+ no meio, a diminuição do pH celular seria drástica para a célula.

A inibição da PFK-1 aumenta a concentração, no meio, de frutose-6-fosfato, que é isomerizada à glicose-6-fosfato, a qual funciona como inibidor da hexoquinase.

A piruvato quinase é inibida por ATP e alanina, dado que o piruvato se transforma em alanina com o auxílio da **transaminase**.

1.3.3.2 Fermentação alcoólica

Em organismos anaeróbicos, as etapas de metabolização final do piruvato passam por um processo de fermentação. Os dois principais tipos de fermentação são a alcoólica e a láctica.

A fermentação alcoólica ocorre principalmente nas leveduras e em vários outros microrganismos. É um dos processos mais antigos utilizados pelo homem para a obtenção de bebidas alcoólicas, como o vinho e a cerveja. Sua primeira etapa é a descarboxilação do piruvato, pela ação da **piruvato descarboxilase**, gerando o aldeído acético, que, em seguida, é reduzido a etanol pela enzima **álcool desidrogenase**, com a concomitante formação de NAD^+ , por meio da regeneração de um NADH . Essa enzima também é responsável pelo metabolismo do etanol consumido pelo indivíduo.

Esse processo não ocorre em mamíferos. Quando ingerimos álcool, ele é degradado pela **álcool desidrogenase**, gerando aldeído acético, porém não é convertido a piruvato, pois nos mamíferos não há a presença da **piruvato descarboxilase**.

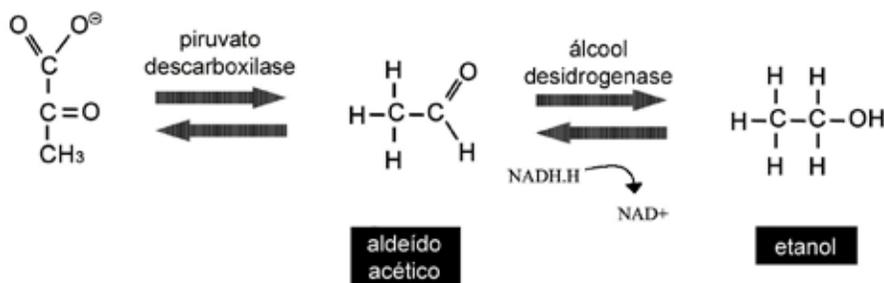


Figura 1.31. Reações da fermentação alcoólica.

1.3.3.3 Fermentação láctica

A fermentação láctica ocorre em vários microrganismos e em algumas células de organismos superiores, como os músculos, quando em exercício intenso e quantidade limitada de oxigênio.

A formação do lactato a partir do piruvato é catalisada pela **lactato desidrogenase**.



Figura 1.32. Reações da fermentação láctica.

1.3.3.4 Ciclo de Krebs

Os processos de formação de ATP pelas fermentações em condições anaeróbicas criam baixa quantidade de energia. Uma quantidade muito mais alta de energia é obtida pela degradação do piruvato em condições aeróbicas, durante o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa.

○ **ciclo do ácido cítrico** – ciclo dos ácidos tricarbóxicos ou ciclo de Krebs – é a primeira etapa na obtenção de energia de forma aeróbica. Ele se inicia com a entrada da acetilcoenzima A (acetil-CoA) no ciclo. A acetil-CoA é formada pela descarboxilação oxidativa do piruvato pelo complexo **piruvato desidrogenase** na mitocôndria.

○ ciclo de Krebs é uma sequência de reações nas quais ocorre a oxidação das moléculas de carbono, levando à liberação de elétrons que serão utilizados na cadeia respiratória para a obtenção de ATP. Ele se inicia com a entrada da acetil-CoA, que se condensa com o oxalacetato a fim de formar o citrato – que possui seis carbonos. Essa reação é catalisada pela **citrato sintase**. O citrato formado é então isomerizado ao isocitrato, pois sua carboxila precisa estar em uma posição que facilite a sua descarboxilação. Essa reação, catalisada pela enzima **aconitase**, ocorre em duas etapas: uma desidratação seguida de uma hidratação. O isocitrato formado é capaz de sofrer descarboxilação, catalisada pela **isocitrato desidrogenase**, para formar o α -cetoglutarato, um composto com cinco carbonos. O α -cetoglutarato também sofre mais uma descarboxilação, catalisada pelo complexo **α -cetoglutarato desidrogenase**, formando um intermediário, o succinilcoenzima A (succinil-CoA). Essa fase é importante pois, com a quebra da succinil-CoA, ocorre liberação de energia, formando

um GTP. O GTP pode transferir o seu P_i para um ADP, formando um ATP. É o único momento do ciclo em que ocorre a formação de um composto pronto de alta energia. O succinato, um composto de quatro carbonos, é formado em seguida, pela ação da **succinato sintetase**, e a coenzima A retorna ao *pool* inicial da mitocôndria.

Após isso, ocorrem reações que objetivam a regeneração do oxaloacetato. O succinato sofre uma série de reações de oxidação, hidratação e uma segunda oxidação para a formação do oxaloacetato. Na primeira etapa de oxidação, ocorre a regeneração de uma FADH_2 e a formação do fumarato, pela ação da enzima **succinato desidrogenase**. Essa enzima é muito utilizada em testes de quantificação celular pelo MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), um sal tetrazólico que é reduzido pela enzima, formando os cristais de formazan, um produto colorido.

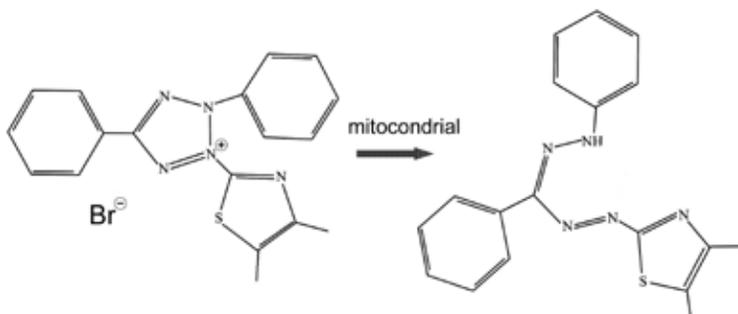


Figura 1.33. Formação dos cristais de formazan.

Em seguida, o fumarato sofre uma hidratação catalisada pela **fumarase** para formar o L-malato. É formado somente o L-malato, pois a enzima adiciona a hidroxila somente em um dos lados da molécula, formando o isômero L especificamente. Por último, o L-malato é oxidado pela **malato desidrogenase** para formar o oxaloacetato. Nessa reação, há a regeneração de uma molécula de NAD^+ . Essa reação é impulsionada pela utilização, no início do ciclo, do oxaloacetato, que é condensado a uma unidade acetila da acetil-CoA, permitindo a entrada de dois carbonos no ciclo.

A síntese do fosfoenolpiruvato a partir do piruvato ocorre *in vitro*, mas é incapaz de ocorrer *in vivo*. O grande regulador do ciclo é o ATP, produto final do ciclo sintetizado na cadeia respiratória. Não há formação propriamente dita de ATP no ciclo de Krebs, mas os NADH e FADH₂ acabam por gerá-lo quando se regeneram. Por isso o ciclo de Krebs está sujeito aos controles de concentração [ATP/ADP], [NADH.H/NAD⁺] e [FADH₂/FAD⁺]. Na fosforilação oxidativa, são geradas cerca de 2,5 ATP por NADH e 1,5 ATP por FADH₂. Apesar de o oxigênio não participar diretamente do ciclo de Krebs, esse é um ciclo estritamente aeróbico, dado que os NAD⁺ e os FAD necessários ao ciclo só podem ser regenerados na mitocôndria quando transferem seus hidrogênios para o oxigênio.

Assim como na glicólise, os pontos de controle são as reações das enzimas irreversíveis. Um dos principais controles do ciclo ocorre na reação catalisada pela enzima piruvato desidrogenase. Nessa reação, há a formação da acetil-CoA por meio do piruvato obtido na glicólise. Essa reação não é reversível nos animais e, por isso, a partir desse ponto, os carbonos da glicose utilizada só podem entrar no ciclo de Krebs ou para formar energia ou para ser transferidos para a síntese de ácidos graxos. Por isso, altas concentrações de seus produtos (acetil-CoA, NADH e, indiretamente, o ATP) inibem a sua reação. Outros mecanismos também são utilizados para a sua regulação.

O ciclo de Krebs é regulado pelo nível energético da célula; por isso, altas concentrações de ATP inibem as enzimas alostéricas (isocitrato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase), além de seus produtos de reação respectivamente. O ciclo de Krebs nunca para; portanto, substâncias que inibam as enzimas desse ciclo podem ser fatais para a célula. Ele também fornece precursores de biossíntese.

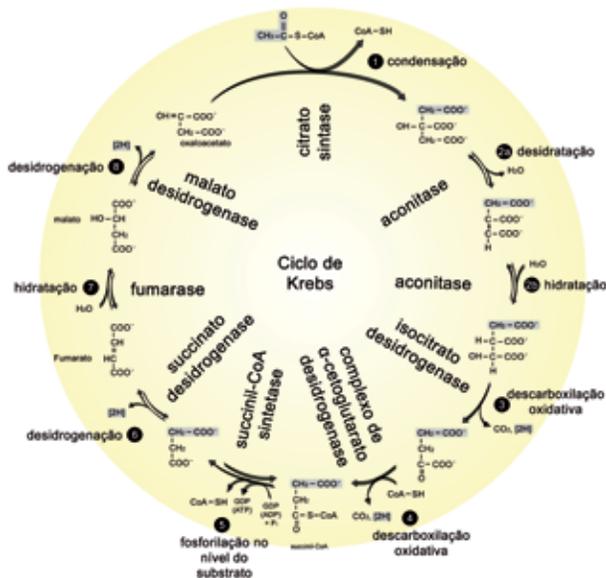


Figura 1.34. Reações do ciclo de Krebs.

1.3.3.5 Cadeia respiratória ou fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa é o processo pelo qual os NADH e os $FADH_2$ formados na oxidação dos ácidos graxos, na glicólise e no ciclo de Krebs são regenerados. Como suas concentrações celulares são muito baixas, os NADH e os $FADH_2$ devem ser constantemente regenerados para retornarem à cadeia metabólica. Eles entregam seus elétrons ao receptor final, o oxigênio, gerando água e uma força eletromotriz responsável pela síntese de ATP. É na fosforilação oxidativa que ocorre a formação de uma grande quantidade de ATP na célula, por meio da oxidação de uma molécula de glicose, com concomitante formação de CO_2 e água.

A fosforilação oxidativa ocorre na membrana interna da mitocôndria. A **mitocôndria** é uma organela formada por duas membranas principais: a interna e a externa. A membrana externa é permeável aos conteúdos citoplasmáticos. Por isso, costuma-se dizer que o espaço entre a membrana interna e a externa da mitocôndria, denominado espaço intermembranar, é uma continuação do citoplasma. Já a membrana interna é muito seletiva, e a entrada de substâncias nela necessita de um transportador específico. Ela é muito extensa e se dobra dentro da mitocôndria, formando estruturas denominadas de cristas. O espaço delimitado pela membrana interna é denominado matriz mitocondrial.

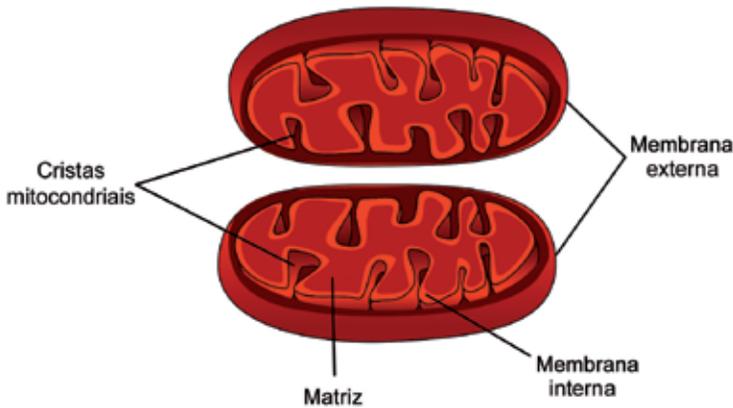


Figura 1.35. Estrutura da mitocôndria.

A cadeia respiratória é um processo do qual participam quatro complexos proteicos e dois carreadores, responsáveis pela transferência dos elétrons até o oxigênio, que é o aceptor final. Esses complexos são denominados NADH-coenzima Q oxidorreductase (complexo I), succinato-coenzima Q oxidorreductase (complexo II), coenzima Q-citocromo c oxidorreductase (complexo III) e citocromo c oxidase (complexo IV). Os carreadores são a ubiquinona e o citocromo c. O último complexo, no qual se dá a síntese do ATP, será abordado mais adiante. O fluxo de elétrons entre os complexos proteicos transmembranares é que leva ao transporte de prótons através da membrana interna da mitocôndria.

Inicialmente, o NADH se aproxima do complexo I e transfere seus elétrons para o grupamento prostético desse complexo, a flavina mononucleotídeo (FMN), reduzindo-a à FMNH_2 . Por sua vez, a flavina transfere seus elétrons para uma série de aglomerados ferro-enxofre (Fe-S), um segundo tipo de grupo prostético do mesmo complexo. Essa transferência faz todo o complexo I assumir uma forma reduzida. O NAD^+ reoxidado fica livre para ser novamente utilizado. Com a formação do NAD^+ , ocorre a saída de H^+ da matriz mitocondrial, o que deixa o espaço intermembranar mais ácido.

O carreador **ubiquinona** se aproxima do complexo I, recebendo seus elétrons e regenerando o complexo para que esse possa receber novos elétrons.

Por ser hidrófoba, a ubiquinona se difunde para dentro da matriz, através da membrana mitocondrial interna. A ubiquinona também é capaz de receber elétrons do complexo II, regenerando o FADH_2 gerado pela succinato desidrogenase no ciclo de Krebs. Para a ubiquinona, a reação de transferência de elétrons está diretamente ligada à liberação de prótons, uma propriedade importante para o transporte de H^+ através da membrana.

A ubiquinona transfere os elétrons tanto do complexo I quanto do complexo II para o complexo III, que apresenta como grupos prostéticos os citocromos b e c. O citocromo c, uma proteína pequena e solúvel, carrega os elétrons do complexo III para o complexo IV. Essa transferência bombeia para fora da matriz mitocondrial dois prótons. Assim, a ubiquinona é oxidada e pode ser reutilizada.

Finalmente, o complexo IV catalisa a redução do oxigênio molecular à água, utilizando os prótons provenientes da matriz mitocondrial. Para que ocorra a síntese de ATP, é necessária a ação da F_0F_1 ATPase, também chamada complexo V, um agregado enzimático presente na membrana mitocondrial interna. A síntese se dá por causa do gradiente de prótons formado entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranar. Esse gradiente é formado com a redução do oxigênio à água, quando prótons são lançados para o espaço intermembranar, tornando-o mais ácido. O retorno desses prótons se dá através do canal formado pela porção F_0 do complexo proteico. O ATP é formado por meio da fosforilação de ADP, reação catalisada pela porção F_1 do complexo V.

1.3.3.6 Metabolismo do glicogênio

Alguns órgãos do corpo são incapazes de sobreviver sem a entrada de glicose em suas células. Porém, nem sempre ela está disponível no sangue nas concentrações ideais para ser captada e utilizada na produção de energia. A fim de que órgãos como o cérebro não fiquem sem o seu abastecimento de glicose, o organismo possui mecanismos de armazenamento da glicose, sob a forma de glicogênio, para momentos de jejum. O **glicogênio** é um polímero de glicose formado por ligações glicosídicas do tipo α -1,4. Ele possui várias

ramificações, que se repetem a cada dez oses e que são formadas por ligações do tipo α -1,6. O glicogênio é principalmente armazenado no fígado, mas também está presente nos músculos esqueléticos.

Apesar de fornecer uma quantidade menor de energia quando comparado aos ácidos graxos, ao ser oxidado, o glicogênio é liberado no sangue à medida que a taxa de glicemia diminui. Isso o faz funcionar como um tampão de glicose sanguínea, impedindo a falta de glicose para os órgãos que a utilizam como fonte de energia somente. O glicogênio é uma fonte de glicose que pode ser liberada com muita rapidez, e por isso é muito importante em atividades extremas e repentinas.

Para ser utilizado, o glicogênio deve ser quebrado. Isso ocorre em três etapas: a enzima **glicogênio fosforilase** quebra as ligações α -1,4 do glicogênio e a **α -1,6 glicosidase** quebra as ligações α -1,6, que liberam, no meio, a glicose-1-fosfato, posteriormente transformada em glicose-6-fosfato pela **fosfoglicomutase**. A quebra do glicogênio é energeticamente vantajosa para a célula, dado que a molécula de glicose formada já vem fosforilada. Isso ocorre porque a quebra é uma clivagem fosforolítica, na qual a enzima fosforila para clivar o glicogênio.

Já a **síntese do glicogênio**, ao contrário do que se possa imaginar, não é o inverso de sua quebra. Para que o glicogênio seja sintetizado, há necessidade da presença de uridina difosfato glicose (UDP-glicose). A UDP-glicose funciona como um doador ativado de glicose na síntese do glicogênio, quando é adicionada às extremidades das cadeias de glicogênio pela ação da enzima glicogênio sintase. Essa enzima, porém, só é capaz de adicionar essas subunidades de glicose se a cadeia poliosídica contiver mais de quatro oses. Assim, a síntese, bem como a duplicação do DNA, necessita de um *primer*.⁵ Quem executa esse papel é a glicogenina, uma proteína que contém duas subunidades, cada uma delas ligada a um oligosídeo de unidades α -1,4 de glicose. As ramificações, ligações α -1,6, são feitas por uma enzima ramificadora, e sua importância reside no fato de aumentarem a solubilidade do glicogênio, além de criarem um grande número de radicais terminais, que são locais onde as enzimas de degradação do glicogênio agem. Para que não ocorram, ao mesmo

⁵ Molécula iniciadora.

tempo, a síntese e a degradação do glicogênio, existe uma regulação hormonal por glucagon e insulina – ou, no músculo, por adrenalina. Quando a adrenalina aumenta, dispara a cascata de AMP cíclico, que ativa a fosforilase quinase. Essa fosforila a glicogênio sintase, deixando-a inativa. Nesse momento, a quebra de glicogênio é preferível. Isso também ocorre quando há um aumento de glucagon. Na presença de insulina, a glicogênio sintase é desfosforilada por uma fosfatase, tornando-se ativa e, assim, sintetizando glicogênio.

O músculo utiliza glicogênio em suas atividades (quando há necessidade imediata de energia extra), e a quebra de glicogênio nele é independente do estado alimentar do indivíduo. Já o fígado é responsável pela liberação de glicose no sangue, e a síntese e a degradação do glicogênio nesse órgão estão diretamente ligadas à presença ou não de glicose no sangue.

1.3.3.7 Gliconeogênese

A gliconeogênese é o processo pelo qual há a transformação de compostos não glicídicos (contendo no máximo três carbonos) em glicose, processo que ocorre nos animais, vegetais e em microrganismos. Nos mamíferos, a gliconeogênese ocorre principalmente no fígado e, em menor extensão, em células do córtex renal.

Na via glicolítica, a transformação de glicose em piruvato tem papel fundamental na obtenção final de energia. Na gliconeogênese, ocorre a formação de glicose a partir do piruvato. Apesar disso, essa via não é o inverso da glicólise, e enzimas diferentes participam dos processos na gliconeogênese. Assim, mesmo que as duas vias apresentem reações reversíveis compartilhadas (sete das dez reações da gliconeogênese são inversões das reações da glicólise), sempre haverá um passo enzimático exclusivo de cada uma delas. A estimulação de uma via sempre gera inibição da outra, mesmo que seus controles sejam feitos por enzimas distintas.

Existem três reações da gliconeogênese que contornam os passos irreversíveis da glicólise (conversão da glicose em glicose-6-fosfato, fosforilação da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bisfosfato e conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato). Tais reações são específicas dessa via e são responsáveis por sua regulação. Seguindo a via glicolítica em seu inverso, o primeiro passo que

deve ser contornado pela gliconeogênese é a formação de piruvato a partir do fosfoenolpiruvato. Sua síntese se dá pela ação da enzima **piruvato quinase**, com concomitante formação de ATP. Como é uma reação irreversível, são necessárias, na gliconeogênese, participações de novas enzimas para reverter a conversão.

O piruvato utilizado no início da gliconeogênese pode ser aquele formado na glicólise no citoplasma. Em seguida, ele é transportado para dentro da mitocôndria ou pode ser obtido na mitocôndria por meio da desaminação da alanina. A enzima **piruvato descarboxilase**, uma enzima mitocondrial que requer a biotina como coenzima, converte, então, o piruvato a oxaloacetato, com concomitante formação de ADP e Pi. São dois os caminhos que o oxaloacetato formado pode seguir. Ele pode ser convertido a malato pela **malato desidrogenase**, com consumo de NADH, e sair da mitocôndria através do transportador malato- α -cetoglutarato, presente na membrana mitocondrial interna, sendo, no citoplasma, novamente reoxidado a oxaloacetato, com a formação de NADH citosólico (processo essencial na manutenção do equilíbrio entre a produção e o consumo de NADH no citoplasma). Ou pode ser convertido a fosfoenolpiruvato dentro da mitocôndria, pela ação da enzima **fosfoenolpiruvato carboxiquinase**, numa reação que necessita de Mg^{+2} e de GTP, como doador de fosfato.

A próxima etapa irreversível da glicólise que precisa ser contornada na gliconeogênese é a fosforilação da frutose-6-fosfato pela fosfofrutoquinase 1 (PFK-1). Para contorná-la, novamente ocorre a ação de uma enzima específica da gliconeogênese, que não participa da via glicolítica. Nesse caso, a formação de frutose-6-fosfato a partir de frutose-1,6-bisfosfato é catalisada pela enzima **frutose-1,6-bisfosfatase**, que promove a hidrólise do fosfato do carbono 1.

A última etapa irreversível da glicólise é a fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato pela **hexoquinase**. Essa fosforilação impede que a glicose saia da célula. A gliconeogênese tem como objetivo restaurar os níveis de glicose sanguínea e, por isso, é extremamente necessário que a glicose formada na via seja liberada pela célula. Para tal, é necessário desfosforilar a glicose-6-fosfato. Essa reação hidrolítica é catalisada pela **glicose-6-fosfatase**, numa

reação que gera glicose livre e um grupo fosfato. A glicose-6-fosfatase é encontrada nos hepatócitos e depende de Mg^{+2} como cofator. Ela não está presente nos músculos ou no cérebro, uma vez que a gliconeogênese não ocorre nesses tecidos. A glicose formada por essa via no fígado é liberada no sangue para ser utilizada pelo cérebro e pelos músculos.

Como não se trata de uma via inversa à via glicolítica, seu consumo de ATP não é o mesmo produzido nessa via. Na gliconeogênese são necessários dois ATPs e dois GTPs para a formação de glicose; além disso, por ser uma via muito custosa ao organismo, ela é irreversível dentro das condições intracelulares. Muitos outros intermediários podem ser utilizados para formar oxaloacetato e entrar na gliconeogênese. Substâncias do ciclo de Krebs – como o citrato, o isocitrato, o α -cetogluturato, o succinato, o fumarato e o malato – podem ser convertidas a oxaloacetato, para posterior formação de fosfoenolpiruvato. Alguns aminoácidos, como a alanina e o glutamato, também são capazes de ser convertidos em glicose; por isso, são chamados de aminoácidos glicogênicos. Os ácidos graxos não são capazes de ser transformados diretamente em glicose pela gliconeogênese, mas, indiretamente, auxiliam a gliconeogênese, dado que a oxidação dos ácidos graxos, quando liberados no jejum, fornece uma boa parte do ATP e NADH necessários para auxiliar energeticamente a gliconeogênese.

A gliconeogênese é regulada em muitos pontos. A enzima piruvato carboxilase é ativada pelo excesso de acetil-CoA, que indica estar a célula produzindo energia e já não ser necessária a transformação da glicose em ATP, podendo a glicose ser armazenada. Assim, a glicose pode ser produzida pela gliconeogênese para, posteriormente, ser armazenada na forma de glicogênio. Outro ponto de regulação é a reação catalisada pela frutose-1,6-bifosfatase, enzima ativada pela presença de ATP e citrato (produto da condensação de oxaloacetato com a acetil-CoA). Esses produtos indicam excesso de energia na célula e novamente a síntese de glicose é preferida para sua posterior armazenagem.

Grande parte do controle da glicose sanguínea é realizada pelo fígado. Quando o nível de glicose sanguínea é baixo, o hormônio glucagon sinaliza ao fígado para que ele produza e libere mais glicose. O fígado faz isso esti-

mulando a quebra do glicogênio armazenado e ativando a gliconeogênese. O processo contrário também é regulado pelo fígado: quando há alta concentração de glicose no sangue, o hormônio insulina sinaliza a entrada da glicose nas células, através de transportadores específicos, e ativa a via glicolítica para a produção de energia.

1.3.3.8 Via das pentoses

A via das pentoses é uma via alternativa de oxidação de glicose. Seu objetivo é gerar NADP^+ , que auxilia nas reações de redução que ocorrem na célula. O NADP^+ também é responsável pela manutenção do ferro em sua forma reduzida (Fe^{+2}) na hemoglobina. Caso o ferro não se encontre nessa forma, a hemoglobina fica incapaz de transportar O_2 . O tripeptídeo glutathione garante que o Fe^{+2} fique nessa forma, pois oxida o NADPH em NADP^+ .

O NADPH é importante por direcionar as reações de redução no organismo. Como as formas de obtenção de energia se baseiam em oxidações, para que a energia seja armazenada, deve estar em sua forma reduzida. O NADPH é importante na biossíntese de lipídios e na síntese de colesterol – responsável pela fluidez das membranas e precursor de hormônios como a testosterona, o estrogênio e a progesterona.

A via das pentoses também gera as pentoses que serão utilizadas na síntese de DNA e de RNA (riboses). Em células tumorais e fibroblásticas, essa via está superativa.

1.3.4 Metabolismo dos ácidos graxos

Como mencionado anteriormente, os lipídios são moléculas altamente energéticas que podem ser obtidos através da dieta ou por biossíntese celular. Existem diversas vantagens em se utilizar os lipídios como substrato para obtenção de energia. Por um lado, essas moléculas são mais reduzidas do que os carboidratos e, por meio das reações de oxidação, geram mais energia; por outro lado, o fato de serem moléculas hidrofóbicas permite que o seu armazenamento não altere a osmolaridade dos fluidos orgânicos

nem esteja associado a moléculas de água, como aquelas presentes nas camadas de solvatação dos carboidratos. Para serem utilizados como fonte de energia, os triglicérides sofrem primeiramente a ação de lípases, que clivam a ligação éster, dando origem aos ácidos graxos livres e ao glicerol. Os carboidratos proporcionam uma fonte energética que pode ser mais rapidamente mobilizada; contudo, a maior parte da energia é estocada no organismo sob a forma de lipídios.

1.3.4.1 Síntese dos ácidos graxos

Os lipídios desempenham um número muito grande de funções no organismo: participam da estrutura das membranas biológicas, são precursores de hormônios, são cofatores enzimáticos, detergentes e mensageiros, além de serem estocados para a produção de energia. Por isso, é importante que o indivíduo seja capaz de sintetizá-los. Como todas as reações biossintéticas, a síntese de lipídios envolve reações endergônicas e de caráter redutor, utilizando o ATP como fonte de energia e o NADPH como transportador de elétrons.

A via de biossíntese de ácidos graxos não é o inverso da β -oxidação, sendo catalisada por enzimas diferentes e em compartimentos distintos da célula. A β -oxidação ocorre na mitocôndria, ao passo que a biossíntese de ácidos graxos ocorre no citoplasma. Além disso, o intermediário malonil-CoA participa da biossíntese, mas não da degradação, sendo importante na regulação da β -oxidação.

Em uma primeira etapa da síntese de lipídios, o malonil-CoA é sintetizado pela ação da **acetil-CoA carboxilase**, a partir da condensação do bicarbonato com uma molécula de acetil-CoA.

Na degradação, os transportadores de elétrons envolvidos são o NAD^+ e o FAD; na biossíntese, o transportador é o NADPH. No processo de síntese, todas as reações são catalisadas por um complexo enzimático, denominado **ácido graxo sintase**. Esse complexo enzimático é formado por proteínas que agem em conjunto, catalisando a formação de ácidos graxos a partir de acetil-CoA e malonil-CoA. Nesse complexo, uma proteína carreadora de acila

(ACP) possui a fosfopanteteína, que apresenta um SH livre como grupo prostético. Esse grupo prostético é responsável por segurar a cadeia de ácido graxo em crescimento na superfície do complexo proteico.

Inicialmente, os grupos acetil e malonil são ativados, ao se ligarem ao grupo SH da ACP. O primeiro passo da biossíntese após a ativação dos grupos acetil e malonil é a condensação entre os dois, que forma um grupo acetoacil ligado à ACP e produz uma molécula de CO_2 . Essa reação é catalisada pela β -**cetoacil-ACP sintase**. A próxima reação é a redução do grupo carbonila situado em C3 para formar D- β -hidroxibutiril-ACP, reação que é catalisada pela β -**cetoacil-ACP redutase** e que tem o NADPH como doador de elétrons. Em seguida, ocorre uma desidratação para formar a trans- Δ^2 -butenoil-ACP. A enzima que catalisa essa desidratação é a β -**hidroxiacil-ACP desidratase**. A última etapa é a redução da dupla ligação resultado da desidratação, formando o butiril-ACP pela ação da **enoil-ACP redutase**, sendo, novamente, o NADPH o doador de elétrons. A cada ciclo de condensação–redução–desidratação–redução, a cadeia de ácido graxo é aumentada de dois carbonos. A sequência de reações se repete para formar o palmitato, um ácido graxo com 16 átomos de carbono. Após a sua formação, o palmitato é liberado pela ação de uma atividade hidrolítica que existe no complexo enzimático.

Nos vegetais, ocorre a síntese de alguns ácidos graxos de cadeia maior, como os de 18 carbonos. Nos animais, a síntese de ácidos graxos ocorre principalmente no citoplasma, ao passo que, nos vegetais, ocorre nos cloroplastos.

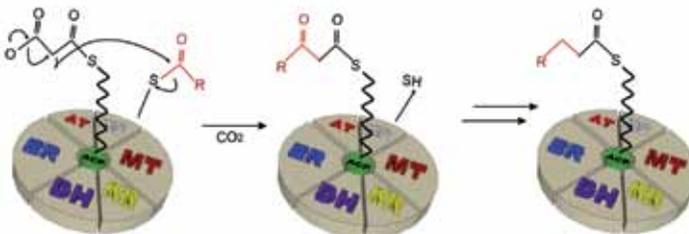


Figura 1.36. Ciclo de biossíntese de um ácido graxo.

1.3.4.2 β -oxidação

A **oxidação de ácidos graxos de cadeia longa** é uma via de grande importância na obtenção de energia, dado que os elétrons liberados nas reações entram na fosforilação oxidativa para gerar ATP. Essa reação de oxidação gera acetil-CoA, que também é capaz de gerar energia, pois é completamente oxidada a CO_2 no ciclo de Krebs.

O destino da acetil-CoA obtida na oxidação dos ácidos graxos varia em alguns organismos. Nos animais, ela é convertida, pelo fígado, em corpos cetônicos, que são combustíveis solúveis em meio aquoso, utilizados pelo cérebro e por outros tecidos quando não há glicose disponível.

Os triglicerídeos são excelentes fontes de energia, pois são formados por longas cadeias de hidrocarboneto, as quais são extremamente reduzidas e possuem alta energia de oxidação.

A gordura utilizada na obtenção de energia pode ser obtida de três formas: ingestão pela alimentação, mobilização de gordura armazenada (nos vertebrados, do tecido adiposo) e conversão de carboidratos a ácidos graxos pelo fígado.

Os ácidos graxos obtidos na alimentação são absorvidos no intestino e transportados no sangue, ligados a proteínas transportadoras. Eles podem ir para os músculos, onde serão oxidados para a obtenção de energia, ou para o tecido adiposo, onde serão reesterificados e armazenados como triacilgliceróis. Os triacilgliceróis também podem ser transportados para o fígado a fim de ser utilizados na produção de corpos cetônicos.

Os hormônios sinalizam quando o organismo necessita de energia, e os triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo são mobilizados e transportados para os tecidos onde são necessários. Quando ocorre baixa concentração de glicose sanguínea, os hormônios epinefrina e glucagon estimulam essa mobilização. A epinefrina e o glucagon ativam uma cadeia de sinalização dentro do adipócito que leva à ativação da enzima **lipase de triacilgliceróis hormônio-sensível**. Essa enzima catalisa a hidrólise das ligações ésteres dos triacilgliceróis, formando ácidos graxos livres e glicerol. Por serem insolúveis em meio aquoso, os ácidos graxos livres são transportados pelo sangue ligados à proteína albumina. Por essa forma, são capazes de chegar aos tecidos que

necessitam de energia. O glicerol formado pela ação da lipase é fosforilado pela ação da **glicerol quinase**, formando glicerol-3-fosfato. Esse é oxidado à diidroxiacetona fosfato e, posteriormente, isomerizado, pela ação da **triose fosfato isomerase**, à gliceraldeído-3-fosfato, que entra na cadeia glicolítica para ser oxidado a piruvato.

A oxidação dos ácidos graxos ocorre na matriz mitocondrial. Porém, os ácidos graxos livres que entram na célula são incapazes de passar para o interior da mitocôndria. Para que isso seja possível, sofrem uma série de reações, que os transforma em um acil-CoA, reação que ocorre na membrana externa e que serve para ativar o ácido graxo.

Na membrana interna, a **carnitina aciltransferase I** retira o grupo CoA do acil, colocando a carnitina em seu lugar. Assim, o ácido graxo atravessa a membrana por meio de um transportador da carnitina. Já na parte interna da membrana, a enzima **carnitina aciltransferase II** retira a carnitina e recoloca o grupo CoA. A carnitina retorna ao espaço intermembranar pelo transportador. Com isso, os conjuntos de CoA citossólico e mitocondrial não se misturam, dado que o primeiro é usado na biossíntese de lipídios e o segundo, na oxidação degradativa de ácidos graxos, piruvato e aminoácidos.

Uma vez dentro da mitocôndria, o acil graxo está pronto para sofrer oxidação. A oxidação mitocondrial dos ácidos graxos ocorre em três etapas. No primeiro estágio, os ácidos graxos de cadeia longa são oxidados e sofrem remoção sucessiva de dois átomos da sua cadeia, formando várias unidades de acetil-CoA. Na segunda etapa, as moléculas de acetil-CoA, ao entrarem no ciclo de Krebs, são oxidadas à CO_2 e as moléculas de acetil-CoA obtidas na glicólise também têm o mesmo destino. Essa etapa também gera NADH e FADH_2 , que, na terceira etapa, transferem seus elétrons para a cadeia respiratória mitocondrial; com isso, os elétrons são transferidos para o oxigênio, ocorrendo também formação de ATP.

A formação de ATP se inicia a partir da desidrogenação para produzir uma ligação entre os carbonos α e β (C2 e C3). Essa oxidação gera uma dupla em configuração trans, o que é incomum nos ácidos graxos naturais. A enzima responsável por esse passo é a **acil-CoA desidrogenase**, que contém o FAD como grupo prostético. Os elétrons produzidos na oxidação são transferidos

para o FAD, que logo os transfere para a ETPF (flavoproteína transportadora de elétrons). A ETPF é uma proteína da membrana mitocondrial interna que também participa como transportadora de elétrons da cadeia respiratória – essa transferência de elétrons na primeira etapa da β -oxidação é capaz de gerar duas moléculas de ATP. Em seguida, ocorre uma hidratação: uma molécula de água é adicionada à dupla ligação trans por meio da ação da **enoil-CoA hidratase**. Nessa reação, forma-se uma 3-hidroxiacil-CoA, também chamada L- β -hidroxiacil-CoA, pois há a formação do isômero L e a introdução da hidroxila ocorre no carbono β – carbono adjacente ao carbono ligado ao grupo funcional. Posteriormente, o produto anterior é desidrogenado e, pela ação da **β -hidroxiacil-CoA desidrogenase**, forma-se a β -cetoacil-CoA. Essa enzima utiliza o NAD^+ como receptor de elétrons; além disso, ela também é muito específica para o isômero L. O NADH formado transfere seus elétrons ao complexo I da cadeia respiratória para posterior síntese de ATP. Na última etapa da oxidação dos ácidos graxos, ocorre o rompimento de duas unidades de carbono da molécula de ácido graxo. Esse passo resulta da ação da acil-CoA acetiltransferase, também conhecida como tiolase. Essa enzima promove a reação entre a β -cetoacil-CoA e uma molécula de CoA, reação que tem, como produtos finais, a acetil-CoA e o tioéster da coenzima A e do ácido graxo original, diminuído de dois carbonos. Essas etapas se repetem até a degradação total do ácido graxo. As moléculas de acetil-CoA formadas nas etapas da β -oxidação podem ser totalmente oxidadas no ciclo de Krebs, para posterior síntese de ATP.

Essas etapas ocorrem apenas em ácidos graxos de cadeia simples. Porém, é comum a ocorrência de **ácidos graxos com cadeia insaturada** (ligações duplas cis). Para que possam ser metabolizados, ocorrem etapas adicionais que vão variar no caso de ácidos graxos mono ou poli-insaturados. Nos pontos da molécula onde há ligações simples, a β -oxidação ocorre normalmente. No momento em que a reação chega a uma dupla ligação cis, que não pode sofrer a ação da enoil-CoA hidratase, entram em ação as enzimas que participam dessas duas etapas adicionais. Primeiramente, a **enoil-CoA isomerase** transforma a ligação cis em trans, que é convertida pela **enoil-CoA hidratase** na L- β -hidroxiacil-CoA correspondente. Essa reação é uma alternativa na

oxidação de ácidos graxos monoinsaturados. No caso de **ácidos graxos poli-insaturados**, é necessária a utilização de outra enzima. Isso porque, para a oxidação ocorrer, a ligação deve estar em posição *trans* e não *cis*. Nos poli-insaturados, também há a ação da enoil-CoA isomerase na dupla ligação mais próxima ao carbono α (carbono situado ao lado do carbono do grupo funcional). Com isso, essa molécula sofre mais um ciclo de oxidação, liberando uma molécula de acetil-CoA, além de sofrer a primeira reação do segundo ciclo de oxidação. A ação conjunta da **2,4-dienoil-CoA redutase** e, novamente, da enoil-CoA isomerase permite a mudança da configuração das ligações para que elas possam novamente entrar no ciclo de oxidação e gerar acetil-CoA.

Essa primeira etapa na oxidação dos ácidos graxos é diferente para os ácidos graxos de cadeia par e para os ácidos graxos de cadeia ímpar. Apesar de os ácidos graxos de cadeia par serem mais comuns do que os de cadeia ímpar, também é possível encontrar como fonte de lipídios os de cadeia ímpar.

Os **ácidos graxos de cadeia ímpar** são, inicialmente, oxidados da mesma forma que os ácidos graxos de cadeia par; nas últimas reações, porém, haverá um acil-CoA graxo de cinco carbonos. Quando ele é clivado novamente, forma-se acetil-CoA e propionil-CoA. A acetil-CoA é prontamente utilizada pelo ciclo de Krebs, mas o propionil-CoA não. Ele necessita de uma via particular para a sua oxidação total.

Nessa via, o propionil-CoA é primeiramente carboxilado, formando o isômero D-metilmalonil-CoA pela ação da **propionil-CoA carboxilase**. O produto formado é então epimerizado ao isômero L pela **metilmalonil-CoA epimerase** e, em seguida, sofre um rearranjo intramolecular, formando o succinil-CoA, que pode, agora, participar do ciclo de Krebs. Essa reação é catalisada pela **metilmalonil-CoA mutase**, que possui como cofator a desoxiadenosilcobalamina – coenzima B12, derivada da vitamina B12.

O acil-CoA graxo formado no citoplasma das células pode entrar na mitocôndria para ser oxidado na via da β -oxidação ou ser transformado em triacilglicerol e fosfolípido por enzimas do citoplasma. O que regula a oxidação é a velocidade com que esses acil-CoA graxos entram na mitocôndria. Um excesso de malonil-CoA, primeiro intermediário da biossíntese dos ácidos

graxos, aumenta sempre que o nível de glicose no sangue está alto, pois o excesso de glicose não metabolizado ou não convertido em glicogênio é transformado em ácidos graxos para posterior estocagem. O malonil-CoA inibe a carnitina acil transferase I, enzima responsável pela entrada desses acil-CoA graxos na mitocôndria para serem oxidados, diminuindo a degradação de lipídios pelo organismo.

A β -oxidação também ocorre nos peroxissomos. Ela é necessária na síntese de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nos humanos e na maioria dos mamíferos, a acetil-CoA formada na β -oxidação possui outra via distinta além do ciclo de Krebs. Ela pode ser convertida aos chamados corpos cetônicos (acetoacetato, D- β -hidroxibutirato e acetona), que servem como combustível para outros tecidos e que são oxidados pelo ciclo de Krebs para fornecer energia. Os tecidos que mais utilizam os corpos cetônicos são os músculos esqueléticos, cardíaco e o córtex renal. O cérebro, quando em baixa de glicose, pode utilizar os corpos cetônicos como energia alternativa; essa, porém, não é a melhor forma de obtenção de energia para esse órgão. A acetona é o único corpo cetônico que é expelido na respiração e não é utilizado como fonte de energia. A produção de corpos cetônicos é estimulada em situações de jejum severo e de diabetes não controlado.

1.3.5 Metabolismo das proteínas

As proteínas são constantemente produzidas e degradadas. Sua síntese e degradação dependem das necessidades das células. Um maquinário celular imenso está diretamente relacionado com o metabolismo proteico. Estima-se que cerca de 400 g de proteínas sejam renovadas por dia em um ser humano adulto. A quantidade ideal de determinada proteína no organismo é mantida pelo balanço perfeito entre a sua síntese e a sua degradação.

1.3.5.1 Síntese proteica

As proteínas são as principais estruturas celulares; elas participam de todas as atividades celulares. Sua síntese se dá no citoplasma, e as estruturas

responsáveis por esse processo são os ribossomos. Na síntese proteica, estão envolvidas muitas proteínas, enzimas, RNAs e o próprio DNA. As proteínas são formadas com base em moldes diretos do DNA, que são levados ao citoplasma através do RNA.⁶

Após a sua síntese, as proteínas podem sofrer modificações a fim de exercerem suas funções. Tais modificações, chamadas modificações pós-traducionais, incluem, entre outras, a adição de açúcares, de lipídios e de grupos prostéticos, e a formação de pontes dissulfeto. Cada modificação será específica e auxiliará a proteína a exercer a função à qual se destina.

1.3.5.2 Degradação proteica

A degradação de proteínas é um processo constante na célula. Proteínas defeituosas ou com tempo de vida curto são degradadas a cada momento. É o processo de degradação que regula o tempo de vida de uma proteína. Nos eucariotos, com exceção de algumas proteínas – como a hemoglobina, que está presente durante todo o período de vida de uma hemácia –, as proteínas se degradam muito rapidamente.

As proteínas defeituosas e com tempo de vida curto são degradadas por sistemas dependentes de ATP, ao passo que as proteínas de membrana, extracelulares e com tempo de vida longo são degradadas nos lisossomos.

Nos procariotos, o sistema de degradação dependente de ATP é, na realidade, uma enzima, denominada La, que é ativada somente em presença das proteínas a serem degradadas. Já nos eucariotos, essa via de degradação é bem diferente. Nela, há a presença da proteína ubiquitina, que se liga covalentemente, com o auxílio de outras enzimas, à proteína a ser degradada, em um processo denominado ubiquitinação. Essa ligação ocasiona o direcionamento dessa enzima para a proteólise.

1.3.6 Integração do metabolismo

○ metabolismo na célula é regulado pela ação das enzimas, pela disponibilidade de substratos e por modificações nas enzimas. Quando

⁶ Mais detalhes sobre a síntese proteica são encontrados no capítulo 2 deste volume, “Biologia molecular”.

pensamos em um organismo complexo multicelular, o mecanismo de regulação é muito complicado. No corpo humano existem vários tecidos, formados por diferentes tipos celulares. Tais tecidos participam da formação dos órgãos do corpo, os quais exercem funções muito distintas. O coração e os músculos são capazes de se contrair; o cérebro é capaz de passar informações por meio de pulsos elétricos; e o fígado é o principal responsável pela degradação de substâncias e pelo armazenamento de glicose sob a forma de glicogênio.

No organismo, os hormônios são os responsáveis pela transmissão de informação entre os diferentes órgãos; são eles também que organizam as atividades metabólicas de cada tecido.

O metabolismo dos mamíferos começa no momento da alimentação. A digestão quebra as macromoléculas obtidas na alimentação em moléculas menores, que podem ser absorvidas no trato gastrointestinal. Os carboidratos, proteínas e lipídios quebrados e absorvidos passam para o sangue. Os aminoácidos e os açúcares são principalmente enviados para o fígado; já os triglicerídeos entram no tecido adiposo. As necessidades dos órgãos variam muito, e o fígado é o responsável por suprir a demanda de cada um deles.

A glicose absorvida no intestino entra no fígado e é fosforilada pela **hexoquinase**, formando a glicose-6-fosfato. A partir daí, ela entra na via glicolítica e em seguida, no ciclo de Krebs, e os elétrons obtidos nessas vias chegam à cadeia respiratória, onde ocorre a produção de ATP.

Os níveis de glicose sanguínea são sinalizados para o fígado mediante informações hormonais. Quando a glicose está em alta concentração, o hormônio insulina ativa a sua entrada no fígado, levando-a para as vias metabólicas que culminam na formação de ATP. Assim que as necessidades energéticas são supridas, o excesso de glicose é convertido em glicogênio pelo fígado, onde o glicogênio ficará armazenado. A glicose também pode ser convertida para a síntese de lipídios após a sua entrada na via glicolítica, e a posterior transformação, pela ação da desidrogenase pirúvica, do piruvato formado em acetil-CoA, criando lipídios que serão posteriormente armazenados no tecido adiposo. Essa forma de armazenamento não é tão disponível quanto o glicogênio, mas é importante em momentos de alta demanda energética e em jejuns de longo período. O excesso de glicose também pode ser desviado

para a via das pentoses-fosfato, responsável pela geração de NADPH, um carreador de elétrons na biossíntese de lipídios e de ácidos nucleicos.

Quando o nível de glicose sanguínea está baixo, entra em ação o glucagon, que estimula a quebra de glicogênio hepático para suprir as demandas de glicose de outros órgãos. Além disso, a própria glicose-6-fosfato, presente ainda no citoplasma da célula, pode ser desfosforilada pela glicose-6-fosfatase a fim de liberar a glicose, cuja concentração deve ser mantida em 4 mM, novamente no sangue. Como mencionado, o cérebro funciona somente com glicose, podendo, em situações muito extremas, utilizar os corpos cetônicos produzidos na gliconeogênese como fonte de energia. Na gliconeogênese, o organismo obtém glicose por meio de precursores não glicídicos.

Já os aminoácidos que são captados pelas células após a degradação das proteínas da alimentação possuem várias rotas metabólicas importantes: são precursores para a biossíntese de proteínas no fígado e participam da síntese proteica em todos os tecidos e da biossíntese de nucleotídeos; além disso, podem ser desaminados e degradados para produzir acetil-CoA, composto que pode entrar no ciclo de Krebs e produzir energia. Os intermediários desse ciclo podem ser convertidos à glicose pela via gliconeogênica.

Os ácidos graxos também possuem diferentes caminhos metabólicos. Podem ser oxidados para formar acetil-CoA e produzir ATP, além de NADH. A produção em excesso de acetil-CoA pode formar corpos cetônicos que são capazes de suprir a energia de determinados órgãos no jejum. Além disso, parte da acetil-CoA produzida é desviada para a biossíntese de colesterol, necessário na síntese das membranas plasmáticas.

Em momentos de longo jejum (durante o sono) ou de desnutrição, o glicogênio armazenado no fígado e nos músculos sofre depleção. Assim, a produção de glucagon é estimulada, levando à mobilização dos triacilgliceróis, que funcionarão como combustíveis primários para os músculos e o fígado. Para fornecer glicose ao cérebro, o fígado degrada proteínas cujos grupos aminos são degradados e seus corpos carbônicos, utilizados na gliconeogênese. O fígado também utiliza os ácidos graxos para isso.

O metabolismo do corpo humano é todo mobilizado e dependente da situação energética do organismo. As alterações das taxas de glicose

sanguínea são responsáveis por estímulos hormonais que controlam todas as vias metabólicas do corpo. As doenças que alteram o controle hormonal – como o diabetes – podem causar grandes alterações metabólicas no organismo e devem ser cuidadosamente controladas. O diabetes, deficiência na secreção ou ação da insulina, é uma doença muito comum e que decorre da má-alimentação, com excesso de doces e massas, podendo ser fatal quando não tratada. Seus principais sintomas são sede excessiva, micção frequente e superprodução de corpos cetônicos, além de acidose decorrente da grande formação de ácidos carboxílicos, que se ionizam e acidificam o sangue, condição que pode ser fatal ao paciente. O diabetes não tem cura, mas pode ser controlado com remédios ou injeções subcutâneas de insulina.

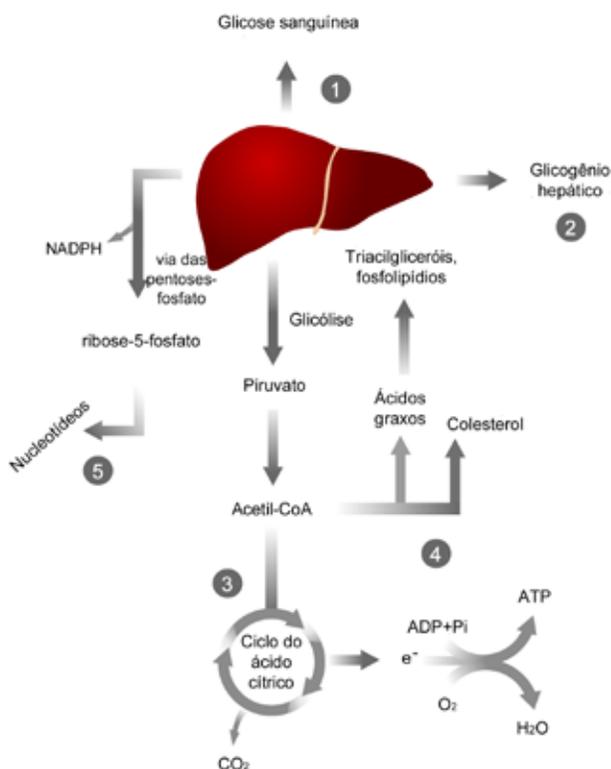


Figura 1.37. Integração do metabolismo.

1.4 Bioquímica clínica

Com a evolução constante das técnicas bioquímicas, os ensaios tornam-se ultrapassados e precisam ser reformulados para alcançar os objetivos inerentes ao processo de modernização. Por esse motivo, abordam-se, neste item, algumas técnicas de análise bioquímica, sem deixar de lado os conceitos básicos necessários à compreensão de cada uma delas.

Inicialmente, é importante esclarecer que uma análise bioquímica sofre influência e interferência de certos fatores, que podem comprometer a qualidade do resultado final. Dentro eles, estão o jejum e a dieta, o uso de medicamentos/drogas, o tabagismo, o consumo de bebidas alcoólicas, o estado físico e emocional do paciente, a coleta das amostras, a hemólise e as condições de armazenamento e transporte das amostras. No quadro 1.6 estão relacionados alguns fatores que podem interferir no resultado analítico de um exame bioquímico.

Quadro 1.6. Fatores que interferem e/ou influenciam nos exames laboratoriais.

Variáveis do paciente	Variáveis da amostra
<ul style="list-style-type: none"> • dieta • drogas/medicamentos • raça • exercícios físicos • tabaco (fumo) • sexo • idade • fase do ciclo menstrual • menopausa • estresse 	<ul style="list-style-type: none"> • turvação/lipemia • hemólise (causa fisiológica e/ou mecânica) • icterícia • jejum • condições de transporte e armazenamento • anticoagulantes • sangue venoso ou capilar • contaminações bacteriológicas

• Jejum

Uma dúvida bastante frequente ao se realizar um exame laboratorial é quanto à obrigatoriedade ou não do jejum, e sua duração. Para análises bioquímicas, como a dosagem da glicose, testes de tolerância – glicose, d-xilose, lactose etc. –, perfil lipídico – também chamado lipidograma –, ferro e capacidade de fixação do ferro, vitamina B12, entre outros, o jejum é recomendado para a análise adequada. No caso da dosagem de triglicerídeos, não devem ser ingeridos alimentos por um período mínimo de 12 horas, a fim de evitar valores falsamente alterados. O aumento nos triglicerídeos normalmente altera o aspecto do soro, tornando-o opalescente (soro lipêmico), e essa condição interfere potencialmente no resultado de várias dosagens. Por sua vez, jejuns prolongados, em período superior a 14 horas, podem influenciar as dosagens séricas. No caso dos triglicerídeos, por exemplo, o jejum prolongado acarreta um resultado falsamente diminuído. Nos dias que antecedem os exames, deve-se manter a alimentação habitual, exceto para os testes em que é obrigatória uma dieta especial – por exemplo, dosagem de oxalatos em urina coletada num período de 24 horas. Mudanças alimentares bruscas podem ocasionar alterações na concentração de alguns constituintes plasmáticos, dado que as alterações permanecem aparentes mesmo transcorridas 12 horas.

• Álcool e tabaco

O uso casual do álcool não exerce efeito significativo nos testes laboratoriais, porém, dependendo da quantidade e frequência em que é consumido, podem ocorrer várias modificações no metabolismo. O uso de bebida alcoólica diminui a glicose sérica e aumenta o lactato plasmático; logo, não é recomendado ingerir álcool de duas a quatro horas antes do exame. Já o tabaco é composto por várias substâncias – como nicotina, piridina, cianeto, entre outras –, e o seu consumo está associado a alterações, agudas ou crônicas, que também são influenciadas pelo sexo e idade do paciente. As alterações causadas pelo tabagismo crônico

incluem a elevação da atividade de várias enzimas e lipoproteínas, assim como o aumento das catecolaminas, glicose, cortisol, aldosterona e ácidos graxos livres.

- **Drogas (medicamentos, vitaminas etc.)**

Diversas substâncias podem interferir nos resultados das análises laboratoriais. É importante que seja informado o uso de medicações, inclusive das não prescritas, como suplementos minerais e vitaminas. Altas concentrações de vitamina C, por exemplo, podem elevar os resultados das frutosaminas e do ácido úrico e provocar possíveis alterações na creatinina sérica. O uso de contraceptivos orais eleva os níveis séricos de ferro, triglicerídeos, transaminase pirúvica e gamaglutamil-transferase, e diminui os níveis de albumina. Os medicamentos diuréticos frequentemente elevam a concentração de sódio, o cálcio e a glicose, e diminuem o potássio.

- **Gravidez**

Durante a gravidez, ocorrem diversas mudanças metabólicas, de acordo com o período gestacional, que promovem modificações nos valores de muitos exames. Há mudanças na função renal, que acarretam a elevação dos níveis de filtração glomerular e, conseqüentemente, uma maior excreção de glicose, ureia, creatinina e proteína. Em contrapartida, são observadas diminuições no nível sérico dessas substâncias.

- **Exercício físico**

A atividade física influencia e interfere substancialmente no metabolismo e, dependendo de sua intensidade e duração, muitas substâncias podem sofrer alterações nas concentrações sanguíneas e urinárias. Inicialmente, ocorre aumento da concentração de glicose e de insulina, que pode levar a um quadro de hipoglicemia com a intensificação da atividade física. As enzimas desidrogenase láctica (LDH), creatinofosfoquinase (CPK) e aldolase são extremamente sensíveis e se elevam com a realização de exercícios físicos. Pode ocorrer também aumento de glicoproteínas,

transferrina, transaminases, ureia, creatinina e ácido úrico. É possível, ainda, que as concentrações lipídicas, conforme o aprimoramento das atividades físicas, sofram alterações, tais como redução do colesterol sérico, da fração LDL-colesterol e dos triglicerídeos e aumento dos valores de HDL-colesterol.

- **Hemólise**

A ruptura da hemácia (hemólise) pode ser provocada por um processo mecânico (traumatismo durante a punção venosa) ou por questões fisiológicas, seja em um processo natural de renovação da célula vermelha ou como consequência de doença, como a anemia hemolítica. A hemólise causa elevação de bilirrubinas, transaminases, fosfatase ácida, LDH, magnésio e potássio, influenciando de modo menos marcante na dosagem de proteínas totais, fosfatase alcalina, ferro e fósforo.

- **Transporte e preparo da amostra**

Para realizar adequadamente o armazenamento e o transporte de amostras biológicas, são necessários cuidados que garantam a preservação dos analitos a serem pesquisados. As consequências do preparo ou do transporte inadequados podem variar desde a perda da amostra por vazamento até alterações na concentração dos seus diferentes constituintes.

