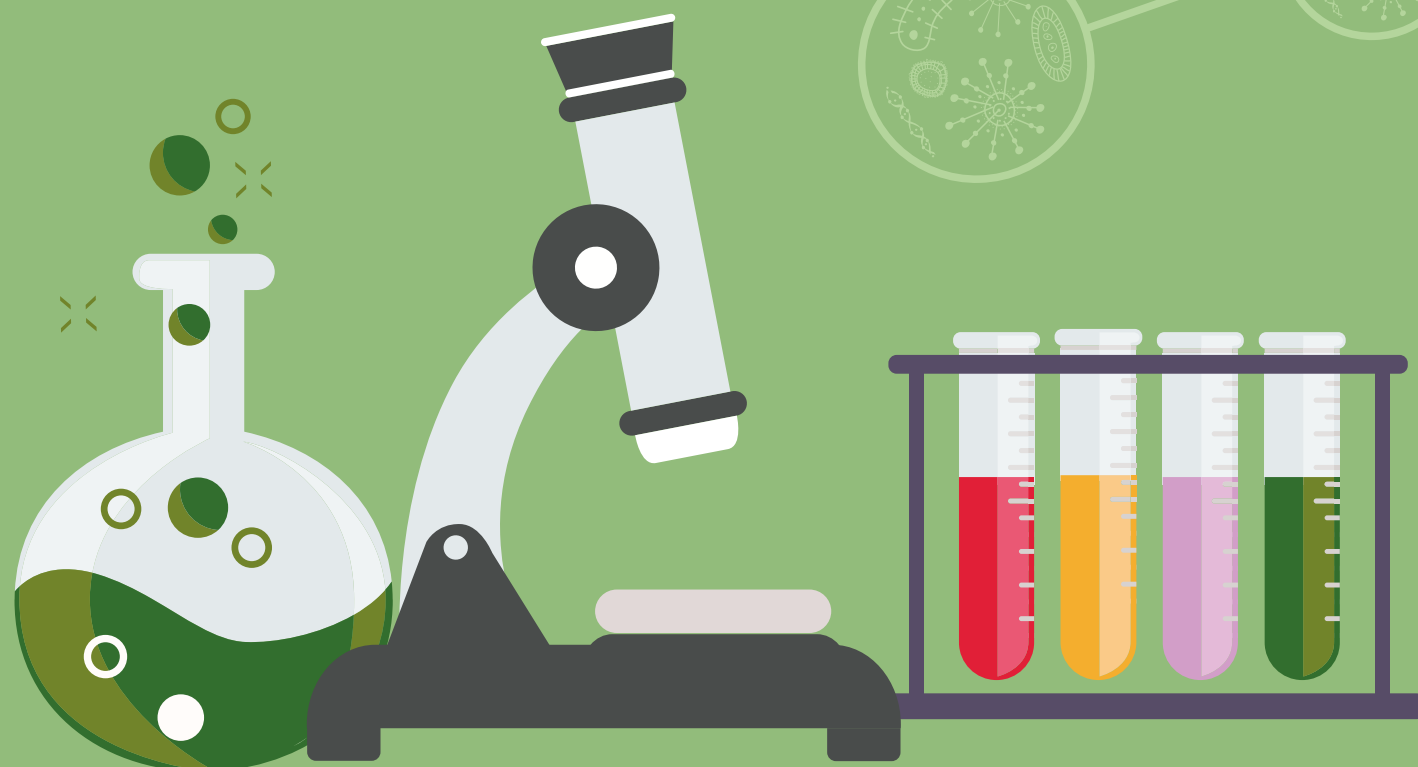


BIOMEDICINA NA PRÁTICA: DA TEORIA À BANCADA

Adriane Pozzobon
(Organizadora)

ISBN 978-85-8167-224-3



Adriane Pozzobon
(Organizadora)

Biomedicina na prática: da teoria à bancada

1ª edição



Lajeado, 2017



Universidade do Vale do Taquari - Univates

Reitor: Prof. Me. Ney José Lazzari

Vice-Reitor e Presidente da Fuvates: Prof. Dr. Carlos Cândido da Silva Cyrne

Pró-Reitora de Pesquisa, Extensão e Pós-Graduação: Profa. Dra. Maria Madalena Dullius

Pró-Reitor de Ensino: Prof. Dr. Carlos Cândido da Silva Cyrne

Pró-Reitora de Desenvolvimento Institucional: Profa. Dra. Júlia Elisabete Barden

Pró-Reitor Administrativo: Prof. Me. Oto Roberto Moerschbaecher



Editora Univates

Coordenação e Revisão Final: Ivete Maria Hammes

Editoração: Marlon Alceu Cristófoli

Capa: Projetado por Photoroyalty - Freepik.com

Conselho Editorial da Editora Univates

Titulares

Adriane Pozzobon

Marli Teresinha Quartieri

Rogério José Schuck

Fernanda Cristina Wiebusch Sindelar

Suplentes

Fernanda Rocha da Trindade

Ieda Maria Giongo

João Miguel Back

Alexandre André Feil

Avelino Tallini, 171 - Bairro Universitário - Lajeado - RS - Brasil

Fone: (51) 3714-7024 / Fone/Fax: (51) 3714-7000

E-mail: editora@univates.br / <http://www.univates.br/editora>

B615

Biomedicina na prática: da teoria à bancada / Adriane Pozzobon (Org.) – Lajeado : Ed. da Univates, 2017.

173 p.:

ISBN 978-85-8167-224-3

1. Biomedicina. 2. Saúde básica. 3. Diagnóstico laboratorial.
I. Pozzobon, Adriane. II. Título.

CDU: 61:17

Catálogo na publicação - Biblioteca da Univates

As opiniões e os conceitos emitidos, bem como a exatidão, adequação e procedência das citações e referências, são de exclusiva responsabilidade dos autores.

Dados cadastrais dos autores:

Nome: Adriane Pozzobon

Formação Acadêmica: Graduação em Biomedicina (Univates) Graduação em Ciências Biológicas (UFSM), Mestrado e Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia Humana (UFRGS). Professora Titular da Universidade do Vale do Taquari- Univates.

Nome: Andréa Horst

Formação Acadêmica: Graduação em Biomedicina (UFRGS), Especialização em Análises Clínicas (Univates). Mestrado e Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia Humana (UFRGS). Professora Adjunta da Universidade do Vale do Taquari- Univates.

Nome: Fernanda Rocha da Trindade

Formação Acadêmica: Graduação em Física Médica (PUCRS), Mestrado em Medicina: Ciências Médicas (UFRGS). Professora Assistente da Universidade do Vale do Taquari- Univates.

Nome: Gabriela Kniphoff da Silva Lawisch

Formação Acadêmica: Graduação em Biomedicina (UFCSPA), Especialização em Análises Clínicas e Toxicológicas (UNISC), Mestrado em Genética e Biologia Molecular (UFRGS). Professora Assistente da Universidade do Vale do Taquari- Univates.

Nome: Geórgia Muccillo Dexheimer

Formação acadêmica: Biomedicina (Univates). Mestrado em Biotecnologia (Univates). Professora Assistente da Universidade do Vale do Taquari - Univates.