- **Valores de referência**

Não são somente metodologias e equipamentos que influenciam nos valores de referência; o resultado de um exame pode ser influenciado por diversos outros fatores, como variações fisiológicas, alimentares e genéticas, sexo, idade etc. Nem sempre tais variações são consideradas em um estudo populacional para a determinação de valores referenciais. Normalmente, os valores de referência são estabelecidos após o estudo de um grupo de indivíduos saudáveis e expressam o que foi observado em 95% da população estudada e não na sua totalidade. O que é realidade para uma população pode não ser para

outra. Portanto, é necessário considerar que os valores de referência são utilizados como orientação genérica, mas não devem ser considerados um determinante para o que é normal ou anormal.

1.4.1 Análise de componentes glicídicos

A análise de alguns componentes glicídicos é indispensável para o diagnóstico do diabetes, independentemente de suas causas e dos diferentes quadros clínicos.

1.4.1.1 Glicose (glicemia em jejum de 8 horas)

Vários são os métodos propostos para determinar o teor de glicose em uma amostra. Inicialmente, utilizava-se o caráter redutor da glicose. São exemplos desses métodos o Folin-Wu e o Somogyi-Nelson, ambos utilizando sais de cobre em meio alcalino. A grande problemática dos testes que envolvem reações de oxidação-redução é o fato de que qualquer interferente com propriedades redutoras, e não apenas a glicose, pode sofrer esse tipo de reação. Dessa forma, tais métodos não são específicos e, por esse motivo, são pouco utilizados.

Outros métodos foram desenvolvidos nos quais a glicose reage diretamente com compostos orgânicos, como a anilina, a antrona e a ortotoluidina (o-toluidina), essa última muito utilizada por fornecer resultados mais confiáveis. A reação se dá entre o grupo aldeído da glicose com a o-toluidina em meio ácido, formando uma glicosamina e a base de Schiff correspondente, responsável pela coloração verde, cuja intensidade é medida fotometricamente.

Posteriormente, métodos envolvendo a ação de enzimas – por exemplo, glicose-oxidase e hexoquinase – foram desenvolvidos e passaram a integrar a prática laboratorial. No método que utiliza a glicose-oxidase, a glicose sofre a ação dessa enzima, formando ácido glicônico e água oxigenada (H_2O_2), a qual, na presença de uma peroxidase, se decompõe em água (H_2O) e oxigênio (O_2). O oxigênio formado reage com substâncias presentes no meio reacional e leva à formação de um complexo de coloração vermelho-cereja cuja intensidade, medida fotometricamente, é diretamente proporcional à concentração de glicose.

No quadro 1.7 estão relacionadas algumas causas do aumento e da redução dos níveis de glicose no sangue.

Quadro 1.7. Causas para o aumento ou a diminuição dos níveis de glicose no sangue.

Níveis aumentados	Níveis diminuídos
<ul style="list-style-type: none"> • diabetes • hipertireoidismo • feocromocitoma • estresse • pancreatite aguda • drogas: atropina, ácido acetilsalicílico (AAS), ácido ascórbico, diuréticos, adrenalina, corticoides, dopamina, estrogênios, tiabendazol, anticonvulsivantes, contraceptivos orais 	<ul style="list-style-type: none"> • insulinosomas • tumores extrapancreáticos: fibromas, sarcomas, hepatomas, mesoteliomas • insuficiência adrenal (doença de Addison) • hipotireoidismo • hipopituitarismo • desnutrição • síndrome de má absorção • alcoolismo • dano hepático – insuficiência cardíaca severa, necrose hepática fulminante • drogas: bloqueadores beta-adrenérgicos, esteroides, anabólicos, levodopa, anti-histamínicos, etanol, inibidor da MAO, acetaminofen

É importante salientar que a determinação do teor de glicose sanguínea deve ser realizada logo após a coleta da amostra, num período máximo de 30 minutos, pois a glicose sanguínea sofre destruição enzimática (glicólise) sob a ação das hemácias e dos leucócitos. Essa destruição ocorre a 37°C e até mesmo em refrigeração. Assim, deve-se centrifugar a amostra logo que ocorra a retração do coágulo; caso contrário, coleta-se a amostra em fluoreto de sódio (1 mg/mL de sangue), que age como conservante e inibe a glicólise. O indivíduo deve estar em jejum de pelo menos 8 horas; períodos superiores a 14 horas, porém, podem conduzir a resultados abaixo dos valores reais.

1.4.1.2 Teste oral de tolerância à glicose

O diabetes pode ser antecedido por estágios com glicemia de jejum inapropriada (entre 100 e 125 mg/dL) e/ou tolerância à glicose diminuída (entre 140 e 200mg/dL, após a administração de 75g de glicose anidra). O tempo de duração desses estágios varia, e pode haver reversão do quadro, com normalização do metabolismo glicídico. Em casos de glicemia de jejum inapropriada, deve efetuar-se o teste oral de tolerância à glicose (TOTG), que avalia a glicemia basal (glicemia de jejum) e, após 120 minutos, a sobrecarga glicídica – adultos: ingesta de 75 g de glicose anidra; crianças: 1,75 g/kg de peso, não ultrapassando 75 g. No TOTG, a ingesta da solução de glicose deve ser realizada no máximo em 5 minutos, com jejum de 8 a 12 horas antes da coleta basal, e o indivíduo deve estar em dieta sem restrição de carboidratos durante pelo menos os três dias que antecedam ao teste. Trata-se de uma análise utilizada na construção de um diagnóstico específico, não sendo recomendada como exame de rotina, e que apresenta valores diferentes conforme o estágio clínico do indivíduo (quadro 1.8).

Quadro 1.8. Valores de referência para os testes envolvendo a análise da glicose.

Estágio	Teste		
	Glicemia de jejum (GJ)	Glicemia aleatória (GA)	TOTG/glicemia após 2 horas
Normal	menor ou igual a 99 mg/dL	–	menor ou igual a 140 smg/dL
Intolerância glicêmica	entre 100 e 125 mg/dL	–	maior de 140 e menor de 200 mg/dL
Diabetes	maior ou igual a 126 mg/dL	GA maior ou igual a 200 mg/dL associada à sintomatologia clássica	maior ou igual a 200 mg/dL

1.4.1.3 Curva glicêmica

A curva glicêmica é uma análise de perfil glicídico muito realizada em gestantes com o objetivo de controlar o diabetes gestacional, quadro que acarreta complicações fetais. Trata-se de um TOTG, porém com algumas diferenças. Realiza-se a coleta de sangue basal (glicemia de jejum) e, após a ingestão de 100 g de glicose anidra, efetuam-se outras três coletas. Essas três últimas coletas para determinação da glicemia são realizadas de hora em hora – 60, 120 e 180 minutos após a ingestão da sobrecarga glicídica. A presença de duas ou mais glicemias acima dos valores apresentados no quadro 1.9 é indicativa de diabetes gestacional.

Quadro 1.9. Valores de referência para a curva glicêmica.

Hora da coleta	Glicemia (mg/dL)
Glicemia de jejum	95
60 minutos	180
120 minutos	155
180 minutos	140

1.4.1.4 Hemoglobina glicosilada

Trata-se de uma hemoglobina que apresenta carboidratos, constituinte normal do sangue, em sua estrutura. Num primeiro momento, não foram identificadas as suas funções fisiológicas específicas, porém os estudos realizados puderam relacionar, nos indivíduos diabéticos, um aumento da hemoglobina glicosilada (HG) não observado em não diabéticos.

De modo lento e gradual, a hemoglobina glicosilada é formada em duas etapas, pela ligação da glicose com o N terminal da cadeia β da hemoglobina, por meio de uma reação não enzimática. Essa ligação é contínua e irreversível, refletindo as concentrações médias da glicose nos dois a três meses que precedem o exame. A dosagem da HG proporciona monitoramento a longo prazo da glicose no sangue, visto que suas breves alterações não influenciam a taxa.

A análise da HG se dá por cromatografia, técnica que permite a separação da fração mais rápida (HG) da hemoglobina total (HT).

1.4.1.5 Glicose urinária

A glicosúria, ou seja, presença de glicose na urina, geralmente ocorre quando a glicose sanguínea alcança valores em torno de 180 mg/dL. Porém, disfunções na taxa de filtração glomerular, na taxa de reabsorção tubular e no fluxo urinário também podem influenciar o seu aparecimento. Outras situações, como infecções, queimaduras, doenças neurológicas e uso de esteroides orais, também podem provocar glicosúria. Quando são analisadas amostras isoladas de urina, a presença de glicose não está necessariamente relacionada com os níveis de glicose sanguínea, pois eles refletem momentos diferentes. Dessa forma, é indicado utilizar a urina coletada num período de 24 horas.

1.4.1.6 Frutose

A frutose é a maior fonte de energia para os espermatozoides, e o principal elemento da sua motilidade. A frutose é produzida nas vesículas e ampolas seminais a partir da glicose, através da via fosforilativa.

A dosagem de frutose é realizada por meio do método de Seliwanoff, no qual pentoses e hexoses reagem com o resorcinol em pH ácido e temperatura elevada, originando um composto de coloração vermelha cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de frutose.

1.4.2 Análise de componentes lipídicos

O perfil lipídico alterado encontra-se entre as causas de doença arterial coronariana (DARC). Com isso, o estudo e a dosagem dos lipídios plasmáticos ganharam inestimável interesse clínico. Cerca de 80% dos casos podem ser diagnosticados por uma simples interpretação dos níveis de colesterol total, colesterol HDL e de triglicérides, associada à avaliação do aspecto do soro após refrigeração, o que permite evidenciar opalescência ou a presença de quilomícrons. Um colesterol total elevado somado a um valor de colesterol HDL baixo constitui um fator de risco independente para o desenvolvimento de DARC.

É importante salientar que, para avaliar e acompanhar corretamente o perfil lipídico, a qualidade da amostra é fundamental. A amostra deve ser coletada mediante confirmação do jejum de 12 a 14 horas. No dia anterior ao da cole-

ta, o indivíduo deve alimentar-se normalmente, evitando o consumo de álcool e os exercícios físicos. Deve ser evitada também a coleta em pessoas enfermas, durante a fase aguda e nas três semanas posteriores à recuperação. Deve-se avaliar sempre o uso de medicamentos.

1.4.2.1 Colesterol total

O colesterol total compreende todo o colesterol encontrado em várias lipoproteínas: cerca de 60% a 70% transportados pela LDL-lipoproteína; 20% a 35% pela HDL-lipoproteína; e 5% a 12% pela VLDL-lipoproteína. Um colesterol alto, maior ou igual a 240 mg/dL em adultos acima de 20 anos, ou maior ou igual a 200 mg/dL em crianças e adolescentes (de 2 a 19 anos) eleva o risco para DARC. Recomenda-se uma dieta estável nas três semanas que antecedem a coleta. A postura anterior ao teste também pode ser significativa (após 20 minutos em repouso, os valores podem ficar de 10% a 15% mais baixos).

Quadro 1.10. Possíveis causas de alteração do teor de colesterol total.

Níveis aumentados	Níveis diminuídos
<ul style="list-style-type: none"> • hipercolesterolemia primária, por fatores alimentares ou ambientais • hipercolesterolemia secundária: pancreatite, hepatopatia obstrutiva, síndrome nefrótica • alguns casos de <i>diabetes mellitus</i> • hipotireoidismo • cirrose biliar primária • gravidez 	<ul style="list-style-type: none"> • abetalipoproteinemia • hipertireoidismo • alguns casos de carcinoma, anemia sideroblástica e talassemia • má absorção • má nutrição • leucemia mielocítica crônica • metaplasia mieloide • mieloma • policitemia vera

Atualmente, a determinação dos níveis de colesterol total é realizada por meio de métodos enzimáticos colorimétricos, e, dependendo dos reagentes utilizados, os valores de referência variam. Os valores de referência atualmente

considerados, que têm pequenas variações relacionadas à faixa etária, são apresentados no quadro 1.11.

Quadro 1.11. Valores de referência utilizados atualmente para o colesterol total.

Colesterol	Resultado
< 200 mg/dL	desejável
200 a 239 mg/dL	limítrofe
³ 240 mg/dL	aumentado

1.4.2.2 Colesterol HDL (C-HDL)

A fração HDL (do inglês *high density lipoprotein*) do colesterol tem relação inversa com o risco de doença coronariana: para cada 1 mg/dL de HDL reduzido, o risco para DARC se eleva de 2% a 3%. Isso ocorre porque a fração HDL está envolvida no chamado transporte reverso do colesterol a ser metabolizado no fígado, onde ocorre a sua maior excreção.

Valores de C-HDL dependem de sexo e idade, e tendem a diminuir temporariamente após infarto agudo do miocárdio. Em doenças da tireoide, os valores do C-HDL não devem ser usados como estimativa de risco de DARC, pois no hipotireoidismo ocorre o aumento dos seus níveis e no hipertireoidismo, a diminuição. A terapia de reposição hormonal em mulheres na menopausa aumenta seus índices, reduzindo o risco de DARC. Preconiza-se uma dieta estável nas três semanas que antecedem a coleta. A variação individual para o HDL é de 3,6% a 12,4%.

Quadro 1.12. Valores de colesterol HDL em humanos.

Sexo	Desejável	Médio risco	Alto risco
Masculino	> 55 mg/dL	35 a 55 mg/dL	< 35 mg/dL
Feminino	> 65 mg/dL	45 a 65 mg/dL	< 45 mg/dL

1.4.2.3 Colesterol LDL (C-LDL) e colesterol VLDL (C-VLDL)

A lipoproteína de baixa densidade LDL (do inglês *low density lipoprotein*) é a maior transportadora de colesterol no plasma. Seus valores estão associados diretamente ao risco de desenvolver DARC. Vários estudos mostram que o risco de DARC tem maior correlação com os altos níveis de LDL do que com o colesterol total. Sua dosagem tem servido como fator determinante para o início de terapias e dietas. Indivíduos com níveis elevados de LDL (≥ 160 mg/dL) possuem alto risco de desenvolver doença coronariana e devem ser tratados para reduzir os níveis de colesterol. Indivíduos com níveis entre 130 mg/dL e 159 mg/dL (*borderline*) devem ser tratados caso possuam outros dois fatores de risco para DARC.

A lipoproteína de muito baixa densidade VLDL (do inglês *very low density lipoprotein*) transporta triglicerídeos e colesterol sintetizados no fígado, derivados provavelmente de precursores da dieta, como ácidos graxos livres, glicerol e carboidratos.

A determinação dos níveis de LDL e VLDL pode ser realizada por cálculo, de acordo com o procedimento-padrão da fórmula de Friedewald. Essa fórmula depende da exatidão de três dosagens diferentes (colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos) e não pode ser usada quando os níveis de triglicerídeos estiverem acima de 400 mg/dL, ou na presença de quilomícrons.

Atualmente, novas técnicas, envolvendo antissoros policlonais em partículas de látex com afinidade para lipoproteínas específicas humanas, possibilitam a dosagem, mesmo com níveis de triglicerídeos acima de 400 mg/dL, pois removem HDL e VLDL da amostra.

O quadro 1.13 traz a relação entre os níveis de colesterol e suas frações com o risco de doença coronariana.

Quadro 1.13. Relação entre os níveis de colesterol e o risco de doença coronariana.

Analito	Valor desejável	Risco moderado	Alto risco
Colesterol total	< 200 mg/dL	200 a 239 mg/dL	≥ 240 mg/dL
LDL	< 130 mg/dL	130 a 159 mg/dL	≥ 160 mg/dL
HDL (homens)	> 55 mg/dL	35 a 55 mg/dL	< 35 mg/dL
HDL (mulheres)	> 65 mg/dL	45 a 65 mg/dL	< 45 mg/dL
VLDL	< 30 mg/dL	30 a 40 mg/dL	> 40 mg/dL
Triglicérides	< 150 mg/dL	150 a 200 mg/dL	> 200 mg/dL

1.4.2.4 Índices de Castelli (I e II)

Alguns autores usam correlações entre o colesterol sérico total, o HDL e o LDL como uma maneira de visualizar a influência combinada de importantes fatores de risco de doença coronariana. O índice de Castelli I é a razão entre o colesterol total e o HDL e o índice de Castelli II é a razão entre o LDL e o HDL.

$$\text{Índice de Castelli I} = [\text{colesterol total}] / [\text{C-HDL}]$$

$$\text{Índice de Castelli II} = [\text{C-LDL}] / [\text{C-HDL}]$$

1.4.2.5 Triglicérides

O aumento de triglicérides é indicativo de distúrbios no metabolismo e, quando associado ao aumento do colesterol total, é fator de risco para DARC. A taxa de triglicérides sofre aumento em seus valores no *diabetes mellitus*, na síndrome nefrótica, na pancreatite, em doenças coronarianas e na arteriosclerose. Valores acima de 2.000 mg/dL aumentam o risco de pancreatite aguda. Alguns medicamentos, como a prednisona, podem elevar os níveis séricos dos triglicérides. É necessário jejum de 12 a 14 horas para realizar a dosagem de triglicérides, além de dieta estável durante as três semanas que

antecedem a coleta e abstenção de álcool por três dias. Se possível e apenas com orientação médica, suspender drogas que possam afetar as concentrações de triglicerídeos no sangue.

Os níveis de triglicerídeos podem estar diminuídos por interferência de substâncias com o glucagon e a heparina endovenosa. Ocorre aumento dos níveis de triglicerídeos pela interferência bacteriana, tabagismo, consumo de álcool e administração de estrógenos. Outras causas de aumento da concentração de triglicerídeos são cirrose hepática, *diabetes mellitus*, síndrome nefrótica e hiperlipidemia essencial.

1.4.3 Análise de componentes nitrogenados

1.4.3.1 Ácido úrico

O ácido úrico é o produto final do catabolismo das purinas. Seus níveis séricos estão diretamente relacionados com a velocidade de sua formação e são inversamente proporcionais à capacidade e à velocidade de sua excreção. Outros fatores, como predisposição genética, sexo, idade, peso corporal, ingestão de álcool, raça, diabetes, dislipidemia, dieta e uso de medicamentos, também exercem influência sobre os seus níveis séricos. Tanto a hiperuricemia – aumento dos níveis séricos de ácido úrico – quanto a hipouricemia – redução dos níveis séricos de ácido úrico – podem ser provocadas por diversas causas, relacionadas no quadro 1.14.

É excretado por via urinária e, por ser o produto final do metabolismo dos compostos purínicos derivados de nucleoproteínas exógenas e endógenas, sua excreção está relacionada com a ingestão e o catabolismo das nucleoproteínas. O ácido úrico urinário é analisado a partir de uma amostra de urina coletada num período de 24 horas e, por sofrer influência de diversas drogas – como aspirina, warfarina, vitamina C e diuréticos –, o uso de qualquer medicação deve ser informado ao entregar a amostra para análise. A hiperuricosúria (aumento dos níveis de ácido úrico na urina) pode ser causada por gota aguda, anemias hemolíticas, leucemias, defeito tubular renal, dieta rica em purinas,

uso de diuréticos e drogas uricosúricas, tratamento com quimioterápicos e radioterápicos. Já a hipouricosúria (redução do ácido úrico urinário) é observada na gota crônica e em indivíduos com uma dieta pobre em purinas.

Quadro 1.14. Causas de aumento ou diminuição dos níveis séricos de ácido úrico.

Hiperuricemia	Hipouricemia
<ul style="list-style-type: none"> ● aumento da produção: alterações enzimáticas – por exemplo, deficiência de glicose-6-fosfato. ● aumento do metabolismo das nucleoproteínas: leucemias, anemias hemolíticas, policitemia, anemia perniciosa, quimioterapia, neoplasias, psoríase, mononucleose infecciosa. ● diminuição da velocidade de excreção: alterações da função renal, jejum prolongado, intoxicação por chumbo, hiperparatireoidismo, hipercalcemia, dieta/perda de peso, exercício muscular intenso, acidose láctica, drogas (efeitos hiper ou hipourícos, dependendo da dose), tiazídicos, furosemida e salicilatos. 	<ul style="list-style-type: none"> ● aumento da velocidade de excreção: defeito da reabsorção tubular, carcinoma de pulmão, leucemia mieloide aguda. ● aumento da secreção tubular: hiperparatireoidismo, hipervolemia. ● drogas (efeitos hiper ou hipourícos, dependendo da dose): aspirina, fenilbutazona, probenecida, salicilatos, tiazídicos e warfarina . ● diminuição da produção: dieta pobre em purinas, deficiência de adenosina desaminase, porfiria intermitente aguda, inibidores da xantina oxidase, alopurinol e síndrome paraneoplásica (adenocarcinoma metastático de pulmão).

1.4.3.2 Creatinina

A creatinina é um produto metabólico formado pela descarboxilação da creatina-fosfato no músculo. Assim, possui relação direta com a massa muscular. Homens e atletas produzem maiores quantidades de creatinina do que crianças,

idosos e mulheres. Deve-se considerar a perda de massa muscular no idoso na interpretação dos resultados. Geralmente, a creatinina não é afetada pela dieta, porém, se houver aumento excessivo na ingestão de carnes, os seus níveis séricos poderão sofrer aumento por um período de 48 horas. A redução do fluxo sanguíneo renal promove a elevação da creatinina, porém de forma mais lenta do que a ureia. De modo geral, a concentração de creatinina só começa a se elevar quando a velocidade de filtração glomerular é menor do que 75 mL/min.

Os níveis séricos da creatinina encontram-se aumentados em casos de insuficiência cardíaca congestiva, choque, desidratação, glomerulopatias, obstrução do trato urinário, intoxicação por metanol, uso de metildopa, trimetoprim, hidantoína, cefalosporinas e vitamina C. Baixas concentrações séricas são observadas nos casos de desnutrição, diminuição da massa muscular, doença hepática severa e processo gestacional.

A creatinina é livremente filtrada pelos glomérulos e excretada constantemente. A determinação da creatinina urinária (mg/kg em 24 horas) é um parâmetro indicativo do volume correto da urina colhida durante um dia inteiro. A secreção tubular da creatinina pode ser inibida por drogas, como cimetidina, trimetoprim e probenecida. A creatinina urinária é avaliada laboratorialmente em conjunto com a determinação da creatinina sérica, e o resultado dessa avaliação é importante nos casos de insuficiência renal aguda ou crônica.

Exercícios severos e ingestão de altas quantidades de carne podem provocar aumentos significativos na excreção de creatinina; já a diminuição da massa muscular nos idosos provoca a diminuição na excreção.

- **Clearance de creatinina**

É o índice de depuração renal de creatinina que avalia o nível de filtração glomerular. Quando comparado à avaliação dos níveis séricos de ureia e creatinina isolados, esse índice possibilita um diagnóstico mais precoce de alteração da função renal. As provas de depuração exigem um controle rígido dos tempos e da coleta de urina, sem perda do volume urinário. São tecnicamente rigorosas, exigindo dosagens simultâneas da creatinina no soro e na urina, e a correção da superfície corporal do paciente pela superfície corporal-padrão.

A velocidade de filtração glomerular encontra-se elevada durante a gravidez; do mesmo modo, exercícios físicos também podem elevar o *clearance* de creatinina. Além disso, drogas como trimetoprim, cimetidina e probenecida interferem na excreção desse analito.

Para o *clearance*, o método mais utilizado é o método de Jaffé, baseado na reação entre a creatinina presente na amostra e o picrato alcalino. O produto formado, o ácido picrâmico, possui coloração alaranjada, medida fotometricamente.

1.4.3.3 Ureia

A ureia é o metabólito quantitativamente mais importante do catabolismo proteico e da desaminação dos aminoácidos – ciclo da ornitina, que libera NH_2 -amoniaco. É a principal fonte de excreção do nitrogênio nos seres humanos e compreende de 80% a 90% do nitrogênio urinário total excretado. Produzida no fígado, passa para a circulação sanguínea, onde é degradada e eliminada pelo suor, pelo trato gastrointestinal e pelo rim. É filtrada livremente pelos glomérulos e, dependendo do estado de hidratação do indivíduo, entre 40% a 80% de seu volume sofrem reabsorção tubular. Sua concentração varia em indivíduos sadios, sendo influenciada por diversos fatores, como grau de hidratação, dieta proteica e função renal. É utilizada para avaliar o estado do funcionamento renal e, em conjunto com a creatinina plasmática, sua dosagem auxilia na diferenciação entre a azotemia pré e pós-renal. A designação **azotemia** denomina qualquer aumento significativo na concentração sérica de componentes nitrogenados não proteicos, principalmente ureia e creatinina, e é classificada como pré-renal, renal e pós-renal.

Em comparação com a creatinina, a ureia sofre maior variação com a dieta, eleva-se mais precocemente nos casos de insuficiência renal e não é influenciada pela massa muscular. Glicocorticoides e hormônios tireoidianos (que exercem efeito catabólico proteico) tendem a aumentá-la, ao passo que androgênios e hormônio de crescimento, por causa de seus efeitos anabólicos, diminuem sua formação.

Algumas condições em que a ureia pode estar aumentada ou diminuída no organismo encontram-se listadas no quadro 1.15.

Quadro 1.15. Causas de aumento ou diminuição dos níveis de ureia no organismo.

Níveis aumentados	Níveis diminuídos
<ul style="list-style-type: none"> • pré-renal: redução da circulação renal, desidratação, redução do volume sanguíneo (hemorragias digestivas), catabolismo proteico aumentado (febre, estresse), insuficiência cardíaca. • renal: diminuição da filtração glomerular causada por doença renal aguda ou crônica, nefropatias, tratamento com glicocorticoides (efeito antianabólico). • pós-renal: obstrução do trato urinário (cálculo, obstrução prostática). 	<ul style="list-style-type: none"> • ingesta proteica diminuída • insuficiência hepática aguda • gravidez • diluição sanguínea • infância

A dosagem de ureia urinária é utilizada na avaliação dos compostos urinários nitrogenados não proteicos e na medida da taxa de produção de ureia. Como a sua produção depende de inúmeras variáveis não renais, como dieta e síntese hepática, o *clearance* de ureia tem pouca utilidade como medida da taxa de filtração glomerular, pois pode subestimá-la. A ureia urinária encontra-se aumentada quando ocorre aumento do catabolismo proteico, nas dietas hiperproteicas e no hipertireoidismo. Seus níveis encontram-se diminuídos nos casos de dietas pobres em proteínas, na insuficiência hepática, na insuficiência renal, na gravidez e na obstrução do trato urinário.

Um dos métodos utilizados para a análise da concentração de ureia é o método da diacetilmonoxima. Nele, ocorre a reação da ureia com a diacetilmonoxima, na presença de tiossemicarbazida, em meio ácido, para formar um produto colorido, que pode ser medido fotometricamente e é proporcional à concentração de ureia.

Um método enzimático também utilizado para esse fim é o método da urease. Nele, a ureia sofre a ação da enzima urease e converte-se em dióxido de carbono e amônia. Essa reage com o fenol e o hipoclorito alcalino, sob a ação catalítica do

nitroprussiato, para formar o azul de indofenol. A intensidade da coloração formada é proporcional à concentração de ureia e pode ser medida fotometricamente.

1.4.3.4 Mucoproteínas

A mucoproteína é uma glicoproteína típica das secreções mucosas, com conteúdo superior a 4% de hexosamina. Denominada inicialmente seromucoide, após estudos realizados por Winzler e colaboradores (Winzler et al., 1948) passou a ser também conhecida como mucoproteína, baseando-se em sua capacidade de permanecer em solução de ácido perclórico 0,6 M, enquanto outras glicoproteínas precipitam. Seus níveis estão consideravelmente aumentados nos processos inflamatórios agudos e ela é um importante índice da atividade reumática, pois se mantém elevada quando outras provas já se normalizaram. Níveis reduzidos são observados em casos de insuficiência hepática – hepatite aguda, cirrose –, insuficiência da suprarrenal e insuficiência hipofisária.

Para a análise de mucoproteínas, o método mais utilizado é o método de Winzler, que envolve a desproteinização da amostra com ácido perclórico. As mucoproteínas permanecem em solução e são posteriormente precipitadas pela ação do ácido fosfotúngstico, sendo quantificadas com a utilização do reagente de Folin-Ciocalteu.

1.4.3.5 Proteínas totais e frações

As proteínas são compostas por aminoácidos e são sintetizadas no fígado e no sistema reticuloendotelial. São essenciais para a manutenção da pressão osmótica e têm diversas funções no organismo, incluindo ação enzimática, autoimune e hormonal, e fatores de coagulação e de transporte, por meio de suas ligações no sangue com substâncias hormonais ou não hormonais. Sua dosagem é utilizada como parâmetro para avaliar o estado nutricional do indivíduo e a presença de doenças sistêmicas severas. Seus índices podem estar reduzidos (hipoproteïnemia) em casos de deficiências nutricionais, infecções graves e prolongadas, defeito de síntese (insuficiência hepatocelular), anemias graves e perdas cutâneas (queimaduras).

Na urina, normalmente não são detectadas proteínas ou são detectadas em baixas quantidades (até 150 mg em 24 horas). São principalmente proteínas

séricas de baixo peso molecular, filtradas de forma seletiva pelos glomérulos (por exemplo, albumina). Somente as proteínas de baixo peso molecular são pequenas o suficiente para atravessar a membrana e alcançar o filtrado glomerular, sendo grande parte delas reabsorvida pelos túbulos renais.

Por sua predominância sérica, a albumina é a principal fração proteica encontrada na urina normal. Outras proteínas, também de baixo peso molecular, são detectadas em menores quantidades, como algumas frações da globulina. As principais causas patológicas para a proteinúria (presença de albumina na urina) são lesão glomerular, distúrbios da reabsorção tubular e aumento dos níveis séricos de proteínas de baixo peso molecular. Conforme a gravidade, uma lesão glomerular pode ou não levar à perda de seletividade, permitindo a passagem de proteínas de alto peso molecular. Quando a proteinúria é decorrente de defeitos na reabsorção tubular (por exemplo, mieloma múltiplo), as proteínas presentes na urina têm baixo peso molecular.

A velocidade de excreção das proteínas varia em 24 horas. Assim sendo, para uma melhor avaliação, o teste deve ser feito em uma amostra de urina coletada num período de 24 horas. A determinação da proteinúria de 24 horas é útil no diagnóstico e no controle de diversas patologias em que ocorre perda de proteínas, como síndrome nefrótica, intoxicação por metais e lúpus eritematoso sistêmico. Indivíduos com diabetes mellitus correm maior risco de sofrer dano renal e, por esse motivo, o aumento subclínico da excreção da albumina urinária é tido como preditivo de nefropatia diabética. Reações falso positivas ocorrem ocasionalmente por causa do uso de salicilatos, contrastes radiológicos e doses maciças de penicilinas.

Um dos métodos mais utilizados para a dosagem de proteínas é o método do biureto. Nesse método, ocorre a reação entre os compostos com mais de duas ligações peptídicas presentes na amostra com íons de cobre (Cu^{+2}) em meio alcalino, gerando um complexo de cor violeta. A intensidade da cor formada é medida fotometricamente.

- **Albumina**

A dosagem dos níveis de albumina auxilia na avaliação do estado nutricional, da síntese hepática e da perda renal do paciente. Índices abaixo

de 1,5 g/dL são considerados alarmantes; em casos de edema, os níveis séricos da albumina encontram-se entre 2 g/dL e 2,5 g/dL. Com a idade, gradativamente ocorre o decréscimo de seus níveis. O aumento dos seus níveis é registrado nos quadros de desidratação – vômitos e diarreias graves – e em casos de uso excessivo de diuréticos. A redução de seus níveis ocorre nos casos de queimaduras graves, síndrome nefrótica, desnutrição, hepatopatias, neoplasias, estado gestacional, alcoolismo crônico e uso de anticoncepcionais.

Para a análise da albumina, utiliza-se o método do verde de bromocresol, método que envolve uma reação, em meio tamponado, entre a albumina e o reagente verde de bromocresol, gerando um composto de coloração verde, medida fotometricamente.

1.4.3.6 Bilirrubinas séricas

A bilirrubina é proveniente da quebra da hemoglobina. É formada pelo sistema reticuloendotelial e circula no sangue ligada à albumina, sob a forma de fração não conjugada. A fração não conjugada da bilirrubina chega ao fígado e sofre conjugação com o ácido glicurônico, convertendo-se em fração conjugada, a qual é hidrossolúvel e pode ser eliminada pelo rim. A bilirrubina conjugada também é excretada pelos canalículos hepáticos no intestino delgado, onde parte dela é desconjugada, transformada pela flora bacteriana em estercobilinogênio e eliminada pelas fezes. O estercobilinogênio, por sua vez, também pode entrar no ciclo entero-hepático ou ser excretado, como urobilinogênio, pela via renal. Níveis elevados de bilirrubina sérica total, geralmente acima de 2,5 mg/dL, provocam icterícia clínica, que é caracterizada pela cor amarelada da pele e mucosas.

Para determinar a dosagem de bilirrubina total utiliza-se um reagente diazo, o qual produz uma reação colorida que pode ser medida com o auxílio de um espectrofotômetro. A fração conjugada da bilirrubina reage diretamente com o diazo, sendo por isso denominada “bilirrubina direta”. Já a fração não conjugada necessita de um catalisador para auxiliar na reação, por isso é chamada “indireta”.

Nos casos de aumento dos níveis de bilirrubina sérica (hiperbilirrubinemia), a investigação diagnóstica deve considerar qual a fração predominante, se a

conjugada ou a não conjugada. Dentre as possíveis causas para a hiperbilirrubinemia, estão as hepatopatias e as hemoglobinopatias. Em recém-natos, os valores de bilirrubina total variam com o tempo e com o estado de maturidade. Geralmente, ocorre um aumento fisiológico nas primeiras 48 horas de vida, seguido por uma queda desses níveis entre o 3º e o 5º dia de vida. Algumas causas da hiperbilirrubinemia em recém-nascidos estão relacionadas à icterícia fisiológica, deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, reabsorção de hematomas, infecções congênitas (toxoplasmose, sífilis, citomegalovírus, rubéola), anemias hemolíticas e a patologias menos frequentes, como galactosemia e hipotireoidismo congênito. O quadro 1.16 apresenta algumas causas de alteração dos níveis das frações de bilirrubina.

Quadro 1.16. Causas de alteração dos níveis das frações de bilirrubina.

Aumento da bilirrubina conjugada (direta)	Aumento da bilirrubina não conjugada (indireta)
<ul style="list-style-type: none"> ● falha na excreção da bilirrubina conjugada: síndrome de Dubin-Johnson. ● disfunção hepatocelular: hepatite, cirrose hepática, colestase intra-hepática (drogas, cirrose biliar, sepse, pós-operatório), mononucleose, linfomas. ● obstrução biliar: coledocolitíase, carcinoma (vias biliares, fígado ou pâncreas), verminoses (<i>Ascaris lumbricoides</i>), abscessos, pancreatites, doenças congênitas das vias biliares. 	<ul style="list-style-type: none"> ● alteração no transporte: mecanismo de competição de drogas pelo sítio de ligação da albumina, acidose metabólica, hipoalbuminemia. ● aumento da oferta: reação transfusional, anemia hemolítica (autoimune, hemoglobinopatias, drogas), infecções virais e bacterianas, queimaduras, reabsorção de hematomas, infarto pulmonar. ● redução da captação: contrastes radiológicos, distúrbio transitório após hepatite, imaturidade neonatal, alguns casos de síndrome de Gilbert. ● alteração na conjugação: deficiência total ou parcial da enzima glicuroniltransferase (síndrome de Gilbert), imaturidade neonatal.

1.4.3.7 Enzimas

As reações bioquímicas que ocorrem no corpo humano normalmente são catalisadas pelas enzimas. Neste tópico, serão apresentadas algumas das inúmeras enzimas avaliadas nas análises clínicas e suas aplicações no diagnóstico de diferentes condições patológicas.

- **Amilase**

Hidrolase de origem predominantemente pancreática e da glândula salivar, cuja função é degradar complexos de carboidratos. São conhecidas duas isoenzimas: a pancreática e a salivar, na proporção de 30:70 em soro de indivíduos sadios. As dosagens de amilase sérica e urinária são largamente utilizadas no diagnóstico de doenças do pâncreas e na investigação da função pancreática. A maioria dos pacientes com pancreatite aguda possui níveis séricos que se elevam entre 2 e 12 horas após o início do episódio, atingindo concentrações máximas em 24 horas, que retornam à faixa de normalidade entre 48 e 72 horas. As altas concentrações de amilase sérica não estão diretamente relacionadas à gravidade do envolvimento pancreático, mas indicam grande probabilidade de um quadro clínico de pancreatite aguda. Aumentos da amilase sérica (hiperamilasemia), no entanto, não se devem necessariamente à pancreatite, pois tumores de pulmão e de ovário podem elevar seus níveis em cerca de 50 vezes o intervalo de referência. Ao redor de 25% da amilase sérica é eliminada pela urina, e na insuficiência renal a amilase sérica mantém-se elevada proporcionalmente à extensão do comprometimento do órgão. Aproximadamente 20% dos indivíduos com pancreatite aguda apresentam índices normais de amilase sérica. Em episódios agudos de pancreatite crônica, esses níveis podem estar ligeiramente aumentados, porém frequentemente permanecem normais. A amilase pode ligar-se a proteínas, formando complexos de alto peso molecular (macroamilases). Esse fato é caracterizado por valores de amilase sérica persistentemente elevados sem causa aparente, acompanhados de dosagem urinária normal ou baixa. Deve suspeitar-se de macroamilasemia quando a relação entre o *clearance* de amilase e o

clearance de creatinina é $< 1\%$ (relação normal entre 1% e 4%). No quadro 1.17 estão listadas algumas causas de hiper e hipoamilasemia.

Quadro 1.17. Principais causas de hiperamilasemia e hipoamilasemia.

Hiperamilasemia	Hipoamilasemia
<ul style="list-style-type: none"> • parotidite • pancreatite aguda • macroamilasemia • queimaduras graves • lesão de glândula salivar • doença intra-abdominal (peritonite, apendicite aguda) • intoxicação alcoólica • insuficiência renal grave • câncer de pâncreas • obstrução das vias biliares • obstrução do canal pancreático • neoplasias de pulmão ou ovário 	<ul style="list-style-type: none"> • insuficiência pancreática • fibrose cística avançada • hepatopatias graves

Para a análise de amilase presente em soro ou plasma heparinizado, utiliza-se o método de Caraway modificado. A α -amilase presente na amostra hidrolisa o amido do substrato, gerando a maltose. A solução de iodo utilizada no ensaio reage com o amido que sobrou da reação com a α -amilase. A atividade enzimática é medida de acordo com a intensidade da cor azul formada (complexo iodo-amido).

- **Colinesterase**

A colinesterase é encontrada no organismo sob duas formas: a colinesterase verdadeira – acetilcolinesterase ou colinesterase eritrocitária –, encontrada nas hemácias e nas sinapses do sistema nervoso central, e a pseudocolinesterase – benzoilcolinesterase ou colinesterase plasmática –, encontrada no soro e no fígado. As duas são muito importantes para o diagnóstico da intoxicação por organofosforados, condição na qual se apresentam em níveis reduzidos. Na suspeita de intoxicação crônica, indica-se a dosagem da acetilcolinesterase; na exposição aguda, recomenda-se determinar a taxa de pseudocolinesterase. A terapia pós-intoxicação pode ser acompanhada pela determinação da concentração de acetilcolinesterase, uma vez que níveis reduzidos dessa enzima levam a coma e convulsões. Os níveis de colinesterase também podem estar reduzidos nos casos de anemias, desnutrição, distrofia muscular, doenças hepáticas (hepatite viral, cirrose, congestão hepática e amebíase hepática), doença renal crônica, infarto do miocárdio, infecções agudas e uso de contraceptivos orais, estrogênios e corticoides. Níveis aumentados podem ser observados nos casos de alcoolismo, câncer de mama, síndrome nefrótica e obesidade. Para a dosagem de colinesterase em soro ou plasma, utiliza-se o método de Ellman modificado. Nesse ensaio, ocorre a hidrólise do iodeto de acetiltiocolina, com formação de iodeto de tiocolina e ácido acético. A tiocolina reage com o ácido dinitrobenzoico presente no meio reacional, gerando um composto de coloração amarela, cuja intensidade é medida fotometricamente (avaliação cinética).

- **Creatinoquinase**

A creatinoquinase (CK), também denominada ATP-creatina-N-fosfo-transferase, funciona como importante enzima reguladora da produção e da utilização de fosfatos de alta energia nos tecidos contráteis. A creatinoquinase total é encontrada em altas concentrações na musculatura esquelética e cardíaca e, em menores quantidades, no cérebro, intestino e pulmões. Trata-se de um dímero composto por duas cadeias distintas, denominadas M (muscle = músculo) e B (brain = cérebro), que

podem estar combinadas de três formas, criando as isoenzimas da CK: CK-MM, CK-MB e CK-BB. A CK-MM é encontrada principalmente na musculatura estriada; a CK-BB está presente no cérebro, cólon, íleo, estômago e bexiga; e a CK-MB encontra-se principalmente no miocárdio, mas pode estar presente em menor proporção no músculo estriado esquelético (1% a 4%, sendo o restante CK-MM).

A CK é utilizada para realizar o diagnóstico e o acompanhamento de patologias que envolvem os músculos esqueléticos, como a dermatomiosite e o hipotireoidismo. Sua importância no infarto agudo do miocárdio atualmente é limitada, uma vez que sua elevação ocorre mais lentamente após o início da dor precordial (4 a 6 horas), além de não ser específica para a musculatura cardíaca e de apresentar uma faixa de referência bastante ampla – por exemplo, pode apresentar-se normal em indivíduos sedentários com infarto agudo do miocárdio.

Assim sendo, marcadores cardíacos mais específicos, que se elevam mais precocemente, como CK-MB e as troponinas (I e T), atualmente substituem a CK total nos quadros de infarto agudo do miocárdio. Os níveis de CK podem estar elevados nos casos de infarto do miocárdio, exercício físico recente, miopatias congênitas e adquiridas, acidente vascular cerebral, doenças infecciosas, convulsões generalizadas e neoplasias de próstata, vesícula e trato gastrointestinal. Em casos onde ocorre diminuição da massa muscular, em doenças do tecido conjuntivo e em doença alcoólica do fígado, os níveis de CK se encontram diminuídos.

- **Creatinoquinase fração MB**

A creatinoquinase fração MB (CK-MB) é considerada um dos marcadores bioquímicos para o diagnóstico de lesão miocárdica, sendo a base para a comparação com outros marcadores. Em termos de diagnóstico, apesar de ser específica para lesão do miocárdio, a CK-MB também pode estar elevada em paciente com lesões concomitantes na musculatura esquelética e cardíaca, e isso pode diminuir sua especificidade cardíaca; para aumentar a sua especificidade, no caso da dosagem de CK-MB, pode ser calculado um índice relativo, conforme a equação:

$$\text{Índice de CK-MB} = (\text{CK-MB/CK total}) \times 100.$$

Essa equação permite avaliar, em termos percentuais, se a fração MB está aumentada em relação à CK total. Embora existam variações entre diferentes autores, valores acima de 5% estão associados com provável origem cardíaca para a CK-MB, indicando lesão do miocárdio. Por outra parte, níveis acima de 25% indicam possível interferência na dosagem causada pela presença da CK-BB ou CK, dado que pacientes com infarto agudo do miocárdio raramente têm concentração percentual de CK-MB superior a esse limite. A elevação e a queda características da CK-MB em uma dosagem seriada são quase decisivas para o diagnóstico de infarto do miocárdio. O aumento inicial dos níveis de CK-MB ocorre entre 4 e 6 horas após o início dos sintomas, atingindo níveis máximos depois de 24 horas e retornando ao nível normal entre 48 e 72 horas. Para um diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade, é recomendada a dosagem seriada ao longo de um período de 8 a 12 horas. A CK-MB também é um componente importante para o diagnóstico de um novo episódio de infarto ou para avaliar a extensão da área de infarto.

Apesar de seu excelente desempenho, existem algumas limitações no uso da CK-MB como marcador ideal no infarto agudo do miocárdio, pois em alguns casos sua elevação só ocorre após 8 a 12 horas do início dos sintomas, uma vez que ela é transportada para a circulação estritamente através do sistema linfático. Em comparação com a mioglobina – que atinge a corrente sanguínea mais rapidamente porque não passa pela circulação linfática –, a fração CK-MB compromete a rapidez do diagnóstico de infarto agudo do miocárdio, além de não ser totalmente específica para o miocárdio. Para essa análise, utiliza-se o método de Rosalki.

- **Desidrogenase láctica (lactato desidrogenase)**

A lactato desidrogenase (LDH), uma enzima tetramérica, pertence a uma classe de enzimas que catalisam reações de oxirredução amplamente distribuídas em todos os tecidos humanos. Dependendo da

sua origem, a LDH apresenta pequenas diferenças. Os mamíferos possuem basicamente duas cadeias proteicas que compõem a LDH. Essas cadeias, quando combinadas, formam as isoenzimas LDH₁, LDH₂, LDH₃, LDH₄ e LDH₅, separáveis eletroforéticamente. A LDH localiza-se no citoplasma e seu aumento sérico ocorre após lise celular. As isoenzimas da LDH existem em diferentes proporções nos vários tecidos: no músculo cardíaco, rim e eritrócitos, predominam a LDH₁ e a LDH₂; as isoenzimas LDH₄ e a LDH₅ são as formas dominantes no fígado e no músculo esquelético. Como as concentrações da LDH dentro das células são cerca de quinhentas vezes maiores do que no soro, qualquer aumento na atividade da LDH no sangue sugere lesão tissular, e a fração isoenzimática predominante identifica o órgão de origem.

Após um infarto agudo do miocárdio, as atividades séricas da CK e da CK-MB elevam-se antes do aumento da LDH. Presente no miocárdio, a LDH₁ frequentemente acompanha a atividade da LDH total, elevando-se entre 8 e 12 horas após o início da dor precordial e atingindo seus níveis máximos em 24 a 72 horas. Como a LDH e suas isoenzimas estão presentes em todos os tecidos, é necessário realizar, na suspeita de infarto agudo do miocárdio, o diagnóstico diferencial com outras patologias ocasionadas por injúria tecidual, como infarto renal agudo, infarto mesentérico, neoplasia, hemólise aguda, hipotireoidismo, pancreatite e pneumonia.

Para a análise de LDH em soro ou plasma, utiliza-se o método de Wroblewski e colaboradores modificado. Nesse teste, a LDH converte reversivelmente o piruvato em lactato, com oxidação simultânea do NADH para NAD⁺. A diminuição da concentração de NADH é proporcional à atividade de LDH.

- **Fosfatase ácida total**

Enzima presente em tecidos, como ossos, próstata e baço, e nas células sanguíneas (hemácias, plaquetas e leucócitos). Sua elevação ocorre em processos de destruição plaquetária, doenças hemolíticas, doença de

Paget, metástase óssea, mieloma múltiplo e no câncer de próstata. Em indivíduos do sexo masculino, a fração prostática representa aproximadamente 50% da fosfatase ácida total, sendo o restante proveniente do fígado e da desintegração das plaquetas e eritrócitos.

- **Fosfatase ácida prostática**

Enzima que auxilia no diagnóstico e no monitoramento da terapia do carcinoma prostático, mas não substitui o antígeno prostático (PSA), uma vez que seus níveis podem se manter normais nos quadros iniciais da doença. Além do adenocarcinoma de próstata, pode estar elevada na leucemia mielocítica, na prostatite e na retenção urinária. Da mesma forma que o PSA, seus resultados sofrem interferência da manipulação prostática, como no toque de próstata e na ultrassonografia de próstata. Um dos métodos utilizados para a análise de fosfatase ácida em soro é o método de Bessey-Lowry modificado. Nesse método, a fosfatase ácida hidrolisa o p-nitrofenilfosfato em pH ácido (4,8), formando p-nitrofenol e fosfato. Em meio alcalino, o p-nitrofenol encontra-se sob a forma ionizada, apresentando coloração amarela que pode ser medida fotometricamente.

- **Fosfatase alcalina**

Enzima presente em muitos tecidos, principalmente no epitélio intestinal, túbulo renal, osteoblastos, fígado e placenta. No soro de adultos normais, a forma predominante origina-se principalmente no fígado e no esqueleto, e depende acentuadamente da idade. Sua função no metabolismo, que ainda não está bem compreendida, parece estar associada ao transporte lipídico no intestino e a processos de calcificação óssea. Sua dosagem é importante na investigação de doenças hepatobiliares e ósseas associadas à hiperatividade osteoblástica. A fosfatase alcalina tem seus níveis aumentados nos casos de doenças hepáticas e do trato biliar, na doença de Paget e nas metástases ósseas e de fígado (funciona como marcador tumoral). Em processos de crescimento ósseo fisiológico, também ocorrem aumentos nos níveis séricos da enzima: mulheres

no terceiro trimestre de gravidez podem apresentar níveis até três vezes acima do normal em decorrência da fração placentária adicional, dado que a atividade osteoblástica é elevada no feto. Os níveis de fosfatase alcalina podem estar diminuídos em casos de hipotireoidismo e durante o uso de estrogênios simples e conjugados com androgênio.

Para a dosagem de fosfatase alcalina em soro, o método mais utilizado é o Bessey-Lowry modificado. Nesse método, ocorre a reação da fosfatase alcalina com o p-nitrofenilfosfato, que é hidrolisado a p-nitrofenol e ácido fosfórico. Em meio alcalino, o p-nitrofenol encontra-se sob a forma ionizada, apresentando coloração amarela que pode ser medida fotometricamente.

- **Lípase**

A lípase é uma enzima que hidrolisa triglicerídeos, formando monoglicerídeos, e atua retirando a molécula de glicerol e liberando ácidos graxos livres. É produzida predominantemente no pâncreas exógeno, sendo um marcador de pancreatite. Na doença pancreática, a elevação de seus níveis séricos nem sempre coincide com a da amilase, e, frequentemente, ela permanece elevada por um período mais longo. Enquanto a amilase tende a aumentar os seus níveis mais precocemente na pancreatite aguda, a lípase eleva-se nas primeiras 12 horas após o início do episódio, mantendo os seus níveis aumentados por sete a dez dias.

Ao contrário da amilase, não existe interferência da lípase nos casos de parotidites agudas, uma vez que ela não está presente nas glândulas parótidas. E o aumento de seus níveis, quando comparado ao aumento da amilase, é menos pronunciado na doença renal crônica e aguda.

Para a dosagem de lípase em soro, que deve ser sem hemólise e não icterício, o método mais utilizado é o de Vogel e Zieve modificado. Nesse método, a lípase presente na amostra catalisa a hidrólise dos ésteres presentes no óleo de oliva tamponado. São realizadas duas leituras de absorbância, e a diferença entre essas leituras representa a atividade enzimática da lípase.

- **Gama-glutamyltransferase (GGT/gGT)**

Enzima originada particularmente do sistema hepatobiliar e que possui a função de transferir o ácido glutâmico através das membranas celulares. Seus níveis encontram-se elevados especialmente nas colestases intra ou extra-hepáticas e também em casos de hepatoma, carcinoma de cabeça de pâncreas, carcinoma metastático de fígado, doença crônica alcoólica, cirrose, hepatite, hipertireoidismo e lúpus eritematoso sistêmico. No hipotireoidismo, os níveis da enzima encontram-se reduzidos.

O uso de álcool, agudo ou crônico, também pode ser verificado pela dosagem dessa enzima hepática, pois seus níveis séricos tornam-se pelo menos duas vezes mais elevados que o seu valor de referência após a ingestão. A liberação da GGT no soro reflete o efeito tóxico do álcool e de drogas como fenitoína, fenobarbital e ácido valproico sobre a estrutura microssomal dos hepatócitos.

Para a análise de GGT em soro e plasma, o método utilizado é o método de Szasz modificado. Esse método envolve a reação entre o substrato γ -glutamyl-p-nitroanilina e a enzima GGT presente na amostra analisada. A enzima transfere o radical glutamyl para a glicilglicina presente no meio reacional, liberando a p-nitroanilina, que é responsável pela formação de coloração amarela, medida fotometricamente.

- **Transaminases (aminotransferases)**

A atividade enzimática é um indicador comumente utilizado para avaliar possível dano hepatocelular. Duas das enzimas que podem ser utilizadas para esse fim são a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST).

A ALT, também chamada transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), está presente em grandes quantidades no fígado e no rim, e em pequenas quantidades na musculatura esquelética e no coração. Na avaliação da função hepática, a ALT é mais sensível para a detecção de danos do hepatócito do que para quadros de obstrução biliar e, por esse motivo, é considerada um excelente marcador hepatocelular.

A AST, ou transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), é encontrada no miocárdio, fígado, musculatura esquelética, rim e cérebro. A dosagem dessa enzima auxilia no diagnóstico de doenças cardíacas, hepáticas e musculares.

Cerca de 80% da AST dos hepatócitos é mitocondrial. Já a ALT é citoplasmática. Essa diferença é muito importante e auxilia no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas. Nos danos hepatocelulares graves, ocorre aumento da AST, ao passo que, nos casos onde as lesões hepáticas são leves, a forma predominante no soro é a citoplasmática, ou seja, ocorre elevação da ALT. A relação AST/ALT (índice de DeRittis) geralmente é menor que 1 em indivíduos com danos hepatocelulares agudos e é alta em casos graves.

A ALT encontra-se elevada na hepatite infecciosa e tóxica, doença pancreática, mononucleose, cirrose, icterícia obstrutiva e carcinoma metastático. Pacientes com infarto do miocárdio apresentam níveis de ALT geralmente normais ou levemente elevados.

Os níveis de AST elevam-se nas primeiras 12 horas após um infarto do miocárdio, atingindo seus valores máximos em 24 horas e normalizam-se após cerca de cinco dias. Ocorre também seu aumento significativo na necrose hepática, pancreatite aguda, anemias hemolíticas, hepatites, cirrose hepática, icterícia obstrutiva, hipotireoidismo, trauma e infarto cerebral, queimaduras severas e lesões da musculatura esquelética. Podem ocorrer pequenas elevações durante a gravidez. Drogas como a isoniazida, a eritromicina, a progesterona e os esteroides anabólicos podem elevar seus níveis; por isso, essa enzima é útil no monitoramento de terapias com substâncias hepatotóxicas.

Para a análise de AST em soro e plasma, utiliza-se o método de Reitman-Frankel modificado para AST. Nesse método, a enzima AST transfere o grupo amino da molécula de aspartato para o α -cetoglutarato, formando glutamato e oxalacetato. Esse último reage com a 2,4-dinitrofenil-hidrazina, presente no meio reacional, para formar a hidrazona correspondente, que em meio alcalino apresenta coloração diretamente proporcional à atividade enzimática e que pode ser medida fotometricamente.

Uma variação desse método também é utilizada para a análise de ALT. Nela, a enzima ALT transfere o grupo amino da molécula de alanina para o α -cetoglutarato, formando glutamato e piruvato. Esse último reage com a 2,4-dinitrofenil-hidrazina presente no meio reacional para formar a hidrazona correspondente, que, em meio alcalino, apresenta coloração que pode ser medida fotometricamente e é diretamente proporcional à atividade enzimática.

1.4.4 Eletrólitos

1.4.4.1 Cálcio

O cálcio é o quinto componente mineral mais abundante no organismo e é encontrado principalmente nos ossos (98%), nos dentes e nas cartilagens. Atua de forma importante na contração e relaxamento do miocárdio, no processo de ossificação, na coagulação sanguínea, na condução neuromuscular, na manutenção da integridade da membrana celular, no mecanismo de ação de alguns hormônios e na ativação de algumas enzimas.

No trato gastrointestinal, o cálcio sofre a ação do suco gástrico, sendo absorvido em seguida no duodeno e no íleo. Essa absorção ocorre por um processo ativo, mediado por proteínas intestinais específicas, cujos níveis aumentam pela ação da vitamina D₃, do paratormônio (PTH) e de esteroides sexuais, e diminuem pela ação de corticoides e algumas drogas anticonvulsivantes. O PTH atua na mobilização de cálcio e fósforo do osso, aumentando a reabsorção tubular de cálcio e a eliminação do fosfato pela urina. A calcitonina inibe a reabsorção óssea e tubular de cálcio, e a vitamina D aumenta a mineralização do tecido ósseo. Os glicocorticoides e os hormônios tireoidianos reabsorvem cálcio e fósforo do osso; já o hormônio de crescimento aumenta a massa óssea, com a manutenção de cálcio e fósforo na matriz óssea. O cálcio sanguíneo pode estar ionizado sob forma ativa (50%), associado à albumina e globulina (45%), ou formando complexos com citrato, fosfato e bicarbonato (5%).

Níveis elevados de cálcio (hipercalcemia) provocam lesões no rim e litíase renal, distúrbios neurológicos e neuromusculares. A hipocalcemia (níveis redu-

zidos de cálcio) provoca hiperexcitabilidade neuromuscular, com espasmos e contraturas musculares. A análise dos níveis de cálcio sérico é um teste bioquímico de triagem muito comum e confiável para diagnosticar o hiperparatireoidismo primário ou secundário. No quadro 1.18 encontram-se listadas algumas possíveis causas de hipercalcemia e hipocalcemia.

Quadro 1.18. Causas de aumento e redução dos níveis de cálcio sanguíneo.

Hipercalcemia	Hipocalcemia
<ul style="list-style-type: none"> • hiperparatireoidismo • hipervitaminose D • doença de Paget • doenças malignas com comprometimento ósseo • carcinoma de mama, gástrico ou de pulmão • nefropatias 	<ul style="list-style-type: none"> • hipoparatiroidismo • deficiência de vitamina D • acidose crônica • esteatorreias • má absorção intestinal • uremias

Outra análise que reflete a absorção intestinal, a reabsorção óssea e a perda renal de cálcio é a **dosagem de cálcio urinário**. Essa dosagem auxilia no acompanhamento das terapias de reposição, nas doenças ósseas, na avaliação do metabolismo do cálcio, na nefrolitíase, nas hipercalcúrias idiopáticas e nas doenças da paratireoide. Na determinação desses valores, deve-se considerar a ingestão de cálcio nos dias que antecedem a coleta de urina. Para a realização dessa análise, o indivíduo deve realizar uma dieta pobre em cálcio, evitando leite e derivados nos quatro a sete dias que antecedem a coleta, ou conforme solicitação médica.

Para a análise de cálcio em soro ou urina (coletada num período de 24 horas), utiliza-se o método de Bachra modificado. Esse método envolve a titulação direta do cálcio pelo EDTA, em meio alcalino, com o ácido calconcarboxílico como indicador. O magnésio interfere no método, porém o pH

12 do meio reacional minimiza essa interferência. Outro método utilizado é o método compleximétrico, no qual o cálcio reage com a cresolftaleína complexona em meio alcalino, formando um complexo colorido que é determinado fotometricamente.

1.4.4.2 Cloro (íons cloreto)

O cloreto (Cl) é o principal ânion extracelular e, juntamente com o sódio, representa a maioria dos constituintes osmoticamente ativos do plasma. Está envolvido no balanço hidroeletrolítico e na manutenção da pressão osmótica. A maior parte do cloreto ingerido é absorvida; seu excesso é excretado na urina. Os níveis de cloreto, portanto, sofrem alterações nos distúrbios ácido-básicos e nos hidroeletrolíticos. O quadro 1.19 relaciona algumas causas de aumento e redução dos níveis de cloreto no sangue.

Quadro 1.19. Causas de aumento e diminuição dos níveis de cloreto no sangue.

Níveis aumentados	Níveis diminuídos
<ul style="list-style-type: none"> • insuficiência renal aguda • acidose metabólica por perda de bicarbonato • acidose tubular renal • alcalose respiratória • intoxicação por salicilato • desidratação 	<ul style="list-style-type: none"> • vômito prolongado (perda de secreção gástrica) • alcalose metabólica • nefrite com perda de sal • acidose respiratória • doença de Addison • hipersudorese

Para a análise de cloreto em sangue e em urina coletada num período de 24 horas, utiliza-se o método de Schales e o método de Schales modificado. Nesses métodos, ocorre a reação dos íons cloreto com os íons mercúrio, formando o cloreto de mercúrio, não dissociado e solúvel. Os íons mercúrio

em excesso se combinam com a difenilcarbazona presente no meio reacional, gerando um complexo de coloração azul-violeta. Também é utilizado o método colorimétrico, no qual os íons cloreto ligam-se ao mercúrio do reagente cloroanilato de mercúrio, formando o cloreto de mercúrio, que é solúvel, mas não ionizável. Ocorre também a liberação de ácido cloroamílico, que possui coloração vermelha e pode ser medido fotometricamente.

1.4.4.3 Ferro

A dosagem do ferro sérico é fundamental para o diagnóstico das anemias ferroprivas (hipocrômicas e microcíticas), nas quais há deficiência desse analito. A avaliação dos níveis séricos de ferro também é importante nas alterações hematológicas em que ocorre o excesso desse analito, como é o caso da hemocromatose e da hemossiderose.

Sua determinação pode ser feita isoladamente ou em conjunto com a ferritina e hemossiderina, que avaliam as reservas de ferro no organismo. Na anemia megaloblástica por carência de B12, pode ocorrer uma carência de ferro após a reposição da vitamina, por causa do aumento do consumo de ferro pelas hemácias. Nas anemias hemolíticas, o ferro sérico pode variar de normal até aumentado, dependendo do tempo em que o processo hemolítico foi iniciado.

Para a dosagem de ferro em soro, utiliza-se o método TPTZ, que envolve uma reação de redução do ferro em meio ácido. O ferro ligado à transferrina é liberado, reagindo, posteriormente, com o TPTZ (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazolium). Ocorre a formação de um produto colorido, cuja intensidade é medida fotometricamente.

• **Transferrina**

Glicoproteína sintetizada no fígado, com meia-vida de aproximadamente sete dias. É a principal proteína plasmática transportadora de ferro, e, por esse motivo, seus níveis sofrem variações em consequência da deficiência de ferro ou de doenças crônicas, voltando ao normal após o tratamento. Em condições normais, apenas um terço da transferrina plasmática encontra-se sob a forma saturada. Sua concentração está diretamente relacionada à

capacidade total de ligação do ferro (TIBC), por isso, é útil nos casos de dosagens pediátricas, uma vez que exige pequenas quantidades de amostra quando comparada com a técnica do TIBC.

Os níveis de transferrina encontram-se aumentados na anemia ferropriva, no período gestacional e durante o uso de contraceptivos orais. A redução dos níveis de transferrina é observada nos estados inflamatórios crônicos, nas doenças hepáticas crônicas e nos casos de doença renal.

• Capacidade total de ligação do ferro

A capacidade total de ligação do ferro (TIBC) representa a porção total de ferro ligada à transferrina. Em patologias que reduzem as reservas de ferro (anemia ferropriva, deficiência do metal ou perda sanguínea), na insuficiência hepática ou em situações em que a produção de transferrina encontra-se aumentada (gestação e uso de anticoncepcional oral), a capacidade total de combinação do ferro aumenta. Na hemocromatose, patologia em que os níveis de ferro estão elevados, a TIBC diminui. A redução da produção hepática de transferrina na cirrose hepática, as nefropatias, hepatopatias crônicas e as perdas proteicas na síndrome nefrótica também diminuem a capacidade total de combinação do ferro.

Para a avaliação dessa ligação, utiliza-se a capacidade do ferro de precipitar na presença de carbonato de magnésio. No soro, a transferrina é totalmente saturada após o tratamento com excesso de ferro. O ferro não combinado é precipitado com o carbonato de magnésio presente no meio reacional, e o ferro combinado pode ser determinado no sobrenadante.

• Índice de saturação da transferrina

O índice de saturação da transferrina é usado na distinção das causas comuns de anemias. Ele estabelece a relação entre a quantidade de ferro sérico e a quantidade de transferrina ou com a capacidade total de fixação do ferro (TIBC) presente. Normalmente, aumentos da TIBC ocorrem em resposta ao decréscimo nos níveis de ferro sérico (deficiência de ferro), porém, em geral, a TIBC apresenta-se

normal em doenças inflamatórias crônicas. O índice de saturação da transferrina é obtido pelo seguinte cálculo:

$$\text{saturação (\%)} = \frac{\text{ferro sérico (\mu\text{g/dL})}}{\text{transferrina (\mu\text{g/dL})}} \times 100 \text{ (valores de referência: 20\% a 55\%)}$$

O quadro 1.20 apresenta a comparação entre os níveis de ferro sérico, a TIBC e o índice de saturação da transferrina em diferentes quadros clínicos.

Quadro 1.20. Comparação entre níveis de ferro, TIBC e índice de saturação.

Quadro clínico	Ferro	TIBC	Índice de saturação
• deficiência de ferro	reduzido	aumentada	reduzido
• infecção crônica	reduzido	reduzida	reduzido
• malignidade	reduzido	reduzida	reduzido
• menstruação	reduzido	normal	reduzido
• envenenamento por ferro	aumentado	aumentada	aumentado
• anemia hemolítica	variado	variada	variado
• hemocromatose	aumentado	normal/reduzida	aumentado
• infarto do miocárdio	reduzido	normal	reduzido
• gravidez tardia	reduzido	aumentada	reduzido
• uso de contraceptivo oral	aumentado/ normal	aumentada	normal
• hepatite viral	aumentado	aumentada	normal/ aumentado
• nefrose	reduzido	reduzida	aumentado
• talassemia	aumentado	reduzida	aumentado

1.4.4.4 Fósforo

O fósforo é um elemento amplamente distribuído no organismo sob a forma de fosfato orgânico ou inorgânico. Nos indivíduos adultos, aproximadamente

85% do fósforo inorgânico estão presentes no esqueleto. O percentual restante encontra-se combinado com carboidratos, proteínas e lipídios, e incorporado a outras substâncias orgânicas, como fosfolipídios, fosfoproteínas, ácidos nucleicos e outros compostos de alta energia envolvidos na integridade celular, com função de estocagem e troca de energia.

Três órgãos estão principalmente comprometidos com o equilíbrio homeostático do fósforo: o intestino delgado, responsável pela sua absorção, os rins, encarregados das funções de filtração e reabsorção do fósforo, e o esqueleto, que promove o seu armazenamento. Cerca de dois terços do fosfato ingerido sofre absorção ativa, principalmente no jejuno; o restante é excretado por via fecal.

O aumento do fosfato sérico ocorre por redução da filtração glomerular, aumento da reabsorção tubular renal e aporte exógeno ou endógeno. Os níveis de fosfato encontram-se aumentados na hipocalcemia, em casos de hipervitaminose D, na osteoporose, na metástase óssea, na insuficiência renal etc. A ação do paratormônio também influi nesse aumento, como provável efeito indireto do metabolismo da vitamina D. Cerca de 90% do fosfato é filtrado pelos glomérulos e reabsorvido pelos túbulos. A diminuição ocorre por distúrbios tubulares de reabsorção e aumento das perdas. Os níveis de fosfato encontram-se reduzidos na hipovitaminose D, no raquitismo, em indivíduos que fazem uso de antiácidos e diuréticos e no alcoolismo. O PTH inibe sua reabsorção tubular renal, ou seja, no hiperparatireoidismo primário encontramos elevação do fósforo urinário. Os níveis séricos dependem da alimentação. Recomenda-se a coleta pela manhã por causa de relatos de variações diurnas.

Os níveis de fosfato urinário variam com a idade, a função renal, a massa muscular, a hora do dia, a dieta e a ação do PTH. A dosagem de fosfato urinário auxilia no diagnóstico das doenças ósseas, como a osteomalacia e a doença de Paget.

A análise de fosfato urinário é realizada em urina coletada num período de 24 horas. Para isso, utiliza-se o método de Fiske e Subbarow. Nesse método, a amostra é desproteïnizada com ácido tricloroacético, e o fosfato presente reage com o molibdato de amônio para formar o fosfomolibdato de amônio. Esse, na presença do ácido aminonaftolsulfônico, gera o azul de molibdênio (óxido de molibdênio), cuja intensidade de coloração é medida fotometricamente.

1.4.4.5 Magnésio

O magnésio é o quarto cátion mais abundante no organismo humano. Atua como cofator indispensável para as enzimas ligadas aos processos de respiração celular, glicólise e transporte de cálcio e sódio através da membrana. Num adulto, o magnésio total encontra-se distribuído da seguinte forma: aproximadamente 60% nos ossos, 20% na musculatura esquelética, 19% em outros tecidos e 1% no líquido extracelular. Cerca de dois terços do magnésio sérico existem predominantemente como íons livres, um terço está ligado a proteínas, principalmente à albumina, e um pequeno percentual forma complexos de ânions. O magnésio ingerido é absorvido no intestino delgado e excretado pela via urinária. Essa eliminação é controlada pela reabsorção tubular.

A redução dos níveis de magnésio sérico (hipomagnesemia) está associada à hipocalcemia (redução do cálcio) e à hipocalemia (redução do sódio). Dentre as causas mais comuns de diminuição do magnésio, estão o alcoolismo agudo, a pancreatite aguda, as perdas gastrointestinais (má absorção, uso abusivo de laxantes e vômitos) e as perdas renais (diuréticos, necrose tubular, acidose tubular renal). Deficiências severas estão ligadas a disfunções neuromusculares, como tetania, fraqueza, convulsões, irritabilidade e delírio.

A hipermagnesemia é comumente causada pelo uso de antiácidos contendo magnésio, enemas com magnésio, intoxicação por lítio e nutrição parenteral; também é observada em indivíduos com nefrolitíase, insuficiência renal aguda ou crônica.

A determinação dos níveis de magnésio urinário é indicada para auxiliar o diagnóstico da hipomagnesemia, quando o indivíduo apresenta sintomas neurológicos e gastrointestinais sem, no entanto, apresentar redução do magnésio sérico. Na ausência de condições que promovam a excreção do magnésio, o indivíduo tende a apresentar níveis urinários acima dos valores de referência (25 mg em 24 horas), o que sugere o quadro de hipomagnesemia.

Para a dosagem de magnésio em soro ou em urina (coletada num período de 24 horas), utiliza-se o método de Sky-Peck. Esse método envolve a formação de um complexo de coloração vermelha proveniente da reação entre o magnésio e o amarelo titan em meio alcalino. A intensidade da coloração é medida fotometricamente.

1.4.4.6 Potássio

O potássio está presente em elevadas concentrações no espaço intracelular e tem grande importância na manutenção do equilíbrio eletrolítico através da membrana celular. As variações em suas concentrações prejudicam a capacidade de contração muscular, tanto da musculatura lisa quanto da musculatura estriada. Os níveis séricos de potássio encontram-se aumentados (hiperpotassemia) em casos de hemólise maciça, insuficiência renal e aumento do catabolismo celular. Patologias que evoluem com hiperplaquetemia por liberação do potássio intraplaquetário também podem apresentar hiperpotassemia artificial. A hipopotassemia (níveis reduzidos de potássio no sangue) pode ser observada nas seguintes condições: vômitos e diarreias excessivos, nefrites e administração de diuréticos, digitálicos, cortisona e testosterona. Amostras hemolisadas são inadequadas para essa análise, pois aumentam sensivelmente os níveis séricos de potássio.

1.4.4.7 Sódio

O sódio é um cátion presente em grande quantidade no líquido extracelular. As variações em seus níveis séricos, seja a redução (hiponatremia) ou o aumento (hipernatremia), provocam alterações na osmolaridade. Graças ao seu grande poder osmótico, o sódio possui a capacidade de distribuir água por todo o corpo. Quase todo o sódio proveniente da dieta é excretado por via urinária. Níveis reduzidos resultam em alterações neurológicas que vão desde fraqueza muscular até alterações de comportamento, distúrbios de equilíbrio e coma.

A dosagem do sódio urinário é importante para a avaliação das hiponatremias por perda renal (rins policísticos, acidose tubular proximal), nas oligúrias pré-renais (sódio urinário < 10 mEq/L) ou oligúria renal (sódio urinário > 10 mEq/L).

O quadro 1.21 apresenta algumas causas de aumento ou redução dos níveis de sódio no sangue e na urina.

Quadro 1.21. Causas de aumento ou redução de sódio no sangue e na urina.

Sangue		Urina	
Níveis aumentados	Níveis reduzidos	Níveis aumentados	Níveis reduzidos
<ul style="list-style-type: none"> • terapia excessiva com salina • acidose diabética • desidratação (vômito, diarreia) • sudorese excessiva 	<ul style="list-style-type: none"> • ingesta baixa de sódio • reposição inadequada • uso abusivo de diuréticos • hipotireoidismo 	<ul style="list-style-type: none"> • diuréticos • dieta rica em sódio • secreção inapropriada de ADH • hipotireoidismo 	<ul style="list-style-type: none"> • dieta pobre em sódio • necrose tubular • síndrome nefrótica • retenção pré-menstrual

Uma solução que entre em contato com uma chama é atomizada, emitindo luz. Cada elemento químico analisado emite radiações específicas, que são isoladas de outras radiações e podem ser medidas. A separação do espectro de emissão de cada elemento é realizada por filtros ópticos e prismas. A intensidade da emissão é proporcional à concentração do elemento analisado. Devido à precisão e à rapidez de análise, é possível determinar os níveis de mais de um analito simultaneamente. O sódio possui a capacidade de emitir luz quando atomizado em chama, e essa característica pode ser utilizada em sua dosagem. O sódio emite luz amarela quando atomizado.

Referência bibliográfica

WINZLER, Richard L. et al. Studies on the Mucoproteins of Human Plasma. I. Determination and Isolation. *Journal of Clinical Investigation*, v. 27, n. 5, p. 609-616, 1948.

Bibliografia complementar

BERG, Jeremy M.; TYMOCZKO, John L.; STRYER, Lubert. *Bioquímica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

HILL, Stephen A.; McQUEEN, Matthew J. Reverse Cholesterol Transport-A Review of the Process and Its Clinical Implications. *Clinical Biochemistry*, v. 30, p. 517-525, 1997.

LEHNINGER, Albert L.; NELSON, David L.; COX, Michael M. *Princípios de bioquímica*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LIMA, A. Oliveira et al. *Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MARTINELLO, Flávia; SILVA, Edson Luiz da. Ascorbic Acid Interference in the Measurement of Serum Biochemical Parameters: In Vivo and In Vitro Studies. *Clinical Biochemistry*, v. 39, p. 396-403, 2006.

MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo Baptista. *Bioquímica básica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MILLER, Otto; GONÇALVES, Raul Reis. *Laboratório para o clínico*. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

MORITA, Tokio; ASSUMPCÃO, Rosely M. V. *Manual de soluções, reagentes e solventes*. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2007.

MORRISON, Robert Thornton; BOYD, Robert Neilson. *Química orgânica*. 10 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1993.

MOURA, Roberto de Almeida et al. *Técnicas de laboratório*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

SOLICHOVA, Dagmar et al. Biochemical Profile and Survival in Nonagenarians. *Clinical Biochemistry*, v. 34, p. 563-569, 2001.

Capítulo 2

Biologia molecular

Emanuele Amorim Alves

Daniel Santos Souza

2.1 História da biologia molecular

2.1.1 A descoberta do DNA

Em muitos aspectos a história da biologia molecular se confunde com a descoberta do ácido desoxirribonucleico (DNA) e de sua importância na transmissão de informações entre gerações. Não é de hoje que os cientistas tentam entender as diferentes características de cada espécie. A enorme variedade de seres, desde indivíduos minúsculos até animais de grandes dimensões, tem intrigado e maravilhado muitos pesquisadores. Porém o mundo científico teve de esperar até 1858 para que Charles Darwin (1809-1882) e Alfred Russel Wallace (1823-1913) descrevessem, separada e concomitantemente, suas **teorias da evolução das espécies**. Essas teorias concebem a evolução das espécies como um processo pelo qual o indivíduo mais adaptado ao meio sobrevive, e aquele que não consegue se adaptar a

determinada mudança do ambiente termina por se extinguir. Tais mudanças seriam geradas por mutações adaptativas?

Somente após a segunda metade do século XIX surgiram as primeiras conclusões sobre a perpetuação das características hereditárias dos seres, baseadas no estudo desenvolvido pelo monge austríaco Gregor Mendel (1822-1884). Suas teorias evolutivas, resultado de estudos realizados com ervilhas, constituem o marco inicial da genética, e seus conceitos são até hoje estudados. Mendel introduziu o conceito de genes – chamados por ele de fatores – e a ideia de que eles eram herdados em pares: um gene materno e outro paterno, sendo as características da prole recessivas ou dominantes em relação às características dos pais.

Anos mais tarde, Friedrich Miescher (1844-1895) isolou um tipo de molécula encontrada no núcleo de linfócitos, ao qual denominou nucleína. A nucleína tinha características ácidas e era solúvel em soluções alcalinas diluídas. Miescher também determinou a composição química dessa molécula, que seria rica em oxigênio, nitrogênio e fósforo. Mais tarde, a natureza ácida da nucleína serviria de base para a denominação ácidos nucleicos.

Entre 1882 e 1885, Walther Flemming (1843-1905) e Eduard Strasburger (1844-1912), em estudos sobre estruturas celulares, descobriram estruturas em forma de bastão no núcleo das células e as chamaram de **cromossomos**, pois eram estruturas intensamente coradas. Poucos anos mais tarde, Theodor Boveri (1862-1915) observou que o número de cromossomos das células germinativas, em determinado estado de sua maturação, era reduzido à metade. Essa observação permitiu elucidar o fenômeno de união dos gametas para criarem uma célula somática do organismo em formação, reforçando ainda mais a teoria de Mendel.

Em 1909, o termo **gene** foi introduzido por Wilhelm Johannsen (1857-1927) para designar a unidade mendeliana antes conhecida como fator, designando os termos **genótipo** para as características genéticas do indivíduo e **fenótipo** para se referir ao seu aspecto externo.

Baseado no estudo que fez com a mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*), o pesquisador Thomas Hunt Morgan (1866-1945) publicou, em 1915, o livro *O mecanismo da hereditariedade mendeliana*, em que afirmava

representarem os genes regiões dos cromossomos responsáveis pelas características inatas do indivíduo. Curiosamente, esse trabalho teve o auxílio de Alfred Sturtevant (1891-1970), um aluno de Morgan que, ao ler os trabalhos de Mendel, inicialmente não lhes dera muito crédito. A partir do trabalho de Thomas Hunt Morgan, passou-se a aceitar que os cromossomos estocavam muitos genes, e que os genes guardavam as informações passadas à progênie.

Em 1923, Robert Feulgen (1884-1955) demonstrou, por meio de técnicas de coloração específicas para o DNA, que o mesmo estava ligado intimamente aos cromossomos. Contudo, até então não se sabia da importância da molécula do DNA na transmissão das informações de um indivíduo para outro.

Até o início do século XX, as biomoléculas mais estudadas foram as **proteínas**, pois seu isolamento era mais simples do que o de outras biomoléculas, e a cada ano eram obtidas mais informações sobre proteínas do que sobre qualquer outra biomolécula existente na célula. Por isso, era de se esperar que a transmissão de informações de pais para filho, processo muito importante para a manutenção da espécie, fosse feita por meio dessas moléculas tão complexas, as proteínas.

Esse paradigma só foi quebrado em 1928, quando Frederick Griffith (1879-1941) introduziu o conceito de **transformação** com base em seus experimentos com pneumococos, bactérias causadoras da pneumonia. Nesse experimento, Griffith utilizou dois tipos de bactérias: o *Pneumococcus* do tipo S (do inglês *smooth*, que significa liso), que possui superfície lisa em decorrência de uma cobertura de polissacarídeo – o que o torna extremamente virulento –, e o *Pneumococcus* do tipo R, assim chamado por possuir a superfície rugosa (*rough* em inglês) e não ter cobertura polissacarídica, não sendo virulento.

Ao inocular a bactéria R viva e a bactéria S morta, o camundongo morria. Griffith concluiu então que havia algum fator na bactéria S que “transformava” a bactéria R em S. Essa conclusão foi confirmada quando Griffith observou, nos camundongos mortos, a presença de colônias de bactérias S vivas. Como elas eram mortas por meio do uso de calor, que desnatura proteínas, era lógico supor que o material que transmitia essa informação não era uma proteína. Pesquisadores contemporâneos de Griffith concluíram que a substância capaz de estimular essa “transformação” devia ser o material genético dos *Pneumococci* do tipo S, que readquiriam a sua virulência.

Alguns anos após o experimento de Griffith, pesquisadores repetiram os seus experimentos utilizando separações que continham apenas DNA, carboidratos, proteínas ou lipídios. Constatou-se que somente a porção com DNA era capaz de transformar as bactérias, e que o DNA perdia essa capacidade quando tratado com enzimas **DNAases**. Tais experimentos confirmaram a teoria de Griffith e deram grande credibilidade aos seus experimentos.

Em 1931, Phoebus Aaron Theodor Levene (1869-1940) identificou que **bases nitrogenadas, açúcar e fosfato** formavam as estruturas básicas dos ácidos nucleicos, afirmando que esses ácidos eram polímeros. Foi ele também que descreveu as diferenças entre o ácido ribonucleico (RNA) e o DNA, sendo essa nomenclatura amplamente utilizada após suas pesquisas.

Em 1952, Alfred Hershey (1908-1997) e Martha Chase (1927-2003) estavam utilizando em seus experimentos um tipo de vírus, denominado fago, capaz de infectar bactérias. No experimento, que ficou conhecido como “experimento do liquidificador”, eles marcaram duas culturas de fagos. Uma delas foi marcada com enxofre radioativo, que se incorporou às proteínas, e a outra, com fósforo radioativo, que se incorporou ao DNA. Posteriormente, incubaram culturas de *Escherichia coli* com os fagos para que as bactérias se contaminassem com os vírus; em seguida, liberaram os vírus das células bacterianas, utilizando um liquidificador. Com isso, as cápsulas virais, por serem mais leves, localizavam-se no sobrenadante e as bactérias, no precipitado. Hershey e Chase perceberam que grande parte do fósforo se encontrava no precipitado e que a maior parte do enxofre estava no sobrenadante, e concluíram que o material infectante era o DNA do vírus injetado dentro das células bacterianas. Após esse experimento, houve uma grande “corrida científica” para descobrir a estrutura do DNA.

Utilizando a técnica de cromatografia, Erwin Chargaff (1905-2002) verificou que havia uma relação quantitativa entre as bases nitrogenadas do DNA: a quantidade de adenina era proporcional à quantidade de timina (T), assim como a de citosina (C), à de guanina (G). Esses dados foram posteriormente denominados **postulados de Chargaff** e seriam muito importantes na descoberta da estrutura do DNA.

Em 1953, os pesquisadores James Dewey Watson (1928) e Francis Harry Compton Crick (1916-2004) publicaram trabalho em que elucidaram

a estrutura do DNA, utilizando para isso dados das pesquisas de Rosalind Franklin (1920-1958) e Linus Pauling (1901-1994). Por meio da difração de raios X, Rosalind obteve excelentes imagens do DNA que mostravam com grande precisão as dimensões da molécula: a estrutura era formada por uma espiral de 20 Å, a distância entre as bases dispostas paralelamente ao eixo helicoidal era de 3,4 Å e o valor da altura de um giro da espiral cristalizada era de 34 Å. Pauling descreveu inicialmente um modelo para o DNA no qual as bases nitrogenadas estavam voltadas para o lado externo da molécula e os fosfatos, voltados para o interior da espiral.

Watson e Crick viram que o DNA era uma espiral, mas as bases não poderiam ser externas à molécula por proporcionar características básicas ao DNA. Além disso, se os grupos fosfato estivessem tão próximos uns dos outros no interior da estrutura seriam repelidos, fazendo-a instável.

Utilizando essas informações, Watson e Crick descreveram a molécula de DNA como uma espiral na qual as bases nitrogenadas são ligadas entre si internamente (timina com adenina e citosina com guanina) e os grupos fosfato, carregados negativamente, estão voltados para fora da molécula. O corpo da molécula é constituído por polímeros de base nitrogenada açúcar-fosfato, e as ligações entre eles, denominadas ligações fosfodiéster, ocorrem na direção 3'-5'.

A elucidação da estrutura do DNA representou um marco na biologia, sendo responsável pelo surgimento da biologia molecular. Originada na bioquímica e na genética, a biologia molecular, principal ferramenta na atualidade para a elucidação e o aperfeiçoamento da vida, é a ciência do século XXI e seguramente ainda tem potencial para auxiliar o ser humano.

2.1.2 A estrutura dos ácidos nucleicos

O DNA, assim como o RNA, é um polímero formado por vários nucleotídeos ligados entre si. Os nucleotídeos são formados por uma base nitrogenada, um açúcar e um radical de ácido fosfórico (fig. 2.1). Graças ao ácido fosfórico, os ácidos nucleicos têm propriedades ácidas e possuem carga negativa quando em pH neutro ou alcalino.

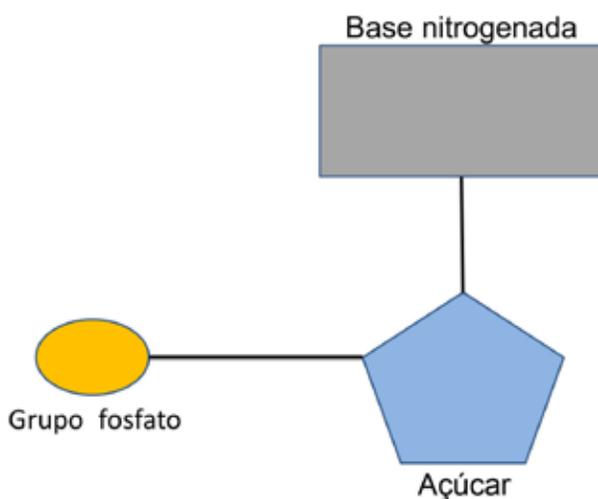


Figura 2.1. Esquema da estrutura de um nucleotídeo.

As bases nitrogenadas podem ser purinas – adenina e guanina – e pirimidinas – citosina, timina e uracila (presente somente no RNA). A estrutura das bases nitrogenadas encontra-se na figura 2.2.

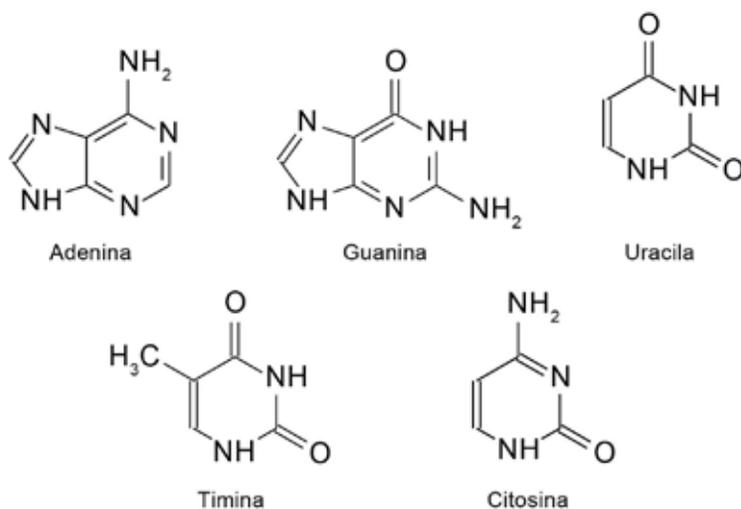


Figura 2.2. Estrutura das bases nitrogenadas do DNA e do RNA: a molécula de DNA apresenta as bases adenina, timina, citosina e guanina; o RNA contém adenina, uracila, citosina e guanina.

Os nucleotídeos se ligam por meio de ligações fosfodiéster que ocorrem entre a hidroxila do carbono 5' da pentose e a hidroxila do carbono 3' do nucleotídeo seguinte.

O DNA é formado por duas fitas de nucleotídeos; já o RNA é formado por uma única fita. Existe interação entre as duas fitas de DNA: por intermédio de pontes de hidrogênio entre as bases e por interações hidrofóbicas. As pontes de hidrogênio ocorrem entre as bases timina (T) e adenina (A) e entre a citosina (C) e a guanina (G). Entre a timina e a adenina, existem duas pontes de hidrogênio; entre a citosina e a guanina existem três. Essas ligações ocorrem por causa das dimensões moleculares das bases nitrogenadas e de seus radicais, assim como em decorrência do posicionamento dos grupos que formam as pontes de hidrogênio. Isso significa que as duas fitas de DNA são complementares entre si, sendo esse fato importante no momento da transmissão de informação. Outra forma de interação ocorre por meio das interações hidrofóbicas entre os anéis heterocíclicos das bases. Essa interação faz que a parte interna das fitas seja apolar e, em um ambiente aquoso, ela favorece a interação entre a dupla fita.

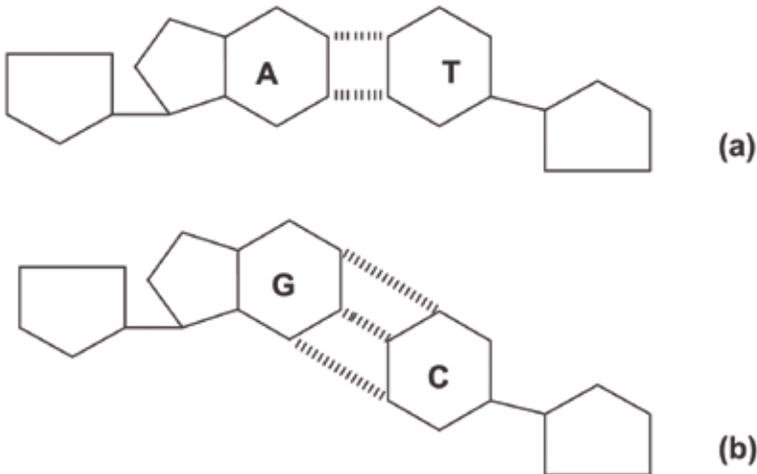


Figura 2.3. Esquema simplificado das interações de hidrogênio que ocorrem entre as bases nitrogenadas do DNA. Em (a), as duas pontes que ocorrem entre a timina e a adenina; em (b), as três pontes de hidrogênio entre a guanina e a citosina.

A espiral formada pelas fitas de DNA também possui outras características. Seu formato favorece a formação de duas reentrâncias, denominadas sulco menor e sulco maior, que auxiliam a interação entre as proteínas e a molécula do DNA. A espiral do DNA também apresenta mais duas conformações, que são variações e dependem da composição de bases e do meio em que o DNA se encontra. Essas formas foram analisadas por meio de estudos de cristalografia.

A espiral descrita por Watson e Crick é denominada forma B do DNA. Essa é a forma mais abundante nas condições fisiológicas e em soluções de baixa força iônica. Ainda existem as formas A e Z. A forma A é mais curta e mais grossa do que a forma B, e é encontrada em meios de baixo conteúdo salino. A forma Z é mais longa e fina do que a forma B. Não se conhecem ainda as vantagens da estrutura Z, mas é fato que há conversão entre B e Z no organismo.

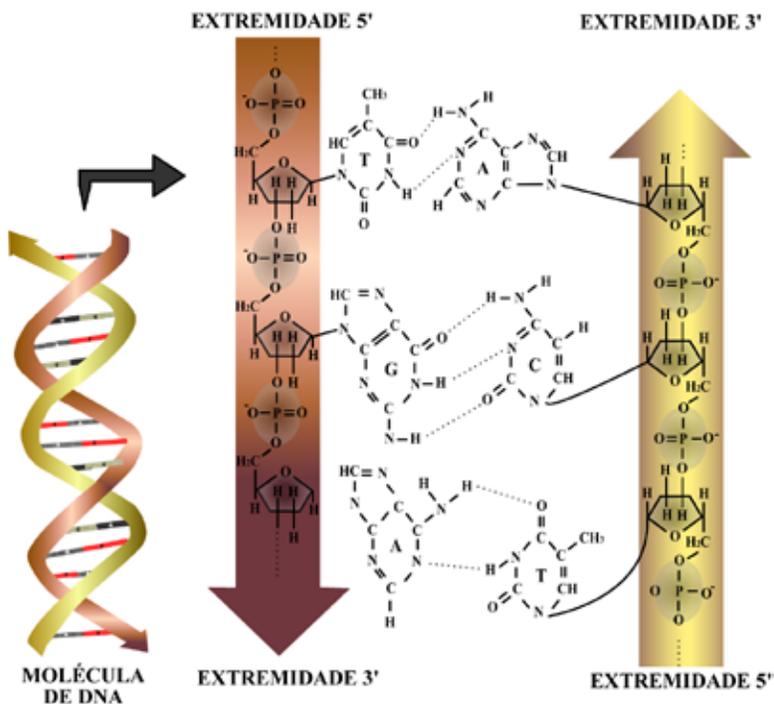


Figura 2.4. Representação esquemática da molécula dupla fita de DNA.

O RNA é semelhante ao DNA, porém não forma fita dupla. Além disso, o açúcar do RNA é uma ribose, diferente do DNA, que é uma desoxirribose. Outra característica particular do RNA é que as bases nitrogenadas que formam seus nucleotídeos apresentam pequena diferença em relação ao DNA. No RNA, a timina é substituída pela uracila (U), que também parecia com a adenina.

O RNA possui três classes principais: RNA mensageiro (mRNA), que contém a informação genética para a produção de proteínas; RNA transportador (tRNA), responsável por carrear o aminoácido específico para o sítio de síntese proteica; e RNA ribossomal (rRNA), que forma grande parte da massa do ribossomo. É no ribossomo que ocorre a síntese proteica.

2.1.3 Características físicas da molécula de DNA

Uma característica dos ácidos nucleicos é a sua capacidade de absorver luz ultravioleta no comprimento de onda de 260 nm. Isso ocorre por causa das ligações duplas dos anéis que formam as bases nitrogenadas. Essa característica favorece medições que utilizam a espectrofotometria como ferramenta e que permitem quantificar as moléculas de DNA presentes em determinada solução e também obter informações sobre as características da fita. Como as bases se encontram no interior da fita, sua absorvância é menor quando comparada à mesma molécula desnaturada, pois, quando as fitas estão separadas, elas expõem as bases, permitindo a adsorção de maior quantidade de luz ultravioleta (UV).

Uma das formas mais comuns de separar as fitas de DNA é aumentando-se a temperatura. Isso induz o aumento da energia cinética na molécula, causando o rompimento das pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, além de romper as interações hidrofóbicas – processo denominado **desnaturação**. A desnaturação também ocorre a partir da alteração de alguns parâmetros físicos, como o pH do meio, entre outros.

A capacidade de aumentar a absorção da luz UV pela molécula de DNA, utilizando o calor para desnaturá-la, é denominada **hipercromia**. Esse fenômeno é reversível: com a diminuição da temperatura, as fitas de DNA se unem lentamente, fazendo a absorção de luz voltar à absorção inicial. A reorga-

nização das cadeias é evidenciada pela diminuição da leitura de absorção, fenômeno chamado **hipocromia**.

Ao se avaliar a relação entre a temperatura e a absorvância de uma amostra, observa-se que, conforme a temperatura aumenta, também aumenta a absorvância. Isso acontece porque o aumento da temperatura das fitas abre as duplas, permitindo maior interação das bases com a luz UV e aumentando sua absorção. O ponto médio de absorção, denominado T_m , representa o ponto médio da curva de aumento de temperatura *versus* absorção da luz UV e define a temperatura na qual a metade das cadeias está dissociada.

O T_m é importante, pois permite avaliar a quantidade de citosina e guanina presente no DNA – quanto mais C e G, maior a interação, por causa da formação de três pontes de hidrogênio. Assim, em moléculas com alto teor de C e G, o T_m é mais alto. Essa característica distingue as moléculas de diferentes DNAs.

Para a manutenção da estrutura da dupla fita, também existem as interações hidrofóbicas dos anéis das bases. Essas interações são evidenciadas quando se coloca o DNA em uma solução contendo compostos que desestruturam as interações, como detergentes ou o sal trifluoroacetato. Quando essas substâncias são acrescentadas, o T_m diminui; quando elas são retiradas, ocorre a reassociação, assim como ocorre com o aquecimento e o resfriamento da molécula. Nesse caso, o tempo de reassociação depende do tamanho da molécula, o que permite calcular o tamanho do DNA por meio de cálculos utilizando dados desses experimentos. Essa análise é importante ao se tratar de DNAs desconhecidos.

Além das forças de interação, também há forças de repulsão, exercidas pelos grupos fosfatos dos nucleotídeos, na dupla fita. Assim, se o DNA for inserido em uma solução que contenha íons que minimizem a repulsão, haverá maior estabilidade da molécula. Isso ocorre quando acrescentamos à solução cátions como o Na^+ .

2.2 Duplicação da molécula de DNA

As informações contidas no DNA residem na ordem das bases nitrogenadas que o compõem. No momento da duplicação, essas informações

devem ser passadas para as fitas filhas. Porém de que forma é possível preservar essa informação?

Desde a publicação do trabalho de Watson e Crick sobre a estrutura do DNA, concebeu-se a possibilidade de duplicação do DNA. Nesse trabalho, além da descrição da dupla hélice, os cientistas ressaltaram que a duplicação do DNA ocorria de forma semiconservativa, ou seja, a dupla hélice recém-formada seria um híbrido entre uma nova cadeia e uma cadeia do DNA que dera origem a ela. Assim, a complementaridade entre as bases é uma forma de preservar as informações contidas no DNA.

A duplicação de forma semiconservativa foi comprovada nos experimentos de Matthew Meselson (1930) e Franklin Stahl (1929), em trabalho publicado em 1958. Meselson e Stahl incubaram bactérias *Escherichia coli* em um meio onde a única fonte de nitrogênio eram os isótopos de N^{15} , não radioativos, mas mais pesados que o N^{14} . As bactérias eram mantidas durante várias gerações nesse meio, a fim de incorporar nitrogênio em seu DNA. Posteriormente, eram retiradas do meio e colocadas em meio contendo N^{14} . Com esse experimento, Meselson e Stahl desejavam avaliar se as novas moléculas de DNA eram híbridas, ou seja, parte sintetizada e parte originária da fita antiga.

Os pesquisadores lisaram as membranas das células e isolaram o seu DNA; esse material foi posteriormente centrifugado em gradiente de densidade. Meselson e Stahl observaram que havia moléculas de DNA leves na parte superior do tubo, moléculas com peso intermediário e moléculas mais pesadas. Assim, concluíram que a duplicação do DNA era semiconservativa, conforme suposto anos antes por Watson e Crick, porque as moléculas leves só continham N^{14} , as moléculas pesadas continham somente N^{15} , e as moléculas intermediárias eram formadas por fitas híbridas contendo os dois isótopos do nitrogênio.

2.2.1 A duplicação do DNA e o ciclo celular

A necessidade de duplicação do DNA é algo que ocorre quando a própria célula precisa duplicar todo o seu material para formar uma nova célula. A

duplicação celular é parte integrante do ciclo celular e deve estar relacionada à sinalização recebida pela célula em determinado momento de sua vida.

O ciclo celular é formado por cinco fases: G1, S, G2, M e G0. Na fase G0, a célula encontra-se em período de dormência, com o maquinário celular voltado para as funções celulares. O ciclo de replicação se inicia mediante sinalizações que induzem a célula a entrar no período G1. Nessa fase, ocorre a síntese de proteínas, enzimas e RNA. Em seguida, a célula entra na fase S, na qual há a duplicação do material genético. Na fase G2, ocorre a síntese do material necessário para a duplicação celular. Já na fase M, ocorre a duplicação da célula como um todo.

A duplicação do DNA na fase S deve ter uma velocidade tal que acompanhe todo o processo do ciclo celular da célula. Células procarióticas promovem sua duplicação em tempos muito mais curtos do que as células de organismos eucarióticos. O tempo de geração da *E. coli*, por exemplo, é de aproximadamente 20 minutos; já as células animais em cultura apresentam ciclos celulares de até 24 horas.

A duplicação se inicia em pontos específicos do DNA, denominados **ORIs** (origens de replicação), uma região rica em **sequências GATC**, com aproximadamente 15 a 20 nucleotídeos. As sequências GATC são sítios de metilação do DNA nas duas fitas responsáveis pela ligação do DNA à membrana celular. É na região de ORI que se inicia a forquilha de replicação. Essa forquilha pode ser ativada mais de uma vez nos procariotos e somente uma vez nos eucariotos. No DNA humano podem existir vários ORIs. Quando há a ativação, verifica-se a abertura das fitas de DNA na região de ORI, formando-se a forquilha de replicação. Isso ocorre com o auxílio da enzima helicase, que é capaz de desfazer as pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, com gasto de trifosfato de adenosina (ATP).

Após a abertura, as fitas são estabilizadas pela ação das topoisomerasas. As proteínas estabilizadoras de fita simples, ou SSB (do inglês *single strand binding proteins*), protegem a fita aberta. Essas proteínas se ligam ao DNA de forma cooperativa e impedem que o DNA aberto se feche, mantendo o DNA de fita simples numa conformação ideal para a duplicação, além de protegerem a fita de ser degradada por nucleases.

Com as fitas abertas, a duplicação se inicia pela ação da enzima primase, responsável pela inserção de um RNA iniciador, chamado *primer*. O *primer* é um conjunto de nucleotídeos com cerca de 20 pares de bases; ele serve para promover uma terminação 3'-OH livre. A terminação livre é importante para o início da síntese da fita de DNA.

A enzima responsável pela síntese da cadeia complementar é a DNA polimerase. Essa enzima necessita da extremidade 3'-OH livre para iniciar o processo de alongamento da fita, ou seja, a adição de nucleotídeos na extremidade 3'-OH livre de uma região pareada do DNA, possibilitando o crescimento da cadeia no sentido 5'-3'. A DNA polimerase possui três funções distintas: polimerização (inserção de nucleotídeos na direção 5'-3'), função exonuclease no sentido 3'-5' (edição e correção) e função exonuclease no sentido 5'-3' (retirada dos *primers*).

A DNA polimerase é dimérica e capaz de sintetizar as duas fitas ao mesmo tempo; porém, como a sua síntese se dá na direção 5'-3', uma das fitas é polimerizada continuamente, ao passo que a polimerização da outra se dá de forma fragmentada, uma vez que as fitas do DNA possuem polaridades opostas. A fita sintetizada de forma contínua é denominada fita *leading* e a fita fragmentada é denominada fita *lagging*. Na fita fragmentada, é necessário que haja constante inserção de *primers* para haver extremidades 3'-OH livres; assim, a atuação da primase é contínua nessa fita. Os fragmentos obtidos pela síntese descontínua são denominados fragmentos de Okazaki. Eles possuem cerca de 100 a 200 nucleotídeos de comprimento, sendo intermediados pelos *primers* sintetizados pelas primases. Com o final da síntese e a substituição dos *primers* por DNA, a enzima DNA ligase liga os fragmentos que foram formados na fita contínua e na fita descontínua para que haja, no final, uma fita inteira de DNA complementar ao seu molde.

A terminação da duplicação ocorre de diversas formas. No DNA circular, de procariotos e mitocôndrias, o término da síntese se dá quando as duas forquilhas de replicação se encontram numa região denominada **Ter**. Para terminar a replicação, ela foi arranjada de maneira a formar uma espécie de armadilha onde a forquilha de replicação entre e não possa sair. Isso é obtido pela ligação da proteína **Tus** à região **Ter**.

Nas células de DNA linear, há um problema na replicação na extremidade da fita tardia. Para solucioná-lo, ocorre a síntese dos telômeros. Os telômeros são porções terminais dos cromossomos que não contêm informação para as células e que possuem várias cópias de uma sequência consenso que são adicionadas, pela telomerase, à fita tardia no final de replicação. Na fita *leading*, a terminação ocorre naturalmente ao final do molde parental.

2.3 Transcrição

Existem semelhanças e diferenças entre o processo de duplicação do DNA e a síntese de RNA. Na duplicação, deve-se ter o máximo de cuidado para que as informações sejam transferidas de forma fidedigna, ou seja, sem que nenhuma informação seja perdida. Na transcrição, que é a síntese de RNA utilizando a molécula de DNA como modelo, retratam-se as necessidades da célula em determinado momento de sua vida. Somente serão produzidos RNAs para a síntese de proteínas necessárias para a célula naquele momento determinado de sua existência. É na transcrição que a célula regula sua expressão gênica.

A transcrição é um processo executado pela enzima RNA polimerase e assemelha-se muito à duplicação, sendo a fita resultante única e formada por nucleotídeos de RNA. Somente uma das fitas do DNA serve como molde para a fita de RNA que será formada. A transcrição segue as mesmas regras de pareamento da duplicação do DNA, mas a timina é substituída pela uracila, que parecia com a adenina.

Assim como o DNA, o RNA é formado por nucleotídeos compostos por um radical de ácido fosfórico, uma base nitrogenada e um açúcar. No RNA, esse açúcar é a ribose. As bases nitrogenadas do RNA são as mesmas do DNA, com exceção da timina, que, no RNA, é substituída pela uracila.

Em eucariotos, existem três RNA polimerases diferentes. A RNA polimerase I é responsável pela síntese de RNA ribossomal; a RNA polimerase II sintetiza o RNA que origina as proteínas (RNA mensageiro); e a RNA polimerase III é responsável pela síntese de RNAs menores e de RNA transportador.

Sabe-se que grande parte do genoma humano não é funcional, ou seja, não gera nenhuma proteína. Assim, é de se esperar que grande parte do DNA não seja transcrita. Essa região não transcrita é denominada *intron*, e a região funcional é denominada *éxon*.

Para que a RNA polimerase possa iniciar a transcrição e dissociar-se depois do gene, é necessário um estímulo. No caso de genes constitutivos não há esse tipo de regulação, pois eles sempre estão sendo transcritos. A regulação ocorre principalmente em genes que se expressam somente em determinados momentos da vida da célula. Esse processo é chamado regulação da expressão gênica. A RNA polimerase não necessita de *primer* para iniciar a transcrição.

No DNA existe uma região, que antecede a região a ser transcrita, denominada região promotora. Nela existem sistemas que auxiliam a RNA polimerase a reconhecer o local onde deve iniciar a transcrição. Nos procarionotos, essa região é denominada **caixa de Pribnow** e, nos eucariotos, é denominada **caixa de TATA**, por causa das repetições TATA presentes nela.

A transcrição se inicia na região promotora, e o primeiro nucleotídeo a ser transcrito é denominado +1 (sítio de início). Regiões que antecedem ao sítio de início recebem números negativos e crescentes, ao passo que as regiões posteriores recebem números positivos e crescentes.

A fase de reconhecimento da região promotora é crítica na regulação da expressão gênica, porque define se um gene será transcrito ou não. Existem duas sequências altamente conservadas nos genes. A primeira localiza-se na região -10 e tem a sequência TATAAT em repetições. A segunda está na região -35 e possui a sequência TTGACA. A RNA polimerase reconhece a sequência em -35 e inicia a sua interação com a fita de DNA. Essa interação se fortalece no momento em que a RNA polimerase chega à região -10.

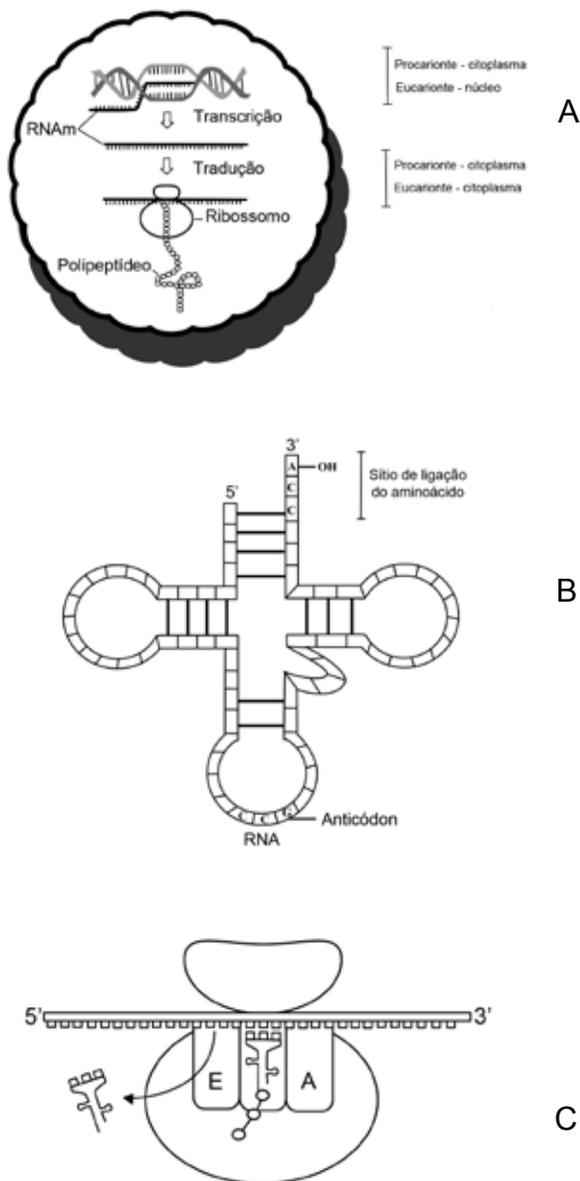


Figura 2.5. Representação esquemática dos processos de transcrição e tradução: A) visão geral do fenômeno dentro de células eucariotas e procariontes; B) RNA transportador, evidenciando a região onde encontramos a trinca de bases nitrogenadas chamada anticódon; C) interação do RNA mensageiro com o RNA transportado e com as subunidades ribossomais, representando a síntese de uma cadeia polipeptídica.

2.3.1 Tipos de RNA

2.3.1.1 RNA mensageiro

O RNA mensageiro de procariotos, ou mRNA, é policistrônico, isto é, uma molécula possui informações de mais de um gene controlado pelo mesmo promotor. Também existem sequências, denominadas sequências líderes, que são transcritas, mas não traduzidas. São sequências importantes no momento do reconhecimento do mRNA pelo ribossomo. Esse mecanismo de transcrição é fundamental nas bactérias por aumentar a velocidade da transcrição, com várias proteínas podendo ser sintetizadas ao mesmo tempo. Geralmente os RNAs traduzem várias cópias da mesma proteína ou de proteínas diferentes que participam de uma mesma via metabólica. Em procariotos, o mRNA tem vida curta, não é processado, mas é transcrito, traduzido e logo degradado.

Nos eucariotos, o mRNA é um pouco diferente, sofrendo processamento de perda dos íntrons e adição de proteções que aumentam o tempo de vida do RNA. Essas modificações são chamadas modificações pós-transcricionais ou processamento do RNA. O RNA de eucarioto, quando transcrito, não está completamente maduro e é chamado transcrito primário ou pré-RNA. Para que o RNA possa exercer sua função biológica, é necessário que ele passe pelo processamento.

No mRNA de eucariotos, essas modificações constituem principalmente a colocação de estruturas protetoras e sinalizadoras, e na retirada de partes que não gerarão proteínas (*splicing*), sendo a principal modificação a inserção de nucleotídeos na extremidade 5' (*cap*) e 3' (poliadenilação).

O *splicing*, retirada de íntrons do transcrito primário, é realizado com o auxílio de um complexo de ribonucleoproteínas denominado spliceossomo. Esse processo ocorre em duas etapas e após duas reações de transesterificação, nas quais há a liberação do íntron na forma de laço. Também há íntrons que participam de sua própria retirada, num processo denominado *autosplicing*.

A adição do *cap* 5 se dá pela ação da guanilil-transferase, quando se insere no DNA um resíduo de guanina por meio de ligação covalente. O *cap* protege o RNA da degradação por exonucleases, além de auxiliar no reconhecimento pelo ribossomo do local onde se iniciará a síntese proteica.

A poliadenilação ocorre ao término da transcrição e é auxiliada pela enzima poli-A polimerase. Além de proteção, a cauda poli-A auxilia no processo de término da transcrição.

2.3.1.2 RNA ribossômico

O RNA ribossômico, ou rRNA, é um tipo de RNA que participa da estrutura do ribossomo. Os ribossomos são estruturas mistas de rRNA e proteínas nas quais ocorre a síntese de proteínas.

Nos procaríotos, o gene que codifica o rRNA se encontra em sequência, e os genes são transcritos em *tandem*. Os três tipos de rRNA são 16S, 23S e 5S. Logo após a sua transcrição, os RNAs são processados pela enzima **Rnase II** – responsável por uma série de clivagens –, resultando na liberação dos rRNAs. O processamento até a forma madura dos rRNAs é feito por outras ribonucleases.

Em eucariotos, o processo é muito semelhante, havendo quatro tipos de rRNA: 5S, 5,8S, 18S e 28S. Como nos procaríotos, seus genes são transcritos de forma a fazer parte de uma mesma e longa unidade de transcrição, produzida pela RNA polimerase I. Somente o 5S não se encontra próximo dos outros, e seus genes estão espalhados pelo genoma do indivíduo. Sua transcrição é feita pela RNA polimerase III e não pela I.

2.3.1.3 RNA transportador

Nos procaríotos, os genes que codificam os RNAs transportadores, ou tRNAs, podem ou não estar agrupados e podem codificar o mesmo tRNA ou tRNAs diferentes. Quando estão unidos, são separados no processamento. O gene do tRNA não é policistrônico, e esses genes até podem ser transcritos juntos, mas a ação de nucleases altamente específicas os separa, e eles geram extremidades 5' e 3'. A molécula de tRNA é transcrita ao mesmo tempo, sendo metilada e adquirindo estrutura secundária, muito importante no seu processamento. Na extremidade 3', sempre há a adição da sequência de nucleotídeos ACC, que irá formar o primeiro braço do tRNA – no total, o tRNA apresenta cinco braços, sendo quatro deles fixos e um variável. Cada braço é responsável por uma ação específica que irá auxiliar na função do

tRNA de transportar o aminoácido certo para o sítio de síntese proteica. No braço que contém ACC, existe o encaixe do aminoácido que será transportado. Esse encaixe é auxiliado pela enzima aminoacil-tRNA sintetase. O segundo braço reconhece o ribossomo, o terceiro contém o código complementar à sequência do mRNA (anticódon) e o quarto contém o encaixe da aminoacil-tRNA sintetase no momento em que carrega o aminoácido. O quinto braço variável não possui função específica.