Nome: Jairo Luís Hoerlle

Formação Acadêmica: Graduação em Biomedicina (Univates) e Graduação em Ciências Biológicas (Ulbra). Especialização em Administração Hospitalar (PUCRS) e Gestão Universitária (Univates). Mestrado em Medicina: Ciências Médicas (UFRGS). Professor Assistente da Universidade do Vale do Taquari - Univates.

Nome: Johan Prediger

Formação acadêmica: Biomedicina (Univates). Mestrado em Biotecnologia (Univates).

Nome: Michelle Mergener

Formação acadêmica: Biomedicina (FEEVALE). Mestrado em Qualidade Ambiental pela Universidade FEEVALE. Doutorado em Ciências da Saúde (UFCSPA). Professora da IMED.

Nome: Vanderlei Biolchi

Formação Acadêmica: Graduação em Farmácia/Farmácia Bioquímica - Análises Clínicas (PUCRS), Mestrado, Doutorado e Pós-Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia Humana (UFRGS). Professor Adjunto da Universidade do Vale do Taquari- Univates.

Nome: Welton Everson Lüdtko

Formação Acadêmica: Graduação em Farmácia e Bioquímica (UCPel), Mestrado em Genética e Toxicologia (ULBRA). Professor Assistente da Universidade do vale do Taquari - Univates.

PREFÁCIO

A área da saúde é multi e interdisciplinar, englobando diferentes atores e conteúdos necessários para a formação de um bom profissional. Neste contexto, a área básica é crucial para a construção dos saberes específicos, sendo um alicerce à formação profissional.

Pensando na formação de um profissional capacitado, professores da área básica elaboraram esta obra, sendo o objetivo de todo esse esforço, formular um documento prático, acessível e capaz de transmitir informações que propiciem uma melhor compreensão e consolidação do conhecimento básico aplicado ao diagnóstico laboratorial.

O livro é constituído por 12 capítulos contendo diferentes roteiros práticos, desde conteúdos básicos como a Biologia celular e Bioquímica, até mais complexos como a Imagenologia e Fisiologia. Além disto, contém correlações clínicas e dicas valiosas para o bom andamento das aulas práticas. Finalmente, ressalta-se que o livro pode ser utilizado como material complementar durante as aulas de diferentes cursos bem como para consulta em diferentes contextos educacionais, tornando-se desta forma um instrumento valioso para a formação acadêmica. A todos, uma boa leitura.

Adriane Pozzobon

SUMÁRIO

PREFÁCIO	5
CAPÍTULO I	
BIOLOGIA CELULAR	8
<i>Geórgia Muccilo Dexheimer</i>	
<i>Gabriela Kniphoff da Silva Lawisch</i>	
<i>Michelle Mergener</i>	
CAPÍTULO II	
CITOGENÉTICA	16
<i>Michelle Mergener</i>	
CAPÍTULO III	
BIOLOGIA MOLECULAR	28
<i>Adriane Pozzobon</i>	
CAPÍTULO IV	
BIOQUÍMICA	39
<i>Geórgia Muccillo Dexheimer</i>	
<i>Jairo Luís Hoerlle</i>	
<i>Vanderlei Biolchi</i>	
CAPÍTULO V	
HEMATOLOGIA	66
<i>Adriane Pozzobon</i>	
<i>Geórgia Muccillo Dexheimer</i>	
<i>Welton Lüdtkke</i>	
CAPÍTULO VI	
IMUNOLOGIA	81
<i>Adriane Pozzobon</i>	
<i>Andréa Horst</i>	

CAPÍTULO VII	
ANÁLISES DE LÍQUIDOS CORPORAIS	91
<i>Adriane Pozzobon</i>	
<i>Geórgia Muccillo Dexheimer</i>	
<i>Welton Ludtke</i>	
CAPÍTULO VIII	
MICOLOGIA	107
<i>Gabriela Kniphoff da Silva Lawisch</i>	
CAPÍTULO IX	
PARASITOLOGIA.....	122
<i>Gabriela Kniphoff da Silva Lawisch</i>	
<i>Geórgia Muccillo Dexheimer</i>	
<i>Jairo Luis Hoerlle</i>	
CAPÍTULO X	
BACTERIOLOGIA.....	135
<i>Geórgia Muccillo Dexheimer</i>	
<i>Jairo Luís Hoerlle</i>	
<i>Johan Prediger</i>	
CAPÍTULO XI	
IMAGENOLOGIA	158
<i>Fernanda Rocha da Trindade</i>	
CAPÍTULO XII	
FISIOLOGIA	167
<i>Andréa Horst</i>	

CAPÍTULO I

BIOLOGIA CELULAR

Geórgia Muccilo Dexheimer

Gabriela Kniphoff da Silva Lawisch

Michelle Mergener

A Biologia Celular se dedica ao estudo da célula e suas estruturas. Historicamente, o início dos estudos com as células se deu através de experimentos realizados por Robert Hooke utilizando cortiça, em 1665. Este foi o primeiro a visualizar as células em um microscópio.

A célula é a unidade estrutural básica dos organismos vivos, podendo, uma única célula, constituir um organismo inteiro, como os protozoários, ou ser uma das muitas, agrupadas e diferenciadas em tecidos e órgãos para a formação de um organismo multicelular.

As células apresentam uma membrana definida, citoplasma (onde são encontradas as organelas) e o material genético. Este pode estar organizado dentro de uma membrana nuclear em células eucarióticas, ou podem estar livres no citoplasma em células procarióticas.

1. PRÁTICA: Utilização do microscópio óptico

Esta prática permite que o aluno aprenda a manusear o microscópio óptico e entender como ocorre a formação da imagem através da objetiva.

Materiais:

- Microscópio óptico;
- Lâminas;
- Lamínulas;
- Letras recortadas de jornal;
- Água;
- Papel filtro;

Procedimentos:

1. Colocar as letras recortadas de jornal sobre a lâmina e pingar duas gotas de água em cima das letras.
2. Colocar a lamínula de uma só vez sobre as letras de jornal, a fim de evitar a formação de bolhas de ar.
3. Limpar o excesso de água com o papel filtro.
4. Observar as letras nos aumentos de 40x, 100x e 400x e observar as diferenças e os detalhes de cada aumento.

2. PRÁTICA: observação de estruturas celulares

Estas atividades práticas têm por objetivo a visualização da diversidade celular que constitui o planeta e elucidar as diferentes estruturas de células procariontes e eucariontes e células vegetais e animais.

2.1. Observação de células do epitélio bucal

Materiais:

- Cotonete;
- Lâmina;
- Lamínula;
- Microscópio óptico;
- Corante azul de metileno;
- Papel filtro;

Procedimentos:

1. Raspar o cotonete na parte interna da bochecha para capturar células da mucosa oral.
2. Esfregar o cotonete em uma lâmina.
3. Pingar duas gotas de corante azul de metileno.
4. Cobrir com a lamínula.
5. Observar no microscópio em aumentos de 100 e 400x.

2.2. Observação de células vegetais

Materiais:

- Pinça;
- Cebola;
- Lâmina;
- Lamínula;
- Água;
- Microscópio óptico;
- Corante azul de metileno.