Nos eucariotos, os tRNAs são muito semelhantes; sintetizados separadamente, seus braços são específicos para cada tipo de aminoácido e apresentam estrutura terciária.

2.3.2 Regulação da expressão gênica

Todos os organismos possuem formas de regulação de quando e quais genes serão transcritos em determinado momento da vida. Alguns genes, ditos constitutivos, são transcritos continuamente, pois são fundamentais na formação de estruturas celulares básicas para o perfeito funcionamento da célula, além de participarem de rotas metabólicas indispensáveis, como a glicólise. Outros genes, ditos induzíveis, somente são transcritos quando a proteína codificada por eles é necessária à célula. Esse processo economiza a energia gasta pela célula na síntese e na degradação de proteínas.

Para as proteínas constitutivas, existem sequências que antecedem a seus genes no DNA, denominadas promotores fortes. Essas sequências são facilmente reconhecidas pela RNA polimerase e muito preservadas. Nos genes induzíveis, esses promotores não estão acessíveis à RNA polimerase a todo momento; estão acessíveis apenas quando há um estímulo externo ou interno para a síntese da proteína.

Em eucariotos multicelulares, a resposta direta às condições externas é limitada. A maioria das células encontra-se em meios uniformes, e existe uma ação coordenada que possibilita a sua diferenciação, culminando no desenvolvimento do organismo. Em determinado momento, as células sintetizam e acumulam diferentes mRNAs e proteínas que possibilitarão a diferenciação.

A regulação da expressão gênica em eucariotos se dá, na maioria das vezes, pela ação de hormônios, principalmente esteroides, sendo pouco afetada por mudanças ambientais.

Nos procaríotos, a ausência ou a presença de nutrientes no meio influencia muito a expressão proteica. Na presença de determinado nutriente, aumenta a expressão das enzimas responsáveis pelo metabolismo desse nutriente.

Em 1961, surgiu o modelo de **óperon**. Existem vários óperons, mas o mais estudado é o óperon lac. Nele, o RNA é policistrônico e responsável pela sequência das três proteínas envolvidas no metabolismo da lactose. O gene lac Z codifica a enzima β -galactosidase, responsável pela quebra da lactose em glicose e galactose. O gene lac Y é responsável por codificar uma proteína permease que permite a entrada da lactose na célula. O gene lac A codifica a enzima transacetilase, que possui função desconhecida.

Constitutivamente, a célula sintetiza um repressor que se sobrepõe ao promotor no mRNA da célula, impedindo que ele seja transcrito. No momento em que há ausência de glicose e presença de lactose, ocorre a ligação da lactose com o repressor, inativando-o, a fim de que não haja nenhum impedimento para que o promotor impeça a transcrição dos genes lac Z, lac Y e lac A. Assim, a célula sintetiza o maquinário que permitirá o aumento da entrada de lactose nela e a quebra da lactose em galactose e glicose, para ser posteriormente usada na via glicolítica, visando à obtenção de energia.

As vias degradativas são induzidas, em geral, quando há a presença do seu substrato. Nas vias biossintéticas, pelo contrário, a ausência de determinado nutriente estimula a sua síntese, como é o caso da via de síntese do triptofano, que se assemelha à do lac óperon.

Nos eucariotos, muitas são as formas de regulação da expressão gênica. No término da transcrição de determinado gene, a expressão gênica pode não terminar ali e continuar, transcrevendo outro gene. Outra forma de regulação é a que ocorre com algumas proteínas ribossomais que, quando em excesso, ligam-se aos genes que as originariam e impedem a sua transcrição. Também é possível encontrar partes do DNA onde ocorre metilação. A presença da metila inibe a transcrição do gene daquela região. A regulação também se dá no processamento do RNA, pois, com a adição da cauda poli-A do *cap* 5, o

tempo de vida de determinado mRNA aumenta, tornando possível a tradução de mais proteínas a partir dele.

2.4 Tradução

2.4.1 O código genético

Como já mencionado, a descoberta do DNA ocasionou uma grande corrida para decifrar as informações contidas nessa molécula e como elas eram transmitidas. Sabe-se que as estruturas de constituição e de atividade em uma célula são formadas por proteínas. Como então relacionar a sequência do DNA de um indivíduo com as proteínas necessárias à sua sobrevivência? Para tal, deve-se levar em consideração que as proteínas já haviam sido bem estudadas na época de descoberta do DNA e que, desde a década de 1950, já se sabia que cada proteína era constituída de sequências de aminoácidos.

É a sequência de nucleotídeos que determina a sequência dos aminoácidos que formará a proteína. A relação entre o DNA e os aminoácidos é denominada código genético, que é lido em trinca denominadas códons. Cada códon, ou seja, três nucleotídeos, corresponde a determinado aminoácido. Na síntese de uma proteína, os nucleotídeos de DNA são transcritos para RNA, e a informação contida no RNA gera a sequência de aminoácidos da proteína a ser traduzida.

Como existem quatro nucleotídeos diferentes, sua combinação dois a dois resultaria em uma probabilidade de 16 aminoácidos diferentes. Como existem 20 aminoácidos, essa probabilidade não era viável. Por isso, percebeu-se que, na verdade, cada aminoácido é gerado por uma trinca de nucleotídeos, o que resulta na probabilidade de formar 64 aminoácidos. Cada trinca, ou códon, gera um aminoácido; nos humanos, somente 61 códons geram aminoácidos – os três restantes são códons de terminação, não especificando nenhum aminoácido. Em eucariotos, os códons de terminação são, na sua grande maioria, UAA, UGA e UAG. O códon de iniciação, tanto em procaríotos quanto em eucariotos, é o AUG, que codifica a metionina, sendo esse aminoácido,

portanto, o primeiro em todas as proteínas. Em *E. coli*, o códon GUG também pode ser utilizado.

Como se explica o fato de haver 61 códons diferentes e somente 20 aminoácidos? Em 1961, Marshall Nirenberg e colaboradores iniciaram pesquisas utilizando sistemas *in vitro* que permitiam fazer combinações e determinar quais aminoácidos correspondiam a códons específicos. Com base nesses achados, novos estudos descobriram os códons e seus aminoácidos correspondentes, percebendo-se que mais de um códon gerava um mesmo aminoácido, o que já havia sido previsto. Essa característica do código genético é chamada degeneração, por isso diz-se que o código genético é degenerado. A partir desses estudos, montou-se o quadro 2.1.

Quadro 2.1. Código genético.

		Segunda base			
		U	C	A	G
Primeira base	U	UUU Phe UUC UUA Leu UUG	UCU Ser UCC UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA Term UAG	UGU Cys UGC UGA Term UGG Trp
	C	CUU Leu CUC CUA CUG	CCU Pro CCC CCA CCG	CAU His CAC CAA Gln CAG	CGU Arg CGC CGA CGG
	A	AUU Ile AUC AUA AUG Met	ACU Thr ACC ACA ACG	AAU Asn AAC AAA Lys AAG	AGU Ser AGC AGA Arg AGG
	G	GUU Val GUC GUA GUG	GCU Ala GCC GCA GCG	GAU Asp GAC GAA Glu GAG	GGU Gly GGC GGA GGG

Apenas a metionina (Met) e o triptofano (Trp) possuem somente um códon; todos os outros aminoácidos são gerados por mais de um códon. A degeneração do código genético permite que exista mais de um tRNA para o mesmo aminoácido, ou até mesmo que um mesmo tRNA possa parear com códons diferentes. Os dois processos são possíveis, pois, caso haja apenas

uma mudança no último nucleotídeo do códon, existe a ligação do tRNA. Ocorre o que se chama pareamento oscilante, pois o pareamento com a última base é menos rígido.

O código genético, além de degenerado, possui muitas outras características: sendo um código não ambíguo – ou seja, um códon codifica apenas um único aminoácido –, o código é universal, pois é igual em todos os seres, desde bactérias até os seres humanos, o que comprova ser essa forma de armazenamento de informações muito eficiente e ter-se mantido ao longo de milhões de anos de evolução.

2.4.2 Síntese proteica

A síntese proteica é um processo complexo que envolve grande variedade de macromoléculas. Ela se dá nos ribossomos do citoplasma e nos ribossomos aderidos ao retículo endoplasmático rugoso, cujo nome deriva da presença dos ribossomos ligados à sua membrana.

Após a transcrição nos procariotos e a transcrição e o processamento nos eucariotos, o mRNA maduro está pronto para transmitir, na forma de uma proteína, as suas informações. Quando se encontra no citoplasma, o mRNA é reconhecido pelo ribossomo. Isso decorre da interação do mRNA com o rRNA do ribossomo, mediante uma sequência no mRNA, denominada sítio de ligação dos ribossomos (RBS), de 30 a 40 nucleotídeos. Essa região contém o códon AUG de iniciação e uma sequência capaz de fazer pareamento com o rRNA, chamada sequência de Shine-Delgarno. Nos eucariotos, também ocorre o reconhecimento do *cap* do mRNA, que auxilia no reconhecimento do início da tradução.

O ribossomo possui dois sítios diferentes: A e P. No sítio A, dá-se a ligação do aminoacil tRNA; no sítio P, ocorre a ligação tanto do aminoacil tRNA quanto do peptidil tRNA. Após o reconhecimento da sequência de Shine-Delgarno, o mRNA se liga ao ribossomo, ocorrendo a interação entre as duas subunidades ribossomais. A partir dessa interação, o códon de iniciação vai se localizar no sítio A do ribossomo, permitindo que se dê a interação

dele com o metionil tRNA. Após a ligação do tRNA ao códon do mRNA, o ribossomo desliza sobre o mRNA, de forma que o códon inicialmente localizado no sítio A passe a se localizar no sítio P, deixando o sítio A livre. Os ribossomos deslocam-se na direção 5'-3', sintetizando a proteína no sentido amino-terminal para carboxi-terminal. Quando o sítio A se encontra vazio, o ribossomo permite a interação de outro aminoacil tRNA, que conterà o anticódon específico do códon do mRNA que se encontra no sítio A. Assim, o segundo aminoácido é incorporado ao peptídeo em formação. A ligação entre os aminoácidos é realizada pela ação da peptidil transferase, que liga o aminoácido, ou a sequência já formada, ao aminoácido preso ao tRNA no sítio A, alongando a cadeia. O tRNA desativado, que ocupava o sítio P, deixa o complexo ribossômico para ser novamente ativado no citoplasma. Esse processo acontece incessantemente e aos poucos forma-se a estrutura primária da proteína que está sendo sintetizada. O último códon lido no mRNA deve ser um fator de término (UAA, UAG ou UGA), que não codifica nenhum aminoácido mas indica o final da síntese proteica.

A síntese proteica termina com a desativação do complexo ribossomo-mRNA, a desativação do tRNA e a formação da proteína em sua estrutura primária.

2.5 Métodos de extração de DNA

Os protocolos utilizados para a extração de DNA são muito parecidos, diferindo apenas em alguns detalhes relativos à natureza do material biológico de onde o DNA será extraído. Basicamente, consistem na lise celular e na purificação do DNA obtido.

A lise celular ocorre mediante o rompimento das membranas celulares, que libera o DNA contido no núcleo. Para esse processo, são utilizados detergentes que desestabilizam os lipídios das membranas. Nessa fase, é comum o uso de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que quelar íons bivalentes que funcionam como cofatores de DNAses, inibindo-as. Após a liberação do material genético, seguem-se as fases de purificação do DNA.

A fase de purificação consiste em reações enzimáticas ou interações entre macromoléculas que favorecem a retirada de todos os contaminantes do DNA. As principais moléculas contaminantes são as proteínas, principalmente as histonas, por estarem intimamente ligadas ao DNA e ao RNA.

O RNA é geralmente retirado através do uso de RNAses que irão degradá-lo, permitindo a sua retirada, juntamente com moléculas menores, por meio de diálise.

Os contaminantes proteicos podem ser digeridos pela ação da proteinase K; porém, o agente desproteinizante mais comum é o fenol, um excelente desnaturador de proteínas. Por ser um composto orgânico, o fenol atua desnaturando as proteínas e transferindo-as, ao mesmo tempo, para uma fase orgânica, enquanto o DNA, que não interage com o fenol, permanece na fase aquosa. O clorofórmio também é um excelente desnaturante e pode atuar em conjunto com o fenol como estabilizador da junção entre as fases aquosa e fenólica. O uso da mistura fenol/clorofórmio diminui a quantidade de solução aquosa retida na fase orgânica, melhorando o rendimento da extração. Nessa fase de desnaturação, pode ocorrer formação de espuma por causa das proteínas desnaturadas. A formação de espuma é impedida com o uso de álcool isoamílico no processo.

Após a desnaturação das proteínas, a solução é centrifugada para a total separação das fases aquosa e orgânica. A fase aquosa contém o DNA; já as proteínas desnaturadas localizam-se em um anel intermediário entre as duas fases. O DNA contido na fase aquosa é precipitado com etanol. Na presença de altas concentrações de cátions monovalentes, o etanol induz uma mudança estrutural transitória nas moléculas dos ácidos nucleicos, ocasionando sua agregação e precipitação. Os cátions utilizados na precipitação, assim como pequenas moléculas orgânicas ainda presentes na preparação, podem ser removidos por lavagem com etanol 70%. Ao final do processo, o DNA é solubilizado em água Milli-Q autoclavada e livre de nucleases, sendo armazenado em baixa temperatura. A seguir, apresenta-se um protocolo de extração de DNA genômico de células sanguíneas.

2.5.1 Extração de DNA genômico de sangue humano

Preparação do sangue

1) Transferir 300 mL de sangue total para cada tubo de centrífuga. Adicionar 900 mL de tampão para lise de células sanguíneas em cada tubo e inverter o tubo cuidadosamente, a fim de homogeneizar a mistura. Incubar a mistura em temperatura ambiente por 10 minutos, invertendo-se o tubo de vez em quando.

2) Centrifugar os tubos em uma microcentrífuga por 20 segundos, em velocidade máxima, em temperatura ambiente.

3) Descartar todo o sobrenadante, deixando cerca de 20 mL.

4) Ressuspender o *pellet*¹ de células brancas na pequena quantidade de sobrenadante deixada em cada tubo. Juntar as células ressuspensas em um único tubo.

5) Centrifugar novamente e retirar todo o sobrenadante.

2.5.2 Extração do DNA genômico

1) Ressuspender as células sedimentadas em 567 mL de Tris EDTA (TE).

2) Adicionar 3 mL de proteinase K² (20 mg/mL) e 30 mL de SDS³ 10%.

3) Incubar a mistura a 37°C por 1 hora.

4) Adicionar 100 mL de NaCl 5 M.

5) Em seguida, adicionar 80 mL de solução CTAB⁴/NaCl (CTAB 10%, NaCl 1,5 M), misturando os componentes suavemente.

6) Incubar por 10 minutos, a 65°C.

7) Adicionar 1 V (~800 mL) de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1).

8) Misturar as fases e centrifugar por 5 minutos, a 1.400 rpm, em microcentrífuga tipo Eppendorf.

9) Transferir a fase aquosa para um novo tubo.

¹ Precipitado de células.

² A proteinase K auxilia na lise celular.

³ Detergente que lisa as membranas celulares.

⁴ Brometo de trimetilamônio, um complexante de proteínas que auxilia na precipitação.

- 10) Adicionar 1 V de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1).
- 11) Misturar as fases e centrifugar por 5 minutos a 1.400 rpm em microcentrífuga tipo Eppendorf.
- 12) Transferir a fase aquosa para um novo tubo.
- 13) Adicionar 0,6 V de isopropanol; inverter o tubo várias vezes.
- 14) Centrifugar por 5 minutos, a 1.400 rpm, em microcentrífuga tipo Eppendorf.
- 15) Lavar o material com etanol 70% gelado e centrifugar por 5 minutos, a 1.400 rpm, em microcentrífuga tipo Eppendorf.
- 16) Ressuspender o *pellet* em 50 mL de água Milli-Q.

2.6 Métodos de análise e quantificação de DNA

2.6.1 Eletroforese

A **eletroforese** é a principal técnica utilizada em biologia molecular para a análise de DNA. Ela permite separar, identificar e purificar os fragmentos de DNA quando não é possível utilizar outras técnicas, como os gradientes de centrifugação. É uma técnica rápida, que permite excelente resolução dos fragmentos de DNA.

A eletroforese é utilizada na separação de várias macromoléculas e consiste na migração das partículas – nesse caso, de fragmentos de DNA – através de um gel durante a aplicação de uma diferença de potencial. Assim, em um polo da eletroforese, é fornecida carga negativa e, no outro, positiva. Como os grupos fosfatos possuem carga negativa, o DNA corre, então, do polo negativo para o positivo. Essa “corrida” se dá através de uma malha, que auxiliará na separação das moléculas. Para formar essa malha, utilizam-se géis que, quando gelificados – ou seja, quando se tornam sólidos –, formam as malhas dentro de suas estruturas. Os géis mais utilizados em biologia molecular são os de **poliacrilamida** e os de **agarose**.

O gel de poliacrilamida é formado pela reação da acrilamida com a bisacrilamida. A acrilamida é uma molécula linear, e a bisacrilamida apresenta forma de “T”. Misturando essas duas moléculas, forma-se a malha. Diferentes relações entre as concentrações dessas moléculas permitem criar diferentes gradientes de separação. Para preparar o gel de poliacrilamida, devem-se misturar as duas substâncias formadoras, nas concentrações desejadas, e adicionar o Temed, que atua como catalisador da polimerização.

O gel de agarose é formado somente por agarose. A agarose é um polissacarídeo e forma uma malha que retém as moléculas durante a migração. Dependendo da concentração de agarose, há diferenças no gradiente de separação. Quanto maior a concentração, mais fechados são os buracos da malha e maior a retenção de moléculas. Para preparar um gel de agarose, faz-se a mistura do pó de agarose com uma solução tampão. Após realizar a fusão da agarose, coloca-se brometo de etídio, um corante capaz de se intercalar entre as bases do DNA e que fluoresce quando excitado com luz UV. Por sua capacidade de interação com as bases do DNA, o brometo de etídio é considerado um corante carcinogênico, devendo o seu manuseio ser efetuado com grande cuidado. Quando a mistura esfria, o gel está sólido. Esse endurecimento é feito diretamente na cuba de corrida da amostra. Antes da total solidificação, deve-se colocar um pente de eletroforese, pois ele cria poços que serão utilizados para a colocação das amostras.

A “corrida” de DNA se dá em conjunto com duas moléculas, adicionadas à amostra de DNA. Tais moléculas são denominadas monitores de corrida. Os monitores mais utilizados são o **azul de bromofenol** e o **xilenocianol**. O azul de bromofenol possui cor azulada e corre como um DNA pequeno, ao passo que o xilenocianol possui cor esverdeada e corre como um DNA maior.

Após a corrida, o DNA é visualizado mediante transiluminação de luz UV, que excita o brometo de etídio, o qual fluoresce com uma cor alaranjada (590 nm). Para o armazenamento das informações contidas no gel, existem aparelhos com câmeras fotográficas acopladas que permitem fotografar e transferir para o computador a fotografia do gel.

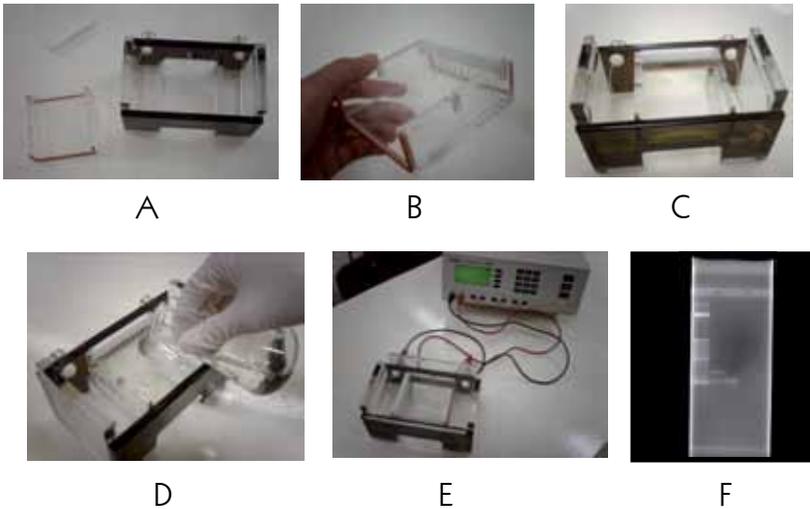


Figura 2.6. Etapas do preparo de uma eletroforese em gel de agarose: A) cuba de eletroforese horizontal com o pente e o suporte para preparo do gel; B) suporte com pente pronto para receber a agarose aquecida; C) cuba preparada para a gelificação do gel; D) agarose aquecida para preparo do gel; E) aparato de eletroforese preparado para a corrida; F) fotografia de um gel de eletroforese mostrando uma corrida de fragmentos de DNA (padrão de 50pb).

2.6.2 Espectrofotometria

A espectrofotometria é uma técnica muito utilizada na biologia, na química e na física e utiliza um aparelho denominado espectrofotômetro, instrumento que permite comparar a radiação absorvida por uma solução ao incidirmos radiação na amostra.

Cada substância é capaz de absorver uma quantidade de luz específica quando excitada com determinada quantidade de energia. A energia inserida eleva os elétrons da molécula para níveis energéticos mais altos. A energia necessária para essa elevação de nível eletrônico é específica de cada molécula e vai variar segundo as características das ligações presentes na mesma.

Em decorrência das ligações duplas presentes nas bases purínicas e pirimidínicas do DNA e do RNA, esses, quando são excitados com uma luz no

comprimento de onda de 560 nm, emitem fluorescência e podem ser detectados por **espectrofotometria**. Quanto maior a quantidade de DNA e RNA presente em determinada amostra, maior será a absorvância lida.

Para diminuir ao máximo a interferência das proteínas que ainda podem estar presentes na amostra, deve-se fazer uma leitura a 280 nm – comprimento de onda em que as ligações peptídicas das proteínas fluorescem. Para avaliar o nível de pureza dos ácidos nucleicos contidos em determinada extração, fazem-se leituras a 260 e 280 nm, analisando-se a relação 260/280. Se o resultado obtido estiver entre 1,8 e 2,0, a amostra se encontra em boas condições de análise, contendo pouca interferência de proteínas. Caso a leitura seja menor do que 1,6, será necessário novo processo de purificação dos ácidos nucleicos. Essa relação para a análise de pureza não é confiável se a amostra estiver contaminada com fenol, pois a mistura de água e fenol fluoresce a 270 nm, um comprimento de onda muito próximo dos 280 nm utilizados na medição. Para utilizar tal relação, deve-se garantir que todo o fenol tenha sido retirado da amostra no momento de seu preparo.

A espectrofotometria não indica se a amostra contém somente DNA, somente RNA, ou ambos, nem se eles estão íntegros, mas proporciona uma boa noção da quantidade na amostra, em mg, do DNA e do RNA. Para se obterem dados quantitativos, é preciso levar em consideração algumas relações matemáticas. No caso de um DNA de fita simples, como uma sonda ou um *primer*, cada unidade de absorvância a 260 nm equivale a 32,7 mg de DNA. Numa amostra de extração de DNA genômico, estima-se que em uma absorvância igual a 1 haja uma concentração de 50 mg de DNA/mL.

Em algumas preparações, a quantidade de DNA pode ser pequena e limitar bastante o uso da espectrofotometria como técnica de quantificação. Nesses casos, a técnica escolhida é a **fluorimetria**. A fluorimetria detecta nanogramas de DNA. Nesse método, a amostra é incubada com o fluorocromo Hoechst 33258 que se liga à *minor groove* do DNA. Essa característica do corante permite que ele core somente DNA íntegros e não core o RNA. É, portanto, uma técnica seletiva. Para efetuar a análise, deve-se construir uma curva de calibração do aparelho e avaliar a amostra desconhecida, interpolando os resultados lidos com a reta a fim de encontrar o valor correspondente à concentração do DNA desconhecido.

2.7 Endonucleases de restrição

As endonucleases de restrição são enzimas capazes de reconhecer e cortar o DNA em locais precisos, permitindo a obtenção de fragmentos específicos de DNA. Na década de 1950, cientistas observaram que algumas cepas de *E. coli* eram resistentes à infecção por bacteriófagos. Avanços nos estudos indicaram, e posteriormente confirmaram, que a resistência aos parasitas ocorre pela existência de um sistema de enzimas na parede da bactéria que reconhece e elimina seletivamente o DNA dos bacteriófagos.

As endonucleases de restrição pertencem a um grupo maior de enzimas, denominadas nucleases, que em geral atuam clivando as ligações fosfodiéster – ligantes de nucleotídeos adjacentes no DNA. O corte na molécula de DNA é feito mediante o reconhecimento, por parte das enzimas, de sequências específicas de 4 a 8 pares de base (pb). Essas sequências de reconhecimento variam de acordo com a enzima; uma vez identificadas, é feito um corte duplo na molécula de DNA: um em cada fita.

Existem dois tipos distintos de clivagem do DNA: 1) cortes em um mesmo eixo de simetria, gerando extremidades abruptas; e 2) cortes simétricos, que apresentam sequenciais de bases complementares, porém sem apresentar o mesmo eixo, gerando extremidades coesivas. O quadro 2.2 mostra os dois tipos de cortes e as extremidades formadas.

Quadro 2.2. Tipos de clivagem do DNA.

Extremidades coesivas (corte pela enzima EcoRV)	Extremidades abruptas (corte pela enzima BamHI)
5' G↓GATCC 3' 3' CCTAG↓G 5'	5' GAT↓ATC 3' 3' CTA↓TAG 5'

Mais de cem tipos de enzimas de restrição foram identificados e purificados. A identificação de cada uma dessas enzimas é feita pela abreviação do nome do microrganismo do qual a enzima foi isolada, seguida de algarismos romanos (ou outras letras) que representam a ordem da descoberta ou a linhagem à que a bactéria utilizada pertence. Por exemplo, a enzima Hind III foi

isolada da linhagem d III da bactéria *Haemophilus influenzae*. O quadro 2.3 traz a relação de algumas das principais enzimas de restrição, o organismo de origem e o local de clivagem.

Quadro 2.3. Relação das principais enzimas de restrição.

Enzima	Organismo fonte	Local de clivagem
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5' G ↓ GATCC 3'
BglII	<i>Bacillus globigii</i>	5' A ↓ GATCT 3'
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> RY13	5' G ↓ AATTC 3'
EcoRV	<i>Escherichia coli</i> R321	5' GAT ↓ ATC 3'
HaeIII	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5' GG ↓ CC 3'
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	5' A ↓ AGCTT 3'
HpaII	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	5' C ↓ CGG 3'
NotI	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	5' GC ↓ GGCCGC 3'
PstI	<i>Providencia stuartii</i> 164	5' CTGCA ↓ G 3'
SmaI	<i>Serratia marcescens</i> Sb	5' CCC ↓ GGG 3'

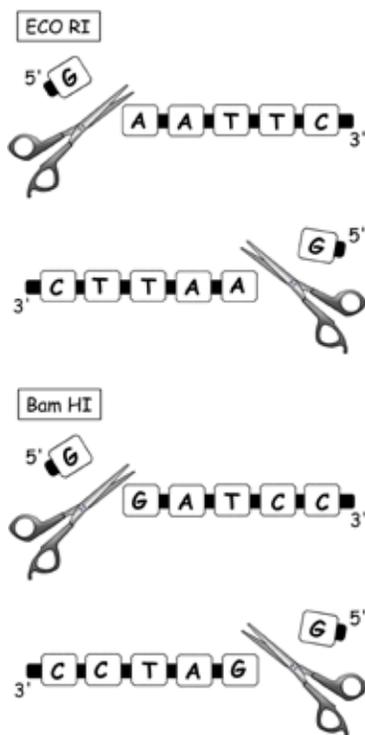


Figura 2.7. Funcionamento das endonucleases de restrição.

2.8 Hibridação molecular

O processo de hibridação do DNA é um dos principais processos para detecção de um gene em particular ou de um segmento específico de ácido nucleico. Apesar de existirem algumas variações do método clássico de hibridação, os procedimentos básicos desses métodos se assemelham em muitos pontos.

Na técnica, um papel de nitrocelulose é prensado numa placa de ágar com colônias individuais de bactérias oriundas de uma biblioteca, contendo cada bactéria um DNA recombinante diferente. Ao tocar a placa com o papel, algumas bactérias ficam aderidas, fornecendo uma “cópia” da placa. O papel é, então, tratado com substâncias alcalinas que provocam a destruição das células e a desnaturação do DNA presente, o qual permanece aderido ao papel no local da colônia de origem.

Após essa etapa, é adicionada ao papel a sonda de DNA marcada com nucleotídeos radioativos, que somente vai ligar-se ao DNA complementar. Como as moléculas de DNA foram desnaturadas pela adição do álcali, elas se encontram no formato de fita simples, e isso permite o pareamento com o DNA marcado (anelamento). O papel é lavado para a retirada da sonda de DNA que não foi anelada. Ao final, o DNA hibridado (que anelou com a sonda de DNA) pode ser detectado por autorradiografia.

2.8.1 Técnicas de hibridação

Os métodos de eletroforese em gel são fundamentais para separar moléculas de DNA de diferentes tamanhos. Assim como as proteínas, os ácidos nucleicos apresentam grupamentos químicos com cargas elétricas. Porém, enquanto as proteínas apresentam grupamentos positivos e negativos, os ácidos nucleicos só apresentam cargas negativas, provenientes dos radicais fosfatos presentes em sua molécula.

Fragmentos de DNA contendo menos de 1.000 nucleotídeos são separados por géis de poliacrilamida. Entretanto, como os poros desses géis são muito pequenos para permitir a passagem de moléculas maiores de DNA, utiliza-se a eletroforese em gel de agarose, um polissacarídeo extraído de algas

marinhas. A eletroforese em gel de agarose é o método mais utilizado nas análises de fragmentos de DNA e RNA. Cromossomos inteiros, contendo milhões de nucleotídeos, podem ser separados por uma técnica de eletroforese em gel de agarose intitulada eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (do inglês *pulsed field gel electrophoresis*).

As amostras formam bandas invisíveis, que ficam situadas em diferentes posições do gel de agarose ou poliacrilamida, e é necessário que as bandas de DNA sejam coradas ou marcadas. Um método de boa sensibilidade para corar o DNA é a utilização do brometo de etídio. Outro método de detecção ainda mais sensível consiste na incorporação de um radioisótopo nas moléculas de DNA. Um fragmento de restrição contendo uma sequência específica de bases pode ser identificado mediante hibridação a um filamento complementar de DNA marcado radioativamente. O radioisótopo ^{32}P , por sua capacidade de se incorporar ao fosfato do DNA, é muito utilizado para isso. Um fragmento de interesse de DNA é separado de um conjunto de moléculas por eletroforese em agarose, desnaturado para formar um único filamento e, em seguida, transferido para um suporte de nitrocelulose, onde é exposto a uma sonda marcada com ^{32}P complementar à sua sequência. O fragmento de DNA contendo a sequência é visualizado por autorradiografia. Essa técnica foi desenvolvida pelo bioquímico britânico Edwin Southern, sendo chamada *Southern blotting*. O *Northern blotting* é utilizado para detectar RNA e segue o mesmo protocolo do *Southern blotting*. A transferência de *Western blotting* é uma técnica que detecta proteínas por coloração, por meio do emprego de anticorpos específicos.

2.9 Clonagem de DNA

2.9.1 Clonagem

O fenômeno da clonagem é aquele no qual um organismo, ou uma célula, é formado a partir de outro por meio de um tipo de reprodução assexuada, mantendo-se, em geral, seu conjunto de genes.

A existência dos clones é algo comum na natureza. Muitos protozoários, bem como as bactérias e alguns tipos de fungos, reproduzem-se por clonagem. E até mesmo as nossas células, ao realizarem o tipo de divisão celular conhecida como mitose, efetuam um processo de clonagem. Com os avanços da biotecnologia, os cientistas passaram a ser capazes de clonar organismos inteiros. A ovelha Dolly foi o primeiro deles.

Por conta do desenvolvimento de novas técnicas de engenharia genética, pode-se isolar um gene específico (ou um conjunto de genes) de um organismo e introduzi-lo em outro de espécie diferente, permitindo sua multiplicação junto com a reprodução do organismo receptor.

2.9.2 Clonagem de DNA

Na biologia molecular, clonagem consiste na produção de cópias exatas de genes ou de grupo de genes (fragmentos de DNA). Nessa técnica, o DNA é retirado de uma matriz (uma suspensão celular ou um fragmento de tecido) e digerido por endonucleases de restrição. Os fragmentos gerados contêm os genes de interesse, que são ligados a um vetor de clonagem, geralmente um plasmídeo.

Um vetor de clonagem é uma estrutura de DNA com capacidade de se introduzir em células bacterianas, um processo conhecido como transfecção. Um dos vetores de clonagem mais utilizados são os plasmídeos. Os plasmídeos são moléculas circulares de DNA presentes em bactérias nas quais geralmente se encontram os genes responsáveis pela resistência a antibióticos. Entretanto, é importante lembrar que existem vários outros vetores de clonagem, bem como diferentes formas de se fragmentar e clonar o DNA.

O primeiro passo da clonagem é a extração do DNA de uma célula doadora qualquer e também do plasmídeo que servirá de vetor. A extração de DNA apresenta uma série de protocolos diferentes, sendo o fundamento básico acessar o DNA presente em determinado compartimento celular para depois separá-lo dos demais componentes celulares (lipídios, proteínas, RNA etc.).

A principal diferença entre a extração de DNA genômico e a extração do plasmídeo é a necessidade, na extração desse último, de se separar o plasmídeo do DNA bacteriano. Para que essa separação seja possível, utiliza-se a característica do plasmídeo de ser uma molécula muito menor do que os fragmentos de DNA cromossômico da bactéria.

Certa quantidade de substância alcalina (básica) é adicionada na solução de lise celular. Essa substância provoca a elevação do pH, que acaba por desnaturar as moléculas de DNA (plasmidial ou cromossômico). Em seguida, é adicionado ácido acético, que neutraliza o álcali, e acetato de potássio. Após a neutralização, os fragmentos de DNA tendem a refazer a molécula original. Entretanto, o sal (acetato de potássio) provoca a precipitação de todas as moléculas que não são muito solúveis em água. Os fragmentos grandes formados pela desnaturação do DNA cromossomial não conseguem se renaturar com rapidez suficiente e, por serem insolúveis, precipitam junto com os restos celulares e proteínas da bactéria. O DNA plasmidial, ao contrário, por causa de seu menor tamanho, regenera-se rapidamente, com o que aumenta a sua solubilidade na água e evita a sua precipitação. Dessa forma, ao se recolher o sobrenadante após uma centrifugação, teremos essencialmente o DNA plasmidial. Uma vez que se tenham os dois tipos de DNA (da célula doadora e o plasmidial), a fase seguinte consiste em clivar ambos com a enzima de restrição escolhida, misturando-os depois em uma solução contendo enzimas ligases, o que permitirá o pareamento dos fragmentos e a reconstrução das ligações fosfodiéster em cada fita de DNA. Essa união entre o fragmento de DNA (inserto) e o plasmídeo (vetor) forma o que chamamos **DNA recombinante**.

O DNA recombinante deve ser introduzido na célula hospedeira para que ela possa replicar-se e, conseqüentemente, replicar o(s) gene(s) do inserto. Isso é obtido, em um processo passivo, por meio das membranas plasmáticas das bactérias previamente tratadas com solução de cloreto de cálcio, ou ativo, pelo uso de descargas elétricas que abrem os poros das células, processo denominado eletroporação. Veremos ambos os métodos a seguir.

2.10 Transformação bacteriana

O processo de transformação bacteriana consiste na introdução de um vetor dentro da bactéria. Esse processo é chamado transformação por causa das novas características que podem ser adquiridas pela bactéria com a introdução do vetor (como a resistência a determinados antibióticos). Existem basicamente dois processos distintos: a eletroporação e a transformação com cloreto de cálcio.

A eletroporação é a união das bactérias e dos vetores em um único tubo, submetido a uma descarga elétrica com o intuito de provocar a desestabilização da membrana plasmática da bactéria e permitir a entrada do vetor. Após essa etapa, as bactérias são transferidas para um meio de cultura e incubadas a 37°C, a fim de que possam se recuperar do choque recebido.

Na transformação com cloreto de cálcio, misturam-se, em um único tubo, as bactérias, o vetor e o cloreto de cálcio. O cloreto de cálcio dissocia-se na solução, liberando íons cálcio (cátions) que irão neutralizar a carga negativa do DNA. Com o choque térmico, a membrana da bactéria desestabiliza (ele tem, portanto, o mesmo papel do choque elétrico), e o DNA, com sua carga neutralizada pelos íons de cálcio, entra facilmente na bactéria.

Após a transformação, as bactérias são colocadas em meios de cultura e incubadas para que possam se multiplicar e formar colônias. A distinção entre as bactérias que possuem o vetor e aquelas que não possuem é feita mediante as características conferidas pelos plasmídeos. Se o plasmídeo confere resistência a determinado antibiótico, o plaqueamento das bactérias em um meio com esse antibiótico selecionará somente aquelas que são resistentes (transformadas), matando as demais.

2.11 Biblioteca genômica

A biblioteca genômica é uma coleção de fragmentos de DNA que representa o genoma inteiro de um organismo ou de uma célula, coleção adquirida pelo processo de clonagem. Dependendo da fonte de DNA utilizada, há uma variedade de formas de bibliotecas genômicas. Uma das formas mais comuns

é aquela na qual a biblioteca é formada pela clivagem do genoma inteiro de determinado organismo em milhares de fragmentos que serão clonados por inserção em determinado vetor de clonagem.

Primeiramente, o DNA a ser clonado é parcialmente digerido por uma endonuclease de restrição, gerando fragmentos grandes, mas com tamanhos diferentes. Esses fragmentos de DNA de tamanhos diferentes são separados por eletroforese em gel, para se separar um tamanho específico de fragmento, que será escolhido em razão do vetor a ser utilizado – por exemplo, um bacteriófago (fago λ). Após a inserção do fragmento no vetor, promove-se a transformação bacteriana, e o lisado resultante apresenta fragmentos de DNA do organismo escolhido em um grande número de fagos, o que garante que praticamente todo o genoma esteja ali representado. Esses fagos recombinantes constituem a biblioteca genômica. O organismo pode ser propagado milhares de vezes, o que permite a utilização da biblioteca por longos períodos.

2.12 A reação em cadeia da polimerase (PCR)

O Projeto Genoma Humano (PGH) permitiu avanços tecnológicos que ampliaram a capacidade de acesso a informações relativas à sequência de genes de um organismo. Enquanto o sequenciamento do genoma completo de um organismo apresenta como etapa intermediária a criação de uma ou mais bibliotecas, a clonagem de um gene pode ser feita de maneira rápida, sem ajuda da biblioteca, visto que a sequência genômica já está completa. Se soubermos pelo menos uma parte da sequência do gene a ser clonado, podemos gerar milhares de cópias pelo processo conhecido como reação em cadeia da polimerase (PCR) (do inglês *polymerase chain reaction*).

A reação é preparada a partir de uma solução contendo a amostra de DNA que se quer amplificar, uma DNA polimerase estável ao calor (Taq polimerase), quatro tipos de deoxinucleotídeos trifosfatados (nucleotídeos com as bases nitrogenadas A, T, C e G, chamados de dNTPs), além de dois oligonucleotídeos chamados *primers*. Os *primers* são oligonucleotídeos complementares às duas extremidades (5' e 3') do fragmento a ser amplificado.

No início, as enzimas utilizadas na PCR não resistiam às altas temperaturas necessárias para a desnaturação da molécula de DNA, o que implicava a adição de grandes quantidades de enzimas a cada novo ciclo de amplificação. Com a descoberta da enzima termostável Taq DNA polimerase, isolada da bactéria de fontes termais *Thermus aquaticus*, resistente a temperaturas de até 117°C (com temperatura ótima de 72°C), foi possível a realização da reação sem que houvesse necessidade de adição de novas quantidades de enzimas. A utilização de Taq polimerase e a criação de termocicladores (equipamento que automatiza os ciclos de temperatura) mais eficientes tornaram a técnica mais fácil e barata.

Após o preparo da mistura para a reação, a amostra é colocada em um termociclador, onde será submetida a ciclos térmicos que se alternam entre temperaturas elevadas e temperaturas mais baixas. A alta temperatura causa a desnaturação da molécula de DNA, desfazendo as pontes de hidrogênio e separando as duas fitas complementares. Por outra parte, a diminuição da temperatura permite a hibridação das extremidades do fragmento de DNA com os oligonucleotídeos complementares (*primers*). A enzima Taq polimerase utiliza os nucleotídeos para polimerizar uma nova sequência de DNA complementar ao fragmento de interesse. O DNA original é utilizado como molde para a construção da nova sequência – o molde é chamado de *template*. Um novo ciclo é iniciado com a desnaturação dos fragmentos e a síntese de novos fragmentos em temperaturas baixas. Dessa maneira, a cada novo ciclo, aumenta-se a quantidade de cópias do fragmento de DNA a ser amplificado. Ao final da reação, o produto apresenta grande quantidade de DNA amplificado junto com o DNA original do início.

Em outras palavras, podemos separar as fases da reação de polimerase em três etapas: separação dos filamentos do DNA (desnaturação), hibridação de *primers* (anelamento) e síntese de DNA (extensão).

A separação dos filamentos ocorre por desnaturação do DNA. Nessa etapa, os dois filamentos da molécula de DNA são separados por aquecimento da solução a temperaturas próximas de 95°C.

A hibridação de *primers* (oligonucleotídeos) consiste no anelamento ou pareamento de cada par de *primers* a um filamento de DNA. A solução é

abruptamente resfriada para a temperatura específica de anelamento do *primer* utilizado, permitindo sua ancoragem e a delimitação da região específica a ser amplificada pela DNA polimerase.

A síntese de DNA ocorre com o aquecimento da solução a 72°C, temperatura ótima para a Taq DNA polimerase, que faz a extensão dos dois *primers* de oligonucleotídeos. A Taq polimerase sintetiza um novo fragmento de DNA a partir da fita molde original.

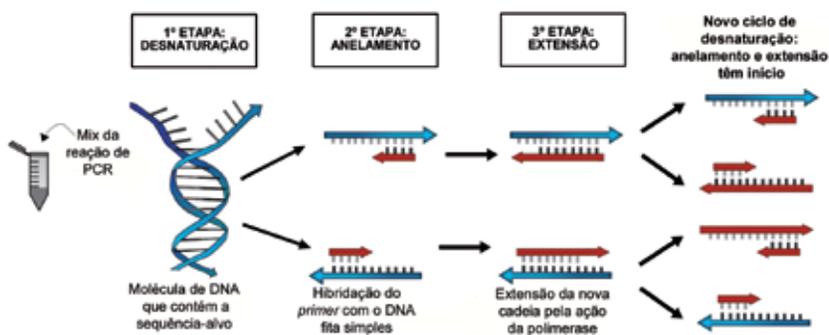


Figura 2.8. Representação das etapas sequenciais da reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.13 Sequenciamento de DNA

Métodos de sequenciamento do DNA são importantes para a determinação das sequências de nucleotídeos de um fragmento de DNA, permitindo o sequenciamento completo de dezenas de milhares de genes. Vários organismos tiveram seus genomas completamente decifrados – inclusive o homem, no Projeto Genoma Humano (PGH).

O Projeto Genoma Humano teve início nos Estados Unidos em 1990. Seus principais objetivos foram os de identificar e mapear os genes dos 23 pares de cromossomos humanos, determinar a sequência de todas as bases do nosso genoma, armazenar essas informações em bancos de dados para analisá-las e desenvolver métodos eficientes para usar essas informações na biologia e na medicina.

No dia 6 de abril de 2000, a firma americana Celera Genomics anunciou a obtenção da sequência do genoma humano, e a publicação da análise da sequência do genoma humano foi feita em fevereiro de 2001. Por meio do PGH, foi possível descobrir que o genoma humano possui entre 30 mil e 50 mil genes. Partindo-se da ideia de que cada nucleotídeo do DNA é representado por uma letra correspondente à sua base nitrogenada (A, T, C ou G), seria possível escrever um “livro genômico humano” com aproximadamente 840 mil páginas.

Inicialmente, os processos de sequenciamento de DNA eram realizados manualmente. Isso consumia muito tempo, dinheiro e esforços dos pesquisadores envolvidos. Atualmente, com o avanço na tecnologia de sequenciamento, é possível a leitura de 500 mil nucleotídeos em apenas um dia.

2.13.1 Sequenciamento de Sanger

No ano de 1977, Frederick Sanger, na Inglaterra, desenvolveu um método que se tornou a base para todo o sequenciamento moderno de DNA. O método consiste na incorporação aleatória de dideoxinucleotídeos trifosfatos (ddNTPs), em uma fita de DNA, pela enzima DNA polimerase. As ddNTPs, ao contrário dos deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), não possuem em sua estrutura uma hidroxila na posição 3'. Assim, a síntese da fita de DNA é paralisada sempre que a DNA polimerase incorpora uma ddNTP na nova fita.

A primeira etapa da reação consiste na desnaturação da molécula de DNA, formando fitas simples que servirão de molde para a DNA polimerase. É necessária a presença de sequências iniciadoras, os *primers*, para que a DNA polimerase possa começar a atuar. Além disso, a solução deve conter baixas concentrações de ddNTP e altas concentrações de dNTP. No decorrer da reação, a DNA polimerase utiliza os dNTPs para a síntese na nova fita de DNA até que, aleatoriamente, utiliza uma ddNTP, a qual, por não possuir uma hidroxila na posição 3', interrompe a polimerização da nova cadeia.

A inclusão de marcadores fluorescentes de cores diferentes para cada ddNTP permite a identificação da cadeia truncada (que não foi capaz de

terminar a polimerização em virtude da adição da ddNTP), independentemente do tamanho do fragmento. Os fragmentos são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida. Existem equipamentos (sequenciadores automáticos) capazes de distinguir os quatro tipos de ddNTP existentes em razão da captação de sua fluorescência. A ordem em que os diferentes fragmentos passam pelo detector de fluorescência indica a sequência dos nucleotídeos da cadeia complementar ao DNA molde, determinando assim a sequência original.

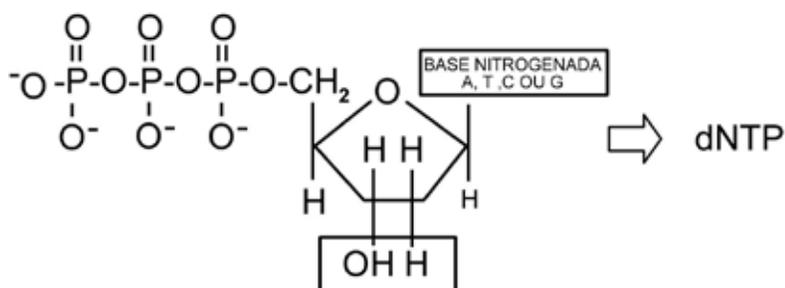


Figura 2.9. Desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dNTP).

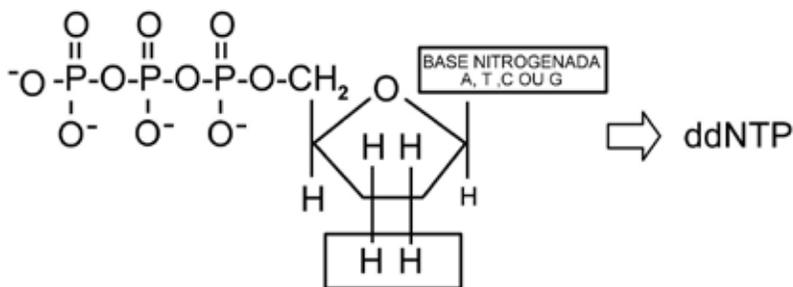


Figura 2.10. Didesoxirribonucleosídeos trifosfatos (ddNTP).

2.13.2 Exemplo de processo metodológico de análise de ácidos nucleicos

Muitos são os métodos utilizados na manipulação e análise de ácidos nucleicos. A seguir, apresentamos um exemplo de processo metodológico muito

utilizado atualmente, denominado polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP, do inglês *restriction fragment length polymorphisms*).

2.13.2.1 Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição

Apesar dos mecanismos bioquímicos existentes para que erros sejam evitados durante a duplicação do DNA, existe uma taxa de mutação constante no genoma de todas as espécies. Essas mutações, nem sempre perceptíveis – pois podem estar localizadas em regiões não codificantes (íntrons ou regiões intergênicas) –, são chamadas polimorfismos e podem ser de grande importância, por exemplo, no entendimento da evolução de determinados genes e na detecção de susceptibilidade genética a determinadas doenças.

A técnica de RFLP baseia-se na hidrólise do DNA com enzimas de restrição específicas e posterior separação dos fragmentos gerados pela digestão por eletroforese. Dessa maneira, busca-se reconhecer modificações do DNA que possam estar presentes dentro da sequência de reconhecimento das enzimas de restrição. Então, um indivíduo que apresente uma modificação no genoma que impossibilite a clivagem por determinada enzima de restrição pode ser identificado por meio da comparação com outro da mesma espécie e que não apresente essa modificação, o que não impossibilita a clivagem do DNA. Com a realização da eletroforese, pode-se comparar o tamanho das amostras de DNA e inferir sobre uma possível alteração ou não. O RFLP pode ser aplicado em DNA plasmidial ou DNA cromossômico.

- **Eletroforese**

Primeira etapa: extração de DNA

A retirada do DNA da matriz escolhida pode seguir protocolos variados. Geralmente o DNA genômico é extraído de uma camada de células brancas separadas (*buffy-coat*) ou do sangue total.

Podem ser utilizados *kits* comerciais para o processo de extração. Seja como for, o processo baseia-se em dois procedimentos básicos: rompimento das membranas celulares (geralmente com detergentes), permitindo a liberação

do DNA; e tratamentos químicos ou enzimáticos, como RNA, proteínas e outras moléculas, para purificar a amostra de contaminantes.

Segunda etapa: amplificação

Após a extração do DNA da matriz escolhida, é preciso amplificar o fragmento específico do material genético de interesse. Para isso, utiliza-se a técnica de PCR anteriormente descrita. Em geral, o procedimento é o mesmo, contendo apenas algumas modificações.

A escolha dos *primers* responsáveis por selecionar a região correta do genoma escolhido a ser amplificada dependerá do produto desejado ao final da amplificação. Da mesma maneira, as condições de temperatura do termociclador dependem das características físico-químicas dos *primers* utilizados. Após essa etapa, o analisador terá uma quantidade suficiente de DNA, e ele poderá ser quantificado por métodos espectrofotométricos.

Terceira etapa: purificação do DNA

A etapa de purificação consiste na eliminação de substâncias indesejáveis à análise, deixando-se somente o ácido nucleico de interesse. A escolha do processo de purificação depende de vários fatores, como as substâncias “contaminantes” de sua amostra, o grau de pureza de que sua análise necessita e a disponibilidade financeira e temporal do projeto desenvolvido. Alguns protocolos de purificação de ácidos nucleicos podem ser muito rápidos. No entanto, dependendo da complexidade da amostra analisada, o método mais rápido pode não ser o mais adequado. O mesmo ocorre em relação ao custo.

Quarta etapa: digestão

O tratamento com enzimas de restrição é comumente chamado digestão. A digestão gera fragmentos de tamanhos específicos de pares de base, que podem ser identificados por eletroforese em gel de agarose. Aqueles fragmentos de menor peso molecular migram mais rapidamente do que os de maior peso molecular.

Quinta etapa: eletroforese

Após as etapas de amplificação, purificação e digestão, são realizadas eletroforeses, para a análise do produto, em gel de agarose. Depois da eletroforese, o gel é corado com brometo de etídio. O tamanho dos fragmentos (bandas) é determinado pela comparação com um DNA-padrão colocado no mesmo gel em que estão as amostras. Esse DNA-padrão é comercializado por empresas especializadas, e contém moléculas que geram bandas de tamanhos específicos de pares de bases. O intervalo entre as bandas pode representar um salto de 50 ou de 100 pares de bases, dependendo do padrão adquirido.

2.14 O DNA e as ciências forenses

Cada indivíduo possui seu DNA próprio, com exceção de gêmeos idênticos. Mesmo em indivíduos da mesma espécie, o DNA é muito semelhante em vários aspectos, pois são necessárias sínteses das mesmas proteínas para as atividades de um organismo de mesma espécie.

Como descrito anteriormente, cada proteína possui um gene no DNA responsável por sua codificação. Assim, no momento da tradução, aquela sequência do mRNA obtida a partir de nucleotídeos complementares do DNA gerará a proteína necessária para o perfeito funcionamento da célula. Porém, em eucariotos, vale ressaltar a presença de íntrons, isto é, pedaços do DNA que não codificam nenhuma proteína e por isso não são utilizados. Seria lógico pensar que, caso houvesse uma mutação nesses pedaços do DNA, não haveria alteração na vida do indivíduo, pois esse íntrons não são utilizados. O que ocorre é exatamente isso. Os éxons são extremamente conservados para que se possa preservar o proteoma do indivíduo, mas os íntrons são passíveis de variadas mutações.

Esse fato foi constatado por Alec Jeffreys, um geneticista inglês. A partir de seus estudos com a mioglobina, ele percebeu que havia um pequeno trecho do DNA que se repetia continuamente. Jeffreys também percebeu que esse trecho não fazia parte somente do DNA da mioglobina, mas do genoma. Em 1980, outros dois geneticistas, Ray White e Arlene Wyman, perceberam

que o número de repetições do trecho descrito por Jeffreys variava de indivíduo para indivíduo.

O trecho descrito por Jeffreys era uma sequência curta de quatro nucleotídeos – GATA –, que se repetiam de forma variável em cada indivíduo. Surgiu, assim, a técnica de *DNA fingerprinting* (impressão digital de DNA), pois a análise do número de repetições desses trechos permite individualizar uma pessoa. Tais trechos foram denominados microssatélites ou STRs (do inglês *shot tandem repeats*, ou seja, repetições curtas consecutivas). É a análise dos STRs que permite, atualmente, correlacionar amostras de DNA a amostras de determinado indivíduo, sendo importante instrumento técnico na medicina forense.

A técnica de *DNA fingerprinting* se inicia com a extração do DNA de amostras coletadas da vítima ou de algum suspeito. Qualquer tipo de fluido biológico ou amostra de tecido que contenha células pode ser utilizado para a análise de DNA. As amostras mais utilizadas atualmente são sangue, sêmen (no caso de crimes sexuais), células do epitélio da bochecha, amostras de biópsias de tecidos moles e ossos, e pelos e cabelos que contenham células do bulbo capilar, entre outras. O DNA obtido é tratado pela técnica RFLP, método que se baseia em clivagens feitas por enzimas de restrição (enzimas que clivam o DNA em determinados pontos específicos), gerando fragmentos de DNA de diferentes tamanhos e sequências específicas. Em seguida, esses fragmentos são separados por eletroforese, marcados e analisados. O perfil formado será específico de cada indivíduo, dado que os fragmentos formados pelas enzimas de restrição, os microssatélites, têm quantidade variável de indivíduo para indivíduo.

Essa técnica revolucionou a ciência forense, pois permitia correlacionar com precisão determinado vestígio de algum suspeito. Sua única limitação era a grande quantidade de DNA necessária, só conseguida em algumas amostras. Com a descoberta da técnica de PCR, esses fragmentos puderam ser amplificados, ou seja, a quantidade de DNA obtida podia ser aumentada, permitindo que amostras com pequenas quantidades de DNA também fizessem parte do rol de amostras coletadas na cena do crime. Atualmente, uma quantidade de apenas vinte células é suficiente para a identificação do DNA. A quantidade de DNA obtida é de cerca de 1 a 20 ng.

Todo exame de DNA utiliza um cálculo que determina a raridade da combinação entre perfis encontrados nas amostras. Esse cálculo determina a probabilidade de o DNA da amostra combinar com o de determinado indivíduo. Esse cálculo é baseado na comparação do padrão de polimorfismo – presença numa população de uma ou mais formas de determinado gene ou de determinada sequência do genoma – com bancos de dados de uma população específica. Para essa análise, deve-se conhecer com que frequência a combinação de fragmentos ocorre no grupo onde se insere o indivíduo suspeito, para estimar assim a confiabilidade do exame.

Atualmente, a identificação por DNA é utilizada pela perícia técnica para elucidar diversos acontecimentos. É uma técnica fundamental na identificação de suspeitos de crime sexual, pois é capaz relacionar o DNA encontrado no sêmen deixado na vítima com amostras de DNA de suspeitos. Em catástrofes, a análise de DNA permite a identificação de corpos carbonizados ou em estado muito avançado de decomposição. Para essa análise, utiliza-se o DNA mitocondrial, que possui características oriundas somente da mãe, mas que também, quando comparado ao DNA genômico, apresenta grande estabilidade. Também é possível identificar cadáveres mutilados e partes de órgãos de determinados indivíduos, e relacionar objetos a determinado crime. Uma faca contendo sangue pode ser fonte de identificação do DNA do agressor, que, ao segurá-la sem o uso de luvas, transfere elementos celulares para o cabo do instrumento.