Procedimentos:

1. Retirar com o auxílio de uma pinça, uma porção da epiderme de uma escama da cebola.

Dica: O epitélio utilizado deve ser o exterior da escama, pois apresenta uma única camada de células, enquanto o epitélio inferior apresenta várias camadas, o que poderia dificultar a observação da célula vegetal.

2. Colocar sobre a lâmina com uma gota de corante azul de metileno e cobrir com a lamínula.

3. Observar no microscópio estruturas como parede celular, núcleo e nucléolo. Usar aumentos de 100 e 400X.

Observação: *Pode ser utilizada uma gota de solução saturada de NaCl para observação de osmose. Deve-se pingar na lateral da lamínula.*

2.3 Observação de bactérias do iogurte

Materiais:

- Iogurte;
- Lâmina;
- Lamínula;
- Vareta de vidro;
- Lamparina ou bico de bunsen;
- Corante azul de metileno;
- Água destilada;
- Óleo de imersão.

Procedimentos:

1. Colocar uma pequena quantidade de iogurte sobre uma lâmina com o auxílio da vareta de vidro.
2. Passar a lâmina três a quatro vezes sobre a chama da lamparina ou bico de bunsen e deixar esfriar.
3. Pingar uma ou duas gotas de azul de metileno e deixar atuar alguns minutos.
4. Lavar a lâmina com água destilada e deixar secar.
5. Colocar uma gota de óleo de imersão e cobrir com a lamínula.
6. Observar ao microscópio no aumento de 100 e 400X.

Observação: *Utilizar óleo de imersão sobre a lamínula para visualização na objetiva de 100x.*

2.4. Comparação de tamanhos: células procariotas e eucariotas

Esta prática tem por objetivo o entendimento das proporções e diferentes tamanhos das células visualizadas em microscópio, bem como suas estruturas.

Materiais:

- Lâmina;
- Lamínula;
- Cotonete;
- Placa de petri com cultura de bactéria;
- Alça;
- Lamparina ou bico de bunsen;

- Álcool 70%;
- Corante azul de metileno;
- Papel filtro;
- Copo de Becker 250 mL;
- Microscópio.

Procedimentos:

1. Com o auxílio da alça, encostar levemente em uma colônia de bactérias na placa de Petri e esfregar na lâmina até espalhar bem as bactérias;
2. Fixar as bactérias pelo calor, passando a lâmina na chama da lamparina ou bico de bunsen com as bactérias voltadas para cima.

Dica: Cuidar para a lâmina não aquecer demais controlando nas costas das mãos.

3. Coletar células da mucosa bucal, esfregando o cotonete na parte interna da bochecha.
4. Esfregar o cotonete em cima da região da lâmina onde foram colocadas as bactérias.
5. Fixar as células com álcool 70% por 1 minuto.
6. Pingar uma gota de azul de metileno e esperar 1 minuto.
7. Retirar o corante deixando passar um pequeno fluxo de água sob a torneira.
8. Cobrir com lamínula e secar as laterais da lâmina.
9. Observar ao microscópio no aumento de 400x

2.5. Visualização de mitocôndria em células vivas

Esta prática é realizada com um corante específico, Verde Janus, o qual é um corante vital que não mata a célula. As mitocôndrias são organelas muito pequenas e serão observadas como grânulos no citoplasma da célula.

Materiais:

- Leveduras (fermento de pão);
- Lâmina;
- Lamínula;
- Corante verde janus;
- Conta-gotas;
- Óleo de imersão;
- Microscópio óptico.

Procedimentos:

1. Preparar uma solução de leveduras e colocar uma gota sobre a lâmina.
2. Pingar uma gota do corante verde janus.
3. Cobrir com a lamínula.
4. Observar no microscópio óptico utilizando óleo de imersão no aumento de 1000x.

3. PRÁTICA: Propriedades físico-químicas dos componentes da membrana plasmática

As membranas biológicas são formadas por lipídios e proteínas, assim, apresentam uma porção apolar, denominada lipossolúvel, e uma porção polar, denominada hidrossolúvel, como os detergentes. Esta atividade prática tem por objetivo caracterizar as substâncias utilizadas e entender o seu comportamento de acordo com suas propriedades físico-químicas.

Materiais:

- 5 copos Becker;
- 1 colher;
- Azeite;
- Água;
- Detergente colorido;
- Solvente orgânico (acetona, éter, água-raz...)
- Açúcar;
- Sal.

Procedimentos:

1. Em um recipiente com um pouco de azeite de cozinha, colocar uma pitada de açúcar e mexer bem.
2. Observar o comportamento de um lipídio, que tem estrutura apolar e o glicídio.
3. Em um recipiente, colocar um pouco do solvente orgânico e uma colher de açúcar. Mexer bem.
4. Observar o comportamento do solvente apolar com o glicídio.
5. Em três recipientes, colocar:
 - 1/2 de água e 1/2 de azeite;
 - 1/2 de azeite e 1/4 de detergente colorido;
 - 1/3 de água, 1/3 de azeite e 1/3 de detergente colorido;
6. Agitar os líquidos com uma colher e observar o comportamento por 5 minutos ou mais.

4. PRÁTICA: Passagem de solutos e solventes pela membrana plasmática

As células são constituídas por uma membrana celular, a qual promove passagem controlada de substâncias e assim, ocorre um equilíbrio dinâmico dentro do organismo. A água e outros íons pequenos podem passar livremente pela membrana através do transporte passivo, onde não há gasto de energia. A osmose é um tipo de transporte passivo, onde há passagem de solvente de uma solução menos concentrada para a solução mais concentrada através de uma membrana semipermeável.

Materiais:

- Lâmina;
- Lamínula;

- Agulha hipodérmica descartável;
- Conta-gotas;
- Água destilada;
- Soro fisiológico (NaCl 0,9%);
- Solução hipertônica (solução saturada de NaCl e/ou açúcar);
- Microscópio óptico;
- Luvas descartáveis.

Procedimentos:

1. Fazer um pequeno furo na ponta do dedo com a utilização de uma agulha hipodérmica descartável e colocar uma gota de sangue sobre três lâminas.
2. Pingar soro fisiológico em uma das lâminas caso a gota de sangue não apresente um volume grande.
3. Cobrir com a lamínula e observar ao microscópio.
4. Na segunda lâmina, pingar uma gota de solução hipertônica sobre a gota de sangue.
5. Cobrir com a lamínula e observar ao microscópio as hemácias “murchas”, ficando crenadas.
6. Na terceira lâmina, pingar uma gota de solução hipotônica (água destilada) sobre a gota de sangue.
7. Cobrir com a lamínula e observar ao microscópio as hemácias com aumento do tamanho, ficando túrgidas e podendo ser visualizada algumas células “estouradas”.

5. PRÁTICA: Observação de mitose em ponta de raiz de cebola *Allium cepa* (2n = 16)

Materiais:

- Cebola;
- Becker;
- Água;
- Estilete;
- Álcool;
- Ácido Acético;
- Álcool 70%;
- Ácido Clorídrico 1N;
- Papel absorvente;
- Lâmina;
- Lamínula;
- Corante.