Além da identificação, a análise de DNA também é capaz de estabelecer a paternidade de um indivíduo, técnica utilizada fora do âmbito criminal. O teste de paternidade é possível porque o DNA de um indivíduo é formado por alelos do DNA da mãe e alelos do DNA do pai. Assim, os STRs têm perfis que se assemelham, em parte, aos alelos do pai e, em parte, aos alelos da mãe. Nesse tipo de teste, procede-se à análise dos DNAs do filho, da mãe, do suposto pai e de uma mistura entre o DNA do filho e o do suposto pai. O padrão formado no gel de agarose do DNA do filho deve ter relação, em parte, com o DNA de seus pais. Caso essa relação não ocorra, a paternidade, e até mesmo a maternidade (procedimento utilizado no caso de troca de bebês em maternidades) não serão confirmadas.

Apesar de muito útil, essa técnica possui várias desvantagens. As amostras utilizadas devem ser coletadas de forma tal a não se degradarem até a chegada ao laboratório e não se misturarem com outras amostras. Além disso, é preciso impedir as trocas nos materiais coletados pelo perito. Por isso, é fundamental a preservação correta do local de crime, além do treinamento para o aprimoramento das técnicas de coleta. Outra desvantagem do método é a expressão da probabilidade de acerto em razão da averiguação em bancos de dados com estatísticas sobre o DNA de determinada população: o fato de duas amostras possuírem o mesmo perfil para um grupo de STRs não significa que tenham origem comum. A interpretação dos testes depende das frequências populacionais para cada marcador genético utilizado. Por isso, quando ocorre o mesmo perfil para um grupo de STRs, é preciso expressar numericamente a sua significância.

A maior limitação do teste de DNA é a necessidade de haver suspeitos em potencial para a comparação de amostras coletadas das vítimas ou do local do crime. Muitos países – como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Alemanha e França – possuem bancos de dados genéticos de indivíduos anteriormente condenados. Assim, quando se obtém determinada amostra de DNA, é possível compará-la com todos os DNAs do banco de dados, o que permite relacionar ao crime investigado suspeitos até então inimagináveis.

Os bancos de DNA contêm informações genéticas de determinados indivíduos e, em sua grande maioria, são de caráter forense. Porém, o uso desses dados pressupõe contrabalançar os direitos do indivíduo e os interesses coletivos. Muitos são os aspectos a serem avaliados no uso de um banco de dados desse tipo, já que muitos temores o circundam. É isso porque as informações contidas no DNA são muito mais amplas do que as contidas em impressões digitais. Pelo estudo do DNA de um indivíduo, podem-se estabelecer traços de sua personalidade – um exemplo disso é o fato de homens com um cromossomo Y a mais (XYY) possuírem, na maioria dos casos, comportamento agressivo – ou revelar possíveis doenças que serão desenvolvidas por uma pessoa – como o câncer ou patologias cardíacas –, o que pode levar à discriminação genética.

No Brasil, não há lei que regule o uso do exame de DNA para fins de identificação criminal. Ainda está em discussão uma lei que permita

a inclusão da análise de DNA nos procedimentos de identificação utilizados rotineiramente, como a fotografia e a papiloscopia, na identificação de detentos indiciados ou acusados de crimes de homicídio doloso, de receptação qualificada e contra a liberdade sexual, dentre outros.

2.15 Utilizações complementares do DNA

2.15.1 *Transgênicos*

O desenvolvimento da engenharia genética permitiu a retirada de genes de uma espécie e sua introdução em um indivíduo de espécie diferente. Com essa nova ferramenta nas mãos, o ser humano foi capaz de reproduzir genes de interesse, criando o que chamamos de organismos geneticamente modificados (OGMs).

A produção de OGMs é parte da nova era da biotecnologia. No Brasil, a lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, estabelece normas de segurança para atividades que envolvem organismos geneticamente modificados, definindo-os como organismos cujo material genético (DNA ou RNA) tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética. Esses indivíduos são constantemente confundidos com os organismos transgênicos, porém nem todos os organismos geneticamente modificados são transgênicos. Os transgênicos são organismos que receberam em sua constituição genética genes de organismos de outras espécies. Aqueles organismos que tiveram seus genes alterados apenas quanto à sua posição ou expressão não são considerados transgênicos.

Os transgênicos têm sido utilizados de forma mais significativa na agricultura, pois com a técnica da transgenia é possível criar plantas resistentes a pragas e a agrotóxicos, organismos resistentes a solos inadequados ou a condições climáticas desfavoráveis ou, até mesmo, organismos capazes de produzir nutrientes específicos de interesse alimentício ou industrial.

Muitas são as discussões acerca dos transgênicos, mas elas podem ser classificadas em quatro dimensões: saúde, agricultura, meio ambiente e ética. No que se refere à saúde, o maior problema é a possibilidade de os organismos transgênicos produzirem toxinas desconhecidas. A introdução de um novo gene pode levar à produção de uma proteína não existente antes no alimento, aumentando as chances de reações alérgicas à nova substância.

Em relação à agricultura, os problemas são vários, como a dependência dos agricultores de indústrias químicas que produzem sementes transgênicas como as agrotóxico-resistentes – por exemplo, as sementes de soja da variedade Roundup Ready®, produzidas pela Monsanto, que resiste ao herbicida Roundup, também produzido por ela. Além disso, a dispersão natural, pelo vento ou pela chuva, de sementes transgênicas traz o risco de contaminação de plantações não transgênicas, acarretando problemas financeiros e jurídicos.

Os impactos ao meio ambiente ainda são muito discutidos entre produtores de transgênicos e investigadores da área. Por exemplo, o fato de ocorrerem modificações bioquímicas do solo (visto que qualquer ser vivo é capaz de intervir e modificar o meio em que vive) causadas por organismos transgênicos e modificações nas frequências gênicas das populações primitivas.

A questão ética permeia todas as demais discussões a respeito dos transgênicos. Os motivos que movem a sua utilização são alvo de críticas científicas e religiosas, fazendo que a transgenia seja sempre um assunto polêmico.

2.15.2 Projeto Genoma Humano

Após a descoberta da molécula de DNA e de sua forma de funcionamento em processos como a síntese proteica, bem como na determinação das características herdadas, grande parcela dos cientistas se dedicou a projetos que visavam à utilização dos conhecimentos de genética para o desenvolvimento da espécie humana. Sem dúvida, o mais ambicioso deles foi o Projeto Genoma Humano, um consórcio internacional idealizado, no final da década de 1980, por James D. Watson – prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1962 e descobridor, ao lado de Francis Crick, da estrutura em dupla

hélice da molécula de DNA —, com o objetivo de caracterizar todos os seres humanos com base na sequência de nucleotídeos de seu genoma. Acreditava-se que, em virtude do seu papel essencial no processo de síntese proteica, o DNA tinha enorme importância na determinação de características bioquímicas e fisiológicas do organismo humano.

Além dos Estados Unidos, vários países participaram do projeto, entre eles Alemanha, França, Inglaterra e Japão. Nos Estados Unidos, que centralizaram as pesquisas, houve a participação de duas frentes importantes: uma pública e outra privada. A frente pública, representada pelo Consórcio Internacional para o Sequenciamento do Genoma Humano, foi dirigida por Francis Collins. A iniciativa privada ficou a cargo da empresa Celera Genomics, liderada por Craig Venter. Mesmo não tendo sido harmônica em todos os momentos, a colaboração entre essas duas frentes propiciou a finalização do projeto em 2003.

O termo genoma se refere ao conjunto de todos os genes existentes nos 23 pares de cromossomos da espécie humana. É válido lembrar que cada espécie possui um número próprio de cromossomos, bem como de genes que os compõem, o que determina um genoma diferente para cada tipo de organismo. Podemos chamar **genômica** o processo de mapeamento, sequenciamento e análise do genoma. A genômica trata de localizar os genes no conjunto de cromossomos do organismo para posterior caracterização da sequência de bases nitrogenadas dos genes e elucidação de sua função dentro do organismo.

A genômica pode ser dividida em estrutural e funcional: a genômica estrutural se refere à fase na qual são construídos mapas genéticos que fornecem a localização e a sequência dos genes do organismo; a genômica funcional está relacionada com a expressão gênica, ou seja, com as propriedades funcionais dos conjuntos de genes.

O desenvolvimento tecnológico contribuiu para o entendimento da complexa constituição do genoma humano e só foi possível com o sequenciamento dos genomas de outras espécies, principalmente microrganismos. As espécies foram selecionadas com base no interesse científico, médico ou econômico. Uma série de instrumentos e técnicas, como a PCR e os sequenciadores automáticos, surgiram nesse momento.

O Brasil não ficou de fora desses avanços da era genômica. Em 1997, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) determinou o sequenciamento do genoma do microrganismo *Xylella fastidiosa*, bactéria responsável por certos tipos de infecção das laranjeiras, importante fonte econômica da região. Esse primeiro sequenciamento teve como principal objetivo a adequação dos laboratórios, com o fornecimento de equipamentos e treinamento técnico. Com o sucesso do projeto, outros mais ambiciosos foram iniciados, como o financiamento do projeto de definição do transcrito humano. Atualmente, o Brasil se coloca como um dos países que mais produziu sequências de organismos vivos no mundo.

Apesar de muitas das expectativas em relação a ele ainda não terem sido realizadas, o PGH gerou importante conjunto de informações para a comunidade científica. Apenas 1,1 a 1,4% do genoma realmente codifica proteínas, sendo que 75% do DNA estão localizados entre os genes. Diferentes segmentos de tamanhos variáveis se repetem no decorrer do genoma, o que talvez denuncie uma complexa história evolutiva. Segundo estimativas, o conjunto de genes da espécie humana varia entre 30 e 40 mil, número que é apenas duas vezes maior do que o número de genes da *Drosophila melanogaster*, a mosca-da-fruta. No entanto, os genes humanos parecem ser muito mais complexos.

As principais diferenças entre os genomas de duas pessoas estão nas modificações específicas de uma única base nitrogenada, chamadas polimorfismos ou SNP (do inglês *single nucleotides polymorphisms*, ou seja, polimorfismos de base única). As consequências do mapeamento genético para a medicina são profundas, pois ele permitirá o diagnóstico mais preciso e rápido, bem como o conhecimento prévio da suscetibilidade genética de uma pessoa ao desenvolvimento de determinada doença. É preciso ressaltar, no entanto, que o DNA não é o único responsável pelo desenvolvimento de doenças: os fatores ambientais e sociais possuem papel tão preponderante quanto o conjunto de genes que a pessoa apresenta. Por isso, é imprescindível, para a melhoria da saúde da população humana, a análise multifatorial dos determinantes patológicos.

Muitas perguntas ainda estão sem resposta e muitos problemas ainda precisam ser resolvidos com auxílio dos estudos e do desenvolvimento da genética e

da biologia molecular. Entretanto, é inegável que os conhecimentos adquiridos nessas áreas colaboram na melhoria da qualidade de vida do homem, e que muitas conquistas científicas serão alcançadas a curto e médio prazo por meio da engenharia genética.

Referência bibliográfica

WATSON, James D.; CRICK, Francis H. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, n. 171, p. 737-7388, April 1953.

Bibliografia complementar

ALBERTS, Dennis B. et al. *Biologia molecular da célula*. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2004.

AZEVEDO, Maristella de Oliveira et al. *Técnicas básicas em biologia molecular*. Brasília: Editora UnB, 2003.

HAUSMANN, Rudolf. *História da biologia molecular*. 2. ed. Ribeirão Preto: Funpec–RP, 2002.

RUMJANEK, Franklin David. *Introdução à biologia molecular*. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2001.

ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique B.; PASSAGLIA, Luciane Maria P. *Biologia molecular básica*. 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003.

Capítulo 3

Hematologia

Paulo Roberto Soares Stephens
Jurandy Susana Patrícia Ocampo Lyra
Marcelo Pelajo Machado
Marcella Martins de Vasconcelos Vaena

A hematologia é uma ciência da área biomédica relacionada ao estudo da **formação, regulação e manutenção do sangue**, assim como dos seus componentes. Por meio das alterações quantitativas e qualitativas das células, dentre outras moléculas presentes no plasma, é possível sinalizar o diagnóstico de algumas patologias relacionadas ao sangue, tais como anemias, leucemias, síndromes mieloproliferativas e distúrbios da coagulação. Mediante a hematologia laboratorial, associada à clínica, é possível pesquisar causas de enfermidades, monitorar tratamentos e definir ou direcionar o diagnóstico.

3.1 A hematopoese

O processo de formação, desenvolvimento e maturação dos elementos figurados do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), a partir de um precursor celular comum e indiferenciado, chamado hematopoese tem início em torno do

segundo mês de embriogênese, persistindo por toda a vida do indivíduo. Nas primeiras semanas de gestação, o embrião humano se localiza ao lado de uma estrutura chamada saco vitelino, que se assemelha a uma grande bolsa. Até a terceira semana de gestação, a nutrição do embrião é feita através da parede do útero materno. A partir daí, o embrião passa a obter do sangue materno, através da placenta, os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento.

Com um mês, o embrião humano já possui um sistema de vasos semelhante ao do indivíduo adulto que permite a distribuição do sangue por todo o seu organismo. A formação desses vasos se inicia nas **ilhas de Wolff e Pander** (fig. 3.1), em torno da terceira semana da gestação, na região externa do saco vitelino. A formação dessas ilhotas começa com pequenas massas celulares visíveis na região, os **hemangioblastos**, que vão sofrendo transformações. O contorno dessa estrutura é formado por células que vão originar os primeiros vasos sanguíneos. Os eritrócitos primitivos (**hemocitoblastos**) se formam a partir das células mais internas das ilhotas de Wolff e Pander. Assim, tanto os vasos sanguíneos quanto os primeiros eritrócitos são formados da mesma estrutura original, sendo, portanto, de origem extraembrionária.

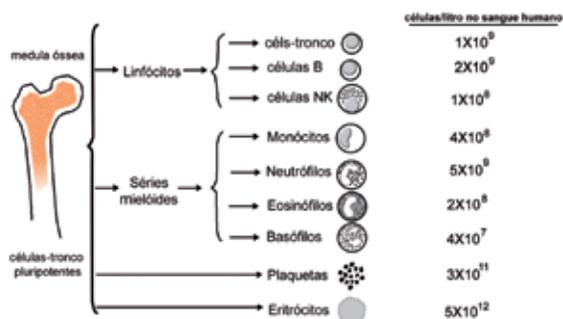


Figura 3.1. Ilhotas de Wolff e Pander: local de formação dos vasos sanguíneos.

Ao final de um mês, observa-se no embrião a presença de um coração rudimentar, responsável por bombear o sangue para o corpo que está sendo formado. A partir do segundo mês de gestação, o embrião já apresenta as suas próprias hemácias, leucócitos e plaquetas.

Após a formação dos primeiros vasos sanguíneos, é deflagrado todo o processo de geração das células sanguíneas, processo que ocorre de forma

ininterrupta durante toda a vida do indivíduo. As células recém-formadas no interior dos vasos passam a ser responsáveis agora pelo transporte e nutrição do embrião. O saco vitelino perde progressivamente a sua função e involui. Os progenitores das células do sangue, produzidas pelo próprio organismo mediante a hematopoese dita definitiva, oriundos do endotélio da aorta dorsal da região **aorta-gônada-mesonefros (AGM)**, expandem-se no fígado fetal e na medula óssea. A fase hepática da hematopoese, na qual também há participação do baço, ocorre a partir do terceiro mês da gestação. Nessa fase, as células imaturas proliferam entre os vasos sanguíneos e os cordões hepatocitários imaturos, de origem endodérmica.

A medula óssea começa a participar da formação do sangue aproximadamente na metade do período gestacional e, a partir daí, por toda a vida extrauterina. Em situações em que exista necessidade de maior contribuição de sangue – quando há tumores, por exemplo –, o baço e o fígado podem retomar suas funções na hematopoese.

No nascimento, todos os ossos realizam hematopoese medular. A partir do terceiro ano de vida, a medula dos ossos longos interrompe essa atividade, que, no entanto, permanece nos ossos esponjosos: esterno, costelas, vértebras, íliacos, escápula e porções proximais dos úmeros e fêmures. Enquanto no recém-nato quase a totalidade da medula está ativa, no adulto, está ativa apenas a metade dela. O quadro 3.1 traz um sumário da correlação entre fase da vida, local da hematopoese e idade.

Quadro 3.1. Cronologia de eventos da hematopoese: sumário da correlação entre fase da vida, local da hematopoese e idade.

Fase da vida	Local da hematopoese	Idade
Intrauterina	saco vitelino	19 ^o dia a 6 ^a semana
	fígado e baço	6 ^a a 24 ^a semanas
	medula óssea	10 ^a ou 11 ^a semanas
	medula óssea	24 ^a semana*
Infância	medula óssea	a partir do nascimento até o início da fase adulta
	praticamente todos os ossos	a partir do nascimento até o início da fase adulta

cont.

	esqueleto central	a partir da fase adulta até o final da vida
Adulta	vértebras (28%), costelas (8%), esterno (2%), crânio/mandíbula (13%), sacro e íliaco (40%), região proximal do fêmur e úmero (8%)	a partir da fase adulta até o final da vida

* A medula óssea ganha predominância na hematopoese a partir da vigésima quarta semana.

Após o nascimento, grande quantidade de células sanguíneas é produzida diariamente pela medula óssea. Em adultos jovens, estima-se que sejam produzidas 20 milhões dessas células por segundo. Essas células são originadas de uma única **célula-tronco indiferenciada pluripotente** (*stem cell*). As células pluripotentes agrupam-se em **unidades formadoras de colônias (UFCs)** e, sob a influência de uma variedade de fatores estimulantes de colônias, diferenciam-se em progenitores comuns de eritrócitos, megacariócitos, linfóides e mielóides. Durante esse processo sucessivo de diferenciação, as células geradas vão adquirindo características específicas e se diferenciam cada vez mais ao receber o estímulo de citocinas específicas para cada linhagem celular. Eis as funções de algumas citocinas:

- **interleucina 1 (IL-1)**: está envolvida na ativação imunológica, bem como na resposta inflamatória;
- **interleucina 2 (IL-2)**: estimula a UFC de linfócitos T;
- **interleucina 4 (IL-4)**: promove o crescimento de linfócitos;
- **interleucina 5 (IL-5)**: age sobre a produção de eosinófilos e linfócitos B;
- **interleucina 7 (IL-7)**: está associada ao desenvolvimento de células imaturas.

No quadro 3.2, observamos alguns dos fatores envolvidos nas diversas etapas da hematopoese, assim como algumas das suas respectivas funções. Esses fatores são produzidos em diferentes locais e por diferentes células.

Quadro 3.2. Fatores envolvidos nas diferentes etapas da hematopoese e algumas das suas respectivas funções.

Fatores	Atividade
GM-CSF	Estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos
G-CSF	Estimulação e diferenciação de colônias de granulócitos
Eritropoetina	Formação de eritrócitos
Interleucina 1 (IL-1)	Regulação de linfócitos B e T e do pirogênio endógeno, indução de outros fatores
Interleucina 2 (IL-2)	Fator de crescimento de células T
Interleucina 3 (IL-3)	Estimulação de múltiplos CSF, granulócitos, eosinófilos, mastócitos, formação de colônias de megacariócitos, interação com eritropoetina e estimulantes de colônias eritroides
Interleucina 4 (IL-4)	Proliferação de linfócitos B e secreção de imunoglobulinas
Interleucina 5 (IL-5)	Diferenciação de linfócitos B, secreção de imunoglobulinas e diferenciação de eosinófilos
Interleucina 6 (IL-6)	Diferenciação de linfócitos B, secreção de imunoglobulinas e diferenciação de eosinófilos
Interleucina 7 (IL-7)	Estimulação da produção de linfócitos pré-B
Interleucina 9 (IL-9)	Formação de colônias eritroides e estimulação da proliferação da linhagem dos megacariócitos
Interleucina 10 (IL-10)	Inibição da síntese de citocinas pelos linfócitos T
Interleucina 11 (IL-11)	Estimulação do linfócito B, do megacariócito e das células-tronco
Interleucina 12 (IL-12)	Estimulação da célula NK (<i>natural killer</i>), proliferação do linfócito T auxiliar e produção de interferon-gama pelo linfócito T e célula NK
Interleucina 13 (IL-13)	Estimulação da proliferação de linfócitos T e inibição da produção de citocinas inflamatórias pelos monócitos

A hematopoese pode ser deflagrada por vários estímulos. Na hipóxia, por exemplo, ocorre a produção de eritrócitos pela baixa concentração de oxigênio no sangue. Certas infecções e processos inflamatórios também desencadeiam maior produção, principalmente de neutrófilos e monócitos. Outro estímulo importante para a hematopoese são as parasitoses e as alergias, que acarretam maior produção de eosinófilos e basófilos. Já os antígenos virais estimulam principalmente a geração de **linfócitos T**, **linfócitos B** e **células NK** (*natural killers*). A figura 3.2 relaciona algumas células sanguíneas, respectivas quantidades e tempo de vida.

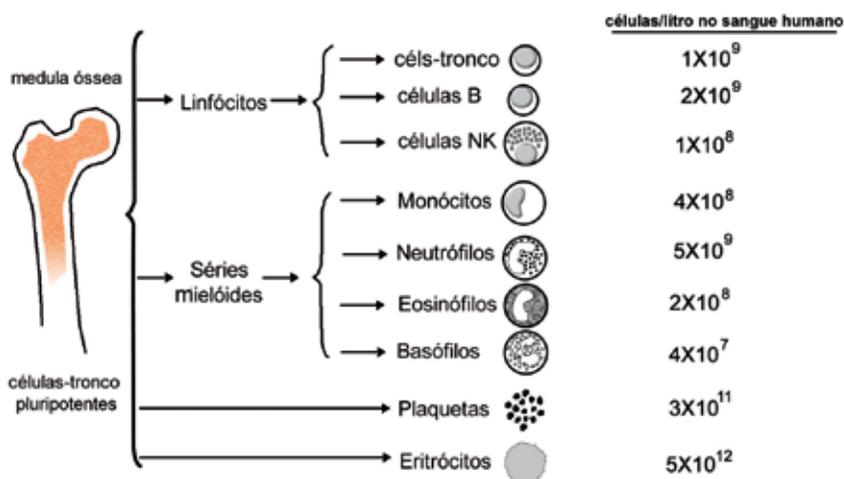


Figura 3.2. Correlação entre algumas células sanguíneas, vida média e quantidade no sangue.

3.1.1 A eritropoese

O processo de eritropoese consiste na produção de eritrócitos, também denominados hemácias. Em adultos, a eritropoese ocorre na medula óssea; nos fetos ou em situações especiais, como anemias severas, pode ocorrer em outros órgãos, principalmente no fígado e no baço.

Na figura 3.3, observamos três fases principais da eritropoese, sendo a primeira caracterizada pela **síntese de ribossomos**, pelos eritroblastos pre-co-

ces; a segunda, aquela em que ocorre um **acúmulo de hemoglobina** pelos eritroblastos tardios; e, na última, observamos a **eliminação do núcleo pelos normoblastos**, além da formação dos reticulócitos. Após todas essas fases são gerados os eritrócitos, que são as células maduras.

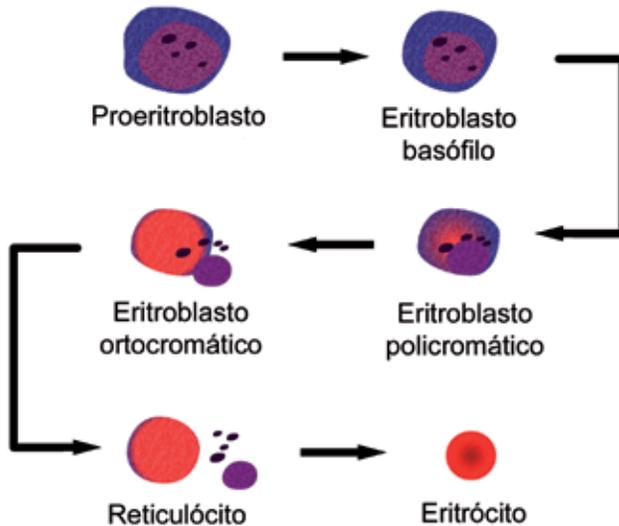


Figura 3.3. Sequência de diferenciação de eritrócitos: a eritropoese.

O processo da eritropoese é regulado por hormônios como a **eritropoetina**, produzida principalmente pelas células justaglomerulares dos rins, capazes de perceber a ocorrência de hipóxia. A eritropoetina é secretada em maior ou menor quantidade de acordo com a produção ou a diminuição de eritrócitos na circulação sanguínea. Na condição de hipóxia, quando há pouca quantidade de eritrócitos na circulação sanguínea, a eritropoetina é liberada em maior quantidade pelos rins, a fim de que mais eritrócitos sejam produzidos. Já quando existe um grande aporte de eritrócitos para a circulação, observa-se uma diminuição da produção do referido hormônio (fig. 3.4).

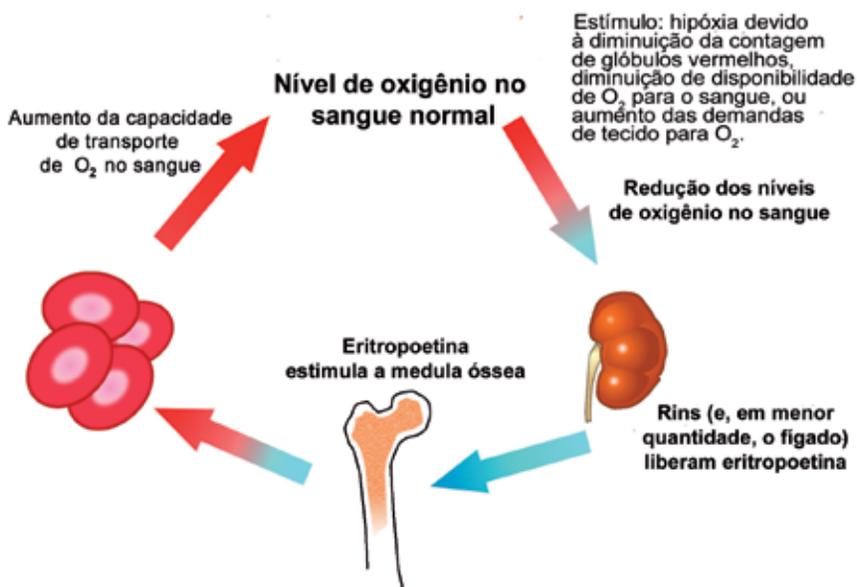


Figura 3.4. Mecanismo da eritropoetina.

3.1.2 A leucopoese

A origem e a maturação dos leucócitos chama-se leucopoese. Durante esse processo, que ocorre na medula óssea, observamos células em diferentes estágios de diferenciação, as quais apresentam morfologias variadas, assim como **atividade mitótica**. Algumas células completam seus processos de diferenciação na própria medula; outras necessitam migrar para os órgãos linfoides para finalizar esse processo. Dentre as células que participam do processo da leucopoese, temos as **células-fonte**, que são autorrenováveis e originam todas as células do sangue. Apesar da baixa capacidade proliferativa dessas células, seu número sempre é constante. As células-fonte se dividem de forma simétrica durante a vida fetal ou em períodos pós-transplantação. Outros fatores podem levar à divisão dessas células: a **morte celular programada (apoptose)**, a **mobilização das células-fonte para a circulação** sob a ação de fatores estimulantes, ou a sua **depleção na medula óssea** em decorrência de radiação ou quimioterapia.

As células-fonte são divididas em dois grupos: **células totipotentes**, também conhecidas como células-tronco, e **células pluripotentes**, que se originam das primeiras e apresentam múltipla capacidade de diferenciação. As células pluripotentes se subdividem em **mieloides** e **linfoides**, grupos de células que são capazes de se diferenciar ainda mais e gerar as células do sangue.

As células pluripotentes originam **células formadoras de colônias (CFCs)** que não possuem capacidade de autorrenovação, mas apresentam grande capacidade mitótica. As CFCs são específicas para cada linhagem celular. Por exemplo, a LCFC é a célula linfocítica formadora de colônia, célula que chegou a esse estágio principalmente sob a influência da IL-7, liberada pelas células-fonte.

Já as células **multipotentes mieloides** originam, na medula óssea, as células formadoras de colônias megacariocíticas, eritrocíticas, eosinofílicas, basofílicas e monocíticas-granulocíticas. Essas últimas sofrem diferenciação ainda em células formadoras de colônias monocíticas e granulocíticas. Todo esse processo de diferenciação é conduzido por diversas substâncias, produzidas por diferentes células. Dentre as principais substâncias, temos as **interleucinas (IL-1, IL-3 e IL-6)** e os **fatores estimulantes de colônias de monócitos e granulócitos (GM-CFC)**.

Em relação ao processo de diferenciação dos linfócitos – no qual a presença dos linfoblastos, encontrados na medula óssea e nos tecidos linfoides, é fundamental –, temos a formação de três grupos de células: **linfócitos T**, **linfócitos B** e **células NK**. Os linfoblastos B se diferenciam em pró-linfócitos B. Deles, muitos migram para os tecidos linfoides; já outros permanecem na medula óssea, caso estejam lá. A última etapa da diferenciação é a formação dos linfócitos B. O processo de diferenciação desse compartimento celular é influenciado por várias citocinas, entre elas a **IL-7**.

Os linfoblastos T, predominantes no timo, sofrem diferenciação e originam os pró-linfócitos T, os quais migram para o sangue e chegam ao baço. Nesse órgão, formam o **corpúsculo de Malpighi**. Já nos linfonodos, os pró-linfócitos T formam a zona paracortical. Nos órgãos linfoides, os linfócitos T adquirem diferentes **grupos de diferenciação (CDs)**, diferenciando-se nos subtipos **Helper**, **citotóxico** e **supressor**. Os CDs são responsáveis por diversas funções imunológicas realizadas pelas células que os possuem. Além disso,

essas moléculas também servem como marcadores celulares, sendo utilizadas na identificação laboratorial de determinada célula.

A partir dos linfoblastos, também são formados os pró-linfócitos NK, os quais sofrem seu processo de diferenciação na medula, mas não migram para os órgãos linfoides.

Ainda em relação à leucopoese, o promonócito, derivado dos monoblastos, origina os monócitos, os quais, por sua vez, migram para os tecidos, diferenciando-se em macrófagos. Os monócitos formam todo o **sistema monocítico fagocitário (SMF)**.

Os promielócitos originam os mielócitos, os quais são precursores de granulócitos específicos, como os eosinófilos, basófilos e neutrófilos. A partir dos mielócitos neutrófilos, são gerados os metamielócitos, que se diferenciam em neutrófilos maduros. O processo de diferenciação das referidas células ocorre sob a influência de diversas substâncias, como **IL-3**, **GM-CSF** (do inglês *macrophage colony-stimulating factor*, ou seja, fator estimulante de colônia de macrófago) e **G-CSF** (do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*, ou seja, fator estimulante de colônia de granulócito).

Na figura 3.5 observamos um sumário da sequência de diferenciação dos leucócitos granulócitos a partir do mieloblasto.

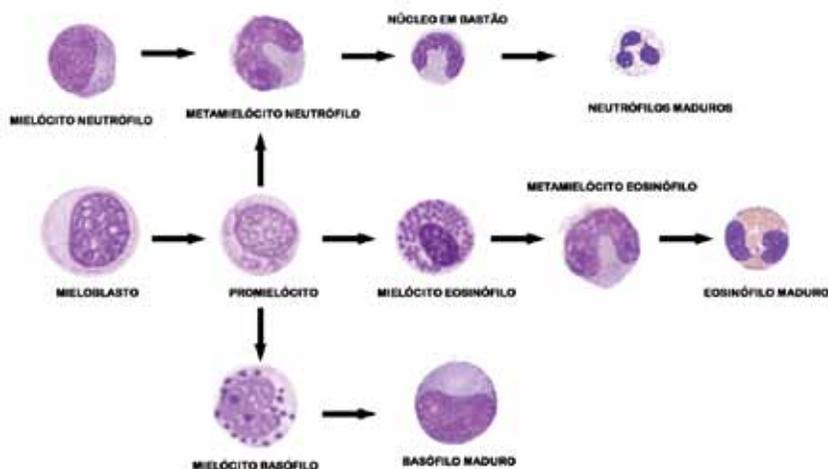


Figura 3.5. Sequência da diferenciação dos leucócitos granulócitos a partir dos mieloblastos.

3.2 O sangue

O sangue, líquido necessário à manutenção da vida, circula nos vasos sanguíneos: as artérias e as veias. Sua coloração é vermelha por causa da presença predominante de hemácias.

A principal função do sangue é transportar diversas substâncias, realizando as trocas entre os diversos sistemas do organismo. Dessa forma, o sangue contribui para a respiração, a excreção, a nutrição das células, a regulação do balanço hídrico, a hemostasia, a regulação térmica e do equilíbrio iônico e ácido básico, a imunidade e a regulação da pressão sanguínea.

O tecido sanguíneo é constituído por uma porção celular, que corresponde a 45% do sangue total, e pelo plasma, que corresponde a 55%. O **hematócrito** é a correlação entre o volume total de sangue e o volume de hemácias. Os diferentes tipos de células que compõem a porção celular do sangue apresentam características morfológicas bastante distintas, assim como funções biológicas específicas. Por exemplo, as hemácias estão encarregadas de transportar os gases respiratórios, como o oxigênio e o dióxido de carbono. Os granulócitos e monócitos estão envolvidos nos processos inflamatórios e da fagocitose. Já as plaquetas são responsáveis pela hemostasia.

Um indivíduo adulto do gênero masculino e com peso aproximado de 75 Kg apresenta de 3,6 a 5,8 L de sangue; já os indivíduos do gênero feminino com aproximadamente 55 Kg apresentam de 2,9 a 4,4 L de sangue.

A composição química do sangue dissolvido no plasma é bastante complexa. Ele é constituído principalmente por sódio, cloro, potássio, cálcio, fosfatos, sais inorgânicos, ácido úrico, escórias nitrogenadas, glicose, colesterol, triglicerídeos, enzimas, anticorpos, hormônios, vitaminas, albuminas, fibrinogênio, protrombina, aglutininas e outras proteínas.

3.2.1 As células sanguíneas

As células sanguíneas, originadas na medula óssea, embora apresentem grande diversidade estrutural e funcional, são todas necessárias à manutenção da saúde do organismo. Essas células compreendem a **série vermelha** (com-

posta pelas hemácias) e a **série branca** (composta por leucócitos – neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos), além de outras possíveis células, como os mielócitos e metamielócitos, e as plaquetas.

3.2.1.1 Série vermelha: hemácias

A geração das hemácias é influenciada por vários fatores, nas diversas fases da eritropoese: **eritropoetina, vitamina B12, folato¹ e ferro.**

As hemácias humanas são anucleadas e em forma de disco bicôncavo (fig. 3.6). Essa célula contém, no seu interior, a **hemoglobina**, constituída por quatro grupos heme, cada um dos quais com um átomo de ferro. A função básica das hemácias é transportar oxigênio (O_2) dos alvéolos pulmonares para os tecidos e transportar dióxido de carbono (CO_2) dos tecidos para os alvéolos pulmonares.

Ao deixarem a medula óssea, essas células perdem o seu núcleo e seguem para a corrente sanguínea. Ao serem coradas pelo Giemsa, as hemácias adquirem coloração róseo-clara. Na corrente sanguínea, células apresentam um halo central mais claro, em consequência da biconcavidade. O halo central nas hemácias normais corresponde a um terço do seu diâmetro, que varia de 6 μm a 8,5 μm .

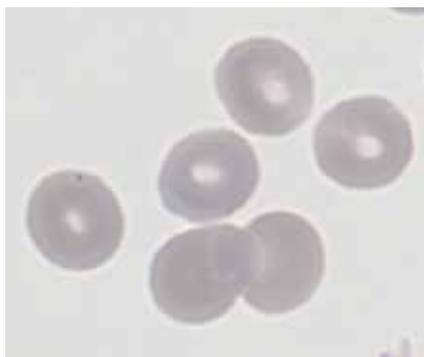


Figura 3.6. Hemácias.

¹ Folato é o ácido fólico, também chamado folacina ou ácido pteroil-L-glutâmico; conhecido como vitamina B9 ou vitamina M. Trata-se de uma vitamina hidrossolúvel necessária à formação de hemoglobina pertencente ao complexo B.

Os **eritroblastos** são encontrados eventualmente no sangue periférico, evidenciando demanda aumentada da produção de eritrócitos. Isso revela grande estimulação da medula óssea, que lança para o sangue periférico células ainda muito jovens e não adequadamente amadurecidas. Isso ocorre, por exemplo, no período neonatal e na anemia hemolítica. Nessas duas situações, existe destruição aumentada das hemácias. Em condições extremas, quando a necessidade é ainda maior, encontramos a presença de reticulócitos, que são precursores anucleados dos eritrócitos no sangue periférico. O número aumentado de **reticulócitos** é indicativo de uma medula submetida a um estado de ativação crítica, como no caso de grande perda sanguínea. Os reticulócitos são identificados pela coloração com azul de cresil brilhante (fig. 3.7).

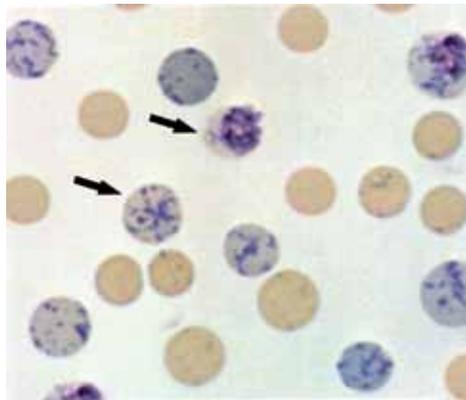


Figura 3.7. Reticulócito corado pelo azul de cresil brilhante.

3.2.1.2 Série branca: leucócitos

Diferentes leucócitos estão presentes no sangue periférico. São eles os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. Podem ser divididos em **granulócitos** e **agranulócitos**, de acordo com a presença ou não de granações específicas no citoplasma. Dessa forma, os neutrófilos, eosinófilos e basófilos são classificados como granulócitos, diferindo dos linfócitos e monócitos, que são agranulócitos.

Os **neutrófilos** são os leucócitos mais numerosos na circulação sanguínea e representam de 60 a 65% dos leucócitos do sangue circulante normal. Apresentam em média $13\ \mu\text{m}$ de diâmetro e possuem núcleo segmentado, geralmente com três lóbulos. No citoplasma, podem ser observadas granulações específicas, pequenas, finas e dispersas, de coloração vermelho-salmão.

Os neutrófilos bastonados estão presentes no sangue periférico (fig. 3.8), em meio à maioria dos neutrófilos segmentados (fig. 3.9). A sua forma nuclear é mais grosseira em relação ao núcleo do neutrófilo segmentado, e os neutrófilos bastonados não apresentam divisão lobular.

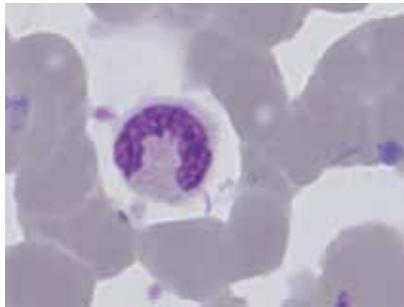


Figura 3.8. Neutrófilo bastonado.

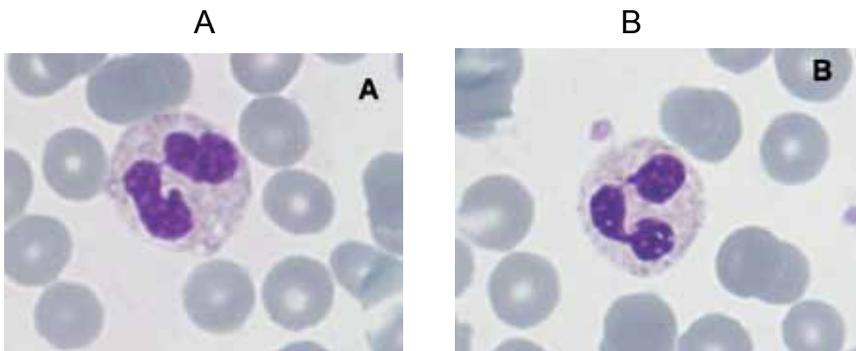


Figura 3.9. Neutrófilos segmentados no sangue periférico:

A) dois segmentos; B) três segmentos.

Os **eosinófilos** (fig. 3.10) são um pouco maiores que os neutrófilos: têm diâmetro entre $12\ \mu\text{m}$ e $17\ \mu\text{m}$. O núcleo é segmentado e apresenta, em geral, dois

lóbulo. As granulações específicas no citoplasma são esféricas, com contorno nítido e de cor laranja ou avermelhada (com aspecto refringente). Os eosinófilos estão presentes no sangue periférico na frequência relativa de até 4%.

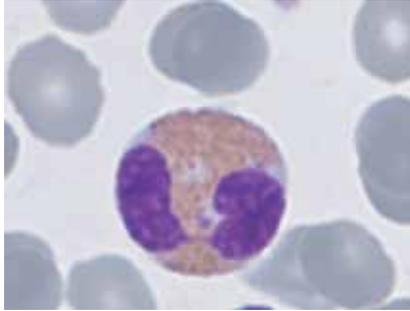


Figura 3.10. Eosinófilo.

Os **basófilos** (fig. 3.11) são os leucócitos circulantes mais raros, com frequência relativa de 0 a 1%. Apresentam núcleo segmentado e citoplasma com granulações específicas metacromáticas, de forma e tamanho variados. Essas granulações, quando coradas por corantes panóticos, apresentam cor violeta.

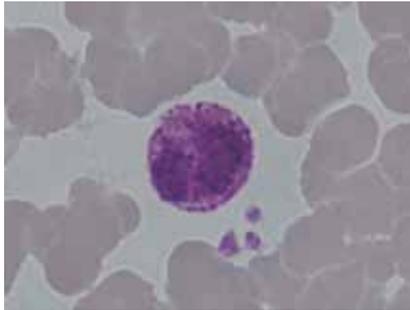


Figura 3.11. Basófilo.

Os **linfócitos** (fig. 3.12) podem ser classificados em grandes ou pequenos linfócitos. Os grandes linfócitos apresentam diâmetro entre 10 μm e 15 μm , núcleo arredondado e excêntrico, e com cromatina densa. O citoplasma é basofílico com granulações azurófilas. A relação núcleo—citoplasma é menor que nos pequenos linfócitos. Já os pequenos linfócitos são células com diâmetro entre 7 μm e 8 μm ; seu citoplasma é basofílico, e o núcleo apresenta cromatina

densa, ocupando 90% do citoplasma (grande relação núcleo–citoplasma). Os linfócitos representam de 20% a 30% dos leucócitos na circulação.

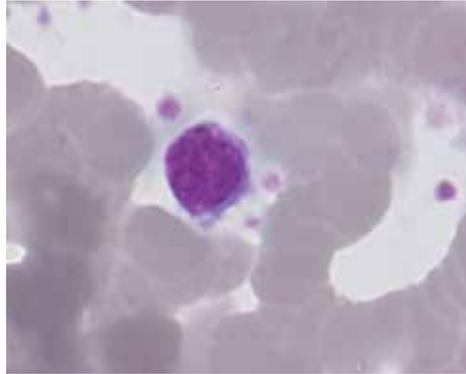


Figura 3.12. Linfócito.

3.3 A coleta de sangue

As análises laboratoriais do sangue podem levar a resultados não reais em decorrência não só da manipulação laboratorial inadequada, mas também de falhas no procedimento de coleta. Antes de se iniciar a coleta, todo o material deve ser separado, inclusive os anticoagulantes adequados; além disso, devem ser usados tubos identificados e específicos para cada tipo de análise. A identificação de cada tubo com o nome do paciente é de extrema importância. No ato da coleta, deve-se sempre confirmar com o paciente o seu nome, dado que a troca de amostras pode ter consequências muito graves. A seguir, são relacionados os itens a serem checados antes da coleta de sangue.

3.3.1 *Material a ser checado antes de proceder à venopunção*

São os seguintes os materiais que devem estar disponíveis antes da coleta de sangue:

- a) aparatos de biossegurança, como luvas, jaleco e todo o equipamento de segurança individual (EPI), para evitar possível contato com microrganismos que possam estar presentes no sangue do paciente;

- b) etiquetas para a identificação dos pacientes;
- c) tubos, identificados adequadamente, de acordo com o tamanho, o volume e o aditivo, e que devem estar acessíveis em uma estante de tubos (fig. 3.13);
- d) adaptadores e agulhas apropriadas;
- e) torniquete para a punção;
- f) álcool a 70%, algodão, gaze estéril e bandagem;
- g) local para descarte apropriado de agulhas e seringas.



Figura 3.13. Estante contendo tubos de diversos tamanhos, com diferente cor das rolhas.

Além da checagem de todo o material necessário para a coleta, algumas informações são de grande valia para as futuras análises dos resultados laboratoriais. Seguem algumas informações importantes que devem ser levadas em consideração nos resultados encontrados nas análises laboratoriais:

- a) a amostra de sangue para exames de rotina deve ser obtida no período da manhã, antes de o indivíduo realizar exercícios físicos, de modo a não alterar o metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas etc., uma vez que essas moléculas podem vir a ser alvo de investigação nos referidos exames; além disso, o indivíduo deve estar em jejum de ao menos 8 horas, ou até mesmo de 12 horas, dependendo do exame e de acordo com a recomendação do médico e do laboratório;

- b) as informações acerca dos medicamentos ou vacinas de que o indivíduo faz/fez uso são de grande importância para que se possa correlacionar a esse fato as possíveis variações observadas nos resultados;
- c) outras informações dadas pelo indivíduo, como a ingestão há menos de 12 horas de alguns alimentos – banana, café, chá, chocolate, refrigerante e álcool – ou o fumo são úteis, posto que análises de catecolaminas, metanefrinas, ácido homovanílico e ácido vanilmandélico apresentam tais restrições;
- d) finalmente, o material coletado deve ser conservado e transportado adequadamente até o laboratório onde serão realizados os exames.

3.3.2 Procedimentos para a venopunção

Em primeiro lugar, o indivíduo deve sentar-se na cadeira de coleta de forma adequada para a realização do procedimento, mantendo o braço em linha reta, desde o ombro até punho, permitindo que as veias fiquem mais visíveis. Deve-se evitar que o cotovelo fique dobrado e manter a palma da mão do indivíduo voltada para cima (fig. 3.14).

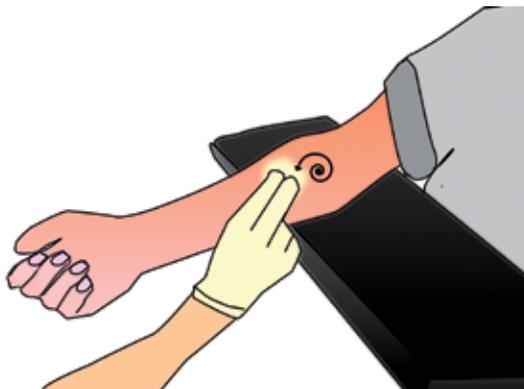


Figura 3.14. Palpação das veias a fim de selecionar a mais adequada para a punção.

A seleção da região da punção deve ser feita examinando-se com bastante atenção o braço do paciente e verificando-se visualmente ou mesmo apalpando-se as veias. A preferência da escolha deve ser das veias do braço

para as da mão, pois as veias de maior calibre e menos sensíveis à dor encontram-se no braço (fig. 3.15).

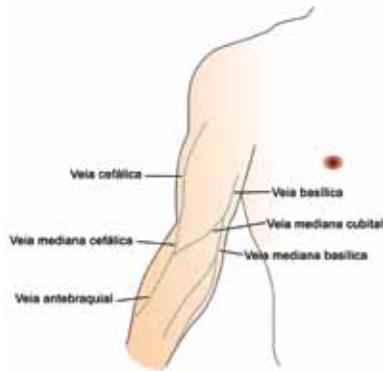


Figura 3.15. Seleção da veia para a venopunção.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC) (2010), a escolha do local da punção deve basear-se nas seguintes considerações:

- a) as amostras não devem ser coletadas de membros nos quais estejam instaladas terapias intravenosas;
- b) devem ser evitados locais com áreas cicatriciais de queimadura;
- c) áreas com hematomas, qualquer que seja o seu tamanho, podem gerar resultados errados; se outra veia, em outro local, não estiver disponível, a amostra deve ser colhida distalmente ao hematoma;
- d) fístulas arteriovenosas, enxertos vasculares ou cânulas vasculares não devem ser manipulados, para a coleta de sangue, por pessoal não autorizado pela equipe médica;
- e) deve-se evitar puncionar veias trombosadas: elas são pouco elásticas, têm as paredes endurecidas e se assemelham a um cordão;
- f) não se deve aplicar, no momento da seleção venosa, o procedimento de “bater na veia com dois dedos”; esse tipo de procedimento provoca hemólise capilar, alterando, portanto, o resultado de certos analitos.

○ garroteamento (fig. 3.16) tem a função de tornar as veias proeminentes durante toda a coleta. ○ garrote deve ser colocado a aproximadamente 10 cm do local da punção. ○ fluxo arterial não pode ser interrompido; logo, é preciso que se verifique a pulsação do paciente. ○ garrote deve ser mantido por no máximo 1 minuto, evitando-se assim a congestão local e a hemoconcentração. ○ garrote deve ser afrouxado ou retirado logo após a coleta.



Figura 3.16. Colocação do torniquete.

Segue abaixo a sequência que deve ser seguida pelo coletor, a fim de se realizar uma adequada venopunção:

- a) Remover a tampa que recobre a borracha da agulha (fig. 3.17);

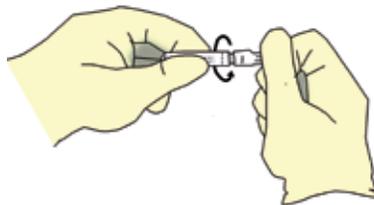


Figura 3.17. Remoção da tampa que recobre a borracha da agulha.

b) Adaptar a agulha já selecionada ao adaptador de tubo (fig. 3.18);

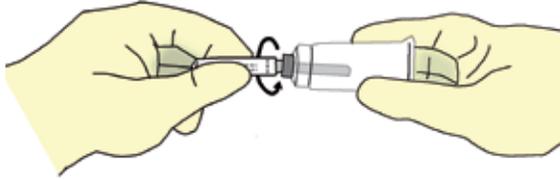


Figura 3.18. Adaptação da agulha ao adaptador de tubo.

- c) Colocar o torniquete no braço do indivíduo por, no máximo, um minuto;
- d) Fazer a assepsia no local da venopunção, utilizando antisséptico adequado;
- e) Manter o braço do paciente inclinado para baixo;
- f) Remover a capa superior da agulha (fig. 3.19);

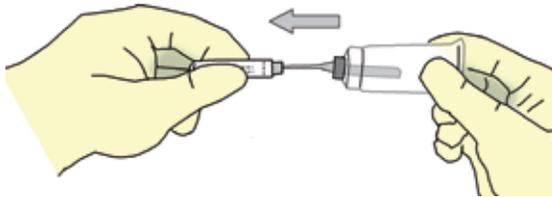


Figura 3.19. Retirada da agulha do adaptador após a agulha ser encapada.

- g) Proceder à venopunção propriamente dita, mantendo o braço do paciente abaixado e a tampa do tubo o mais alto possível (fig. 3.20);



Figura 3.20. Venopunção.

- h) Remover o torniquete após o sangue fluir para dentro do tubo; caso necessário, utilizar mais de um tubo: proceder à troca de tubo seguindo o mesmo procedimento feito para o primeiro tubo; deve-se evitar que o sangue entre em contato com a tampa do tubo;
- i) Remover cuidadosamente da veia do paciente o adaptador, juntamente com a agulha;
- j) Descartar a agulha em recipiente adequado para perfurocortantes (fig. 3.21);
- k) Comprimir com algodão o local da punção e colocar bandagem.



Figura 3.21. Descarte para material perfurocortante.

3.3.3 Cuidados com a amostra coletada

A coleta de sangue venoso em geral é feita em tubos contendo anticoagulante, sendo o mais usado o **ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)**, anticoagulante recomendado para hematologia por preservar melhor a integridade das células sanguíneas. O sangue contendo anticoagulante deve ser conservado a **4°C por no máximo 24 horas**, dado que, após esse período, começa a ocorrer alteração morfológica das células, lembrando-se que, idealmente, as análises devem ser realizadas logo após a coleta do sangue.

Para cada tipo de análise sanguínea, é necessário utilizar reagentes diferentes: nos exames bioquímicos de modo geral, pode-se usar o plasma ou o

soro; no hemograma completo e tipagem sanguínea, é requerido o sangue total com EDTA; na análise de glicemia, é necessário utilizar plasma com fluoreto; já para analisar os fatores da coagulação sanguínea, é necessário utilizar plasma com citrato de sódio. No quadro 3.3, observamos a correlação entre a cor da tampa do tubo, o anticoagulante e o respectivo exame.

Quadro 3.3. Correlação entre a cor da tampa do tubo, o tipo de anticoagulante e o seu uso respectivo.

Cor da tampa*	Anticoagulante	Exemplos de uso
Vermelha	nenhum	exames que requerem soro: bioquímica e sorologia, por exemplo
Lilás	EDTA	hematologia e tipagem sanguínea
Azul claro	citrato de sódio	exames de coagulação: TAP, TTPa, fibrinogênio
Cinza	fluoreto de sódio	glicose
Verde	heparina	exames especiais, tais como avaliação de fragilidade dos glóbulos vermelhos e gasometria

* Cores de tampas conforme a ISO 6710.2

3.4 O hemograma

No hemograma, examinamos o sangue por meio de um esfregaço ou de distensão sanguínea sobre a superfície de uma lâmina. Isso permite analisar o aspecto morfológico das células. Tal exame é utilizado rotineiramente pelo médico, como exame laboratorial adicional, o qual acrescenta informações importantes à investigação clínica inicial. O hemograma contribui com **a análise quantitativa e qualitativa** dos elementos figurados sanguíneos: células das séries branca e vermelha, contagem de plaquetas, reticulócitos, índices hematimétricos e parâmetros hematológicos. As alterações das células sanguíneas refletem diretamente às variações internas do organismo.

○ líquido sanguíneo possui dois componentes: plasma e células. Esses componentes podem ser vistos facilmente após centrifugação de um volume sanguíneo qualquer e da colocação da amostra em um tubo de ensaio comum, quando notamos que há fracionamento daquele volume em duas partes: a superior, formada por líquido amarelado citrino, translúcido – o plasma; e a porção inferior, constituída por uma camada avermelhada onde se encontram os elementos figurados do sangue – as células. Há, ainda, uma fase intermediária, composta por um anel esbranquiçado, rico em leucócitos e plaquetas, denominado *buffy coat* (fig. 3.22).

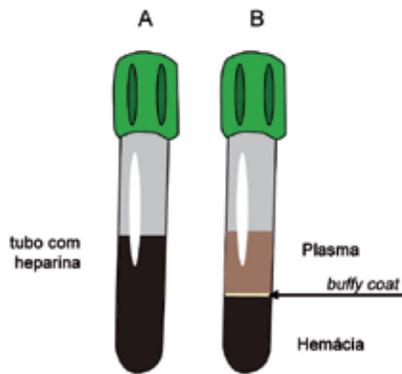


Figura 3.22. Tubos ilustrando sangue total e após a centrifugação: A) Sangue fresco recém-coletado; B) Após a centrifugação do sangue, o sangue se divide em plasma e hemácias, e o *buffy coat* apresenta-se como um anel esbranquiçado.

A avaliação sanguínea requer a quantificação de cada elemento celular, mediante a utilização de métodos manual e automatizado. Ao se utilizarem métodos automatizados, é preciso lembrar que o equipamento deve ser apropriado e estar calibrado. Além disso, é importante entender que os resultados obtidos pelos métodos automatizados traduzem a média das características apresentadas pelo total das células da amostra, mas não descrevem adequadamente os valores individuais das células dispostas em torno da média apresentada. ○ exame microscópico desse espécime sanguíneo também é necessário para a análise complementar, por meio da filmagem do sangue ou da avaliação do espreado sobre uma lâmina de esfregaço sanguíneo.

3.4.1 Avaliação automatizada

3.4.1.1 Série vermelha

A análise das hemácias envolve três parâmetros quantitativos: o hematócrito – correlação entre o volume total de sangue e o de hemácias; a quantidade total da hemoglobina; e a quantidade de hemácias por unidade de volume, que nos permite avaliar as características da população celular. A contagem de hemácias utiliza corriqueiramente um método automatizado eletrônico cujo resultado é o mais próximo da realidade, pois a equação permite descontar os erros matemáticos de cálculo. No quadro 3.4, estão descritos os valores normais dos parâmetros das hemácias. Nesse mesmo quadro, podemos observar que os valores da hemácia, da hemoglobina e do hematócrito variam de acordo com a idade e o sexo.