Procedimentos:

1. Encher um frasco com água e colocar a cebola com a parte das raízes imersa na água e esperar até que as raízes comecem a crescer. *Isto pode levar entre 24h e alguns dias.*
2. Quando as raízes atingirem pelo menos cinco milímetros poderão ser facilmente destacadas do bulbo com auxílio de um estilete. *Não é necessário o crescimento excessivo da raiz, pois o material necessário se encontra na ponta da mesma.*
3. As pontas da raiz devem ser imediatamente fixadas em solução de álcool e ácido acético (3:1). *Esta solução deve ser preparada no momento de uso.* As raízes devem ficar em torno de 2 horas nesta solução fixadora.
4. Após o tempo de imersão no fixador, as pontas de raiz podem ser estocadas em álcool 70% em refrigerador ou então preparadas para a observação das mitoses.
5. O material fixado deve ser hidrolisado. Transferir as pontas de raiz de cebola para uma solução de ácido clorídrico 1N e deixar em imersão por 15 minutos.
6. Lavar em água (imersão por um ou dois minutos).
7. Remover o excesso de água com um papel absorvente e transferir para uma lâmina de microscopia.
8. Antes de adicionar o corante sobre a ponta da raiz, pode-se remover ou romper com uma agulha as extremidades do material, correspondendo à região da coifa, pois isso facilitará a coloração e observação ao microscópio.
9. Para a coloração, pode ser utilizado o coranteorceína acética 2%, pingando uma gota sobre a lâmina e aguardar cerca de 20 minutos.
10. Colocar a lamínula cuidando para que não fiquem bolhas de ar.
11. Envolver a lâmina com um papel filtro e pressionar com o dedo polegar a lamínula, fazendo com que o tecido se espalhe pela lâmina e seja possível observar camadas de células isoladas.

Dica: Deve-se cuidar para não colocar muito tecido sobre a lâmina, pois isto dificultará a visualização da mitose. Cerca de 2mm de ponta de raiz são suficientes.

Dica: O material também pode ser espalhado segurando a lamínula com um papel absorvente e bater com um lápis borracha ou com a tampa de caneta.

12. Após, a lâmina pode ser observada em microscópio em menor aumento (100x) para que se localize rapidamente onde estão as células em divisão e posteriormente se necessário analisar em aumento de 400x.

Referências

DE ROBERTIS, E.D.P., DE ROBERTIS, E.M.F. **Bases da Biologia Celular e Molecular**. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

LORETO, E.L.S. & SEPEL, L.M.N. **Atividades experimentais e didáticas de Biologia Molecular e Celular**. Ribeirão Preto, ed. Da Sociedade Brasileira de Genética. 2003. 2a ed.

JORDÃO, B.Q. *et al.* **Práticas de Biologia Celular**. Londrina, Editora UEL, 1998.

JUNQUEIRA, L.C.U. E JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo. Ed. Santos, 1983.

VALLE, F.C. **Práticas de citologia e genética**. Rio de Janeiro, MEDSI, 2001.

CAPÍTULO II

CITOGENÉTICA

Michelle Mergener

AVALIAÇÃO DE DANOS NO DNA PELO ENSAIO COMETA

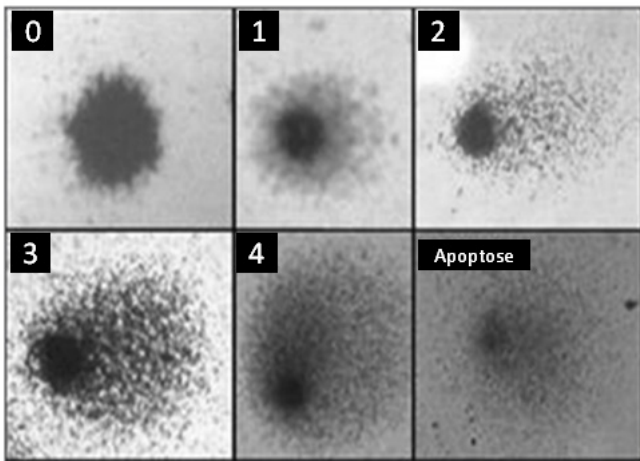
O Ensaio Cometa, também conhecido como eletroforese de Célula Única (*Single Cell Gel eletroforese – SCGE*) é uma técnica rápida, simples e sensível, de baixo custo, para mensurar e analisar as lesões e detectar efeitos de reparo no DNA em células individuais expostas a agentes genotóxicos. Tal ensaio representa um método que é capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Além disso, o DNA pode sofrer alterações decorrentes do avanço da idade, causando alterações cromossômicas estruturais. Fatores como gênero, dieta, hábito de fumar e consumo de bebidas alcoólicas também podem alterar a frequência de mutações gênicas, causando alterações cromossômicas e/ou trocas de cromátides indicando uma correlação entre a atividade carcinogênica e mutagênica.

Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos alcali-lábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão. Estes danos no DNA podem ser reparáveis. Entretanto, quando o tipo e a quantidade de danos superam a capacidade de reparo das células, esses mecanismos celulares essenciais podem ser seriamente afetados. Caso essas lesões não sejam removidas, podem levar as células à morte, ou resultar na incorporação de mutações ao genoma, sendo transmitidas para as gerações futuras, ou ainda, provocando efeitos genotóxicos severos e, conseqüentemente, gerar instabilidade genômica e até mesmo o surgimento de doenças crônicas degenerativas, dentre elas o câncer.

Podendo ser utilizado tanto em animais como em plantas, o Ensaio Cometa demonstra sensibilidade e rapidez em estudos de genotoxicidade. Além disso, apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, uma vez que pode ser empregado em qualquer organismo eucarioto e apresenta bons resultados a partir de um pequeno número de células analisadas e sem a necessidade de que elas estejam em divisão. Assim, apresenta como vantagens: a simplicidade, rapidez, sensibilidade e baixo custo. Por tais motivos, este ensaio possui uma grande aplicabilidade como teste de genotoxicidade *in vivo* e *in vitro*, incluindo estudos de biomonitoramento humano e ambiental.

Além de muitas vantagens, este teste também apresenta algumas limitações: o dano pode ser reparado por ser muito sensível, assim, deve-se ter cautela, além de um bom controle para análise das conclusões; o tempo entre a exposição ao agente e a preparação das lamínas, até a lise, deve ser curto (até 24 horas), pois o reparo pode ocorrer imediatamente.

O princípio é simples: as células são colocadas em gel sobre uma lâmina de microscopia, passa-se em uma corrente elétrica (eletroforese), e se houver rompimento no DNA, migra para fora do núcleo dando a aparência de um cometa ou cauda. O surgimento desta cauda assemelha-se a de um cometa, como é mostrado na figura abaixo.



0= sem dano, 1= com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça; 2: com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça; 3: com uma cauda longa superior a duas vezes o diâmetro da cabeça; 4: cauda longa e mais espalhada (em forma de leque) do que a classe 3; Apoptose: ausência de núcleo.

Fonte: Adaptado de FRANCESCHI, 2011.

1. PRÁTICA: Ensaio cometa em linfócitos humanos

Materiais:

- Luvas;
- Jaleco;
- Solução de lise;
- Tampão alcalino de eletroforese;
- Tampão de Neutralização;
- Solução de parada;
- PBS;
- Soluções para coloração com nitrato de prata;
- Agarose low melting;
- Agarose padrão;
- Lâminas;
- Lamínulas;
- Erlenmeyer;
- Provetas;
- Pipetas automáticas;
- Ponteiras;
- Cuba de eletroforese;
- Fonte para eletroforese;
- Caixas para coloração de lâminas;

- Gelo;
- Água destilada;
- Frascos para armazenar soluções (âmbar e padrão);
- Provetas;
- Estufa;
- Medidor de pH;
- Micro-ondas;
- Microscópio óptico;
- Banho-maria;
- Microtubos eppendorf.