Quadro 3.4. Índices normais de hemácias, hemoglobina e hematócrito.

Idade	Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobina ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hematócrito (%)
Recém-nascidos (a termo)	4 a 5,6	13,5 a 19,6	44-62
Crianças (3 meses)	4,5 a 4,7	9,5 a 12,5	32-44
Crianças (1 ano)	4 a 4,7	11 a 13	36-44
Crianças (10 a 12 anos)	4,5 a 4,7	11,5 a 14,8	37-44
Mulheres grávidas	3,9 a 5,6	11,5 a 16	34-47
Mulheres não grávidas	4 a 5,6	12 a 16,5	35-47
Homens	4,5 a 6,5	13,5 a 18	40-54

Fonte: Extraído de Verrastro e Lorenzi, 2005, com modificação dos valores normais para eritrócitos, hemoglobina e hematócrito.

Três outros índices qualitativos se somam à análise rotineira das hemácias, tais como o **volume corpuscular médio (VCM)**, a **hemoglobina corpuscular média (HCM)** e a **concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)** (quadro 3.5).

Os métodos analíticos calculados pelos aparelhos automáticos permitem alto grau de precisão nos resultados, em comparação com a análise realizada por métodos manuais.

Quadro 3.5. Índices hematimétricos.

Índice	valores normais	cálculo (exemplo)
VGM (volume globular médio)	hematócrito x 10/hemácias mícrons cúbicos valores normais: 80-100	6.100.000 hemácias e Ht 46% $VGM = 46 \times 10 / 6,1$ $VGM = 75,41$
HGM (hemoglobina globular média)	Hemoglobina x 10/ hemácias picogramas valores normais: 27-32	6.200.000 hemácias e Hb 16 $HGM = 16 \times 10 / 6,1$ $HGM = 26,23$
CHGM (concentração hemoglobínica globular média)	hemoglobina x 100/ hematócrito % valores normais: 33-37	Hb 16 e Ht 46 $CHGM = 16 \times 100 / 46$ $CHGM = 34,7\%$

- **Hematócrito (Htc) = volume total de sangue/volume das hemácias**

Esse índice diz respeito ao volume ocupado pelas hemácias em determinada amostra sanguínea. Podemos observar facilmente quando, após a centrifugação de um volume de sangue fresco, obtemos o soro e um volume de hemácias: isso nos traduz o hematócrito.

○ hematócrito não corresponde à massa total das hemácias, apenas mede a concentração dessas células. Assim, um paciente que tenha perdido grande volume sanguíneo pode apresentar valores normais ou altos índices de hematócrito, por causa da perda de importante quantidade de hemácias em relação ao seu percentual normal por volume.

○ hematócrito é expresso em porcentagem por volume: um hematócrito de 35% significa que há 35 mL de eritrócitos em 100 mL de sangue.

- **Concentração de hemoglobina**

A hemoglobina é um pigmento proteico, de coloração vermelha. Seu valor é obtido pela técnica de espectrofotometria. Essa proteína se encontra no sangue sob diversas formas – oxihemoglobina, carboxihe-

moglobina etc. – e passa a expressar uma forma estável de hemoglobina: a cianometaglobulina.

- **Contagem de hemácias**

Na análise hematológica, tanto as hemácias quanto os leucócitos são obtidos após diluição de todo o volume sanguíneo em solução isotônica. Observamos, então, que o número total de hemácias excede em muito o número total de leucócitos (1:500 ou mais).

- **Volume corpuscular médio (VCM) = Hmt (L/L) x 1.000/número total de hemácias (1.012/L)**

A média do volume das hemácias representa a média do volume (tamanho) das hemácias; é um parâmetro importante utilizado na classificação das anemias e que pode evidenciar alterações próprias de doenças eritrócíticas.

- **Hemoglobina corpuscular média (HCM) = hemoglobina (g/L)/ número total de hemácias (1.012/L)**

A HCM representa a média do conteúdo de hemoglobina por hemácia. Pode ser calculada tanto por métodos automatizados quanto por métodos manuais. A HCM expressa a massa de hemoglobina.

- **Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) = hemoglobina (g/dL)/Htc (L/L)**

A CHMC representa a média da concentração de hemoglobina em volume sanguíneo; esse parâmetro é expresso em gramas.

- **RDW (do inglês *red cell distribution width*, ou seja amplitude da distribuição de células vermelhas)**

O coeficiente RDW indica a anisocitose (variação de tamanho) das hemácias, representando a percentagem de variação dos volumes obtidos. Os valores de referência do índice são 11,5% a 15. O valor ideal é 13%.

3.4.1.2 Série branca: leucócitos

Podemos analisar os leucócitos tanto por métodos manuais (erro entre 6,5% e 15%) quanto por métodos automatizados (erro entre 1% e 3%). A contagem leucocitária é feita mediante a diluição do sangue na presença de tampão de lise (comumente ácidos ou detergentes). O valor de referência para a contagem de leucócitos totais em homens e mulheres é de 5.000 a 10.000 leucócitos/ μL de sangue ($5\text{-}10 \cdot 10^3/\mu\text{L}$); o valor é igual para homens e mulheres, pois o número total de leucócitos no sangue não depende do sexo.

3.4.1.3 Análise de plaquetas

As plaquetas são identificadas à microscopia de luz, pelas suas características de impedância e mediante coloração por Giemsa.

3.4.2 Análise morfológica das células sanguíneas

Uma avaliação muito criteriosa de um espreiado de sangue sobre superfície de vidro é a etapa mais importante na análise de doenças hematológicas.

- **Preparação do esfregaço ou distensão sanguínea**

Uma gota de sangue é colocada no centro de uma lâmina previamente limpa. O tamanho da gota pode influenciar no resultado. Se a gota for muito grande, pode resultar em uma distensão sanguínea muito espessa, impossibilitando a leitura; se, ao contrário, a gota for muito pequena, o resultado será prejudicado por causa do escasso exemplar de células sanguíneas.

O esfregaço ou distensão sanguínea se faz com a utilização de outra lâmina, colocada sobre a primeira, em um ângulo de 45° , trazendo o sangue, de modo firme, rápido e com movimentos leves (fig. 3.23). Produz-se, assim, um filme de 3 a 4 cm de extensão, com uma amostra homogênea e bastante representativa.

Em situações nas quais há poucas células – por exemplo, no fluido espinhal –, a utilização de técnicas de centrifugação é mais apropriada. A distensão sanguínea traz melhor resultado, nesses casos, quando

processada por técnico bem experiente em métodos automatizados. A coloração utilizada é azul de metileno e eosina, uma coloração básica.



Figura 3.23. Desenho esquemático mostrando a sequência do esfregão, ou distensão sanguínea.

O sangue deve ser examinado ao microscópio óptico, em objetivas de 10X a 20X, para a análise eficaz da distribuição celular e dos contrastes que as células apresentam após a coloração. Esse aumento nos permite analisar as células da série branca, assim como a presença de células imaturas e/ou alteradas que porventura estejam presentes. Já as objetivas de 40X e 100X (imersão) permitem a análise diferencial e detalhada dos leucócitos.

É importante analisar todo o sangue espreado em uma lâmina, principalmente nos limites externos, mais do que na região central, pois há uma tendência de as células grandes, entre as quais estão os leucócitos, agregarem-se mais nessas regiões.

3.5 O hemograma alterado

Como já mencionado anteriormente, ratificamos aqui o hemograma como um exame laboratorial complementar à clínica, o qual pode auxiliar nos diagnósticos não apenas de anemias, leucemias e outras alterações da medula óssea, mas também de muitas outras alterações clínicas – por exemplo, a presença de infecções. A análise quantitativa das séries vermelha e branca e das plaquetas, juntamente com a observação cuidadosa das alterações morfológicas presentes na lâmina de sangue periférico, podem oferecer indícios importantes para o diagnóstico de diversas doenças. Abaixo discutimos algumas das principais alterações.

3.5.1 Alterações da série vermelha

3.5.1.1 Anemia por deficiência de ferro

A **anemia por deficiência de ferro** é a causa mais comum de anemia no mundo. O ferro faz parte da formação da hemoglobina e está presente nas hemácias. Esse tipo de anemia ocorre quando a síntese de hemoglobina fica prejudicada pela carência de ferro.

A **anemia ferropriva** caracteriza-se inicialmente por baixo estoque de ferro na medula óssea (ferritina² baixa < 30 ng/mL) com hemácias de tamanho e forma normal, evoluindo a seguir para **anemia microcítica** (VCM < 80) e **hipocrômica**. Na fase inicial, o **RDW** (índice de anisocitose) encontra-se aumentado. Na anemia crônica, quando a maior parte das hemácias é microcítica (fig. 3.24), o valor do RDW pode estar normal.

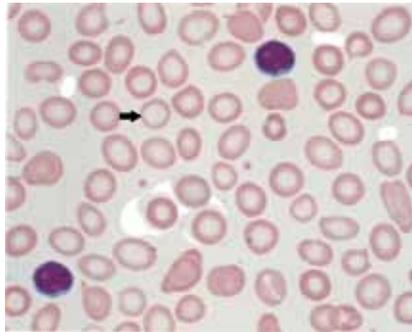


Figura 3.24. Hemácias hipocrômicas ou microcíticas.

Na lâmina de sangue periférico, verifica-se, além de microcitose e hipocromia, a **poiquilocitose** (fig. 3.25) (alteração na forma das hemácias) e a **anisocitose** (variação no tamanho das hemácias), podendo também ocorrer **trombocitose**.

² Proteína que serve de reserva de ferro e que está envolvida na síntese de compostos que contêm ferro, como os precursores eritroides, e no metabolismo e reserva do ferro, estando presente em células como os hepatócitos e macrófagos.

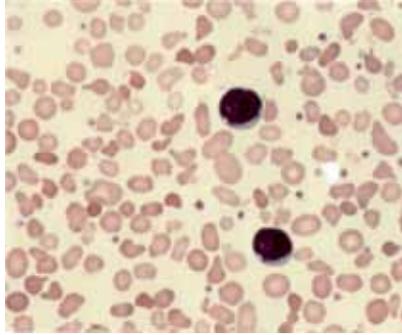


Figura 3.25. Anisopoikilocitose.

A deficiência de ferro pode decorrer de carência alimentar, falha na absorção ou perdas ocasionadas por sangramento – mais frequente em mulheres com distúrbios menstruais. As parasitoses intestinais e a gravidez também podem ser causa de anemia ferropriva. Uma vez diagnosticada, deve-se investigar a causa dessa anemia para que, além da reposição de ferro, seja feito tratamento adequado.

3.5.1.2 Anemia megaloblástica

A anemia megaloblástica deve-se na maioria das vezes à **deficiência de vitamina B12 (cobalamina) e/ou de ácido fólico**. Essas duas substâncias são necessárias para a formação do DNA da célula, e a anemia ocorre como resultado da eritropoese ineficaz.

No sangue periférico, há hemácias macrocíticas (fig. 3.26) ($VCM > 100$), com macrovalócitos e neutrófilos plurissegmentados (fig. 3.27). A anemia megaloblástica costuma cursar com reticulocitopenia e em casos mais graves pode levar a leucopenia e trombocitopenia.

A principal causa de deficiência de cobalamina é a anemia perniciosa pela presença de anticorpo antifator intrínseco no estômago, que impede a absorção adequada da cobalamina. Outras causas de deficiência dessa vitamina são deficiência dietética pós-gastrectomia ou cirurgia bariátrica. A deficiência de cobalamina pode acarretar alterações neurológicas.

A deficiência de ácido fólico pode decorrer de carência causada por alcoolismo, por exemplo, ou ser resultante do aumento da necessidade, como

ocorre durante a gestação e em anemias hemolíticas em geral. Alguns medicamentos – como trimetoprim, metotrexato e AZT – também podem estar relacionados a essa deficiência. O tratamento é feito por meio da reposição oral de ácido fólico e reposição intramuscular de vitamina B12.

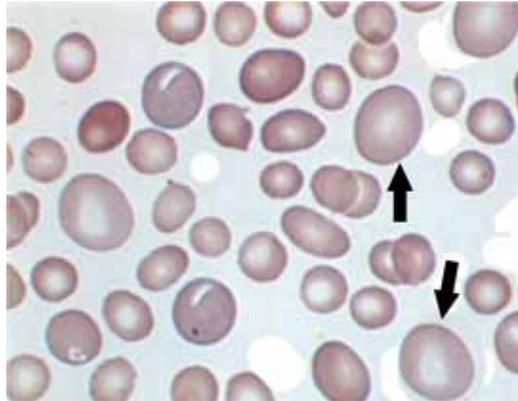


Figura 3.26. Hemácia macrocítica.

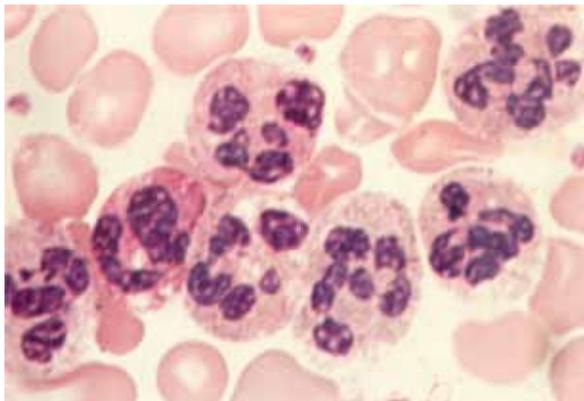


Figura 3.27. Neutrófilo plurissegmentado.

3.5.1.3 Anemia associada a doenças crônicas

Esse tipo de anemia geralmente está associado a doenças crônicas, processos inflamatórios ou câncer, e é causado por citocinas que interferem no metabolismo do ferro, na sobrevivência das hemácias e na resposta dos precursores

eritroides, a eritropoetina. O sangue periférico apresenta hemácias normocíticas e normocrômicas, e a contagem de reticulócitos é normal. O ferro sérico está diminuído e a ferritina, por ser uma proteína de fase aguda, tende a estar aumentada, embora não reflita os estoques de ferro da medula óssea.

3.5.1.4 Anemia decorrente de defeitos na membrana eritrocitária

A membrana eritrocitária é composta por lipídios e proteínas e fornece à hemácia sua característica de elasticidade/resistência e deformabilidade. Alguns defeitos genéticos na membrana podem levar à anemia hemolítica, quando ocorre a **destruição das hemácias** e o **aumento da bilirrubina**, um produto da degradação da hemoglobina.

3.5.1.5 Esferocitose hereditária

Caracteriza-se por ser uma doença autossômica dominante na qual, em decorrência de uma anormalidade na **espectrina** – uma **proteína da membrana eritrocitária** –, ocorre a produção de hemácias com forma esférica (fig. 3.28) e sem a palidez central no sangue periférico. As hemácias não deformáveis são destruídas no baço.

As manifestações clínicas variam, mas pode haver anemia (que varia com o grau de alteração), aumento da bilirrubina indireta, reticulocitose e esplenomegalia associada à esferocitose, no sangue periférico. As hemácias apresentam fragilidade osmótica aumentada. O tratamento para os casos graves consiste em esplenectomia (retirada cirúrgica do baço).

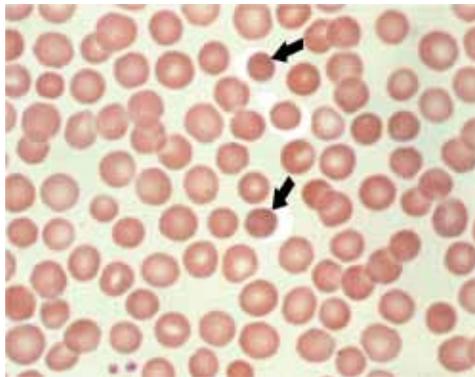


Figura 3.28. Esferócitos.

3.5.1.6 Eliptocitose

A eliptocitose é caracterizada pela presença de hemácias de forma elíptica (fig. 3.29) ou oval no sangue periférico por causa de um defeito no exoesqueleto da membrana eritrocitária. Cursa com hemólise mais discreta e, em alguns casos, não causa anemia.

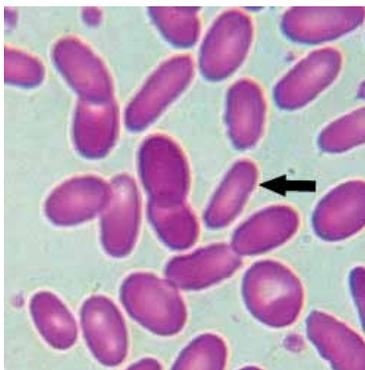


Figura 3.29. Eliptócitos.

3.5.1.7 Acantocitose e estomatocitose

A **acantocitose** é caracterizada por anormalidades na composição lipídica da membrana eritrocitária. Os eritrócitos apresentam-se contraídos e com projeções na membrana (fig. 3.30). Podem ser vistos em pacientes hepatopatas graves ou em portadores de **abetalipoproteinemia**, uma doença autossômica recessiva que cursa com alterações neurológicas e doença celíaca. A intensidade de hemólise geralmente não é clinicamente significativa e não necessita de tratamento específico.

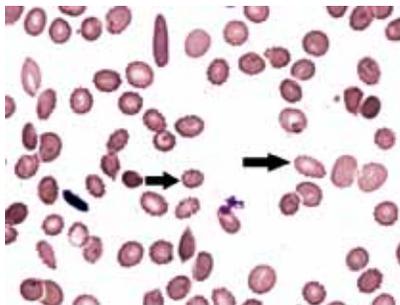


Figura 3.30. Acantócitos.

A **estomatocitose** está associada a alterações hereditárias na permeabilidade da membrana eritrocitária. Cursa com anemia hemolítica leve a moderada e macrocitose (VCM > 100). Pode haver hemácias em alvo no sangue periférico.

3.5.1.8 Anemia devido à deficiência enzimática

As hemácias contam com um arsenal de enzimas capazes de gerar energia por meio da glicólise. A falta dessas enzimas pode causar aumento da susceptibilidade à hemólise, com diminuição da vida média da hemácia.

3.5.1.9 Deficiência de piruvatoquinase

A **deficiência de piruvatoquinase** é uma anemia hemolítica não esferocítica de quadro clínico variável. Cursa com anemia, esplenomegalia e icterícia. Deve ser investigada em recém-nascidos com anemia hemolítica, mediante dosagem da enzima. Não há tratamento específico, mas a esplenectomia pode estar indicada em casos de hemólise mais grave.

3.5.1.10 Deficiência de G-6-PD

A **deficiência de G-6-PD** acarreta quadros de anemia hemolítica aguda, precipitados por infecções ou por ingestão de substâncias oxidantes – como derivados de sulfa, alguns analgésicos e antimaláricos. Tem início súbito e geralmente é autolimitada. O hemograma apresenta **microesferócitos** e **hemácias “mordidas”** (*bite cells*), além de **reticulocitose**.

3.5.1.11 Doença falciforme

A **doença falciforme** é uma alteração na hemoglobina (hemoglobinopatia) autossômica recessiva. Em decorrência de uma alteração genética, forma-se uma **hemoglobina anormal chamada S** (do inglês *sickle*, que significa foice). Essa **hemoglobina HbS** pode polimerizar-se, levando a uma alteração em

forma de foice da membrana da hemácia, o que pode desencadear **hemólise** ou **episódios vaso-oclusivos**, dado haver perda na deformabilidade da célula.

Nos Estados Unidos, 8% dos negros são portadores do gene da HbS. No Brasil, cerca de 0,2% da população negra é portadora da HbS, sendo a alteração mais prevalente no estado da Bahia.

A doença falciforme varia desde o traço falcêmico – quando há **heterozigose HbAS** –, com quase nenhuma repercussão clínica, até a anemia falciforme – **homozigose HbSS** –, que cursa com anemia hemolítica crônica e icterícia, podendo evoluir com crises dolorosas, em decorrência da vaso-oclusão, que pode resultar de diversos fatores – **como desidratação, infecção ou hipoxemia** – e evoluir com complicações – **insuficiência renal, necrose isquêmica óssea etc.**

O diagnóstico pode ser feito precocemente com base na eletroforese de hemoglobina indicando a presença da hemoglobina anormal S. Cursa com Hb em torno de 7%, reticulocitose, leucocitose e trombocitose. A lâmina de sangue periférico apresenta hemácias em forma de foice, eritroblastos (hemácias jovens nucleadas) e policromatofilia (fig. 3.31).

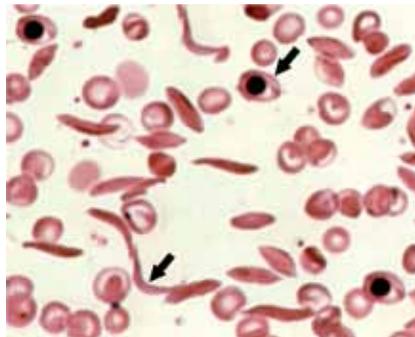


Figura 3.31. Hemácia em foice e eritroblastos.

3.5.1.12 Anemia aplástica

A **anemia aplástica** é definida como um distúrbio na hematopoese que ocorre na medula óssea, resultando em diferentes graus de anemia, leucopenia e trombocitopenia. Cursa com baixa contagem de reticulócitos. Pode ser de causa adquirida, como após infecções pelo **vírus Epstein-Baar**, ou por uso de alguns medicamentos, como cloranfenicol, ou hereditária. Aproximadamente 65% dos casos são idiopáticos. Não apresenta alterações significativas na lâmina de sangue periférico, exceto pela pobreza de células e plaquetopenia.

3.5.1.13 Eritrocitose

A **eritrocitose** é definida como o aumento do número de hemácias circulantes. Pode ser primária ou secundária. A **eritrocitose primária – policitemia primária ou policitemia vera** – é uma doença mieloproliferativa em que ocorre aumento na produção de hemácias, independentemente do estímulo da eritropoetina ou da quantidade de hemácias circulantes.

Na **eritrocitose secundária – policitemia secundária** –, o aumento do número de hemácias é compensatório. Por exemplo, nas altas altitudes, quando o ar é rarefeito, há aumento do número de hemácias para compensar a hipoxemia; o mesmo acontece em cardiopatias e doenças pulmonares crônicas. Fumantes também podem apresentar eritrocitose. O hematócrito é geralmente $> 51\%$ em homens e $> 48\%$ em mulheres, sendo a morfologia das hemácias normal.

3.5.1.14 Efeito *rouleaux*

Rouleaux é o empilhamento de hemácias (fig. 3.32). É visto na lâmina de sangue periférico e na maioria das vezes está relacionado com doenças que cursam com aumento de proteína ou imunoglobulina circulante, como o mieloma múltiplo. É causa de aumento da velocidade de hemossedimentação (VHS) e pode interferir em testes imuno-hematológicos.

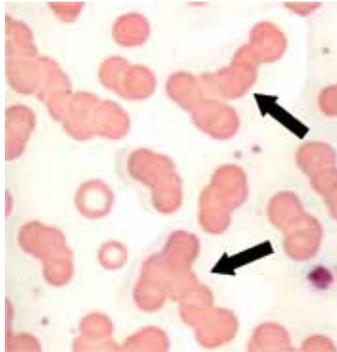


Figura 3.32. Hemácias em *rouleaux* (hemácias empilhadas).

3.5.2 Alterações da série branca

3.5.2.1 Leucocitose

A **leucocitose** é o aumento do número de leucócitos circulantes $>10.000/\mu\text{L}$. Pode ser resultante de processos infecciosos ou de alterações medulares. É importante avaliar a contagem diferencial, que pode indicar a causa da alteração. A contagem de leucócitos é geralmente expressa na seguinte ordem:

basófilos \Leftrightarrow eosinófilos \Leftrightarrow mielócitos \Leftrightarrow metamielócitos \Leftrightarrow
bastões \Leftrightarrow neutrófilos \Leftrightarrow linfócitos \Leftrightarrow monócitos

Em processos infecciosos bacterianos agudos, o número de neutrófilos tende a aumentar. Em processos mais graves, a medula óssea libera formas mais jovens – **bastões, metamielócitos, mielócitos** – para a defesa do organismo. Dessa forma, quando um hemograma está alterado por infecção bacteriana aguda, além de leucocitose e neutrofilia, é possível observar o chamado **desvio para esquerda**, isto é, um aumento do número de formas mais jovens circulantes. Observa-se, ainda, **granulação tóxica dos neutrófilos**.

Em alguns casos, pode acontecer a chamada **reação leucemoide**, com contagens de leucócitos acima de 30.000, na maioria dos casos causada por infecção e que deve ser diferenciada da leucemia aguda por meio dos dados clínicos e de exames complementares.

O uso de alguns medicamentos, como corticosteroides, também pode causar leucocitose e aumento do número de formas mais jovens circulantes, sem infecção. Na gestação, há também tendência à leucocitose.

As infecções virais, em sua maioria, cursam com leucopenia e linfocitose; já as infestações por parasitas e alergias em geral podem cursar com eosinofilia.

A basofilia pode estar presente em situações clínicas específicas, como **doença de Hodgkin** (um tipo de linfoma) e leucemia mieloide crônica.

Outras causas de leucocitose estão relacionadas com doenças malignas, como os diversos tipos de leucemias que, além de acarretarem aumento no número total de leucócitos, podem apresentar células blásticas – células muito jovens, clonais, com relação núcleo-citoplasma alterada – no sangue periférico. Essas **células clonais** invadem a medula óssea. Muitas vezes, o paciente apresenta leucocitose, porém com anemia e trombocitopenia, uma vez que toda a produção da medula óssea é desviada para as células leucêmicas. As leucemias podem ser agudas ou crônicas, tendo, nesse último caso, curso clínico mais brando.

3.5.2.2 Leucopenia

A **leucopenia** é a diminuição da contagem global de leucócitos circulantes. Pode estar associada à diminuição da contagem de células específicas, como linfócitos ou neutrófilos. A **linfopenia**, diminuição do número de linfócitos, pode ocorrer em algumas infecções virais ou bacterianas e em doenças autoimunes, como o **lupus eritematoso**.

A **neutropenia** (neutrófilos $<1.500/\mu\text{L}$) é a diminuição da contagem de neutrófilos, que pode ser consequência de doenças que infiltram a medula óssea, como leucemias e linfomas, ocorrer após tratamentos de quimioterapia ou uso de alguns medicamentos, como anti-inflamatórios e medicamentos para a tireoide, ou ser de causa infecciosa ou mais raramente hereditária. Pacientes neutropênicos estão em grande risco para infecções em geral e devem ser cuidadosamente investigados e acompanhados.

3.5.3 Alterações das plaquetas

3.5.3.1 Trombocitose

Trombocitose (fig. 3.33) é o nome que se dá ao excesso de plaquetas no sangue ($>400.000/\mu\text{L}$), que pode ter diferentes causas. Como as plaquetas possuem importante papel na coagulação do sangue, é frequente o aparecimento de trombocitose após alguma hemorragia já debelada ou nas duas primeiras semanas do pós-operatório. Sendo as plaquetas destruídas pelo baço, pacientes esplenectomizados podem manifestar trombocitose.

Algumas condições podem apresentar elevação plaquetária, por exemplo, pacientes adultos com doenças inflamatórias crônicas ou crianças pré-escolares, após inflamação aguda. Pode também ser uma manifestação paraneoplásica de portadores de câncer ou, mais raramente, ocasionada por doença mieloproliferativa crônica, sendo a trombocitose primária (e não reacional) denominada, nesse caso, **trombocitemia essencial**.

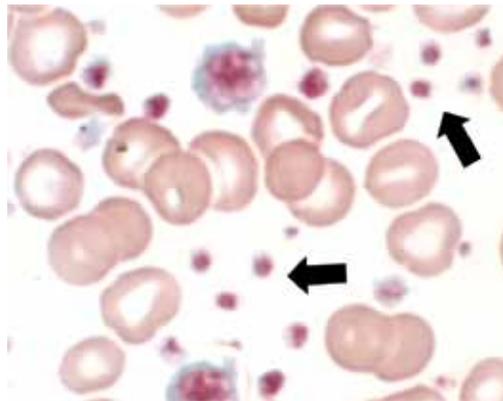


Figura 3.33. Trombocitose.

3.5.3.2 Trombocitopenia

É a baixa contagem de plaquetas no sangue circulante ($<150.000/\mu\text{L}$), um achado bastante frequente no hemograma. A avaliação da lâmina de san-

que periférico é importante para confirmar trombocitopenia, pois, em alguns casos, as plaquetas podem formar grumos, o que impede a sua contagem correta pelos métodos automáticos.

A **trombocitopenia** possui diversas causas associadas: como as plaquetas são formadas na medula óssea, doenças hematológicas proliferativas, como as leucemias, podem afetar a produção de plaquetas, assim como a quimioterapia e a radioterapia antitumorais. Sendo o baço o responsável pela destruição plaquetária, a **esplenomegalia** (crescimento do baço) ou o **hiperesplenismo** (aumento de sua atividade) podem levar à trombocitopenia.

A contagem plaquetária diminui fisiologicamente de 10% a 30% na gravidez. Condições patológicas que cursam com a trombocitopenia podem variar, ocorrendo desde viroses comuns até quadros graves – como hemorragias, septicemia ou coagulação intravascular disseminada, quando as plaquetas são consumidas no processo. Existem ainda doenças autoimunes em que as plaquetas são atacadas por anticorpos do próprio paciente, como a púrpura trombocitopênica imunológica. Por último, é necessário lembrar que vários medicamentos de uso corrente – como anti-inflamatórios não esteroidais – podem causar trombocitopenia como efeito colateral.

3.6 Hemostasia e coagulação

3.6.1 Componentes principais

- **Endotélio**

Os vasos sanguíneos e linfáticos são revestidos internamente por uma camada de células, ditas endoteliais, as quais, juntamente com o tecido conjuntivo imediatamente subjacente – subendotélio –, constituem a denominada túnica íntima desses vasos. Em artérias, arteríolas, veias e vênulas, as células endoteliais formam um revestimento contínuo. Em capilares, no entanto, podem se apresentar de três formas distintas: **contínua**, **fenestrada** (as células endoteliais

apresentam pequenas fenestras, mas a membrana basal é contínua) ou **descontínua** (tanto as células quanto a membrana basal possuem fenestras), forma encontrada, por exemplo, no baço, na medula óssea e no fígado.

Em um indivíduo humano adulto de cerca de 70 Kg, essas células chegam à casa dos trilhões (1 a 6×10^{13}), cobrindo uma área total de 1 a 7 m² e pesando cerca de 1 Kg. Possuem grande heterogeneidade de fenótipo, tanto em forma quanto em expressão de moléculas em sua superfície, dependendo do sítio onde se encontram. Não possuem estruturas similares a desmossomos, unindo-se entre si mediante ligações intercelulares dos seguintes tipos: *tight* (por meio de **occludinas**); **de adesão** (**caderinas**, em especial a **VE-caderina**); *gap* (**conexinas**); e *syndesmos* (**desmoplaquina interagindo com VE-caderina ou caderina-5**). Essas interações são fundamentais para a determinação de aspectos relacionados à permeabilidade vascular, bem como na transferência de sinais intracelulares.

As células endoteliais não são inertes. Pelo contrário, são altamente ativas metabolicamente e possuem várias funções, as quais podem variar segundo a região onde elas se encontram. Destacadamente, atuam no controle da permeabilidade vascular, na transmigração leucocitária, na regulação do tônus vascular, na angiogênese e na hemostasia.

- **Plaquetas**

Presentes habitualmente no sangue periférico na quantidade de 150.000 a 450.000/ μm , as plaquetas são derivadas da fragmentação citoplasmática de megacariócitos na medula óssea. Diariamente, formam-se cerca de 100 bilhões de novas plaquetas, que possuem tempo de vida de 8 a 14 dias, quando são, então, removidas da circulação por macrófagos.

Morfologicamente, quando não ativadas, são estruturas discoides, com aproximadamente 3 μm de diâmetro e 1 μm de espessura, estrutura essa mantida à **custa da disposição circunferencial de microtúbulos e filamentos de actina**. Na membrana plasmática, expressam principalmente **GPIb-IX** (glicoproteína rica em leucina), **integrinas** (**VLA-2, VLA-5 e VLA-6**), **GPIIb-IIIa**, **CD31**, **CD36** e **P-selectina**. Seu citoplasma possui mitocôndrias, lisossomos, corpúsculos

densos (ricos em difosfato de adenosina – ADP, trifosfato de adenosina – ATP, serotonina e cálcio) e grânulos alfa. Esses últimos secretam proteínas adesivas, como **fibrinogênio, fator de von Willebrand, fibronectina, vitronectina e trombospondina**, além de possuírem algumas proteínas específicas, tais como o **fator 4 plaquetário** e a **beta-trombomodulina**, e de conterem proteínas associadas à coagulação, como **fatores de crescimento, albumina, P-selectina, proteína S** e os **fatores V e XI**.

Funcionalmente, além do papel referente à hemostasia tradicionalmente atribuído às plaquetas, elas também atuam em processos como inflamações, angiogênese e metástase tumoral.

- **Proteínas séricas**

No plasma circulam uma série de proteínas que, juntamente com seus cofatores, são produzidas majoritariamente no fígado e têm papel fundamental nos processos de hemostasia, desde a adesão plaquetária até a formação completa do coágulo. Essas proteínas participam da adesão e da interação celulares, bem como em complexos processos de interação molecular e em reações de proteólise que resultam na formação do coágulo de fibrina e, posteriormente, na sua reabsorção.

Tradicionalmente, a coagulação é apresentada como uma cascata de reações sequenciais na qual ocorreriam sucessivas ativações de pró-enzimas por proteases plasmáticas, até a obtenção de **trombina**, enzima que converte fibrinogênio em fibrina. Essa proposta delinea duas vias de reação: uma dita **intrínseca**, com participação de fatores plasmáticos, e outra, **extrínseca**, com participação de fatores plasmáticos e de componentes extravasculares.

Essas duas vias apresentam convergência para um ponto comum: **a ativação do fator X**.³ Nesse modelo, a via **extrínseca** ativaria o fator X pelo fator VIIa – fator VII plasmático ativado pelo seu cofator, a tromboplastina, também chamada de fator tecidual. A via **intrínseca**, por sua vez, começa com a ativação do fator XII em XIIa, mediante seu contato com uma superfície carregada negativamente na presença de pré-caliceína e cininogênio

³ Por convenção, os fatores de coagulação são representados por algarismos romanos e, se ativados, recebem a letra “a” logo a seguir.

de alto peso molecular. A partir daí, são ativados sucessivamente os fatores XI, IX e X.

No entanto, a evolução do conhecimento vem mostrando que o modelo de cascata dividida em duas vias não reproduz com exatidão a fisiologia da coagulação, pois: a) a ativação do fator IX não é exclusiva da via intrínseca; b) a via extrínseca é a principal iniciadora da coagulação (deficiências de fator VII provocam quadros hemorrágicos graves); e c) essas vias não funcionam de maneira independente.

3.6.2 Fisiologia

O endotélio normal inibe a adesão plaquetária, bem como a ativação de fatores de coagulação. Quando ocorre lesão do revestimento endotelial por trauma ou doença, e o sangue entra em contato com o conjuntivo subendotelial, dispara-se o processo de **hemostasia primária**. Para esse processo, que ocorre poucos segundos após a lesão, concorrem componentes do endotélio vascular e plaquetas, resultando na formação, no local da lesão, de tampão plaquetário cujo efeito hemostático é transitório, porém fundamental, na interrupção do extravasamento de sangue em capilares, vênulas e pequenas arteríolas.

A **hemostasia secundária** (coagulação) demora vários minutos e consiste em reações do sistema plasmático de coagulação que resultam na produção de **filamentos de fibrina**. Esses filamentos consolidam o tampão hemostático primário, formando o **trombo**. Por fim, após a resolução da lesão, entra em ação o **sistema fibrinolítico**, o qual dissolve gradativamente o coágulo e restabelece o fluxo sanguíneo normal.

- **Hemostasia primária**

É o processo pelo qual se forma um tampão plaquetário no local do traumatismo vascular. O primeiro evento que ocorre na hemostasia primária é a **vasoconstrição**. Essa, embora efêmera, é importante e pode atingir até 60% de redução da luz original do vaso lesado. Alguns fatores endoteliais atuam nesse momento, com destaque para a **endotelina-1**, que age promovendo o

aumento do cálcio intracelular e, subseqüentemente, do tônus da musculatura lisa vascular, e o **fator ativador de plaquetas (PAF)**.

Também de forma muito aguda (poucos segundos após a lesão), as plaquetas aderem diretamente ao colágeno fibrilar subendotelial exposto por meio da **integrina VLA-2 (GPIa/IIa)**, que é expressa em sua membrana plasmática. A esse colágeno ligam-se também moléculas do **fator de von Willebrand**, que, por sua vez, ligam-se à **GPIb/IX das plaquetas**, formando uma ponte entre as plaquetas e o colágeno subendotelial que estabiliza a interação entre esses dois elementos. Essa associação se dá com grande rapidez, de maneira que viabiliza a adesão plaquetária mesmo em locais de circulação em alta velocidade do sangue.

À adesão, seguem-se a ativação das plaquetas, que perdem sua forma discoide e se tornam arredondadas, e a secreção de produtos contidos em seus grânulos, especialmente **tromboxano A₂**, **heparinase**, **ADP**, **fator Va**, **trombospondina**, **fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)**, **fator de von Willebrand**, **fator 4 plaquetário**, **fibronectina** e **fibrinogênio**. Alguns desses elementos são agregantes e vão provocar a ativação de outras plaquetas, e conseqüente agregação plaquetária.

Terceiro momento da hemostasia primária, **a agregação plaquetária é dependente da ação do complexo GPIIb/IIIa, o qual se liga habitualmente ao fator de von Willebrand**. No entanto, o ADP induz uma modificação conformacional nesse complexo, o qual passa a ligar fibrinogênio. Tanto o fator de von Willebrand quanto o fibrinogênio (em especial esse último) levam à agregação plaquetária ao formar pontes entre complexos GPIIb/IIIa de plaquetas diferentes.

• Coagulação

Consiste na ativação sequencial em cascata de várias proteínas plasmáticas que culminam na formação de fibrina, aumentando e solidificando o tampão plaquetário inicial. Durante a formação do tampão hemostático, as proteínas plasmáticas relacionadas à coagulação (hemostasia secundária) estão sendo ativadas, disparando a via da coagulação que produzirá trombina – a qual, por sua vez, converterá fibrinogênio em fibrina – por meio de uma série de reações que dependem de um complexo ligado a substrato (membrana celular) e da

ativação de pró-enzimas por proteases, em processo cálcio-dependente que necessita de cofatores celulares e solúveis. Alguns fatores da coagulação (II, VII, IX e X) são dependentes de **vitamina K**.

Cabe ressaltar que o início desse processo de ativação se dá pela exposição do fator tecidual – ausente no endotélio e em leucócitos, mas presente, por exemplo, em fibroblastos subendoteliais – ao ambiente intravascular. A essa exposição, segue-se a formação de um **complexo entre o próprio fator tecidual, fator VIIa e cálcio**. Esse complexo ativa, por clivagem, os fatores IX e X, formando os fatores IXa e Xa. O fator Xa, por sua vez, forma outro complexo com o fator Va, convertendo protrombina (fator II) em trombina (fator IIa), o que ocorre sobre a superfície de plaquetas ativadas e/ou células endoteliais. Além do seu principal papel de converter fibrinogênio em fibrina, a trombina assim formada também **induz a agregação e a secreção plaquetárias, além de ativar os fatores V, VIII e XIII** – esse último essencial na estabilização do coágulo de fibrina.

Todo o processo de coagulação descrito resumidamente acima possui sistemas reguladores, constituídos por diversas proteínas inibitórias, como a **proteína C** – que inativa os fatores Va e VIIIa por clivagem –, a **proteína S** – cofator não enzimático dessas reações – e a **antitrombina**, também chamada antitrombina III. Essa última inibe a ação dos fatores IXa, Xa e XIa, além de ser um inibidor primário da trombina e catalisar a dissociação da interação entre o fator tecidual e o fator VIIa (fig. 3.34).

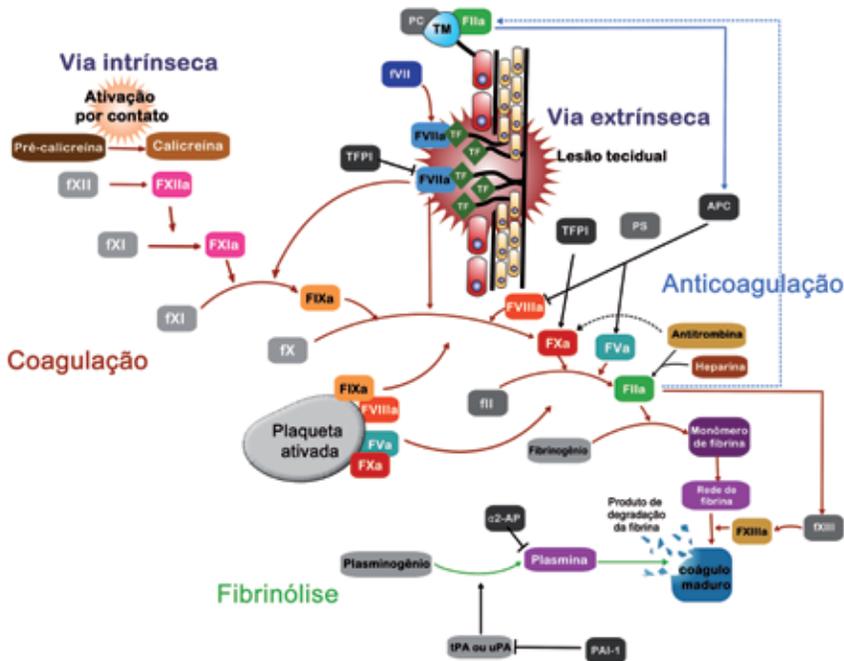


Figura 3.34. Ilustração das vias de coagulação.

• Fibrinólise

Logo após a formação do coágulo definitivo, inicia-se a lise do mesmo e o reparo do vaso, processo realizado pelo sistema fibrinolítico, o qual regula a geração de plasmina a partir da sua forma inativa, o plasminogênio. O evento começa com a liberação, pelas células endoteliais, do **ativador do plasminogênio tecidual (tPA)** e do **ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (uPA)**. Ambos penetram o coágulo de fibrina e hidrolisam uma ponte peptídica do plasminogênio, convertendo-o em plasmina, a qual degrada principalmente a fibrina, gerando **produtos de degradação da fibrina (FDPs, do inglês *fibrin degradation products*)**, embora também tenha ação sobre o fibrinogênio e os fatores V e VIII.

3.6.3 Avaliação laboratorial

- **Hemostasia primária**

Os principais testes para avaliar a hemostasia primária são tempo de sangramento, contagem de plaquetas e avaliação da função plaquetária.

○ **tempo de sangramento (TS)** precisa ser realizado por técnico experiente, uma vez que há certa subjetividade na apuração do resultado. Porém, se corretamente realizado, esse teste é uma abordagem sensível e confiável da função plaquetária *in vivo*. No entanto, o **método Duke** é o mais frequentemente empregado, apesar de possuir baixa sensibilidade. Nele, é feita uma pequena perfuração no lóbulo auricular seguida de observação da parada do sangramento. Esse procedimento, porém, possui sensibilidade bem menor que o **método de Ivy**, realizado com pequena incisão no antebraço, feita com bisturi apropriado após garroteamento com esfigmomanômetro insuflado até 40 mmHg. O emprego do método de Ivy é mandatório em pacientes sob investigação de sangramento anormal, trombopatias e doença de von Willebrand. Em algumas situações, como nesse último caso, um TS normal demanda repetição, por conta de variações plasmáticas cíclicas do fator de von Willebrand. Há controvérsias sobre a aplicabilidade do TS como teste de avaliação pré-operatória, mas há certo consenso de que o teste não deve ser empregado sozinho nessa abordagem.

Tempos de sangramento maiores que 10 minutos indicam risco aumentado de sangramento, que se acentua quando esse valor passa dos 15 minutos. Como habitualmente existe uma correlação quase linear entre o tempo de sangramento e a contagem de plaquetas, é fundamental correlacionar esse dado com a avaliação quantitativa e qualitativa das plaquetas. Cabe mencionar que pacientes com trombocitopenia autoimune muitas vezes apresentam TS muito curto, decorrente da intensa atividade das plaquetas imaturas circulantes.

A contagem de plaquetas é habitualmente realizada em equipamentos automatizados, os quais utilizam sangue total anticoagulado com EDTA, que age como quelante de cálcio. Muitos desses aparelhos são capazes de avaliar o volume plaquetário, identificando a presença de macroplaquetas. No entanto, algumas vezes pode ocorrer a chamada falsa trombocitopenia, decorrente da

ação conjunta de certas proteínas plasmáticas que, na presença de EDTA, provocam aglutinação plaquetária. Assim, recomenda-se a repetição de uma contagem alterada de plaquetas, com amostra obtida de nova coleta, e que, ao menos nesses casos, seja realizada contagem manual em lâmina pelo método de Fonio, que oferece menor precisão quantitativa, mas permite a análise direta da morfologia plaquetária. Até o limite inferior a 100 mil plaquetas por microlitro, não costuma haver manifestações clínicas e nem alterações no TS. Entre 50 e 100 mil, pode ocorrer ligeira alteração do TS, mas sem repercussão clínica importante, exceto em situações de trauma ou cirurgia. Abaixo de 50 mil plaquetas por microlitro, podem ocorrer equimoses e, quando esse número é inferior a 30 mil, os sangramentos podem ocorrer espontaneamente, inclusive em territórios nobres, como o encéfalo.

A função plaquetária pode ser abordada pelos testes de agregação, os quais avaliam *in vitro* diferentes vias de ativação plaquetária. Após o ensaio com agente agregante (ADP, adrenalina ou colágeno), coloca-se a suspensão de plaquetas em um aparelho denominado agregômetro, capaz de medir o percentual de transmissão de luz através dela. Eventualmente, podem-se empregar, em vez de agentes agregantes, moléculas que só induzam a agregação em situações anormais, como é o caso da **ristocetina**, que só aglutina plaquetas na presença de fator de von Willebrand ou de GPIIb, de maneira que o teste pode ser empregado, respectivamente, na investigação de doença de von Willebrand ou **púrpura de Bernard-Soulier**. Da mesma forma, outras doenças podem ser avaliadas com base em técnicas de citometria de fluxo utilizando marcadores específicos para proteínas plaquetárias que possam estar ausentes, normais ou superexpressas.

- **Coagulação plasmática**

Quanto à função da coagulação plasmática, os testes mais empregados são **tempo de protrombina (TAP)**, **tempo de tromboplastina (PTT)**, **tempo de trombina (TT)** e **dosagem do fibrinogênio sérico**. Todos esses métodos são coagulométricos, ou seja, baseiam-se na formação de coágulos de fibrina com posterior análise fotométrica em coagulômetros. Esses testes são específicos para certos fatores de coagulação, de modo que são muito úteis no diagnóstico

de doenças relacionadas às reações bioquímicas da coagulação, bem como no acompanhamento e monitoramento de tratamentos que interfiram nessas vias.

Para a execução desses testes, utiliza-se plasma livre de hemácias, leucócitos e plaquetas, obtido por meio de coleta cuidadosa e minimamente traumática de sangue periférico em frasco ou seringa contendo citrato de sódio na exata proporção de volume de 9:1 (sangue/citrato), seguida de pronto processamento da amostra – a demora na realização dos testes pode alterar os resultados.

○ **TAP** é um teste que aborda a coagulação pela via dependente do fator tecidual, medindo o tempo de formação do coágulo de fibrina após a adição de fator III (tromboplastina tecidual) e cálcio, os quais, em conjunto, ativam o fator VII. Esse, uma vez ativado (VIIa), ativa o fator X, disparando a via comum de coagulação, levando à produção de trombina e, subsequentemente, de fibrina. Assim, é um método apropriado para a avaliação dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K (II, VII e X), e seu resultado normal indica bom funcionamento da estimulação dependente do fator tecidual, bem como a integridade da via comum. ○ TAP é o teste mais aplicado no controle de terapia de anticoagulação oral com cumarínicos, para o qual se utiliza um índice, denominado INR, que relaciona o TAP do paciente com o TAP normal.

○ **PTT** também avalia a via comum, mas, por sua vez, juntamente com os fatores da dita “via intrínseca” da coagulação (fatores XII, XI, IX, VIII, cininogênio de alto peso molecular e pré-calicreína). Dessa feita, o tempo de formação do coágulo (expresso por meio da proporção entre o tempo obtido com o plasma em teste e aquele obtido com o plasma controle) é medido após a adição de cefalina e de um ativador de contato. Esse é um teste ideal para o monitoramento de heparinização plena.

○ **TT** é aquele medido após a introdução de trombina em baixa concentração no plasma puro, sendo, portanto, dependente da concentração de fibrinogênio e de inibidores de formação de fibrina, como a heparina. A concentração de fibrinogênio pode ser aferida pelo tempo de coagulação do plasma após a introdução de alta concentração de trombina (**método de Clauss**).

Bibliografia complementar

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS (AABB). *Technical Manual*. 16. ed. Bethesda: AABB Press, 2008.

AIRD, William C. Endothelium in Health and Disease. *Pharmacological Reports*, v. 60, n. 1, p. 139-143, 2008.

_____. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, Function, and Mechanisms. *Circulation Research*, v. 100, p. 158-173, 2007.

BAIN, Barbara J. *Células sanguíneas: consulta rápida*. Porto Alegre: Artmed, 1998.

BEUTLER, Ernest et al. *Williams Hematology*. 6. ed. Nova York: McGraw-Hill, 2001.

BLUTEAU, Dominique et al. Regulation of Megakaryocyte Maturation and Platelet Formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 7, supl. 1, p. 227-234, 2009.

DACIE, John V.; LEWIS, S. Mitchell. *Practical Haematology*. 8. ed. Edimburgo: Churchill Livingstone, 1995.

DEJANA, Elisabetta; CORADA, Monica; LAMPUGNANI, Maria Grazia. Endothelial Cell-to-Cell Junctions. *The FASEB Journal*, v. 9, n. 10, p. 910-918, 1995.

FAILACE, Renato (org.). *Hemograma: manual de interpretação*. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995.

FRANCO, Rendrik F. Fisiologia da coagulação do sangue e da fibrinólise. In: ZAGO, Marco Antonio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo (org.). *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 3-13.

FURIE, Bruce. Pathogenesis of Thrombosis. *Hematology*, v. 1, p. 255-258, 2009.

HAMERSCHLAK, Nelson. *Manual de hematologia: programa integrado de hematologia e transplante de medula óssea*. Barueri: Manole, 2010.

HOKAMA, Newton Key; MACHADO, Paulo Eduardo de Abreu. Interpretação clínica do hemograma nas infecções. *Jornal Brasileiro de Medicina*, v. 72, n. 3, p. 38-49, 1997.

LAMPUGNANI, Maria Grazia. Endothelial Adherens Junctions and the Actin Cytoskeleton: An 'Infinity Net'? *Journal of Biology*, v. 9, n. 3, p. 16-19, 2010.

LOURENÇO, Dayse M. Avaliação laboratorial da hemostasia. In: ZAGO, Marco Antonio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo (org.). *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 749-755.

MORELLI, V. M. Estrutura e funções das plaquetas e das células endoteliais. In: ZAGO, Marco Antonio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo (org.). *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 731-737.

OLIVEIRA, Raimundo Antônio Gomes; POLI NETO, Adelino. *Anemias e leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais*. São Paulo: Roca, 2004.

PERKINS, Sherrie L. Examination of the Blood and Bone Marrow. In: GREER, John P. et al. (org.). *Wintrobe's Clinical Hematology*. 12. ed. Filadélfia: Lippincott Williams and Wilkins, 2009. p. 9-35.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA. *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica: medicina laboratorial para coleta de sangue venoso*. 2. ed. Barueri: Minha Editora, 2010.

TIERNEY, Lawrence M.; McPHEE, Stephen J.; PAPADAKIS, Maxine A. (org.). *Current Medical Diagnosis & Treatment*. Nova York: McGraw-Hill, 2008.

VERRASTRO, Therezinha (org.). *Hematologia e hemoterapia*. São Paulo: Atheneu, 2005.

WOHNER, N. Role of Cellular Elements in Thrombus Formation and Dissolution. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, v. 6, p. 3, p. 224-228, 2008.

Capítulo 4

Hemoterapia básica na prática transfusional

Paulo Marcelo T. Cotias

4.1. Histórico

Até chegar aos dias atuais, a hemoterapia passou por várias fases, e cada descoberta facilitou o desenvolvimento da tecnologia que temos hoje. Desde a Antiguidade o homem sabe que a perda de sangue pode levar à morte ou, quando não, provocar fraqueza e desânimo. Com isso, consolidou-se a ideia de que o sangue é sinônimo de vida e força.

Ainda que durante muitos séculos se tenha tentado realizar transfusões de sangue como método terapêutico, o uso do sangue para curar doenças foi totalmente infrutífero, quando não resultou na morte imediata do paciente. Um caso bastante conhecido é o do papa Inocêncio VIII, que, em 1492, contraiu grave enfermidade que o deixou à beira da morte. Com o intuito de salvá-lo, os médicos da época teriam administrado transfusões de sangue de três jovens no pontífice. Como não eram conhecidos os mecanismos da circulação sanguínea, o sangue foi bebido pelo paciente, que, meses depois, veio a falecer.

Os três doadores também morreram logo após a doação, acredita-se que por hipovolemia,¹ pois não havia controle acerca da quantidade de sangue que podia ser retirada de cada doador.

A história da transfusão de sangue pode ser dividida em três períodos: pré-histórico, pré-científico e científico. No primeiro período, a maioria das “transfusões” consistia na ingestão de sangue dos inimigos derrotados nos campos de batalha, ou nas lutas de gladiadores, sendo encontrados relatos médicos em procedimentos da Grécia Antiga e do Império Romano. O período pré-científico começa com a descoberta da circulação sanguínea, descrita, em 1628, por William Harvey (1578-1657), e do papel central do coração nela, o que levou ao desenvolvimento da prática de injeções intravenosas. Essa técnica deu início à infusão não só de medicamentos, mas também de sangue na veia dos pacientes.

As primeiras transfusões datam de meados do século XVII. Nelas, em geral, utilizava-se o sangue de animais. Os resultados dessas transfusões nem sempre eram satisfatórios, o que fez a Academia Nacional de Medicina da França proibir, em 1670, qualquer tipo de infusão de sangue. Pouco tempo depois, passou-se a utilizar sangue humano. Porém, como não se conheciam os sistemas sanguíneos, muitas transfusões acabavam em tragédia; já outras, por casualidade, eram bem-sucedidas, havendo visível recuperação do paciente.

O período científico é caracterizado pela descoberta dos grupos sanguíneos por Karl Landsteiner (1868-1943), pesquisador austríaco que, em 1900, descobriu o sistema ABO, e, posteriormente, por Philip Levine (1900-1987) e Rufus E. Stetson (1886-1967), que, em 1939, descobriram o fator Rh. Em 1911, Reuben Ottenberg (1882-1959), baseado nos grupos sanguíneos ABO descritos por Landsteiner, torna-se o primeiro indivíduo a selecionar sangue compatível para transfusão. Ottenberg estabeleceu o postulado de que a transfusão só é possível quando o soro do receptor não aglutina as hemácias do doador. A partir daí, foram descobertos vários sistemas de grupos sanguíneos, e as pesquisas relacionadas aos antígenos e anticorpos eritrocitários foram sendo desenvolvidas para que se alcançasse a segurança transfusional. Surge, então, o conceito de compatibilidade sanguínea e a necessidade de

¹ Diminuição do volume sanguíneo.

respeitá-lo, evitando assim que o sangue transfundido seja destruído por incompatibilidade ABO.

No entreguerras, foi desenvolvida uma solução anticoagulante à base de citrato de sódio que permitiu a conservação e a estocagem do sangue em seu estado líquido e o estabelecimento de bancos de sangue.

Durante o período científico, são descobertos vários procedimentos transfusionais. É possível caracterizar as etapas desse processo de descobertas em três fases: fase do braço a braço, fase do frasco e fase da bolsa plástica. Essas fases revelam a evolução da hemotransfusão desde o momento em que a infusão era realizada diretamente do doador para o paciente, passando pelo período em que o hemocomponente era coletado em frascos contendo anticoagulante, até evoluir, posteriormente, para as bolsas de plástico especiais, usadas atualmente.

A medicina transfusional, denominação moderna da hemoterapia, estuda e avalia, para fins terapêuticos, os componentes e derivados do sangue, chamados respectivamente hemocomponentes e hemoderivados. Os hemocomponentes são obtidos por processos físicos. Entre eles, estão os concentrados de hemácia (CH), o plasma fresco concentrado (PFC), o concentrado de plaquetas (CP) e o crioprecipitado. Os hemoderivados, obtidos do plasma humano por processos físico-químicos, são industrializados. Os principais são albumina, imunoglobulinas, fatores de coagulação (VII, VIII, IX, complexo protrombínico), cola de fibrina e antitrombina III.