Procedimentos:

1. Preparar todas as soluções e os géis de agarose.

Preparo das soluções

a) Solução de Lise

Utilizada para degradar a membrana plasmática, deixando apenas o núcleo.

Preparar inicialmente a solução mãe:

- Pesar 146,1g NaCl 2,5M
- Pesar 37,2g EDTA 100mM
- Pesar 1,2g Tris 10mM
- Adicionar água destilada até completar 890 mL.
- Ajustar o pH para 10 com NaOH (aproximadamente 12g)
- Estocar em temperatura ambiente.

Solução de Uso

- 1 mL Triton X-100
- 10 mL DMSO
- 89 mL da solução de Lise Mãe
- Refrigerar por 60 minutos antes do uso.

b) Tampão Alcalino de Eletroforese

Utilizado para desnovelamento das cadeias de DNA e exposição dos sítios alcali-lábeis. Inicialmente preparar a solução A e a solução B e depois unir formando a solução de uso.

Solução A

- Pesar 200g NaOH 10N
- Adicionar 500 mL de água destilada
- Colocar em vidro âmbar e armazenar em temperatura ambiente.

Solução B

- Pesar 14,89g EDTA 200mM
- Adicionar 200 mL de água destilada
- Colocar em vidro âmbar, e armazenar em temperatura ambiente.

Solução de Uso: Misturar 30 mL da solução A com 5 mL da solução B e adicionar 965 mL de água destilada.

c) Tampão de Neutralização

- Pesar 48,5g Tris 0,4M e adicionar água destilada até completar 1000 mL.
- Ajustar o pH 7,5 com HCl.

d) Coloração com Nitrato de Prata

Preparar as soluções para a coloração.

Solução Fixadora

- Ácido tricloroacético (15%)
- Sulfato de zinco (5%)
- Glicerol (5%)
- Água destilada (75%)
- Armazenar em temperatura ambiente.

Solução Corante

Preparar as soluções A e B e depois unir formando a solução de uso.

Solução A:

- Carbonato de Sódio (5%) diluído água destilada e armazenar em temperatura ambiente.

Solução B

- Nitrato de amônio (0,1%)
- Nitrato de Prata (0,1%)
- Ácido tungstosalicílico (0,25%)
- Formaldeído (0,15%)
- Adicionar água destilada

- Armazenar em temperatura ambiente.

Solução de Uso: Adicionar a Solução A com a Solução B (na proporção 1:2)

e) Solução de Parada

- Ácido acético (1%) e água destilada (99%) e armazenar em temperatura ambiente.

f) Tampão PBS

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Na₂HPO₄
- 0,24g KH₂PO₄
- Adicionar água destilada até completar 1000 mL
- Ajustar pH 7,4 com HCl
- Filtrar com filtro estéril para remover partículas não dissolvidas.

Preparo dos Géis de Agarose

a) Agarose Low Melting

- 0,07g Agarose Low Melting
- 10 mL PBS
- Dissolver em micro-ondas

b) Agarose Padrão

- 0,15g Agarose padrão
- 20 mL PBS
- Dissolver em micro-ondas

2. Processamento das amostras.

Dica: *Todo o processamento das amostras deve ser feito com as luzes desligadas ou com o mínimo possível de luminosidade. Pois a radiação UV pode causar dano no DNA.*

3. Preparar as lâminas tratadas com pré-cobertura da seguinte forma:

- Identificar as lâminas com tarja fosca: asterisco no alto do canto esquerdo;
- Mergulhar a parte superior da lâmina na agarose regular já dissolvida;
- Deixar secar em temperatura ambiente.

4. Confeccionar as lâminas com sangue total humano conforme descrito abaixo:

- Coletar o sangue total em tubos contendo anticoagulante EDTA, envoltos com papel alumínio;
- Preparar a solução de lise de uso, deixando-a esfriar até 4° C;
- Dissolver a agarose low melting em micro-ondas e deixar em banho-maria a 40°C;
- Pipetar 5 µL de sangue total em um eppendorf de 0,2 mL;
- Pipetar 95 µL de agarose low melting e dispensar no mesmo eppendorf do sangue e, ao mesmo tempo, repipetar a mistura;

- Colocar a mistura na lâmina com pré-cobertura, cobrindo com lamínula;
- Colocar as lâminas na câmara úmida por 10 minutos na geladeira;
- Retirar a lamínula, bem devagar, de maneira que a amostra fique na lâmina;
- Colocar as lâminas imersas na solução de lise e deixar na geladeira por no mínimo 24 horas (máximo de 48 horas);

5. Retirar as lâminas da geladeira e proceder a Eletroforese, conforme descrito:

- Preparar o tampão de eletroforese e deixar na geladeira até atingir 4° C;
- Retirar as lâminas da Solução de Lise com auxílio de uma pinça, secando a parte de baixo e a lateral;
- Colocar as lâminas de forma horizontal na cuba de eletroforese, sem espaço entre elas e entre as duas colunas de lâminas, de maneira que fiquem com as tarjas para a direita (lado positivo).
- Colocar gelo ao redor da cuba de eletroforese, controlando a temperatura que deve ser 4°C;
- Colocar o tampão eletroforese (4°C) na cuba de eletroforese até cobrir as lâminas e deixar por 25 minutos;
- Após os 25 minutos, programar a fonte de eletroforese para 25V constantes e 300mA e deixar migrar por 25 minutos;
- Após, tirar as lâminas com pinça e secá-las na lateral e embaixo;
- Colocar as lâminas na cuba de vidro e mergulhar no tampão de neutralização, repetindo por 3x durante 5 minutos cada;

6. Realizar a coloração das lâminas da seguinte forma:

- Lavar as lâminas por 2x com água destilada;
- Deixar as lâminas secarem por, no mínimo, 2 horas a 37°C na estufa (por mais tempo se for em temperatura ambiente);
- Fixar as lâminas por 10 minutos em solução fixadora;
- Lavar as lâminas 3 vezes com água destilada;
- Secar as lâminas por, pelo menos, 5h a temperatura ambiente, ou por 1,5h a 37°C na estufa;
- Hidratar os géis das lâminas por 5 minutos em água destilada;
- Corar as lâminas com agitação no escuro por 35 minutos utilizando a solução corante que deve ser preparada na hora.
- Lavar as lâminas 3 vezes com água destilada;
- Colocar as lâminas na solução de parada por 5 minutos;
- Lavar as lâminas 3 vezes com água destilada;
- Deixar secar em temperatura ambiente.

7. Proceder a análise das lâminas:

- Em microscópio óptico analisar 100 núcleos em aumento de 400x;
- Classificá-los de 0 a 4;
- Obter escore de 0 a 400 para cada amostra.