4.2. Imuno-hematologia: conceitos básicos

- **Antígenos**

Antígeno é um fragmento de uma proteína estranha ao organismo que é capaz de desencadear uma resposta imune.

a) Propriedades dos antígenos

Imunogenicidade: é a capacidade do antígeno de induzir a formação de uma resposta imune.

Antigenicidade: é a capacidade de uma substância ser reconhecida pelo sistema imune.

Obs.: Nem todo antígeno é um imunógeno,
mas todo imunógeno é um antígeno.

b) Estrutura básica do antígeno

Determinante antigênico ou **epítopo:** é o sítio do antígeno ao qual a molécula de anticorpo se liga.

c) Categorias de antígenos

Aloantígenos: são antígenos comuns a uma mesma espécie. Ex.: antígenos eritrocitários.

Heteroantígenos: são antígenos pertencentes a espécies diferentes.

Autoantígenos: são proteínas, eritrocitárias ou não, do próprio indivíduo que já não são reconhecidas por ele. Ex.: anemia hemolítica autoimune.

d) Estrutura química

Segundo a sua estrutura química, os antígenos se distribuem em três grupos:

Proteínas, como o sistema Rh;

Polissacarídeos, como o sistema ABO;

Lipídios e ácidos nucleicos.

• Anticorpos

Os anticorpos são proteínas plasmáticas (imunoglobulinas) secretadas por plasmócitos – células derivadas dos linfócitos B –, após contato com qualquer antígeno estranho no organismo.

a) Categorias de anticorpos

Aloanticorpos: são aqueles produzidos contra um antígeno não próprio, diante de um estímulo imune.

Autoanticorpos: são anticorpos dirigidos contra antígenos próprios.

Heteroanticorpos: são anticorpos produzidos contra antígenos de indivíduos de espécies diferentes. Ex: produção de uma antiglobulina humana, mediante a imunização de coelhos por um anticorpo humano.

b) Isotipos de imunoglobulinas

Existem cinco classes de imunoglobulinas (Ig) nos líquidos corporais humanos. São elas: **IgA, IgD, IgE, IgG e IgM**. Cada classe de imunoglobulina difere de outra em peso molecular, conteúdo de carboidratos, atividade biológica e meia-vida plasmática. **Cerca de 80% das imunoglobulinas séricas são IgG, 13% são IgA, 6% são IgM e 1% são IgD. Já a IgE normalmente está presente em quantidades apenas desprezíveis, cerca de 0,004%.**

c) Fenótipos e genótipos eritrocitários

Fenótipo: é a expressão, na membrana da hemácia, da carga genética. Ex.: presença de antígeno A na superfície da hemácia, no grupo sanguíneo A.

Genótipo: diz respeito à estrutura genética herdada pelo indivíduo. Ex.: o indivíduo que apresenta o antígeno A na sua superfície pode ter os genótipos AA ou AO.

4.3. O sistema ABO

O sistema ABO foi descoberto por Karl Landsteiner, a partir de estudos realizados em amostras de sangue de diversas pessoas. Landsteiner separou o soro de cada indivíduo, misturou as hemácias de um com o soro do outro e observou a ocorrência de aglutinação em alguns casos e sua ausência em outros. Os indivíduos que não apresentavam aglutinação foram classificados como O. Os outros foram classificados como A e B. Em 1902, dois anos depois da descoberta de Landsteiner, seus colaboradores Alfred von Decastello (1872-1960) e Adriano Sturli (1873-1964) identificaram e classificaram o grupo AB. Os grupos O, A e B são os mais comuns; o grupo AB é o mais raro.

Com essas descobertas, foram estabelecidos os preceitos básicos da imunohematologia, os quais preconizam que, em condições gerais, o soro dos indivíduos normais só contém anticorpos contra antígenos que não estão presentes na superfície de suas hemácias.

- **Frequência dos grupos sanguíneos na população**
 - **grupo O:** 45%
 - **grupo A:** 41%
 - **grupo B:** 10%
 - **grupo AB:** 4%

4.3.1 Estrutura dos antígenos do sistema ABO

Os antígenos do sistema sanguíneo ABO são formados estruturalmente por moléculas de carboidratos, os quais são determinados pela ação de enzimas chamadas **glicosiltransferases**, que adicionam monossacarídeos a um substrato precursor. A **enzima fucosiltransferase** adiciona uma fucose, dando origem ao chamado **antígeno H**. A enzima **N-acetilgalactosaminiltransferase** adiciona o monossacarídeo N-acetilgalactosamina ao antígeno H, formando o **antígeno A**; a enzima **galactosiltransferase**, por sua vez, adiciona galactose, formando o **antígeno B do sistema ABO**. O grupo sanguíneo AB apresenta atividade dessas duas enzimas. O grupo sanguíneo O não possui glicosiltransferase A ou B, mas apresenta o antígeno H em grande quantidade nas superfícies das hemácias.

4.3.2 Herança dos grupos sanguíneos ABO

O grupo sanguíneo de cada indivíduo é determinado pela **herança** de um gene de cada um dos pais. As combinações desses genes resultam em quatro principais fenótipos: **A, B, O, AB**. O **gene O**, por ser amorfo, não ocasiona a produção de nenhum antígeno. Os **genes A e B** resultam, respectivamente, na produção dos antígenos A e B, e sua expressão depende da herança do

gene H. O **fenótipo AB** condiciona a produção de ambos os antígenos A e B. Os indivíduos O possuem o antígeno H em maior quantidade.

4.3.3 Antígenos do sistema ABO

A expressão dos antígenos ABO na superfície das hemácias é determinada por genes localizados no braço longo do cromossomo 9. Esses genes codificam a produção de enzimas chamadas glicosiltransferases, que adicionam diferentes carboidratos (açúcares) a uma substância precursora denominada H. A substância H está presente na superfície das hemácias e tem a sua síntese codificada pelos alelos H e h. A herança de pelo menos um gene H (HH ou Hh) leva à produção de uma enzima, a fucosiltransferase, que adiciona o açúcar fucose na superfície das hemácias, dando origem ao antígeno H. Esse antígeno vai ser transformado nos antígenos A e/ou B pela ação de enzimas determinadas pelos genes A e B. A substância H é um precursor obrigatório para a expressão dos alelos A ou B. A fucosiltransferase necessária para a produção da substância H é controlada pelo gene H, localizado no cromossomo 19.

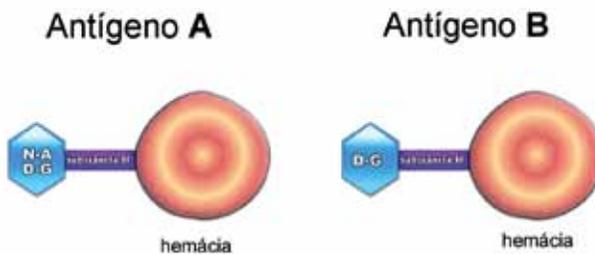


Figura 4.1. Antígenos do sistema ABO nas hemácias.

O **gene A** codifica a produção da enzima N-acetilgalactosaminiltransferase, que adiciona o açúcar **N-acetilgalactosamina** ao antígeno H, formando o antígeno A.

O **gene B** codifica a produção da enzima galactosiltransferase, que, por sua vez, adiciona o açúcar **D-galactose**, formando o antígeno B. O grupo san-

guíneo AB possui atividade dessas duas enzimas. O grupo sanguíneo O não possui glicosiltransferases A ou B, mas apresenta, na superfície das hemácias, o antígeno H em grande quantidade.

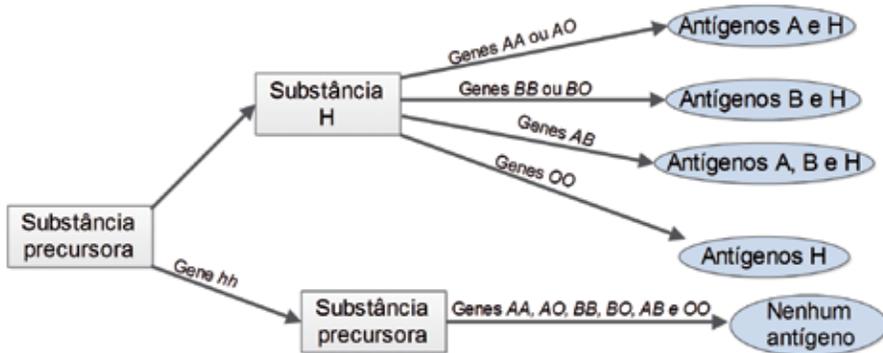


Figura 4.2. Expressão dos antígenos ABO nas hemácias.

4.3.4 Fenótipo de Bombaim

O **fenótipo de Bombaim** (hh, H_{nulo}, Oh) é muito raro. Foi encontrado pela primeira vez em 1952, em Bombaim, na Índia. Esse fenótipo ocorre em indivíduos nos quais as hemácias não têm as características de grupos determinados pelos genes A e B, ainda que esses genes tenham sido herdados por eles, e apresentam ausência total da substância H, ou seja, são desprovidos dos antígenos ABH normais. Por isso, não aglutinam com anti-A, anti-B e anti-AB, o que sugere serem essas pessoas do tipo O. No entanto, hemácias do tipo O reagem com o anti-H, o que não ocorre com o fenótipo de Bombaim. O soro desses indivíduos contém anti-A, anti-B, anti-AB e anti-H. Como o antígeno H é comum a todos os grupos sanguíneos ABO, o **sangue Bombaim é incompatível com todos os doadores ABO.**

4.3.5 Interação dos genes Hh e ABO

O **gene H** evoca uma enzima L-fucosiltransferase que transfere o carboidrato L-fucose para a galactose terminal da cadeia precursora. É comum na popu-

lação (99,99%), sendo o fenótipo hh (fenótipo de Bombaim), extremamente raro, sem expressão dos genes ABO.

- **gene A** codifica a produção de N-acetilgalactosamiltransferase, transferindo acetilgalactosamina para a estrutura H.

- **gene B** codifica a produção de D-galactosiltransferase para a substância H.

- **gene O** não apresenta carboidratos na sua estrutura; possui, portanto, elevada concentração de substância H.

4.3.6 Formação dos antígenos solúveis A, B e H

Os antígenos solúveis A, B e H podem ser encontrados em hemácias, linfócitos, plaquetas, tecidos epiteliais, medula óssea, rins e em secreções orgânicas e líquidos biológicos – saliva, lágrima, urina, suco gástrico, bile, leite, líquidos amniótico, pleural, peritoneal e pericárdico, cisto ovariano e cisto hidático.

- aparecimento da especificidade ABH nas secreções é regulado pelo **gene secretor Se**. Indivíduos com **genótipo SeSe ou Sese** são denominados secretores, e indivíduos com genótipo sese são denominados não secretores.

- Os **antígenos ABH** secretados são glicoproteínas, ao contrário dos glicolipídios, encontrados na superfície das hemácias.

4.3.7 Interação de genes Sese, Zz e ABH

Os genes Sese e Zz são herdados de forma independente dos genes ABO e H. **Sese** é denominado secretor e regula a formação do antígeno H, subsequentemente aos antígenos.

- **sistema Zz** regula a produção do antígeno H nas hemácias; na ausência desse sistema, de ocorrência rara, nenhum antígeno H é formado.

Quadro 4.1. Características do sistema ABO.

Grupo ABO	Antígeno ABO (hemácia)	Anticorpos (soro/plasma)	Genótipos possíveis
O	nenhum	anti-A, anti-B, anti-AB	OO
A ¹	A ¹	anti-B	A ¹ A ¹ , A ¹ A ² , A ¹ O
B	B	anti-A	BB, BO
A ¹ B	A ¹ e B	nenhum	A ¹ B
A ²	A ²	anti-B, eventualmente anti-A ¹	A ² A ² , A ² O
A ² B	A ² e B	nenhum, eventualmente anti-A ¹	A ² B

4.3.8 Subgrupos de ABO

• Subgrupos de A

Os subgrupos mais comuns dos antígenos A são A₁ e A₂, que correspondem a 99% dos indivíduos do grupo A. Os mais raros são os subgrupos A₃, A_x, A_{terminal}, A_m, A_y e A_{el}. Aproximadamente 80% dos indivíduos do grupo A e AB são respectivamente A1 e A1B; e 19% são A2 e A2B.

As diferenças qualitativas e quantitativas principais entre A₁ e A₂ são:

- A₁ tem A₂, mas A₂ não tem A₁;
- A₁ apresenta os antígenos A, A₁ e A₂, ao passo que A₂ possui apenas um antígeno;
- A₁ possui menor quantidade da substância H em relação a A₂;
- a lectina anti-H, produzida a partir do extrato *Ulex europaeus*, semelhante ao anti-H humano, aglutina as células A₂ e O;
- o anti-A₁ é encontrado no soro de 1 a 8% dos indivíduos A₂ e em 22 a 35% dos indivíduos A₂B;
- as hemácias A₁ reagem somente com soros anti-A₁ – lectina anti-A₁ (*Dolichos biflorus*); quando não reagem, são denominadas A₂.

Obs.: Os anticorpos anti- A_1 e anti- A_2 são anticorpos frios.²

- **Subgrupos de B**

Os subgrupos de B – B_3 , B_x , B_m e B_{el} – são menos frequentes que os subgrupos de A; eles também possuem uma lectina para classificá-los, denominada *Bandeiraea simplicifolia*, preparada para diferenciar as variantes de B.

4.3.9 Anticorpos do sistema ABO

Os anticorpos do sistema ABO são naturais, ou seja, existem no soro dos indivíduos sem que os mesmos tenham sido expostos ao antígeno correspondente. Considera-se que os anticorpos naturais são formados pela imunização por antígenos semelhantes, presentes em alimentos e microrganismos. Esses anticorpos são, em geral, **imunoglobulinas IgM, que não atravessam a barreira placentária**. No material para exame, os anticorpos encontram-se no plasma ou no soro das amostras estudadas. Por causa de estímulos bacterianos, podem estar presentes no trato intestinal, pois alguns açúcares produzidos pelas bactérias são imunodominantes e possuem características similares aos antígenos A e B. Além das bactérias, outros fatores externos – alimentos, poeiras e cosméticos – podem estimular a produção de anticorpos desse sistema.

Os anticorpos podem ser classificados em **naturais e imunes**.

São classificados como naturais quando não identificamos um estímulo antigênico específico. Na sua grande maioria, são imunoglobulinas do tipo IgM.

São classificados como imunes quando resultam de estímulo antigênico específico. Essa imunidade pode ser resultado de heteroimunização, infecções bacterianas – principalmente intestinais –, soros antidiftéricos ou tetânicos (animal/bacteriano), aloimunização – quando, durante a gestação, o bebê recebe os anticorpos da mãe – ou transfusão ABO incompatível. Quase sempre são

² Anticorpos frios são aqueles que se encontram a 4°C.

imunoglobulinas do tipo IgG. No indivíduo com 3 a 6 meses de idade já se encontram quantidades pequenas de anticorpos A e B, os quais atingem produção máxima entre os 5 e os 10 anos de idade. Após os 65 anos de idade, os títulos desses dois anticorpos decrescem.

4.4. Sistema RH

O sistema Rh (Rhesus) foi descoberto em 1939 por Levine e Stetson, a partir da observação do caso clínico de uma mulher que, depois de ter dado à luz uma criança com **doença hemolítica perinatal (DHPN)**, ou **doença hemolítica do recém-nascido (DHRN)**, apresentou reação transfusional grave após ter sido transfundida com sangue ABO compatível com o do marido. O soro dessa mulher aglutinava as hemácias de seu marido e de cerca de 80% dos doadores caucasianos ABO compatíveis. No ano seguinte, Karl Landsteiner e Alexander Wiener (1907-1976) relataram que o soro de coelhos imunizados com hemácias de macacos do gênero *Rhesus* aglutinava cerca de 85% das hemácias humanas. Inicialmente pensaram que esses anticorpos identificavam o mesmo antígeno – o **antígeno Rh (Ag Rh)** – da superfície dos glóbulos vermelhos humanos e do macaco *Rhesus*. Posteriormente, demonstrou-se que o anticorpo anti-Rh produzido nos animais não era idêntico ao anti-D humano, mas o termo de grupo sanguíneo Rh já estava consagrado pelo uso. Sendo assim, o heteroanticorpo passou a ser chamado de **anti-LW** e o aloanticorpo humano foi renomeado **anti-D**.

O **antígeno Rh(D)** é altamente imunogênico. Entre os indivíduos Rh(D) negativo que tenham contato com hemácias Rh(D) positivo, mais de 80% desenvolverão anticorpos específicos contra esse antígeno.

Depois do sistema ABO, o sistema Rh é o sistema sanguíneo mais importante, com 49 antígenos descritos; deles, os **antígenos D, C, c e e** são responsáveis por quase 99% dos problemas clínicos associados ao sistema, relacionados a reações transfusionais e à DHRN/DHPN.

4.4.1 Variantes fenotípicas do antígeno D

A expressão fenotípica do antígeno D pode variar, com a ocorrência de alterações qualitativas/quantitativas:

- **D positivo:** no indivíduo D positivo, o antígeno D é um mosaico de subunidades proteicas com todos os seus epítomos, ou seja, com todos os seus determinantes antigênicos até agora estudados. Portanto, do ponto de vista qualitativo e quantitativo, esse é considerado o D normal.
- **D fraco:** por muitos anos conhecido como “variante Du”, no D fraco as hemácias examinadas reagem somente na técnica de Coombs indireto, quando o soro anti-D é testado em fase de antiglobulina humana. Na atualidade, a determinação sorológica do D fraco depende não apenas do título do reagente, mas também da técnica empregada. Essa variação está de acordo com o valor quantitativo do antígeno D, expresso na proteína RhD da membrana eritrocitária, que é diretamente proporcional à porção intramembranar do antígeno. Indivíduos com esse fenótipo não produzem anti-D no caso de receberem transfusão de hemácias D positivo ou normal. Estima-se que a frequência de D fraco na população seja inferior a 1%, sendo mais comum entre os negros. Indivíduos que expressam o antígeno D fraco são fenotipicamente Rh positivo.
- **D parcial:** os antígenos D parcial são caracterizados pela ausência de um ou mais epítomos do antígeno D, ocasionada por substituições de aminoácidos promovidas por mutações de ponto missense³ ou por rearranjos gênicos entre **genes RHD e RHCE**, que alteram qualitativamente a proteína RhD na porção extracelular. Sorologicamente, na prática de rotina, são de difícil distinção, podendo ser detectados por antissoros monoclonais.

Os antígenos D parcial são classificados em categorias, de acordo com os epítomos ausentes. A categoria VI é a mais frequentemente encontrada entre os indivíduos Rh positivo que são D parcial. Em alguns casos, podemos encontrar no soro de indivíduos previamente transfundidos ou com gestações

³ Pontos missenses do RhD são pontos de mutações em diferentes éxons do gene RHD.

e/ou abortos prévios que se apresentam sorologicamente como D normal a presença do anticorpo anti-D, podendo tratar-se então de um D variante. Esses indivíduos podem produzir anticorpos anti-D após transfusão ou gravidez, anticorpos que são formados contra alguns epítomos que estão ausentes.

Algumas categorias são identificadas como D fraco; no caso do DIII, os indivíduos se apresentam sorologicamente como D normal.

Obs.: Indivíduos que expressam o antígeno D fraco são fenotipicamente Rh positivo.

4.4.2 *Recomendação transfusional*

Transfusionalmente, a conduta ainda é controversa, mas, em geral:

- **doadores RhD fraco** devem ser considerados Rh positivo, pois podem sensibilizar receptor para anti-D, ou mesmo reagir com anti-D previamente formado.
- **receptores RHD fraco e/ou D parcial**: a regra para evitar imunizações transfusionais ou feto-maternas de indivíduos D parcial fraco e/ou D fraco é transfundir sangue RhD negativo em indivíduo D fraco e realizar a prevenção de imunização da mãe D fraco com imunoglobulinas anti-D.
- **receptores RHD parcial**: devem receber transfusão de hemocomponentes RhD negativo.
- **Rh null**: não apresenta antígeno do sistema Rh nas hemácias; esse fenótipo é causado por gene relacionado a esses antígenos suprimidos.

Os antígenos do sistema Rh são passados geneticamente pelos pais. A genética molecular mostrou que dois genes controlam a produção das proteínas do sistema Rh: o **gene RHD**, que codifica a produção da **proteína RhD**; e o **gene RHCE**, que possui vários alelos – **RHc_e**, **RHc_E**, **RHc_e**, **RHCE** – e codifica a produção da **proteína RhCE**. Existem duas teorias para explicar a formação genética dos antígenos desse sistema:

- **Teoria de Fisher e Race:** afirma que há um gene para cada antígeno, e em cada par de cromossomos homólogos há três loci intimamente ligados, cada um deles ocupado por um gene do sistema Rh.
- **Teoria de Wiener:** afirma que existe um gene para um complexo antigênico, e em cada cromossomo de um par de homólogos existe um gene responsável por um aglutinogênio com múltiplas especificidades sorológicas.

Os antígenos do sistema Rh somente estão presentes nas hemácias, ou seja, estão ausentes no plasma, no soro, nos leucócitos e nas secreções. Esses antígenos estão bem desenvolvidos no nascimento.

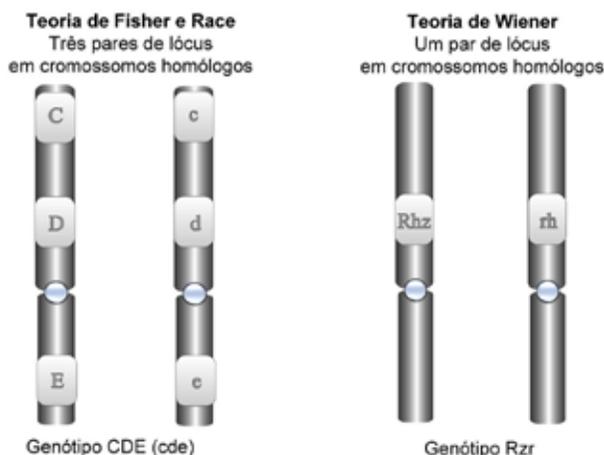


Figura 4.3. Esquemas representativos das teorias de formação genética dos antígenos.

4.4.3 Anticorpos do sistema Rh

A maioria dos anticorpos do sistema Rh é produzida após estímulo com antígenos Rh específicos, mas também há casos de anticorpos naturais, como o anti-E. A temperatura ideal para a reação dos anticorpos do sistema Rh é de 37°C; grande parte dos anticorpos do sistema Rh é constituída por anticorpos incompletos do tipo IgG, os quais não fixam complemento e nem causam hemólise *in vitro*.

4.5. Outros sistemas de grupos sanguíneos

4.5.1 O sistema Lewis

O sistema Lewis (Le) se diferencia dos outros sistemas de grupos sanguíneos pelo fato de seus antígenos não estarem inteiramente interligados às hemácias, mas serem adsorvidos do plasma pelas hemácias com antígenos Le^a e Le^b positivo.

Os antígenos do sistema são codificados pelo gene Le , que age sobre um substrato – substância precursora transformada em substância H sob a ação do gene H – e o converte no fator Le^a , presente no plasma, nas secreções e, subsequentemente, nas hemácias.

A produção do fator Le^b , além de depender da presença do gene Le^a , também depende dos genes H e Se , relacionados com o sistema ABO. Se algum desses genes estiver ausente, nenhuma substância Le^b estará presente no plasma, nas secreções ou nas hemácias, pois a substância Le^a somente é transformada em Le^b na presença de pelo menos um desses dois genes. Ao nascimento, a expressão de antígenos desse sistema nas hemácias é reduzida: a maioria dos recém-natos é $Le(a-b-)$.

Observam-se três fenótipos na população caucasiana:

- $Le(a+b-)$;
- $Le(a-b+)$;
- $Le(a-b-)$.

Obs.: O fenótipo $Le(a+b+)$ é raro.

4.5.1.1 Anticorpos do sistema Lewis

Os anticorpos do sistema Lewis são geralmente naturais (IgM), isto é, aparecem nos indivíduos cujo respectivo antígeno se encontra ausente. O anti- Le^a é o anticorpo mais frequentemente encontrado. É de ocorrência natural (IgM) e em geral não possui importância clínica. Apenas em raros casos, quando ativo a $37^{\circ}C$, pode determinar reação transfusional.

- o antígeno Lea não está desenvolvido no nascimento e, portanto, esse anticorpo não determina a ocorrência de DHRN/DHPN;
- o anti-Leb é um anticorpo de ocorrência natural, encontrado com mais frequência em negros com fenótipo Le(a-b-). Em geral não determina reação transfusional mesmo que ativo a 37°C e não está relacionado com a ocorrência de DHRN/DHPN;
- em geral, o anti-Leb é uma aglutinina fria que determina aglutinação direta com hemácias Leb;
- o anti-Lex é um anticorpo incomum, de ocorrência natural, mais encontrado no soro de indivíduos Le(a-b-). Em geral, não determina reação transfusional, exceto em alguns raros casos em que é ativo a 37°C. Anti-Lex não está relacionado com a ocorrência de DHRN/DHPN. Anti-Lex reage com todas as hemácias exceto com as Le(a-b-), porém não é uma mistura de anti-Lea e anti-Leb.

4.5.2 O sistema MNS

○ sistema MNS, também chamado MN, foi o segundo sistema a ser descrito. Semelhante em tamanho e complexidade ao sistema Rh, o sistema MNS está localizado na membrana das hemácias, em **duas glicoproteínas ricas em ácido siálico, no cromossomo 4**. Seus antígenos mais relevantes são **M, N, S, s e U**.

○ sistema MNS possui características clínicas importantes, e os seus antígenos estão bem desenvolvidos no nascimento. Os antígenos M e N estão formados na 9ª semana de gestação, e os antígenos S e s, na 12ª semana.

Os antígenos M, N, S e s são destruídos por **enzimas proteolíticas**, como a **papaína**, a **bromelina** e a **tripsina**. O antígeno U não é destruído pelo tratamento enzimático.

○ antígeno U é de alta frequência na população; casos de U negativo são raros, e sempre ocorrem em indivíduos negros. Os indivíduos U(-) são também S(-)s(-), porém nem todos S(-)s(-) são U(-).

4.5.2.1 Anticorpos do sistema MNS

Os anticorpos do sistema MNS podem ser naturais ou imunes. Muitos exemplos de anti-M têm sido reconhecidos, a maioria de ocorrência natural e sem importância transfusional. Apenas em raros casos, pode ser uma potente imunoglobulina IgG, ativa a 37°C, determinando reação transfusional importante. Apesar de encontrado em pacientes politransfundidos como resultado de aloimunização transfusional, raramente determinam hemólise transfusional ou DHRN/DHPN.

○ **anti-N** é um anticorpo raro e não determina hemólise transfusional ou DHRN/DHPN, podendo ser ignorado na seleção de unidades de concentrados de hemácias.

○ **anti-S** pode ser de ocorrência natural ou imune. Pode determinar reação transfusional, e poucos exemplos de DHRN/DHPN foram relatados. Anti-S pode determinar reações direta ou apenas pela técnica da antiglobulina humana com hemácias S positivo. Aproximadamente 56% dos doadores de sangue são S negativo.

○ **anti-s** pode estar associado à hemólise transfusional e à DHRN/DHPN. Frequentemente reage por meio da técnica da antiglobulina humana com hemácias s positivo.

○ **anti-U** é um raro anticorpo encontrado na raça negra. Não há relato de alo-anti-U em caucasianos. Esse anticorpo pode determinar reação transfusional e ocasionar casos graves de DHRN/DHPN.

De forma geral, anti-U é uma imunoglobulina IgG que reage pela técnica da antiglobulina humana com hemácias U positivo.

- **Associações patológicas**

M pode servir como receptor de cepas de *Escherichia coli*.

MN ou Ss facilitam a penetração do *Plasmodium*, o parasita da malária, na invasão da hemácia.

4.5.3 O sistema P

P1 foi o primeiro antígeno do sistema P a ser descrito por Landsteiner e Levine, em 1927, mediante a imunização de coelhos com hemácias humanas. Em 1935, foram descobertos os **antígenos P e PK**. Atualmente, apenas o antígeno do sistema P1 (001) faz parte do sistema P, sendo os demais obsoletos. O fenótipo raro pp está associado à formação de anti-Tja, de ocorrência natural, porém ativo a 37°C, determinando reação transfusional e abortamento prematuro em mulheres.

4.5.3.1 Anticorpos do sistema P

Anti-P1 é um anticorpo de ocorrência natural e não determina reação transfusional ou DHRN/DHPN. Apenas em raros casos, trata-se de potente IgG ativa a 37°C, com importância transfusional. Os antígenos P1 e P2 são análogos a A1 e A2.

Por não apresentarem hemolisinas potentes, os anticorpos do sistema P são clinicamente sem significado.

Os antígenos P são detectados precocemente, com até 12 semanas de idade, ao passo que os antígenos P1 são detectados mais tarde, por volta dos 7 anos de idade, atingindo a sua potência com reatividade variando em cada indivíduo.

4.5.4 O sistema I

O **sistema I** é composto pelos **antígenos I e i**. Tanto I quanto i são antígenos de alta frequência populacional. O antígeno I é pouco desenvolvido ao nascimento. Esses antígenos são encontrados na membrana de leucócitos, em plaquetas, hemácias, plasma, saliva, leite humano e soros de adultos e neonatos, não sendo encontrados em outras células.

Os neonatos apresentam grandes quantidades de i, sendo I é praticamente indetectável neles. Durante os primeiros 18 meses de vida, a quantidade de i decresce lentamente, enquanto a de I aumenta. Eritrócitos de adultos são ricos em I.

- **Fenótipo i1:** predominante em indivíduos brancos.
- **Fenótipo i2:** predominante em indivíduos negros.

Os **antígenos I e i** são constituídos por uma série de carboidratos na porção interna das cadeias oligossacarídicas dos antígenos ABH.

O **antígeno li** está localizado abaixo dos antígenos ABH, e a atividade de I aumenta quando se retira a atividade ABH por meio de enzimas.

Os antígenos anti-I são autoanticorpos comuns, mas fracos, encontrados na maioria dos indivíduos normais e saudáveis. A produção de autoanticorpos I pode ser estimulada por microrganismos portadores de antígenos semelhantes – por exemplo, a bactéria *Mycoplasma pneumoniae*.

4.5.4.1 Anticorpos do sistema I

O anti-I é um autoanticorpo comum, habitualmente uma imunoglobulina IgM. Na maioria dos casos, os anticorpos do sistema I não têm importância clínica. O anti-i é raro, mas pode ser detectado em pacientes com mononucleose infecciosa.

Os anticorpos associados a patologias podem apresentar-se em títulos muito elevados e promover destruição celular *in vivo*. Assim, deve-se fazer transfusão aquecida: sangue aquecido a 37°C, mantendo-se o paciente com as extremidades aquecidas. Geralmente não causam DHRN/DHPN.

- **Associações patológicas**

Anti-I não reage com hemácias de cordão.

Anti-I está associado à *Mycoplasma pneumoniae*.

Anti-i está associado à mononucleose infecciosa e a doenças do sistema reticuloendotelial, tais como reticulose, leucemias mieloides e cirrose alcoólica. O antígeno anti-i difere do anti-I por não ser considerado benigno em indivíduos saudáveis. Anti-i é uma IgM que reage melhor a 4°C.

O **anticorpo anti-i IgG** foi associado a DHRN/DHPN, leucemia aguda, anemia hipoplástica, anemia megaloblástica, anemia sideroblástica, hemoglobulinopatia, anemia hemolítica crônica, pacientes flebotomizados e leucemia aguda.

4.5.5 O sistema Kell

Em 1946, foi descoberto o primeiro antígeno do sistema Kell (K), a partir do uso da antiglobulina humana; o sistema foi denominado Kell por ter sido detectado no soro da Sra. Kellacher, sendo responsável por DHRN de seu filho. A partir daí, foram descobertos vários outros anticorpos, de alta e baixa frequência. Em 1949, foi relatado o seu parceiro antitético (parceiro simular) de alta frequência k (cellano). Em 1957, foi descrito Kp^a e, em 1958, foi relatado o seu parceiro antitético Kp^b . Também em 1957, foi descrito J_s^a e, em 1963, J_s^b . O fenótipo nulo, também descrito em 1957, designado por K_0 , contribuiu para associar outros antígenos do sistema Kell. Em condições patológicas graves, quando o sistema Kell está com expressão enfraquecida, o **fenótipo McLeod**, descrito em 1961, evidencia-se.

São 23 os antígenos do sistema Kell, sendo os mais importantes **K**, **k**, **Kp^a**, **Kp^b**, **Kp^b** e **Kp^b**. O gene Kell (autossômico) é análogo ao Rh, com locus intimamente ligado.

Na rotina de banco de sangue, os genes Kk , Kp^a , Kp^b são os mais importantes. Já o gene K_0 é raro, silencioso, sendo a combinação mais frequente KKp^b , J_s^b e K^1 .

4.5.5.1 Bioquímica e genética

Os antígenos do sistema Kell são codificados pelo **gene KEL**, localizado no braço longo do cromossomo 7. A expressão desses antígenos também é controlada por um **gene regulador XK**, localizado no braço curto do cromossomo X.

O gene ligado ao cromossomo X controla a expressão dos antígenos de alta frequência Kx nas hemácias e, possivelmente, nos macrófagos – neutrófilos e monócitos. Foi sugerido que Kx fornece uma proteína precursora ou base na qual os antígenos Kell autossômicos são acrescentados; à medida que isso acontece, Kx torna-se menos acessível. Kx é bem expresso nos casos de Kell nulo, mas fracamente expresso em hemácias normais.

Os antígenos do sistema Kell são **glicoproteínas** e estão **bem expressos nas hemácias fetais e ao nascimento**; no adulto, esses antígenos se desenvolvem cedo nas hemácias em maturação e podem ser detectados precocemente no estágio de eritroblasto.

Observam-se diferenças segundo a raça na frequência desses antígenos: KEL1 é característico de caucasianos, menos frequente em negros e raro em mongóis; KEL6 está presente em 19,5% dos negros e ocorre em menos de 1% dos caucasianos.

4.5.5.2 Antígenos e anticorpos Kell na rotina do banco de sangue

Com exceção do Kx, todos os antígenos do sistema Kell são encontrados nas hemácias. Ao nascimento, esses antígenos se encontram bem desenvolvidos, e contribuem também para a DHRN/DHPN. Esses antígenos não são desnaturados por enzimas, podendo ser destruídos pela **combinação de tripsina e quimiotripsina**. Em caso de estudo de diferenciação para identificação do anticorpo Kell, é usado o ditiotreitol, o qual desnatura todos os antígenos Kell, exceto Kx e Km.

Os antígenos **k**, **Kp^b**, **Js^b** são de alta frequência.

Os antígenos **K**, **Kp^a**, **Js^a** são de baixa frequência.

- **Antígenos K e k**

Os antígenos K e k são muito imunogênicos, porém menos do que o antígeno D do sistema Rh; no entanto, a frequência de indivíduos K⁺ é baixa.

- **Antígenos Kp^a, Kp^b e Kp^c**

Existe semelhança entre o Kp^a e o antígeno C do sistema Rh, pois ambos podem suprimir a expressão de k, Js^b, K¹¹, K¹⁴ e K¹⁸, o que não ocorre com os outros antígenos Kp^b e Kp^c.

- **Frequência dos antígenos Js^a e Js^b**

Js^a é de baixa frequência.

Js^b é de alta frequência

4.5.5.3 Anticorpos do sistema Kell

Os anticorpos do sistema Kell geralmente se apresentam após exposição à transfusão ou gravidez; esses anticorpos são imunoglobulinas IgG reativas a 37°C, sendo melhor detectados na fase da antiglobulina humana.

Anti-K determina reação hemolítica transfusional e pode causar DHRN/DHPN. Anti-K geralmente é uma IgG melhor detectada pela técnica de **Coombs**. O anti-K natural foi associado à *Escherichia coli* e ao bacilo da tuberculose.

Anti-k determina reação hemolítica transfusional e está relacionado à DHRN/DHPN. Anti-k é uma IgG melhor detectada pela técnica de Coombs. Como o antígeno k é de alta frequência, é difícil selecionar unidades compatíveis na presença desse anticorpo.

Anti-Kpa pode determinar, em raras ocasiões, reação hemolítica transfusional e estar relacionado a casos moderados de DHRN/DHPN. Anti-Kpa geralmente é uma IgG e é melhor detectado pela técnica de Coombs.

Anti-Kpb é um anticorpo contra antígeno de alta frequência e determina reação hemolítica transfusional e DHRN/DHPN moderada. Esse anticorpo geralmente é uma IgG melhor detectada pela técnica de Coombs.

Anti-Jsa pode determinar reação hemolítica transfusional e causar DHRN/DHPN. Anti-Jsa geralmente é uma IgG melhor detectada pela técnica de Coombs.

Anti-Jsb é um anticorpo contra antígeno de alta frequência e determina reação hemolítica transfusional e DHRN/DHPN moderada. Esse anticorpo geralmente é uma IgG melhor detectada pela técnica de Coombs.

- **Características gerais dos anticorpos Kp^a, Js^a e de outros de baixa frequência**

Os anticorpos Kp^a, Js^a e outros anticorpos de baixa frequência são raros e fáceis de detectar. Para fins transfusionais, é difícil encontrar doador compatível para esse tipo de sangue, justamente por ser de baixa frequência.

- **Expressão antigênica alterada**

Indivíduos Kell negativo podem adquirir um antígeno semelhante ao Kell após infecção por *Mycoplasma pneumoniae*.

- **Autoanticorpos**

Os autoanticorpos do sistema Kell em geral são **K**, **Kp^b** e **K¹³**. Muitos pacientes com anti-K tiveram lesões cranianas ou tumores cerebrais, sugerindo uma possível associação entre K e o tecido cerebral. Usualmente, os autoanticorpos do sistema Kell são benignos ou hemolíticos.

4.5.6 O sistema Duffy

O sistema Duffy (**Fy**) foi descoberto em 1950, no soro de um homem hemofílico politransfundido de sobrenome Duffy. Na época, foram descobertos dois antígenos, **Fy¹** e **Fy²**, com seus respectivos anticorpos, sendo que a maior parte desse fenótipo se encontrava em indivíduos brancos. Em 1970, três outros anticorpos desse sistema foram identificados: **Fy³**, **Fy⁴** e **Fy⁵**.

Os antígenos do sistema Duffy são codificados por genes localizados no cromossomo 1. Os dois principais antígenos do sistema são **Fya (FY1)** e **Fyb (Fy2)**. A presença ou ausência desses antígenos define quatro fenótipos: **Fy(a+b+)**, **Fy(a+b-)**, **Fy(a-b+)** e **Fy(a-b-)**.

4.5.6.1 Anticorpos do sistema Duffy

Os anticorpos do sistema Duffy são moderadamente imunogênicos, ocorrendo três vezes menos que o anti-K. São IgG, comumente IgG1, e reagem melhor em antiglobulina humana. Mesmo após estímulo secundário, poucos são da classe IgM. Uma vez identificado o anticorpo, o sangue administrado deve ser fenotipado para antígeno negativo. São os anticorpos de maior incidência na clínica hemoterápica, como também os mais importantes. São detectados nas hemácias no início da vida fetal e estão ligados a uma glicoproteína. Eles são desnaturados por enzimas proteolíticas e têm boa conservação no plasma, mesmo quando congelados; sua conservação é ainda melhor quando se utiliza o soro.

Anti-Fya é um anticorpo frequente, determina reação hemolítica transfusional e raramente está relacionado a casos de DHRN/DHPN moderada ou grave. Anti-Fya geralmente é uma IgG, e é detectado apenas pela técnica de Coombs.

Anti-Fyb é um anticorpo incomum. Em raros casos, pode determinar reação hemolítica transfusional e ocasionalmente está relacionado à DHRN/DHPN moderada ou grave. Anti-Fyb geralmente é uma IgG, e é detectado apenas pela técnica de Coombs. Esse anticorpo parece ter baixa imunogenicidade e geralmente é encontrado em pacientes politransfundidos que já apresentam outros anticorpos.

Anti-Fy3 é um anticorpo raro, produzido por indivíduos Fy(a-b-), que reage com hemácias tanto **Fya(+)** quanto **Fyb(+)**. Pode determinar reação hemolítica transfusional e raramente está envolvido na DHRN/DHPN.

Anti-Fy3 geralmente é uma IgG detectada pela técnica de Coombs. Fy3 não é desnaturado por enzimas proteolíticas.

O fenótipo Fy(a-b-) frequente em negros determina resistência ao *Plasmodium vivax* e *Plasmodium knowlesi*.

- **Sumário genético**

O locus do sistema Duffy, como no sistema Rh, pertence ao cromossomo 1, porém seus genes são separados independentemente.

- **Associação entre o sistema Duffy e a malária**

Foi demonstrado que indivíduos negros com hemácias Fy(a-b-) geralmente são resistentes a infecções com parasitos da malária (*Plasmodium knowlise*). Em estudo com 16 indivíduos expostos ao *Plasmopdium vivax*, cinco deles Fy(a-b-) foram resistentes a infecção, mas seis negros Fy(a+b-) e cinco brancos Fy(a-b+) contraíram a doença.

No Vietnã, outros estudos demonstraram que 13 negros tipados como Fy(a+b-) e Fy(a-b+) foram contaminados, enquanto outros com tipagem Fy(a-b-) não foram infectados.

4.5.7 O sistema Kidd

O sistema Kidd (Jk) foi descoberto em 1951 após a implantação da técnica de Coombs em uma paciente (Sra. Kidd) que gerara um feto com DHRN/DHPN causada por um anticorpo então denominado anti-Jka, o qual, posteriormente, revelou ser anti-Jkb. Em 1959, foi descrito o fenótipo nulo em uma mulher com reação transfusional importante causada por anti-Jka + anti-Jkb – posteriormente renomeado anti-Jk3.

O sistema Kidd mais simples é constituído pelos antígenos Jk^a , Jk^b e Jk^3 e pelo fenótipo nulo $Jk(a-b-)$. Os antígenos Jk^a e Jk^b são mais comuns em 77% dos indivíduos brancos, sendo que 91% dos negros e 50% dos chineses são portadores de $Jk(a+)$.

Os Jk^a são detectados em hemácias de fetos com 11 semanas e contribuem para DHRN/DHPN. Existem três microrganismos que se assemelham à especificidade do antígeno eritrocitário Jk^b : *Streptococcus faecium*, *Micrococcus* spp. e *Proteus mirabilis*.

O fenótipo **Jk null** é extremamente raro em caucasianos e negros e está associado à população chinesa e polinésia, aos índios do Mato Grosso e a hindus e japoneses.

4.5.7.1 Anticorpos do sistema Kidd

A imunogenicidade dos anticorpos do sistema Kidd é fraca e de difícil detecção; a principal característica dos anticorpos do sistema é o fato de se ligarem ao complemento, além de estarem associados a outros anticorpos.

Anti-Jka é o anticorpo que determina severa reação hemolítica transfusional, imediata ou tardia. Em raras ocasiões, está relacionado a casos de DHRN/DHPN. Anti-Jka é uma IgG e reage melhor com antiglobulina humana poliespecífica ou soro de Coombs. Em geral, fixa complemento. Em alguns casos, determina ligeira hemólise ou aglutinação direta com hemácias tratadas por enzimas.

Anti-Jkb pode determinar reação hemolítica transfusional imediata ou tardia e raramente está relacionado com DHRN/DHPN. Geralmente é uma IgG, principalmente IgG3, mas existem relatos de que pode apresentar-se como IgM; é melhor detectado pela antiglobulina humana poliespecífica. Com a

substância de baixo peso molecular (LISS) e certas enzimas proteolíticas – como a ficina e a papaína –, estimula a atividade da reação antígeno–anticorpo, levando à formação da lise das hemácias.

Anti-Jk3 é um raro anticorpo produzido por indivíduos Jk(a-b-). Pode determinar reação hemolítica pós-transfusional e DHRN/DHPN. Anti-Jk3 geralmente é uma IgG detectada pela técnica de Coombs.

Do ponto de vista laboratorial, para estudo do sistema Kidd, a amostra deve ser manuseada imediatamente, porque **os anticorpos do sistema Kidd se enfraquecem muito rapidamente *in vitro***, no que se diferenciam dos anticorpos dos outros sistemas. O estudo de identificação de anticorpos do sistema Kidd pode levar várias semanas ou meses; assim, é importante que os serviços de hemoterapia registrem os dados do paciente para que, caso ele seja positivo, possam ser evitadas reações transfusionais futuras.

- **Autoanticorpos**

Os **autoanticorpos Jk^a** podem estar relacionados ao uso de medicamentos à base de clorpropamida.

4.5.8 O sistema Lutheran

O **sistema Lutheran (Lu)** foi descoberto em 1945 por causa da presença de **anti-Lu^a (antígeno de baixa frequência)** no soro de um paciente após transfusão.

Os antígenos do sistema Lutheran são, respectivamente, **Lu^a** e **Lu^b**. O **antígeno Lu^b+ é de alta frequência na população.**

Os antígenos Lu^a e Lu^b não estão desenvolvidos no indivíduo ao nascimento; seu desenvolvimento é muito demorado, e apenas na idade adulta é possível identificá-los.

Os genes do sistema Lutheran estão localizados no cromossomo 19, ligados ao gene Se. Apenas um gene, **ln(lu)**, evita a expressão normal de todos os antígenos Lutheran. O fenótipo **Lu(a-b-)** ou **Lu null** é muito raro, podendo resultar de três circunstâncias genéticas: de um gene inibidor ln(Lu), dominante fora do lócus Lutheran, o que ocorre na maioria dos casos – este gene suprime

também i, P, Au^a, Anton e An/Wj; da herança de um gene amorfo recessivo -LuLu; e do inibidor recessivo, ligado ao sexo, que não se enquadra em nenhum dos dois anteriormente citados. É chamado locus XS, com XS1 (alelo comum) e XS2 (alelo raro).

Pode-se detectar um inibidor recessivo transportado por X, ligado ao sexo, para o sistema Lutheran. **A maior probabilidade de Lu(a+b+) é para o sexo feminino e há uma probabilidade mais evidente de Lu(a-b-) para o sexo masculino.**

4.5.8.1 Anticorpos do sistema Lutheran

○ **anti-Lu^a** não está relacionado com a reação transfusional e raramente está envolvido em DHRN/DHPN. Apesar de não apresentar importância transfusional, devemos evitar transfusões incompatíveis para prevenirmos reações inesperadas. A frequência aproximada do antígeno Lu^a é de 8%. Anti-Lu^a geralmente é uma IgG ativa a 37°C, e é demonstrado pela técnica de anti-globulina humana; no entanto, podemos observar em alguns casos aglutinação direta com hemácias Lu(a+).

○ **anti-Lu^b** está relacionado a reação transfusional e DHRN/DHPN. É um antígeno de alta frequência (99,9%), geralmente uma imunoglobulina IgG ativa a 37°C, e é demonstrado pela técnica de antiglobulina. O anti-Lu^b é muito raro, pois poucas pessoas são Lu^b negativo; é sempre evidenciado a 37°C na fase de antiglobulina humana; geralmente é uma IgG (IgG4), podendo ser também IgM e IgA. Pode causar DHRN/DHPN branda, sendo considerado clinicamente significativo, por ocasionar destruição lenta e progressiva das hemácias.

As enzimas proteolíticas não alteram a reação antígeno-anticorpo.

○ **anti-Lu³** é um anticorpo raro encontrado no soro de indivíduos Lu(a-b-). Esse anticorpo está relacionado com reação transfusional tardia e está envolvido na DHRN/DHPN. Em geral, anti-Lu³ é uma IgG ativa a 37°C, e é demonstrado pela técnica de antiglobulina humana.

Os anticorpos Lutheran são encontrados raramente; isso resulta não só do fato de os antígenos serem de tal forma comuns na população que a produção de anticorpos correspondentes não é possível, mas também da reduzida frequência antigênica.

4.5.9 O sistema Diego

O sistema Diego (Di) envolve dois antígenos, Di^a e Di^b . Raramente encontrados na população branca, estão presentes em 36% da população indígena da América do Sul e em 2 a 10% das populações mongólicas. Os anticorpos **anti- Di^a** e **anti- Di^b** , de origem imunológica, são detectados pela técnica de antiglobulina humana.

4.5.10 O sistema Cartwright

O sistema Cartwright (Yt) apresenta dois antígenos, Yt^a e Yt^b , de frequência relativamente baixa. O antígeno Yt^a é potente e capaz de imunizar indivíduos, tendo sido descritos anticorpos Yt^a imunes e também naturais. Os **anti- Yt^a** e **anti- Yt^b** são identificados por técnicas de antiglobulina humana.

4.5.11 O sistema Colton

O sistema Colton (Co) é representado pelos antígenos Co^a (alta frequência) e Co^b (baixa frequência). Os **anti- Co^a** e **anti- Co^b** são de origem imune e reagem com a AGH; o anti- Co^a também reage com hemácias tratadas com papaína.

4.5.12 O sistema Scianna

O sistema Scianna (Sc) apresenta dois antígenos: Sc^1 , um antígeno de alta frequência, e Sc^2 , um antígeno de baixa frequência. O antígeno Sc^2 parece ser bastante potente, causando imunização em indivíduos Sc^{1-2} . Os dois anticorpos são imunes e detectados por técnica de antiglobulina humana.

4.5.13 O sistema Dombrock

O sistema Dombrock (Do) consiste de dois antígenos: Do^a e Do^b . O antígeno Do^a está presente, com potência variada, nas hemácias de indivíduos

adultos, em 64% das pessoas brancas. O Do^b está presente em 82% da população branca; esse antígeno pode mostrar efeito de dose,⁴ ou seja, a variação da expressão do antígeno está relacionada com a condição de o gene estar em homozigose ou heterozigose. Os anticorpos Do^a e Do^b são anticorpos imunes e reagem pelo teste de antiglobulina humana, por meio do uso de hemácias papainizadas. As células com antígeno Do^a, sem tratamento com papaína, geralmente reagem fracamente pelo teste de antiglobulina humana; nem todos os soros AGH são capazes de detectar o anticorpo Do^a.

4.5.14 O sistema Xg

O sistema Xg foi descoberto em 1962, quando se descreveu um anticorpo presente em um homem politransfundido que reconhecia um gene localizado no cromossomo X; por isso, recebeu o nome de Xg^a. Além de estar presente em hemácias humanas, também foi encontrado em macacos gibões e parece estar associado ao sexo. Cerca de 89% da população feminina e 66% da população masculina expressam Xg^a. O antígeno reage mais fracamente em sangue de cordão. O anticorpo anti-Xg^a é de origem imunológica.

Sabemos que o indivíduo Xga não é facilmente imunizado. O sistema Xg é detectado pela técnica de antiglobulina humana. Podem ser encontradas reações de campo misto,⁵ já foi detectado em uma mulher grávida. A sua temperatura de reação é 37°C.

Apresenta classe de imunoglobulinas IgG e não faz hemólise *in vitro* sem fixar complemento. É encontrado raramente na clínica hemoterápica. Foram relatados muitos exemplos de transfusões incompatíveis em indivíduos portadores de anti-Xg^a, sem que tenham ocorrido reações transfusionais; pode causar DHRN/DHPN. Sua grande relevância diz respeito à sua relação com o cromossomo X, que oferece possibilidades para o campo da genética, como importante marcador genético.

⁴ Diferença na intensidade da reatividade do anticorpo nas hemácias reativas.

⁵ Aparecimento de dupla população de hemácias na reação, que pode ocorrer por vários motivos, entre eles reação transfusionais ou quimeras imuno-hematológicas.

4.6 Doenças associadas aos grupos sanguíneos

4.6.1 DHPN ou DHRN por Rh(D)

A **doença hemolítica do recém-nascido** ou **doença hemolítica perinatal** caracteriza-se por ser uma doença imunológica singular, cuja principal evidência é a destruição eritrocitária durante a vida fetal, **causada pela incompatibilidade sanguínea materno-fetal**. Consiste na destruição dos eritrócitos do feto e neonato por anticorpos produzidos pela mãe. Uma mãe Rh negativo com pai Rh positivo pode ocasionar o desenvolvimento do aloanticorpo anti-D, que se dirige contra as hemácias do neonato, caso ele tenha herdado o antígeno do pai – sendo, portanto, Rh positivo. A frequência desse tipo de ocorrência é de 1:10. A DHRN/DHPN também pode ocorrer por outros sistemas de grupos sanguíneos; contudo, a mais comum decorre do anti-D do sistema Rh. No sistema ABO, os sintomas associados à DHRN/DHPN são brandos ou subclínicos.

Novos avanços da ciência foram aplicados para se evitar a DHRN/DHPN, principalmente para a prevenção da doença. Um método importante é a **imunossupressão de anticorpos** para se evitar a imunização RhD em uma mãe Rh negativo. A imunossupressão de anticorpos consiste na administração de imunoglobulinas anti-Rh (D) à mãe após o nascimento de um concepto Rh positivo a fim de se prevenir a imunização pelo antígeno D e, conseqüentemente, a formação de anticorpos anti-D. Em geral, a doença só se manifesta em gestações posteriores.

- **Principais condições para que ocorra a DHRN/DHPN**

- a) **Exposição antigênica**

A **exposição antigênica** mais comum é a que ocorre no momento do parto. Em 50% dos partos, há entrada de hemácias fetais na circulação materna. Na maioria dos casos, o volume da hemorragia feto-materna é pequena; porém, 1% das hemácias fetais já pode imunizar a mãe.

A maior prevalência de imunização é para o **antígeno D**, mas também ocorrem imunizações com outros antígenos; assim, **C**, **E**, e **c**, além de **Kell**, são bastante imunógenos, mas têm incidência percentualmente menor.

b) Produção de anticorpos

A **produção de anticorpos** ocorre de 6 a 8 semanas após a estimulação. Para que o anticorpo seja sorologicamente detectável, é necessária uma exposição antigênica secundária, que corresponde a uma resposta de memória. O nível de anticorpos produzidos é proporcional ao volume da exposição antigênica.

• Classificação e especificação do anticorpo

Para que os anticorpos maternos ocasionem DHRN/DHPN, eles devem atravessar a placenta e reagir com os antígenos das hemácias fetais, iniciando a sua destruição.

É importante salientar que das três principais classes de imunoglobulinas – IgA, IgM e IgG – apenas **IgG (IgG1 e IgG3)** é capaz de produzir DHRN/DHPN, pois, ao contrário das outras classes de imunoglobulinas, é a única transportada através da placenta.

• Classificação das DHRN/DHPN

DHRN/DHPN por RhD ou por outros antígenos do sistema Rh: pode ser causada por anti-D sozinho ou, em menor frequência, combinado com anti-C ou anti-E.

DHRN/DHPN por ABO: usualmente causada por anti-AB e, com menor frequência, por anti-A ou anti-B.

DHRN/DHPN por outros sistemas de grupos sanguíneos: anti-c e anti-K estão mais implicados na DHRN/DHPN que envolve outros sistemas.

• Efeitos da destruição das hemácias

O desencadeamento da imunização ocorre durante o segundo trimestre gestacional e pode ocasionar destruição das hemácias. A hemólise provocada no concepto causa anemia e bilirrubinemia, e, indiretamente, leva a hepatoesplenomegalia, esplenomegalia e cardiomegalia acompanhada de ascite.

• Diagnóstico

a) **A detecção do anticorpo** na gestante deve ser feita durante o pré-natal. A partir do primeiro trimestre de gestação, são realizados testes de tipagem

sanguínea do sistema ABO, do sistema Rh e de D fraco e fenotipagem CDE. Após o nascimento de criança com suspeita de DHRN/DHPN, deve-se coletar sangue do cordão umbilical e realizar os seguintes testes: **fenotipagem ABO/Rh, teste de antiglobulina direto (TAD) ou teste de Coombs direto, dosagem de bilirrubina, hematócrito, hemograma, dosagem de hemoglobina e contagem de reticulócitos.**

b) Titulação do anticorpo: técnica em que o soro é diluído de forma seriada e testado contra as hemácias fenotipadas, a fim de se determinar a mais alta diluição do anticorpo específico.

c) Teste de Coombs direto ou prova de antiglobulina humana:⁶ o teste isolado para a pesquisa de anticorpo intravascular é o mais importante para a avaliação da ocorrência de DHRN/DHPN após o nascimento. Um resultado positivo indica que os anticorpos estão revestindo as hemácias do neonato *in vivo*, o que pode ser detectado mesmo quando a doença é subclínica.

d) Eluato: um eluato preparado das hemácias do neonato demonstrará a presença de anticorpos maternos; isso pode ser evidenciado mesmo com AGH direta negativa, ainda na fase inicial.

Utilizam-se no eluato técnicas de aquecimento, congelamento, descongelamento, éter ou outras técnicas de eluição preconizadas; o anticorpo é prontamente eluído das hemácias do neonato e pode ser identificado.

Quando o teste de AGH pela técnica direta é positivo, deve-se realizar a pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) e, em caso positivo, identificar o anticorpo presente, mediante a identificação de anticorpos irregulares (IAI). Em caso da PAI ser negativa, deve-se fazer o eluato, embora se preconize que o mesmo deve ser feito de qualquer maneira.

e) Teste de compatibilidade: no teste de compatibilidade, as hemácias escolhidas para a transfusão do neonato devem ser sempre compatíveis com a mãe, porque o neonato apresenta anticorpos maternos circulantes. A preferência para as amostras a serem utilizadas nesses testes é o soro da mãe e as hemácias do neonato. Nos casos em que não se tenha disponível uma amostra de sangue da mãe, o neonato deve ser transfundido com sangue do grupo O.

⁶ Exame utilizado para identificar imunoglobulinas que já estão ligadas às hemácias, ou seja, identificar hemácias que, *in vivo*, se sensibilizaram.

f) **Amniocentese:** é o procedimento diagnóstico intrauterino mais importante para avaliar a DHRN/DHPN. Esse exame baseia-se na concentração de pigmentos gerados pelo feto e no título do anticorpo materno formado. Uma agulha é inserida no saco amniótico fetal, coletando-se uma quantidade de líquido amniótico para que se avaliem os níveis de bilirrubina, jogando-se esses valores em um gráfico de Liley.

Por meio da aminocentese também se avalia se o feto pode ou não ser submetido à hemotransfusão intrauterina.

• Tratamento e prevenção

a) **Hemotransfusão intrauterina:** a finalidade da transfusão intrauterina é corrigir a anemia severa e evitar a possível morte *in utero* quando existe risco de parto prematuro. Injeta-se um concentrado de hemácias, através de uma agulha de calibre 22 mm, na veia umbilical fetal. Todo o procedimento é monitorado por aparelho de ultrassom (fig. 4.4).

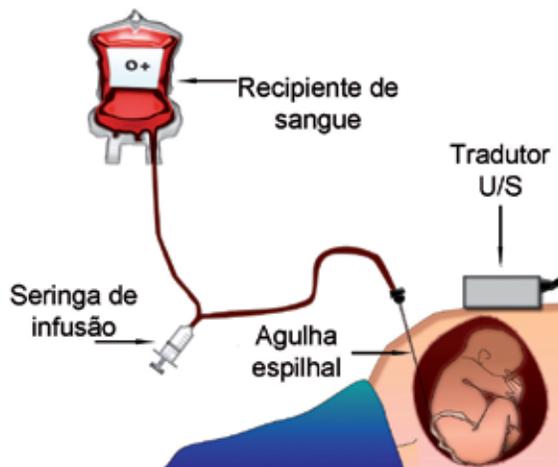


Figura 4.4. Transfusão intravascular intrauterina direta.

b) **Exame ultrassonográfico:** é usado para orientar a realização da transfusão intrauterina e também para detectar sintomas de hidropisia, tais como ascite fetal, edema subcutâneo ou derrame de pericárdio.

c) Exossanguineotransfusão: utilizada para o tratamento da anemia derivada do aumento do título do anticorpo e da hiperbilirrubinemia. Quantidades pequenas de sangue compatível são transfundidas, e, ao mesmo tempo, são retiradas quantidades iguais de sangue do neonato. Nesse processo, são extraídos do plasma do neonato a bilirrubina e os anticorpos maternos circulantes, além de ser feita a substituição dos eritrócitos revestidos por anticorpos.

Seleção do sangue para exossanguineotransfusão: o sangue deve ser negativo para todos os antígenos das hemácias; deve também ser ABO e Rh compatível com o grupo sanguíneo materno; como último recurso, no caso de não ser possível obter amostra igual ao grupo sanguíneo da mãe ou do grupo O, podem ser usadas hemácias com a mesma tipagem sanguínea do neonato.

d) Fototerapia: é a exposição do neonato à luz ultravioleta, que decompõe a bilirrubina. Essa técnica é utilizada quando os níveis dessa substância ainda estão baixos.

e) Prevenção da DHRN/DHPN com imunoglobulina anti-D: a imunoglobulina anti-D humana concentrada e purificada atua como um imunossupressor; ela é administrada em mães Rh negativo que geram neonatos Rh positivo. As mães tratadas evitarão a sensibilização anti-D em gestações subsequentes. A imunoglobulina anti-D é administrada à mãe 72 horas após o parto, enquanto as hemácias fetais ainda circulam, para que haja fixação do antígeno-anticorpo e, dessa forma, esse complexo seja retirado da circulação materna.

Indicação: administração intramuscular de 30 µg de RhIG 72 horas após o parto ou o aborto. Mulheres que já produziram anti-D não devem ser submetidas à imunoglobulina anti-D.

Falha no tratamento com RhIG: o tratamento com RhIG apresenta taxa global de falha de 1% a 2%, sendo sua principal causa o sangramento materno-fetal; outra causa também importante é a administração de RhIG em doses insuficientes. Assim, é fundamental o controle laboratorial imuno-hematológico a fim de se determinar a neutralização do anticorpo pela imunoglobulina.

Outras aplicações do uso de RhIG: essa imunoglobulina pode ser administrada em qualquer indivíduo Rh negativo, mas deve ser administrada em especial às mulheres Rh negativo em idade fértil.

Por não existir antiglobulina específica, o tratamento profilático não está disponível para outros anticorpos que também causam DHRN/DHPN.

4.6.2 DHRN/DHPN por ABO

A proporção de ocorrência de DHRN/DHPN por ABO é de 1:5 gestações, e menos de 10% dos neonatos necessitam de tratamento.

- **Etiologia**

A IgG na DHRN/DHPN por ABO é de ocorrência natural, pois os anticorpos se manifestam na ausência de qualquer estímulo eritrocitário conhecido – os anticorpos são produzidos a partir de estímulos ambientais. Ocorre em menor porcentagem em neonatos de mães do grupo O, apresentando forma clínica branda, com destruição celular mínima.

- **Sorologia ABO**

É de difícil confirmação, exigindo testes trabalhosos que, no máximo, demonstram a presença de IgG materno. Em geral, utiliza-se AGH e 2-mercaptoetanol para tratamento prévio do soro.

- **Teste de antiglobulina humana direto (TAD) ou teste de Coombs direto**

O teste de antiglobulina direto (TAD) por incompatibilidade ABO pode ser fracamente positivo ou até negativo em crianças clinicamente afetadas, diferentemente do que ocorre nos casos da doença hemolítica por incompatibilidade Rh, nos quais o TAD pode ser fortemente positivo, sem ser observado nenhum sinal clínico da doença.

- **Eluato**

O procedimento é o mesmo já comentado quando se tratou da DHRN/DHPN por Rh(D); é preciso acrescentar que nesse sistema é mais difícil detectar o anticorpo presente.

- **Consequências e tratamento**

A DHRN/DHPN por ABO pode ocasionar icterícia neonatal. A destruição eritrocitária começa no período intrauterino. Há aumento do nível de bilirrubina pós-natal que, em muitos casos, se normaliza. É raro na DHRN/DHPN por ABO a ocorrência de natimortos e hidropisia fetal.

4.7 Prática imuno-hematológica

4.7.1 Classificação direta do sistema ABO

A **classificação direta do sistema ABO** ou **teste de Beth-Vincent** tem como objetivo pesquisar e classificar os antígenos nas hemácias do paciente ou do doador.

Consiste em pôr em contato soros-teste conhecidos – anti-A, anti-B e anti-AB (fig. 4.5) – com glóbulos vermelhos a serem testados, a fim de se identificar se estão ou não presentes os antígenos A e B. Com essa classificação, definem-se os grupos sanguíneos A, B, AB e O.

- **Procedimento**

- 1) Identificar três tubos da seguinte maneira: A, B e AB;
- 2) Preparar uma suspensão das hemácias a 5%;
- 3) Colocar nos tubos identificados, respectivamente, duas gotas dos soros anti-A, anti-B e anti-AB;
- 4) Adicionar em cada tubo uma gota da suspensão das hemácias;
Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 5) Fazer a leitura, agitando levemente o tubo, a fim de deslocar o botão de hemácias do fundo do tubo, anotando os resultados obtidos.

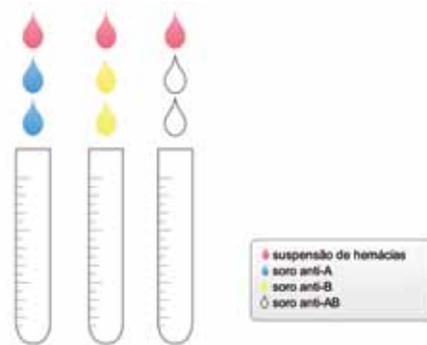


Figura 4.5 Classificação direta ABO em tubos.

• **Interpretação**

Nas técnicas imuno-hematológicas em tubo, as leituras são realizadas após centrifugação. Em geral, a velocidade utilizada na centrifugação é de 1.000 rpm durante 1 minuto. Devemos ressuspender o botão de hemácias formado, balançando-o gentilmente.

A intensidade da reação é padronizada segundo a análise do botão quanto à formação de agregados ou aglutinados. A figura 4.6 estabelece a graduação das reações antígeno–anticorpo.

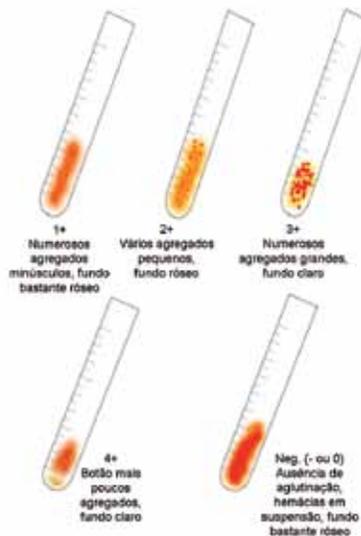


Figura 4.6. Padrão de leitura em intensidade de cruz (0 a 4+) das reações antígeno–anticorpo.



Figura 4.7. Interpretação da classificação ABO direta.

Quadro 4.2 Classificação ABO direta.

Tubos			Resultados
A	B	AB	
+	0	+	A
0	+	+	B
+	+	+	AB
0	0	0	O

O resultado encontrado nessa técnica deve ser confirmado pela classificação reversa.

4.7.2 Classificação reversa do sistema ABO (ou prova de Simonin)

Tem como objetivo a pesquisa dos anticorpos naturais, no soro, do paciente ou do doador. Consiste em colocar o soro a ser testado em contato com

glóbulos vermelhos fenotipados A1 e B (fig. 4.8), que, por possuírem seus respectivos antígenos específicos, permitem reconhecer a presença ou não de anticorpos existentes no plasma ou soro a ser testado.

Obs.: A utilização de hemácias A2 não é obrigatória, porém auxilia nos casos de discrepância ABO.

• Procedimento

- 1) Identificar dois tubos: A1 e B;
- 2) Colocar nos tubos identificados duas gotas dos respectivos soros em estudo;
- 3) Adicionar, no tubo A1, uma gota de suspensão das hemácias A1 fenotipadas e, no tubo B, uma gota de suspensão das hemácias B fenotipadas;
- 4) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 5) Fazer a leitura, agitando levemente o tubo, a fim de deslocar o botão de hemácias do fundo do tubo, anotando os resultados obtidos.

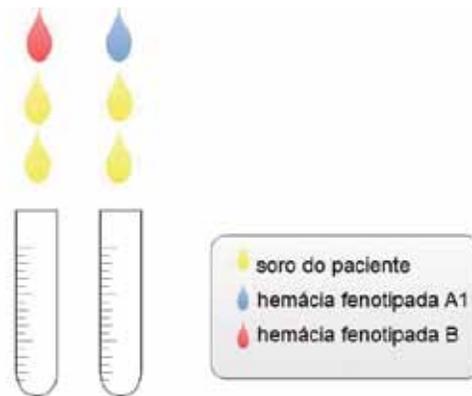


Figura 4.8. Classificação reversa em tubos.

• Interpretação

A figura 4.9 mostra graficamente a reação da prova reversa da classificação ABO de acordo com a prova reversa. A aglutinação significa a presença

do antígeno. As reações devem ser anotadas de acordo com o seu grau de intensidade.

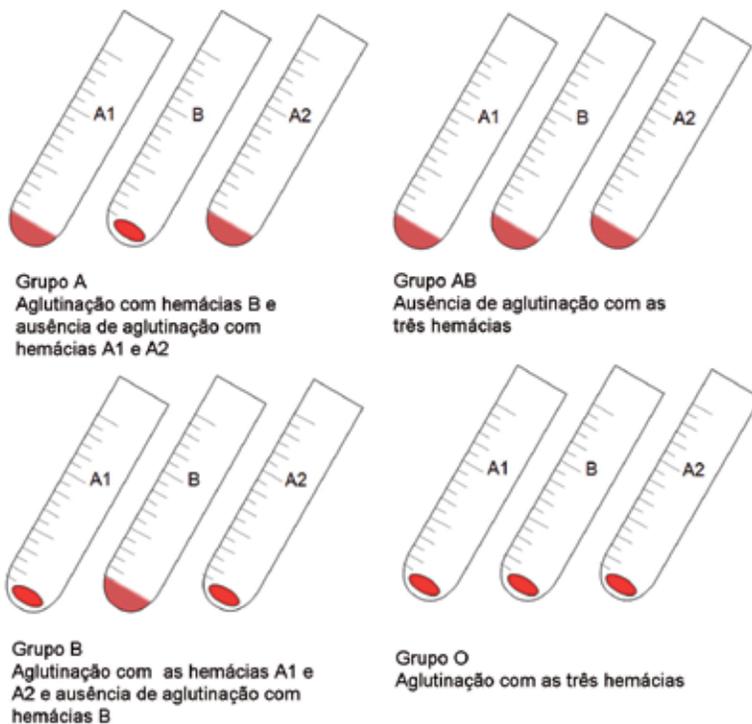


Figura 4.9. Interpretação da classificação ABO reversa.

Quadro 4.3. Classificação ABO reversa.

Tubos		Resultados
A1	B	
0	+	A
+	0	B
0	0	AB
+	+	O

Obs.: As duas provas – direta e reversa – devem ser realizadas preferencialmente por dois técnicos diferentes, cada teste servindo para checar o outro; o resultado da prova reversa só tem validade diante do resultado da prova direta. O confronto dos antígenos encontrados com os anticorpos presentes confirma a classificação ABO.

validação dos testes = concordância dos resultados

Na interpretação da tipagem ABO, dizemos que há concordância quando a presença do antígeno significa ausência do anticorpo correspondente e vice-versa.

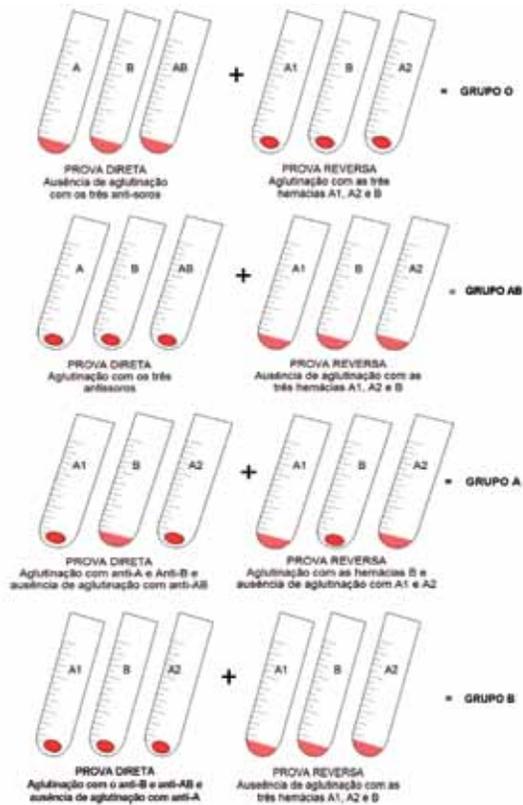


Figura 4.10. Interpretação da classificação ABO direta e reversa.

4.7.3 Pesquisa de subgrupos do sistema ABO

Tem como objetivo determinar em qual subgrupo do sistema ABO o indivíduo está inserido, sendo realizada logo após a classificação ABO, caso o indivíduo seja do grupo A.

A técnica para determinação de subgrupos do antígeno A possui como soros reagentes as lecitinas *Dolichos biflorus* e *Ulex europaeus*. Para a pesquisa dos demais subgrupos do sistema ABO, utiliza-se a mesma técnica, mudando-se apenas as lecitinas, quando não forem necessárias técnicas mais especializadas ou conjuntos de técnicas para a sua elucidação.

- **Procedimento**

- 1) Identificar dois tubos da seguinte maneira: A_1 e H;
- 2) Fazer suspensão de hemácias a 5% da amostra a ser examinada;
- 3) Adicionar a cada tubo duas gotas de sua respectiva lecitina:

$$A_1 \rightarrow \textit{Dolichos biflorus},$$

$$H \rightarrow \textit{Ulex europaeus};$$
- 4) Adicionar a cada tubo uma gota da suspensão de hemácias;
- 5) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 6) Fazer a leitura, agitando levemente o tubo, a fim de deslocar o botão de hemácias do fundo do tubo, anotando os resultados obtidos.

Obs.: Para determinar os subgrupos do antígeno B utiliza-se a lecitina *Bandeiraea simplicifolia*; de acordo com o escore obtido nas aglutinações, identifica-se o subgrupo.

4.7.4 Classificação RhD

A tipagem do Rh refere-se somente ao antígeno D do sistema Rh. Geralmente, quando o antígeno D é negativo, é importante fazer uma pesquisa de D fraco, pois alguns indivíduos apresentam expressão do antígeno D fraco, e é necessário fazer a determinação com técnica do Coombs indireto para que possamos identificá-los.

Denomina-se Rh positivo ao indivíduo Rho(D) positivo e Rh negativo, àquele em que a tipagem para Rh(D) e D fraco foi negativa. Contrariamente ao sistema ABO, não há prova reversa.

Os indivíduos não apresentam naturalmente anticorpos séricos contra o antígeno D. O soro anti-Rh(D) contém anticorpos imunes, IgG, anti-D e potencializadores que provocam aglutinação rápida e visível desses anticorpos com os antígenos D. Em virtude desse meio ter alto peso molecular, podem ocorrer reações falso-positivas. Por isso, a determinação do tipo Rh(D) exige a utilização, em paralelo, de um controle negativo: o controle Rh.

Controle Rh: reagente que contém o meio macromolecular utilizado na fabricação de soro anti-Rho(D), mas que é imunologicamente inerte, isto é, **não contém anticorpos.**

Obs.: Os meios macromoleculares contidos no soro anti-D variam segundo o fabricante, ocorrendo, portanto, variação no controle Rh. Assim, como testemunho negativo, ele deve ser do mesmo fabricante do anti-D. Não usar albumina bovina como controle negativo. A albumina bovina foi, durante muitos anos, utilizada com esse objetivo, mas não fornece a potencialização na união antígeno–anticorpo fornecida pelo controle Rh.

• Procedimento

- 1) Identificar dois tubos da seguinte maneira: Rh e Controle de Rh;
- 2) No tubo Rh, colocar duas gotas do soro anti-D;
- 3) No tubo Controle de Rh, colocar uma gota do soro controle Rh anti-D;
- 4) Colocar nos dois tubos uma gota de suspensão de hemácias a 5%;
- 5) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 6) Fazer a leitura, agitando levemente o tubo, a fim de deslocar o botão de hemácias do fundo do tubo, anotando os resultados obtidos.

- **Interpretação**

Se houver aglutinação, o paciente é Rh positivo; se não houver, proceder à pesquisa de D fraco. O controle de Rh deve sempre dar negativo, porque o soro não tem em sua composição o anti-D; se o mesmo for positivo, é indicação de que houve algum erro na técnica, mas, caso o paciente a ser classificado já não tenha indicação clínica, alguma doença intercorrente deve ser pesquisada.

- **Procedimento para a pesquisa em caso de controle de Rh positivo**

- 1) Repetição da técnica; caso permaneça a positividade, prosseguir com a investigação;
- 2) Avaliar as possíveis causas clínicas;
- 3) Dependendo das conclusões tiradas, realizar classificação Rh com soro salino, pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), teste de Coombs direto (TAD), dosagem de proteínas e autoprova.

4.7.5 Pesquisa de D fraco

Proceder com essa técnica caso tanto a classificação RhD quanto o controle de Rh sejam negativos.

- 1) Incubar dois tubos (D e CTL) por 15 minutos em banho-maria a 37°C;
- 2) Lavar as hemácias de cada tubo três vezes, em solução salina fisiológica; decantar completamente por inversão rápida dos tubos, após a última lavagem;
- 3) Acrescentar duas gotas de soro antiglobulina humana (soro de Coombs) em cada tubo;
- 4) Centrifugar a 3.400 rpm por 15 segundos ou a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 5) Ressuspender o “botão” de hemácias, por agitação delicada, e examinar para aglutinação macroscópica;
- 6) Colocar nos tubos onde não houve aglutinação 1 gota do reagente das hemácias controle de Coombs;⁷

⁷ O controle de Coombs é composto de hemácias sensibilizadas por anticorpos; ao ser adicionado à amostra de hemácias, torna a reação positiva (presença de aglutinados). Portanto, é um controle positivo.

7) Centrifugar e ressuspender delicadamente o botão; se o teste tiver sido feito corretamente, deve ocorrer aglutinação.

• Interpretação

Quando ocorrer aglutinação apenas no tubo marcado D, o sangue deve ser classificado como D positivo ou Rh positivo.

Havendo ausência de aglutinação em ambos os tubos, devemos fazer a pesquisa da variante fraca de D. Se não ocorrer aglutinação em nenhum dos tubos, o sangue deve ser classificado como D negativo ou Rh negativo.

Havendo aglutinação no tubo marcado D, o sangue deve ser classificado como D positivo fraco ou D fraco. Se ambos os tubos, D e CTL, aglutinarem, o indivíduo não deve ser considerado como Rh positivo, e sim como tendo um teste de Coombs direto positivo, provavelmente por sensibilização de algumas hemácias ou autoanticorpos (fig. 4.11).

Quando não houver tempo de realizar estudos mais aprofundados na vigência de uma transfusão de urgência, escolher para essa transfusão um sangue Rh negativo.

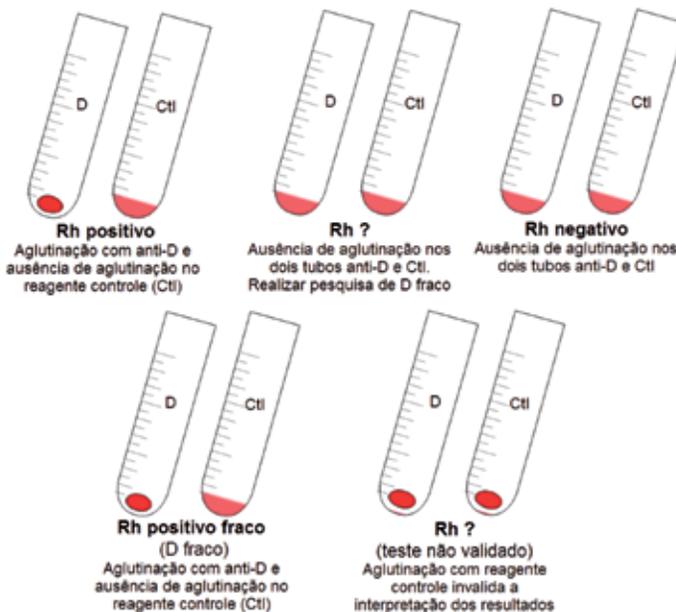


Figura 4.11. Interpretação dos resultados da determinação do Rh(D).

Se houver aglutinação, o paciente é Rh positivo com D fraco; se não houver, o paciente é Rh negativo. Caso haja oportunidade, é importante realizar a fenotipagem CDE.

4.7.6 Fenotipagem CDE

- 1) Colocar duas gotas do soro anti-CDE em um tubo;
- 2) Adicionar uma gota da suspensão de hemácias a 5%;
- 3) Agitar gentilmente;
- 4) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 5) Fazer a leitura.

- **Interpretação**

Se o resultado for negativo, o paciente não possui os antígenos CDE; se o resultado for positivo, os antígenos C ou E podem estar presentes. Sendo assim, deve-se fenotipar com soro anti-E ou anti-C.

4.7.7 Teste de antiglobulina humana ou teste de Coombs

O teste de antiglobulina humana foi descrito em 1945 por Robin Coombs, Arthur Mourant e Robert Race. Em 1946, Coombs descreveu o uso de antiglobulina humana para detectar a sensibilização *in vivo* de hemácias por anticorpos, tornando possível o diagnóstico da DHRN/DHPN. Com a descoberta do teste de AGH, foram detectados outros anticorpos IgG, com seus respectivos antígenos. Isso levou à descoberta e à caracterização de muitos sistemas de grupos sanguíneos – por exemplo, foi encontrado o primeiro anticorpo do sistema Kell e seu respectivo antígeno. Coombs produziu soro de antiglobulina humana injetando soro humano em coelhos. Como resposta imunológica, ocorreu a produção de anticorpo contra a globulina humana.

O uso da antiglobulina humana para detectar a sensibilização de hemácias *in vitro* é uma técnica de duas fases chamada **teste de antiglobulina indireto**

(TAI), também conhecida como **teste de Coombs indireto**. A sensibilização *in vivo* é detectada por procedimento de uma fase chamada de **teste de anti-globulina direto (TAD)**, também conhecida como **teste de Coombs direto**.

O TAI e o TAD continuam sendo os procedimentos mais comuns e de grande importância na sorologia de grupos sanguíneos.

O teste de Coombs é baseado no princípio de que as **globulinas anti-humanas obtidas de espécies não humanas imunizadas ligam-se a globulinas humanas incompletas (IgG ou IgM), após fixadas em hemácias**. A técnica de Coombs revela anticorpos bloqueadores ou incompletos que, mesmo em altas concentrações, não aglutinam em meio salino, apesar de se fixarem na superfície das hemácias.

O soro anti-humano é preparado a partir do soro de coelhos imunizados com componentes purificados do soro humano, isto é, gamaglobulinas ou betaglobulinas. Na preparação do soro antiglobulina humana, utilizam-se colônias de coelhos para a imunização e a obtenção do soro, mediante coletas sucessivas de sangue total do animal, com título acima de 1:1.024. Esse soro é absorvido de seus anticorpos, utilizando-se hemácias humanas dos grupos A, B e O; com isso, o soro está pronto para a determinação de seu título, sua avidéz e sua especificidade.

Para a utilização do soro, também é preciso investigar se as hemácias estão ou não **sensibilizadas por anticorpos incompletos**, isto é, se elas estão ou não com sítios antigênicos bloqueados por moléculas de anticorpo.

- **Tipos de antiglobulina humana**

Poliespecífica: soro anti-IgG mais anticomponentes do complemento.

Monoespecífica: soro anti-IgG humano.

O teste de antiglobulina direto ou técnica de Coombs direto é empregado nos seguintes casos:

- DHRN/DHPN;
- reação hemolítica transfusional (RHT);
- anemia hemolítica imune (AHI);
- anemia hemolítica autoimune (AHA);
- anemia hemolítica induzida por drogas (PHID).

• Procedimento

- 1) Preparar uma suspensão a 5% de hemácias que tenham sido bem lavadas;
- 2) Identificar dois tubos da seguinte maneira: T (teste) e CC (controle de Coombs);
- 3) Colocar em ambos os tubos duas gotas da antiglobulina humana (soro de Coombs);
- 4) Adicionar no tubo T numa gota da suspensão de hemácias a pesquisar;
- 6) Adicionar no tubo CC uma gota do reativo de hemácias do controle de Coombs;
- 7) Esperar 5 minutos;
- 8) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 9) Fazer a leitura.

• Interpretação

A aglutinação no tubo T indica que existem anticorpos cobrindo as hemácias; no caso de não aglutinação, pode ou não haver anticorpos contra as hemácias. A reação deve ser analisada ao microscópio para certificação da presença ou ausência de aglutinação das hemácias. Caso existam indícios clínicos, deve ser feito um eluato.

O controle de Coombs deve aglutinar, porque as hemácias do controle de Coombs sempre estão sensibilizadas por um anticorpo.

4.7.8 Teste indireto de antiglobulina humana ou técnica de Coombs indireto

Tem como objetivo identificar a presença, no plasma, de anticorpos circulantes capazes de se ligar a antígenos de hemácias, causando uma reação antígeno/anticorpos (sensibilização) que não leva à aglutinação em meio salino e que necessita do soro de antiglobulina humana para que haja a aglutinação. É empregada nos seguintes casos:

- pesquisa de anticorpos desconhecidos e identificação, utilizando-se células eritrocitárias com antígenos conhecidos (painéis);
- pesquisa de D fraco;
- provas de compatibilidades;
- fenotipagem.

- **Procedimento**

Usam-se dois grupos de hemácias fenotipadas, geralmente identificados como I e II, com a caracterização dos antígenos dos principais sistemas sanguíneos que possuem significado clínico e representados em um diagrama que compõe essas hemácias.

Fase salina

- 1) De acordo com as hemácias usadas, identificar três tubos da seguinte maneira: I, II e AP (autoprova);
- 2) Colocar duas gotas do soro nos tubos identificados;
- 3) Colocar uma gota das hemácias fenotipadas I, II e a pesquisar (suspensão a 5%), respectivamente;
- 4) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 5) Fazer a leitura e anotar os resultados no diagrama.

Fase albuminosa

- 1) Colocar duas gotas em cada tubo de albumina ou de substância de baixo peso molecular (LISS) para diminuir o potencial zeta, reduzindo

as forças de repulsão das hemácias, induzindo a aproximação entre elas e favorecendo a visualização da aglutinação;

- 2) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 3) Fazer a leitura e anotar os resultados no diagrama.

Fase de incubação a 37°C

- 1) Incubar a 37°C por 15 minutos;
- 2) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 3) Fazer a leitura e anotar os resultados;
- 4) Lavar três vezes as hemácias com solução salina para a retirada das frações iônicas e diminuição do potencial zeta; escoar e secar bem após a última lavagem.

Fase antiglobulina humana ou AGH

- 1) Colocar duas gotas do soro de Coombs ou AGH nos três tubos;
- 2) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 3) Fazer a leitura e anotar os resultados no diagrama.

• Interpretação

A aglutinação indica a presença de anticorpo irregular, que será demonstrada pela pesquisa de anticorpos irregulares (PAI).

Sem aglutinação, o resultado pode ser negativo, desde que a visão microscópica e os dados clínicos do paciente sejam compatíveis com o achado. Existem casos em que é necessário utilizar outras técnicas, como a de eluição, a fim de retirar o anticorpo preso à membrana das hemácias. Nesse caso, deve-se fazer um teste de Coombs direto.

Nos resultados negativos em que não ocorre aglutinação com AGH, acrescentar ao tubo uma gota de hemácias controle de Coombs – que, após centrifugação, deve apresentar aglutinação –, de forma a avaliar o soro de Coombs ou AGH.

4.7.9 Testes de compatibilidade

Os testes de compatibilidade, ou provas cruzadas, devem predizer a capacidade biológica de um anticorpo causar destruição, imediata ou tardiamente, de eritrócitos incompatíveis. A prova de compatibilidade maior é feita testando-se os glóbulos vermelhos do doador contra o soro/plasma do receptor; da mesma maneira que a PAI, o teste de compatibilidade maior é realizado nas seguintes fases: salina, incubação a 37°C e antiglobulina. A prova de compatibilidade menor é feita testando-se o soro/plasma do doador contra as hemácias do receptor. Atualmente essa prova está em desuso.

Os principais testes de compatibilidade são:

1) Doador: **reclassificação ABO e Rh(D)**

Receptor: **ficha hemoterápica e imuno-hematológica do paciente**

2) **Classificação ABO**

3) **Classificação Rhesus – Anti(D)**

4) **PAI**

5) **Prova cruzada maior**

- **Ficha hemoterápica**

Não é usual que os serviços de hemoterapia elaborem prontuários imuno-hematológicos dos pacientes; no entanto, caso eles existam, é importante que sejam avaliados para que se determine a evolução dos procedimentos e a necessidade de novos exames.

- **Prova cruzada maior**

A prova cruzada maior é realizada para **assegurar a compatibilidade entre as hemácias do doador e o soro do receptor, usando a técnica do Coombs indireto**. Consiste em colocar em contato, antes da transfusão, o soro do receptor com as hemácias do doador, a fim de assegurar ao receptor um sangue compatível. A técnica utilizada deve revelar anticorpos sensibilizantes, aglutinantes e hemolisantes.

Procedimento

- 1) Fazer a suspensão de hemácias do doador a 5%;
- 2) Identificar dois tubos da seguinte maneira: PC (prova cruzada) e AP (autoprova);
- 3) Colocar, em cada tubo, duas gotas do soro do receptor;
- 4) Colocar uma gota da suspensão da hemácia do doador no tubo PC;
- 5) Colocar uma gota da suspensão da hemácia do receptor no tubo AP;
- 6) Incubar por 5 minutos à temperatura ambiente (TA);
- 7) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 8) Fazer a leitura por meio de movimentos lentos, tendo o cuidado de deslocar suavemente o botão das hemácias, e anotar o resultado.

Obs.: Essa fase pode identificar anticorpos do tipo completo (frio) e erros de tipagem sanguínea.

- 9) Adicionar duas gotas de albumina 22% ou LISS; centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 10) Fazer a leitura por meio de movimentos lentos, tendo o cuidado de deslocar suavemente o botão de hemácias, e anotar o resultado;
- 11) Levar os tubos ao banho-maria a 37°C durante 15 minutos;
- 12) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 13) Fazer a leitura por meio de movimentos lentos, tendo o cuidado de deslocar suavemente o botão das hemácias, e anotar o resultado;
- 14) Fazer três lavagens com solução salina fisiológica e centrifugar a 2.000 rpm por 2 minutos;
- 15) Decantar o sobrenadante o máximo possível, tomando o cuidado de secar bem o tubo, com papel-filtro, na última lavagem;
- 16) Adicionar duas gotas de antiglobulina humana ou de soro de Coombs;
- 17) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 18) Fazer a leitura por meio de movimentos lentos, tendo o cuidado de deslocar suavemente o botão das hemácias, e anotar o resultado.

Interpretação

A transfusão será compatível quando o resultado dos dois tubos for negativo. A transfusão será incompatível se o resultado do tubo PC for positivo e o da autoprova for negativo, ou se o resultado de ambos os tubos for positivo. No caso de resultado negativo na prova cruzada e positivo na autoprova, a transfusão será compatível, com restrições a serem esclarecidas.

Só fazer a autoprova no caso de a mesma não ter sido incluída na PAI. Quando não ocorrer nos resultados aglutinação com AGH, não esquecer de acrescentar ao tubo uma gota de hemácias do controle de Coombs – tubo que, após a centrifugação, deverá apresentar aglutinação –, de forma a avaliar o soro de Coombs ou soro AGH.

• Identificação de anticorpos irregulares (IAI)

Inicialmente, é feita a pesquisa do anticorpo irregular (PAI) pela técnica de Coombs indireto. São utilizadas duas hemácias fenotipadas I e II, formando o que se chama de painel de triagem. Caso qualquer das hemácias tenha resultado positivo, deve-se fazer a identificação de anticorpos irregulares. A IAI é realizada também por meio de um painel contendo, em média, 11 hemácias fenotipadas, que é chamado painel de identificação.

Princípio

Usa-se a técnica de Coombs indireto ou da antiglobulina humana indireta para a identificação do anticorpo irregular no soro, por meio de um diagrama de antígenos de vários sistemas sanguíneos de maior significado clínico.

Procedimento

- 1) Usando um painel de identificação de onze hemácias, identificar onze tubos com o número das hemácias tipadas e um com AP (autoprova);
- 2) Colocar em cada tubo duas gotas do soro a ser estudado;
- 3) Adicionar uma gota das suspensões de hemácias em cada tubo, e a suspensão do paciente estudado (5%) no tubo AP;
- 4) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;

- 5) Fazer a leitura dos tubos por meio de movimentos lentos, tendo o cuidado de deslocar suavemente o botão das hemácias, aglutinado ou não, e anotar os resultados no diagrama anexo ao reativo das hemácias fenotipadas (painel de identificação);
- 6) Adicionar duas gotas de albumina bovina a 22% ou LISS, de acordo com o procedimento indicado no laboratório;
- 7) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 8) Fazer a leitura dos tubos por meio de movimentos lentos, tendo o cuidado de deslocar suavemente o botão das hemácias, aglutinado ou não, e anotar os resultados no diagrama anexo ao reativo das hemácias fenotipadas (painel de identificação);
- 9) Levar os tubos ao banho-maria ou a banho seco a 37°C por 15 a 60 minutos;
- 10) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 11) Fazer a leitura dos tubos por meio de movimentos lentos, tendo o cuidado de deslocar suavemente o botão das hemácias aglutinado ou não, e anotar os resultados no diagrama anexo ao reativo das hemácias fenotipadas (painel de identificação);
- 12) Mesmo que haja aglutinação, lavar três vezes as hemácias com solução fisiológica, centrifugando a 2.000 rpm por 2 minutos;
- 13) Decantar o sobrenadante o máximo possível, tomando o cuidado de secar bem o tubo, com papel-filtro, na última lavagem;
- 14) Adicionar duas gotas de antiglobulina humana;
- 15) Centrifugar a 1.000 rpm por 1 minuto;
- 16) Deslocar o botão de hemácias, suavemente, do fundo do tubo; anotar os resultados no diagrama anexo ao reativo das hemácias fenotipadas (painel de identificação).

Colocar em todos os tubos onde não houve aglutinação com AG (negativos) uma gota de hemácias do controle de Coombs, os quais, após centrifugação a 1.000 rpm por 1 minuto, devem apresentar aglutinação. Essa é uma forma de avaliação do soro de Coombs ou da AGH.

• Resultados

De acordo com as aglutinações em cada etapa do processo, pode-se direcionar a pesquisa para anticorpos frios e quentes⁸ do sistema Rh ou de outros sistemas sanguíneos, revelados com antiglobulina humana.

A presença do antígeno está representada no diagrama do painel de identificação de anticorpos de hemácias por uma cruz (+); a ausência está representada por um zero (0).

Deve-se comparar a representação do referido painel com o resultado encontrado, ou seja, presença ou ausência de aglutinação de hemácias que indicará a possível caracterização de um anticorpo.

Pode haver uma mistura de anticorpos; nesse caso, é importante que, além das aglutinações, analise-se também a intensidade dessas reações de aglutinação, buscando identificar uma possível sobreposição de anticorpos.

Podem ser usadas enzimas para reforçar ou anular a reação de aglutinação. Isso facilita a identificação dos anticorpos mediante suas propriedades de reagirem ou não com enzimas proteolíticas, tais como a bromelina e a papaína.

O *kit* do painel de identificação tem um diagrama que permite caracterizar o(s) anticorpo(s); ele está composto por onze hemácias de doadores, genotipados e fenotipados para os nove principais sistemas sanguíneos – Rh, Duffy, Kell, Kidd, Lewis, P, MNS, Lutheran e Xg –, ou melhor, caracterizados para os principais antígenos desses sistemas.

Estruturalmente, as colunas horizontais no diagrama caracterizam os antígenos presentes em cada doador das hemácias desse painel, apresentando seus genótipos (sistema Rh) e fenótipos (outros sistemas). As colunas verticais do diagrama caracterizam o anticorpo em relação aos antígenos de cada sistema. Além disso, o diagrama fornece a reatividade química dos anticorpos em relação às proteínas usadas – como a albumina, a antiglobulina e as enzimas proteolíticas. Em outros diagramas de outros fabricantes de painéis, indica-se a reatividade em relação à temperatura de alguns anticorpos e sistemas.

⁸ Anticorpos frios, como mencionado, são os que se encontram a 4°C; anticorpos quentes encontram-se à temperatura de 37°C.

Assim, o fato de se ter o genótipo do paciente facilita a identificação de um anticorpo do sistema Rh, pois é possível encontrar no diagrama quais os antígenos que não existem no genótipo formado (coluna horizontal) e, com isso, o anticorpo deverá ser referente ao antígeno que o soro estudado não possui em seu genótipo ou fenótipo dos sistemas sanguíneos existentes. Comparando com as colunas verticais do diagrama das onze hemácias dos doadores, os antígenos presentes caracterizam o provável anticorpo buscado, para identificação.

○ conhecimento do fenótipo também ajuda na identificação de outros sistemas sanguíneos da mesma forma descrita acima, pois diminui o número de antígenos a serem consultados.

Como mencionado, o resultado é dado de acordo com as aglutinações formadas pelo anticorpo diante do seu antígeno, que deve estar entre as hemácias tipadas do painel de identificação. Os que aglutinam são positivos e os que não aglutinam, negativos.

4.7.10 Técnicas de separação de anticorpos

- **Adsorção de anticorpos**

Tem como objetivo adsorver (fixar) o anticorpo a fim de se obter um soro puro, com ausência do anticorpo absorvido. Nesse procedimento, são utilizadas hemácias contendo o antígeno relacionado ao anticorpo a ser absorvido. Se quisermos, por exemplo, adsorver o anti-A do soro de um indivíduo do grupo B, utilizamos hemácias que contenham o antígeno A, ou seja, uma hemácia do grupo A.

Essa técnica é de grande importância na preparação de reativos imunohematológicos, auxiliando na identificação de anticorpos irregulares, pois por meio dela é possível eliminar os anticorpos identificados na amostra e manter o anticorpo a ser identificado.

Procedimento

- 1) Lavar as hemácias contendo os antígenos relacionados ao anticorpo a ser adsorvido com solução salina fisiológica por 5 minutos, centrifugando a 3.000 rpm – esse procedimento deve ser repetido pelo menos seis vezes;

- 2) Em um tubo, colocar uma parte de hemácias lavadas para duas partes de soro ou plasma;
- 3) Deixar o tubo contendo o soro com hemácias em descanso por, no mínimo, 30 minutos;
- 4) Centrifugar a 3.000 rpm por 5 minutos;
- 5) Separar o soro das hemácias e testá-lo com hemácias tipadas contendo o antígeno referente ao anticorpo, a fim de verificar se o mesmo foi totalmente absorvido.

Resultado

O resultado deve ser sempre negativo para o antígeno formado. A positividade indica que o anticorpo ainda está presente e não foi retirado, sendo necessário realizar uma segunda absorção.

Observações

- 1) Antes de fazer a adsorção de um anticorpo, é necessário avaliar o título (potência) do mesmo com o seu antígeno respectivo, de forma que, ao final da adsorção, possa fazer-se a comparação do soro absorvido, a fim de se observar se houve ou não queda no título do anticorpo.
- 2) Para se ter certeza de que já não existem anticorpos no soro ou plasma, além de verificar em tubo se houve ou não aglutinação das hemácias, é preciso observar a reação ao microscópio. Caso não seja visualizado nenhum aglomerado de hemácias, e sim a sua dispersão, o anticorpo estará completamente absorvido.

• Técnica de eluição por éter

Procedimento

- 1) Lavar 2 a 3 mL de sangue total seis vezes; caso as hemácias tenham sido obtidas de cordão umbilical, necessitarão de tantas lavagens quanto suficiente para remover a geleia de Wharton; guardar a última solução salina de lavagem;
- 2) Retirar 2 mL de hemácias lavadas e suspender com 50% de volume em solução salina;

- 3) Adicionar éter em volume igual ao da suspensão;
- 4) Agitar vigorosamente o tubo, que deve estar bem fechado, por 15 segundos;
- 5) Misturar por inversão durante 1 minuto;
- 6) Remover a tampa cuidadosamente, para retirar o éter volátil;
- 7) Centrifugar a 3.000 rpm por 10 minutos;
- 8) Retirar cuidadosamente a camada formada no fundo do tubo, tendo o cuidado de introduzir uma seringa conectada a uma agulha ou uma pipeta de Pasteur para remover o eluato; introduzir a seringa ou a pipeta na camada de estroma com suavidade;
- 9) Caso necessário, centrifugar, durante 10 minutos, o eluato obtido, a fim de retirar o estroma residual;
- 10) Colocar o eluato em banho-maria por 5 minutos a 56°C ou por 15 minutos a 37°C, até que o éter residual evapore; agitar, ocasionalmente, com um bastão, tendo o cuidado de que não se forme espuma; caso ocorra precipitação de estroma, proceder à centrifugação, retirando com cuidado o sobrenadante, que será o eluato, obtido sem resíduo de éter ou estroma;
- 11) Usar o eluato para pesquisa de anticorpo irregular (PAI) no painel de seleção e identificação; testar também, comparando, no painel de seleção, a última solução salina, reservada no passo 1, da lavagem das hemácias.

4.8. Controle de qualidade de reagentes usados em imunohematologia

O controle de qualidade de reativos imuno-hematológicos, tais como soros e hemácias fenotipadas, tem como objetivo a avaliação dos reativos no que diz respeito a **avidez, título, especificidade e potência**.

- **Avidez**

Avalia a quantidade necessária de soro – que depende da qualidade do anticorpo específico do material a ser testado – para que ocorra uma reação de aglutinação nítida.

Procedimento

- 1) Usar suspensão de hemácias lavadas três vezes em solução salina a 0,9%;
- 2) Preparar a suspensão de hemácias a 10% em solução salina a 0,9%;
- 3) Colocar em uma lâmina de 2x2 cm uma gota da suspensão de hemácias e uma gota do reativo a ser testado;
- 4) Misturar as hemácias e o reagente com o auxílio de outra lâmina ou bastão;
- 5) Acionar o cronômetro;
- 6) Observar e anotar o tempo de início da reação;
- 7) Movimentar a lâmina, de forma que as hemácias sofram mistura constante;
- 8) Observar o desenvolvimento da aglutinação durante 2 minutos;
- 9) Anotar os resultados em intensidade de cruces (de 1 a 4).

Obs.: Para caracterizar boa avidéz, o soro deve apresentar ao final desse teste um escore de 10 a 12, correspondente a 4+.

• Título

○ título é avaliado pelas reações obtidas no soro que contém o anticorpo, em diluições seriadas – 1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512... –, contra hemácias específicas. ○ resultado é expresso pela reação de maior diluição para uma reação de 1+.

Procedimento

- 1) Numerar tubos de hemólise 1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e reserva;
- 2) Nos tubos 1 e 2, colocar 50 µL do reagente;
- 3) Nos tubos 2 e posteriores, colocar 50 µL de solução salina a 0,9%;
- 4) Realizar diluições sucessivas do soro em solução salina a 0,9% (1:2 a 1:512), transferindo 50 µL de cada tubo para o tubo seguinte, até o tubo reserva;
- 5) Após a diluição, acrescentar a cada tubo 50 µL das hemácias selecionadas e homogeneizar levemente;
- 6) Centrifugar a 3.400 rpm por 15 segundos;
- 7) Anotar os resultados;

- 8) O resultado é expresso pela reação de maior diluição para uma reação de 1+;
- 9) Determinar o escore segundo o quadro 4.4.

**Quadro 4.4. Escore das reações de aglutinação
(utilizado na clínica e no controle de qualidade dos reativos).**

Intensidade de aglutinação	Escore de reação
4+	12
3+	10
2+	8
1+	5
W ou (+)	2
0	0

- **Especificidade**

Especificidade é uma característica inerente ao anticorpo que o torna capaz de reconhecer apenas as hemácias portadoras do antígeno correspondente.

A especificidade é estabelecida testando antissoros (anti-A, anti-B, anti-AB) com hemácias positivas e negativas em relação aos determinantes antigênicos específicos (A, B, AB).

O antissoros deve reconhecer somente o antígeno correspondente à especificidade a que ele se propõe.

Procedimento

- 1) Identificar quatro tubos de hemólise da seguinte maneira: A, B, I e II;
- 2) Adicionar em cada tubo duas gotas do soro a ser testado e uma gota de sua respectiva hemácia fenotipada (A, B, I e II);
- 3) Centrifugar a 3.400 rpm por 15 segundos;
- 4) Fazer a primeira leitura;
- 5) Dar continuidade mediante a utilização da técnica de Coombs indireto.

Obs.: Para que o soro seja específico, ele só deve aglutinar no tubo que contenha o seu antígeno-alvo. Em caso de soro anti-D ou de soros raros, deve-se, além de testá-lo pela técnica acima, proceder à identificação do anticorpo correspondente ao soro indicado pela técnica de Coombs indireto, mediante a identificação de anticorpos irregulares (IAI).

- **Potência**

A potência de um soro é verificada por meio da titulação do seu anticorpo.

Procedimento

- 1) Numerar dez tubos de 1 a 10 para fazer a titulação de 1:2 até 1:1.024;
- 2) Adicionar mais um tubo (nomeando-o remanescente), no qual serão gotejadas as últimas três gotas após a titulação, e cujo conteúdo servirá para dar continuidade à titulação, caso necessário;
- 3) Adicionar três gotas de solução salina em todos os tubos, exceto no remanescente;
- 4) Adicionar três gotas do soro a ser testado no primeiro tubo;
- 5) Passar três gotas do primeiro tubo para o segundo, homogeneizando delicadamente a solução, para que não forme espuma (agente dispersante);
- 6) Repetir o processo até o último tubo;
- 7) Adicionar em cada tubo, exceto no remanescente, uma gota de hemácia tipada específica para o soro testado;
- 8) Centrifugar a 3.400 rpm por 15 segundos;
- 9) Fazer a leitura, anotando o escore de cada aglutinação; o tubo correspondente ao título menor será o último a apresentar aglutinação visível.

Obs.: Quando se testa soro anti-D ou outros soros albuminosos, a titulação é obtida com albumina bovina a 22%, e não com solução salina.

4.9. Controle das hemácias fenotipadas

Devem ser realizados os testes descritos acima, juntamente com a classificação ABO e Rh, além do teste de Coombs direto, para certificar-se de que as hemácias não possuem anticorpos contaminantes em sua estrutura.

4.10. Controle da albumina bovina a 22%

Dosar por métodos bioquímicos as proteínas totais e a albumina, e proceder ao teste de especificidade, pois esse reativo não deve apresentar nenhum tipo de anticorpo ou antígeno.

4.11 Hemocomponentes usados em hemoterapia

Na hemoterapia, são usados dois grupos de elementos para a transfusão: **hemocomponentes** e **hemoderivados**. Os primeiros consistem em concentrados específicos, obtidos por métodos físicos (centrifugação, congelamento e descongelamento) e aférese. Os segundos abrangem os derivados sanguíneos produzidos por processos físico-químicos, mediante a industrialização de frações do plasma: **albumina**, **imunoglobulinas** e **fatores da coagulação** – fator VII, fator VIII, fator IX –, além de **complexos protrombínicos**.

4.11.1 Principais hemocomponentes utilizados em hemoterapia

Neste item serão abordados os hemocomponentes preparados mediante processos físicos (centrifugação, congelamento e descongelamento) nos bancos de sangue. Todos esses hemocomponentes devem passar por rigoroso controle de qualidade, a fim de serem monitoradas todas as suas etapas de produção.

- **Concentrado de hemácias**

○ **concentrado de hemácias (CH)**, de coloração vermelho-escura, pode ser obtido de uma unidade de **sangue total (ST)**, em bolsa de coleta simples ou não, por meio de punção venosa, sendo centrifugado posteriormente. Seu volume varia de 220 mL a 280 mL. Deve ser preparado logo depois da coleta do sangue total ou até 8 horas após a mesma, no máximo. Quando coletado em locais mais distantes, a bolsa de sangue total deve ser armazenada, imediatamente após a coleta, à temperatura de $+ 4^{\circ}\text{C}$ a $\pm 2^{\circ}\text{C}$, a fim de serem conservados os fatores de coagulação. Visando minimizar a hemólise, as bolsas devem ser transportadas suspensas, em cestas de metal adequadas a esse fim.

A transfusão de concentrado de hemácia deve ser realizada visando tratar ou prevenir iminente e inadequada liberação de oxigênio (O_2) para os tecidos, como em casos de anemia ou em hemorragias agudas.

De modo geral, a transfusão deve ser feita por indicação médica, principalmente nos casos em que **o paciente esteja precisando de oxigênio tecidual**.

- **Plasma fresco congelado**

○ **plasma fresco congelado (PFC)** é constituído de sódio, potássio, glicose, citrato, lactato e fator VIII. O plasma é separado de uma unidade de sangue total por centrifugação e totalmente congelado até 8 horas depois da coleta.

○ plasma deve ser armazenado à temperatura de, no mínimo, -20°C – a temperatura ideal é de -30°C . O tempo de validade do PFC varia de acordo com a temperatura em que foi armazenado.

São restritas as indicações do plasma fresco congelado para uso terapêutico, pois se leva em conta o risco de transmissão de doenças virais e a existência de hemoderivados. **Está indicado no tratamento de algumas coagulopatias (distúrbios de coagulação) e desordens hemorrágicas, atribuídas quase sempre a defeitos da coagulação e/ou plaquetas, e nas deficiências de baixas proteínas totais.**

- **Plasma isento de crioprecipitado**

É o plasma obtido sem o crioprecipitado (fator VIII), o qual foi retirado ainda em sistema fechado. Esse plasma deve ser armazenado à temperatura igual ou inferior a -20°C , e pode ser consumido em até cinco anos. Em geral, **é recomendado para indivíduos com déficit de albumina.**

- **Crioprecipitado**

○ **crioprecipitado (crio)** é uma fonte concentrada de algumas proteínas plasmáticas insolúveis à temperatura de 1°C a 6°C . O crioprecipitado contém fator VIII, fator de von Willebrand, fibrinogênio, fator XIII e fibronectina. É preparado a partir do descongelamento do plasma fresco congelado (PFC), à temperatura de 1°C a 6°C , por 18 a 24 horas. Depois de descongelado, o plasma é centrifugado; o sobrenadante, que nada mais é do que o plasma isento de crio, é transferido para outra bolsa, deixando-se nela a proteína precipitada com 10 a 15 mL de plasma. O crioprecipitado deve ser imediatamente congelado à temperatura de -20°C ou inferior.

○ crioprecipitado pode ser **utilizado para tratar deficiências de fator VIII e de fibrinogênio.**

- **Concentrado de plaquetas (CP)**

○ **concentrado de plaquetas (CP)** pode ser obtido a partir de unidade de sangue total (ST), coletado em bolsa tripla, ou por aférese. Para a obtenção de concentrado de plaquetas, é recomendado o tempo máximo de doação de 12 minutos. Para a preparação do concentrado de plaquetas, o sangue total deve ser armazenado à temperatura de 20°C a 24°C, e deve ser preparado até 8 horas após a coleta do sangue total.

A transfusão de plaquetas é usada em pacientes com **baixa contagem de plaquetas (plaquetopenia) e disfunção plaquetária que apresentam sangramento ativo (uso terapêutico) ou que se encontrem em risco sério de apresentar sangramento.**

Bibliografia consultada

ADVENT, Neil D.; REID, Marion E. The Rh Blood Group System: A Review. *Blood*, v. 95, p. 375-387, 2000.

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. *Standards for Blood Banks and Transfusion Services*. 17. ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 1999.

BATISSOCO, Ana Carla; NOVARETTI, Marcia Cristina Zago. Aspectos moleculares do sistema sanguíneo ABO. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 25, n. 1, p. 47-58, 2003.

BEIGUELMAN, Bernardo. *Os sistemas sanguíneos eritrocitários*. 3. ed. Ribeirão Preto: Funpec, 2003.

CHANG, Tylis Y.; SIEGEL, Don L. Genetic and Immunological Properties of Phage-Displayed Human Anti-Rh(D) Antibodies: Implications for Rh(D) Epitope Topology. *Blood*, v. 91, p. 3.066-3.078, 1998.

COOMBS, Robert R. A.; MOURANT, Arthur Ernest; RACE, Robert R. Detection of Weak and "Incomplete" Rh Agglutinins: A New Test. *Lancet*, n. 246, p. 15-16, 1945.

DANIELS, Geoff. *Human Blood Groups*. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 2002.

DAVIDSOHN, Israel; HENRY, John Bernard. *Diagnóstico clínico por el laboratorio*. 6. ed. Barcelona: Salvat, 1978.

ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO (org.). *Textos de apoio em hemoterapia*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000. V. 1 e 2.

GIRELLO, Ana Lúcia; KUHN, Telma Ingrid B. de Bellis. *Fundamentos da imunohematologia eritrocitária*. São Paulo: Editora Senac, 2002.

HARMENING, Denise M. *Técnicas modernas em bancos de sangue e transfusão*. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

MURADOR, Priscila; DEFFUNEL, Elenice. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, n. 2, p. 168-178, 2007.

OLIVEIRA, Maria do Carmo V. C.; GÓES, Sonia M. P. M. *Práticas em imunologia eritrocitária*. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 1999.

Este livro foi impresso pela Suprema Gráfica Editora, para a Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio e o Instituto Oswaldo Cruz, da Fundação Oswaldo Cruz, em outubro de 2013. Utilizaram-se as fontes Geometr231 BT e Geometr415 MT na composição, papel pólen bold 70g/m² no miolo e cartão supremo 250g/m² na capa.