FREQUÊNCIA DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS COMO INDICADOR DE GENOTOXICIDADE

O dano de DNA é particularmente prejudicial, pois ele pode se tornar uma mutação e, se não reparado em tempo apropriado, ser transmitido às células filhas. A mutação é uma alteração no material genético, que quando não é letal para a célula, pode propagar-se pelo corpo em crescimento (mutação somática) ou transmitir-se às gerações seguintes (mutação germinal). A taxa de mutação espontânea de uma determinada população refere-se a uma frequência basal, que pode alterar-se ao longo da história evolutiva, podendo sofrer um aumento induzido por agentes físicos, químicos ou biológicos, bem como de alguns vírus.

Para avaliação de risco individual é de extrema importância poder estimar as alterações funcionais das células ou tecido. Os fatores de risco individual como a predisposição genética, estado nutricional e estilo de vida, podem piorar os possíveis danos causados por fatores ambientais. Nesse sentido, a determinação das alterações moleculares em nível de DNA pode se tornar um marcador de suscetibilidade de risco individual.

Técnicas como a análise de micronúcleos têm sido utilizadas como uma forma alternativa e não invasiva de biomonitorar populações humanas expostas a agentes mutagênicos. Isso porque os biomarcadores têm a capacidade de indicar eventos celulares e moleculares importantes para esclarecer sobre as relações entre a exposição a agentes causadores de doenças e os efeitos sobre a saúde humana, além do processo de doença. Assim, utilizando-se da análise da frequência de micronúcleos (MN) em células epiteliais, fibroblastos ou linfócitos de sangue periférico em cultura, estas técnicas podem ajudar a melhor compreender a etiologia e a patogênese das doenças, subsidiando, assim, mais efetivamente, o planejamento de estratégias de prevenção e tratamento.

A frequência de MN vem pode ser facilmente ser avaliada em linfócitos e células epiteliais, como por exemplo, as provenientes da mucosa oral, urotelial e nasal, para se obter uma medida de dano de DNA induzido in vivo. A presença de MN em células é um evento relativamente raro e, os dados epidemiológicos disponíveis são bastante limitados devido à falta de padronização de protocolos utilizados, quanto a própria variabilidade individual, a qual costuma ser bastante grande.

A expressão de micronúcleos pode ser consequência de aberrações cromossômicas causadas por quebra de DNA (clastogênese) ou disfunção de fuso mitótico, caracterizando a perda de cromossomos inteiros (aneugênese). Além da detecção de eventos clastogênicos e aneugênicos, o micronúcleo pode expressar amplificação gênica. Com o bloqueio da citocinese, é possível analisar aquelas células que completaram apenas uma divisão e se apresentam binucleadas. Além disso, o escore de micronúcleos é simples, requer um pequeno treinamento e consome pouco tempo.

Micronúcleos são detectados em células interfásicas como pequenas partículas de cromatina, perto do núcleo principal. Derivam de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que foram perdidos durante a anáfase, por falharem ao se ligar ao fuso mitótico e serem excluídos do núcleo. Na análise microscópica, pela formação de carioteca ao seu redor, é possível a visualização de um pequeno núcleo que pode ter um diâmetro entre

1/16 e 1/3 do diâmetro dos núcleos principais. A formação de MN é indubitavelmente um mecanismo da perda de cromossomo, apesar deste não ser o único mecanismo. Acredita-se que estas estruturas também possam ser formadas na fase S da replicação celular, através da amplificação gênica, projetando “buds” nucleares, os quais possivelmente serão cortados após a telófase. Esta técnica possibilita também a quantificação das pontes nucleoplasmáticas, que são cromossomos dicêntricos que tiveram os centrômeros puxados para os polos opostos da célula em anáfase.

1. PRÁTICA: Frequência de micronúcleos em linfócitos humanos

Materiais:

- Luvas;
- Jaleco;
- Soro fetal bovino;
- RPMI- meio de cultura
- Fitohemaglutinina
- Formalina;
- Citocalasina B;
- Citrato de sódio a 1%;
- Fixador Carnoy
- PBS;
- Lâminas;
- Lamínulas;
- Erlenmeyer;
- Provetas;
- Pipetas automáticas;
- Ponteiras;
- Solução de Giensa a 20%;
- Centrífuga;
- Água destilada;
- Frascos para armazenar soluções;
- Estufa;
- Medidor de pH;
- Micro-ondas;
- Microscópio óptico;
- Banho-maria;
- Microtubos eppendorf;
- Pipetas Pasteur;

- Capela de fluxo laminar;
- Tubo falcon;
- Agitador de tubos tipo vórtex.

1. Soluções usadas:

- Soro bovino fetal: Meio nutritivo celular que contém substratos
- RPMI 1640: Meio de cultura específico para linfócitos T
- Fitohemaglutinina: Induz a mitose dos linfócitos T
- Citocalasina B: Interrompe a citocinese durante a anaphase.
- Formalina a 1%: Conserva amostras biológicas.
- Citrato de Sódio a 1%: Estabiliza proteínas.
- Fixador Carnoy: Misturar 3 partes de methanol e uma parte de ácido acético: Retira os resíduos de hemácias da amostra de linfócitos e fixa o material na lâmina
- Solução de Giemsa 20% em PBS: Coloração da amostra.

Preparar o Tampão fosfato (PBS):

8 g NaCl

0,2g KCl

1,44g Na₂HPO₄

0,24g KH₂PO₄

Adicionar água destilada até completar 1000mL.

Ajustar pH 7,4 com HCl.

2. Pré-preparo das lâminas:

Dicas:

- Utilizar sempre lâminas novas, de preferência com tarja fosca.
- Lavar cada uma com detergente (para retirar a gordura).
- Estocar em álcool 70% dentro da geladeira até o uso.

3. Cultivo e Processamento:

- Coletar 4 mL de sangue em tubo heparinizado;
- Limpar a Capela de Fluxo Laminar com álcool 70%;
- Ligar a lâmpada UV por 20 minutos;
- Em cada frasco, colocar:
 - 5 mL de RPMI 1640;
 - 1 mL de soro bovino fetal;
 - 0,1 mL de fitohemaglutinina;
 - 0,8 mL de sangue total ou 0,5 mL de concentrado de leucócitos.

- Identificar cada frasco;
- Colocar na estufa, a 37°C.

4. 44 horas após preparo da amostra, realizar o bloqueio da Citocinese adicionando 0,2 mL citocalasina B;

5. Recolocar, novamente, o frasco na estufa a 37°C;

6. 72 horas após preparo da amostra, proceder da seguinte forma:

- Transferir cada cultura para um tubo Falcon de vidro, previamente identificado;
- Centrifugar a 1.500 rpm por 7 minutos, cuidando o balanceamento;
- Ao término da centrifugação, desprezar o sobrenadante com a Pasteur;
- Adicionar 4 gotas de formalina em cada amostra;
- Agitar cada amostra com o vortex;
- Colocar as amostras em banho Maria a 37°C por 5 min;
- Adicionar 4 mL de citrato de sódio;
- Logo em seguida, ressuspender com a pipeta pauster especifica da amostra;
- Colocar as amostras em banho Maria a 37°C por 7 min;
- Adicionar 0,5mL de fixador Carnoy;
- Logo em seguida, ressuspender com a pipeta pauster especifica da amostra;
- Centrifugar a 1.500 rpm por 7 minutos;
- Desprezar o sobrenadante com a pipeta Pasteur;
- Adicionar 5 mL de fixador e ressuspender;
- Centrifugar a 1.500 rpm por 7 minutos;
- Desprezar o sobrenadante com a pipeta Pasteur;
- Estocar em congelador ou geladeira por, no mínimo, 15 minutos;
- Durante este tempo, realizar a preparação das lâminas:
 - Retirar as lâminas do álcool 70% e colocá-las dispostas em cubetas, sob água corrente da torneira, para remover o álcool;
 - Remover toda a água e preencher a cubeta com água destilada;
 - Retirar as amostras da geladeira, centrifugar a 1.500 rpm por 7 minutos e desprezar o sobrenadante;
 - Adicionar 5 mL de fixador e ressuspender;
 - Centrifugar a 1.500 rpm por 7 minutos e desprezar o sobrenadante;
 - Se necessário, realizar essas lavagens até a amostra obter aparência límpida, clara, translúcida;
 - Na última lavagem, ao desprezar o sobrenadante cuidar para manter aproximadamente 1 mL (aproximadamente na medida de 2 dedos)
 - Ressuspender a amostra, contendo agora, apenas 1 mL.

7. Após este procedimento, deve-se realizar a coloração da seguinte forma:

- Pingar na lâmina 3 a 4 gotas do material;
- Deixar secar em temperatura ambiente;
- Preparar a solução de Giemsa;
- Preencher toda a lâmina com a solução de Giemsa 20%;
- Deixar agir por 5 min (máximo 7min);
- Desprezar o corante em água corrente abundante;
- Desprezar o excesso de água batendo a lâmina lateralmente em papel absorvente;
- Deixar secar em temperatura ambiente.

8. Proceder a análise em microscópio óptico, analisando de 1000 a 2000 células binucleadas.

9. Fazer um escaneamento em zigue-zague por toda a lâmina em aumento de 400x;

10. Verificar com o aumento de 1000x em imersão a presença de alteração nuclear.

Referências

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Quim. Nova*, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research*. v. 531, p. 5-23, 2003.

COSTA, R. M. A.; CHIGANÇAS, V.; GALHARDO, R. S.; CARVALHO, H.; MENCK, C. F. M. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*. V. 85, p. 1083-1089, 2003.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; BIRINCI OGLU, M.; RODRIGUEZ, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med*, v. 32, n. 11, p. 1102-1115. 2002.

MALUF, S.W. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel eletrophoresis. *Clinica Chimica Acta*, Elsevier Science Publishers, v. 347, p. 15-24, 2004.

MALUF SW, MERGENER M, DALCANALE L, COSTA CC, POLLO T, KAYSER M, DA SILVA LB, PRA D, TEIXEIRA PJZ. DNA damage in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Mutat. Res*. v. 626, p. 180-184, 2007.

MARTINEZ, G. R., LOUREIRO, A. P. M., MARQUES, S. A., MIYAMOTO, S., YAMAGUCHI, L. F., ONUKI, J., ALMEIDA, E. A., GARCIA, C. C. M., BARBOSA, L. F., MEDEIROS, M. H. G., MASCIO, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutation Research*, v. 544, p. 115-127, 2003

MERGENER M, MARTINS MR, ANTUNES MV, DA SILVA LB, LAZARETTI C, FONTANIVE TO, SUYENAGA ES, ARDENGHI PG, MALUF SW, GAMARO GD. Oxidative stress and DNA damage in older adults that do exercises regularly. *Clin. Biochem*. v. 42, p. 1648-1653, 2009.

NORPPA, H; FALCK, G.C-M. What do micronuclei contain? *Mutagenesis*, v. 18, n. 3, p. 221-233, 2003.

ROSSNER, P., BOFFETTA, P., CEPPI, M., BONASSI, S., SMERHOVSKY, Z., LANDA, K., JUZOVA, D., SRÁM, R.J. Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environmental Health Perspectives*, v. 113, n. 5, 2005.

CAPÍTULO III

BIOLOGIA MOLECULAR

Adriane Pozzobon

O DNA é o material genético que contém a informação crucial para a hereditariedade, determinando as características da população. A descoberta da sua estrutura indica um marco no desenvolvimento da biologia dos últimos dois séculos, que começou com a descoberta das leis da herança por Mendel contribuindo para avanços significativos no melhoramento de organismos vivos e no entendimento de processos biológicos. O ácido desoxirribonucleico (DNA) é um polímero de nucleotídeos constituído de uma dupla fita contendo uma pentose (desoxirribose), um fosfato e uma base nitrogenada. É atribuído a James Watson e Francis Crick, por sua publicação na Revista Nature, de 25 de abril de 1953, a descrição da estrutura de DNA, atualmente aceito como modelo de dupla hélice. Diversas técnicas moleculares empregam o DNA para detectar mutações, diagnosticar doenças hereditárias ou doenças infectocontagiosas, além de testes de paternidade e demais aplicações na medicina forense. Desta forma, a primeira etapa para se estudar/analisar o DNA ou genoma de um organismo é o isolamento deste ácido nucleico a partir de diferentes amostras biológicas.

1. PRÁTICA: Extração de DNA de sangue periférico

Materiais:

- Pipetadores automáticos:
 - P1000- para volumes de 200 a 1000 μ L
 - P200- para volumes de 30 a 200 μ L
 - P100- para volumes de 20 a 100 μ L
 - P20- para volumes de 3 a 20 μ L
 - P2- para volumes de 0,2 a 2 μ L
- Caixas de ponteiras:
 - Azuis: 100-1000 μ L (P1000)
 - Amarelas: 2-20 μ L, 10-100 μ L, 20 a 200 μ L (P200, P100, P20)
 - Cristal: 0,2-2 μ L (P2)
- Sangue periférico humano com anticoagulante (EDTA);
- Microtubos eppendorf 1,5 mL;
- Estante para microtubos;
- Descarte para o sangue e para os plásticos;
- Papel absorvente;
- NONIDET p-40;
- Alíquotas de TKM1, TKM2, SDS 10%, NaCl 6M, etanol absoluto e TE;
- Microcentrífuga;

- Banho-maria;
- Agitador de tubos do tipo vórtex;
- Luvas de látex.

PREPARO DAS SOLUÇÕES:

Solução TKM1:

- 10mM Tris/HCl pH 7,6
- 10mM KCl
- 10mM MgCl₂
- 2mM EDTA

Solução TKM2:

- 10mM Tris/HCl pH 7,6
- 10mM KCl
- 10mM MgCl₂
- 2mM EDTA
- 0,4mM NaCl

SDS (Sulfato de Dodecil Sódio) 10%

NaCl 6 Molar

Solução TE (Tris/EDTA):10mM de Tris pH 8,0 e 1mM de EDTA

Todos os tampões devem ser estocados na geladeira.

Procedimentos:

1. Em um microtubo (eppendorf) de 1,5 ml adicionar a amostra de sangue ($\pm 450 \mu\text{L}$) e em seguida adicionar 20 μL de NONIDET p-40.
2. Adicionar 500 μL de TKM1;
3. Misturar bem, centrifugar a 4000 rpm por 10 min;
4. Após centrifugar, jogar fora o sobrenadante e cuidar para não perder o pellet que fica no fundo do tubo;
5. Adicionar mais 400 μL de TKM1 ao tubo com o pellet, agitar bem até o pellet se dissolva, colocar novamente na centrifuga por 10 minutos; desprezar o sobrenadante (por inversão). Repetir este passo mais 2 vezes. E, se necessário, 3 vezes, até que o pellet fique claro;
6. Adicionar 64 μL de TKM2 em cada tubo e ressuspender o pellet agitando vigorosamente no vórtex;
7. Adicionar 4 μL de SDS 10%, agitar (cuidando para não formar muita espuma). Após isto colocar em banho-maria por 10 minutos a 55°C, previamente aquecido;
8. Adicionar 24 μL de cloreto de sódio 6M agitar;
9. Centrifugar a 4500 rpm por 10 minutos;

10. Retirar o sobrenadante (que contém o DNA) com uma pipeta e colocá-lo em um novo microtubo. Desprezar o pellet de proteínas que está no fundo do tubo.
11. Adicionar ao sobrenadante 2 volumes de etanol absoluto (aproximadamente 220 μ L) e inverter o tubo várias vezes até o DNA precipitar;
12. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 min. Desprezar o sobrenadante (por inversão) e deixar escorrer o líquido restante por alguns segundos sobre papel absorvente (o DNA ficará aderido à parede no fundo do tubo);
13. Ressuspende o DNA em 100 μ L de TE. Deixar a 37°C por 2-4 horas ou 24 horas em geladeira e depois quantificar ou congelar a -20°C.

2. PRÁTICA: Extração de RNA de tecido animal usando o reagente Trizol® (Invitrogen, USA)

Materiais:

- Pipetadores de todos os volumes;
- Caixas de ponteiros azuis, amarelas e cristal;
- Microtubos eppendorf de 2,0 mL;
- Estante para microtubos;
- Alíquotas de clorofórmio PA, etanol 75% e álcool isopropílico;
- Reagente Trizol®;
- Água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato);
- Cotonete;
- Frasco para descarte;
- Isopor com gelo;
- Ultracentrífuga refrigerada a 4°C;
- Homogenizador de tecidos;
- Amostra de tecido (animal);
- Banho-maria a 65°C;
- Agitador de tubos do tipo vórtex;
- EPIs (Luvas de látex, máscara, avental).

Procedimentos:

Dica: Antes de iniciar verifique se a centrífuga está ligada e refrigerada a 4°C, pois ela demora para atingir a temperatura.

1. Adicionar 1 mL de Trizol em cada tubo eppendorf para fragmentos de tecido de 1 cm²;
2. Fragmentar o tecido usando o Homogeneizador. Pode realizar a homogeneização no próprio tubo de 2,0 mL, previamente identificado;

Cuidado! Evite inalar o trizol, uso de luvas e máscaras é obrigatório, pois o trizol é irritante de mucosas.

3. Deixar 5 minutos em temperatura ambiente (cerca de 30°C);

4. Adicional 0,2 mL de Clorofórmio PA;
5. Agitar por 15 segundos no vórtex;
6. Deixar 3 minutos em temperatura ambiente;
7. Centrifugar 12.000xg por 15 min – 4°C;
8. Pipetar a fase aquosa para um tubo limpo e identificado;
9. Adicionar 0,5 mL de Propanol (álcool isopropílico);

Dica: para um melhor rendimento do RNA isolado, sugere-se interromper o procedimento, deixando a amostra a -20°C overnight (12 a 24h). Caso não seja necessário, pode-se proceder para a etapa 10.

10. Centrifugar 12.000 g por 15 min – 4°C;
11. Desprezar sobrenadante (o RNA precipita formando um *pellet* como um gel);
12. Adicionar 1 mL de etanol 75% gelado;
13. Centrifugar 8.000 xg por 10 min – 4°C;
14. Desprezar sobrenadante;
15. Secar o tubo e o *pellet* . Deixar o tubo escorrendo e após usar o cotonete para secar o tubo, sem tocar no *pellet*;
16. Adicionar H₂O DEPC (~ 20- 40 µL depende do tamanho do *pellet*);
17. Deixar em banho-maria por 10 min – 60°C;
18. Deixar 1 minuto no gelo;
19. Fazer spin 4.000 rpm (deixar sempre no gelo a partir de agora);
20. Estocar a -80°C ou realizar a quantificação antes de estocar.

Responda as perguntas a seguir:

- a) Pra que extrair RNA de uma célula?
- b) Quais as vantagens/desvantagens de trabalhar com RNA, se comparado ao DNA?
- c) Quais as principais diferenças entre os princípios da técnica de extração de DNA e a do RNA?
- d) Qual a função do reagente fenol? Em qual fase durante o processo de extração fica o RNA e em qual se encontra o DNA e proteínas?
- e) O RNA depois de isolado deve ser acondicionado no freezer a -70 graus Celsius. Por quê?

3. PRÁTICA: Quantificação de ácidos nucleicos

Antes de utilizar o ácido nucleico recomenda-se quantificar para verificação de Pureza e Quantidade. O Protocolo de quantificação: depende do aparelho utilizado, pode ser feito por análise do comprimento de onda ou detecção de fluorescência.

Quantificação por comprimento de onda

As amostras de DNA ou RNA obtidas no laboratório devem ser avaliadas quanto à sua concentração e à sua pureza por meio da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. O DNA e o RNA absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm e as proteínas, de 280 nm.

Materiais:

- Pipetadores de todos os volumes;
- Caixas de ponteiras azuis, amarelas e cristal;
- Microtubos eppendorf de 2,0 mL;
- Estante para microtubos;
- Água ultrapura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato);
- Frasco para descarte;
- Isopor com gelo;
- Agitador de tubos do tipo vórtex
- EPIs (Luvas de látex, máscara, avental)
- Cubeta de quartzo

Procedimentos:

1. As amostras de DNA ou RNA devem ser preparadas (diluídas) com água ultrapura, onde, por exemplo: 10 µL de DNA em 490 µL de água (diluição 1:50) ou 5 µL de DNA em 495 µL de água (diluição 1:100) ou de acordo com o volume necessário para leitura no equipamento.
2. Neste caso, utilizando como exemplo a diluição 1: 500, deve-se pipetar em um tubo eppendorf 499 µL de água e, posteriormente, 1 µL de DNA ou RNA.
3. Agitar no vórtex por 15 segundos e proceder a quantificação. Recomenda-se fazer sempre em duplicata ou triplicata.
4. Zerar o aparelho com o branco (somente água ultrapura tratada com DEPC).
5. Quantificar as amostras no comprimento de onda de 260 nm e fazer o cálculo da concentração, conforme a fórmula abaixo:

$$[] \text{ RNA em } \mu\text{g}/\mu\text{L} = \frac{\text{média } 260 \times 40 \times 500}{1000} = \text{média } 260 \times 20$$

Onde:

260= Absorbância

40= Densidade óptica do RNA, se for DNA usar 50

500= fator da diluição (neste caso 1: 500)

1000= conversão de mg para µg

Dica: Para a concentração de DNA, basta multiplicar o valor da absorbância por 25 (se for a diluição 1:500). Para a concentração de RNA basta multiplicar o valor da absorbância por 20 (se for diluição 1:500).

Analizando o resultado:

A relação entre a quantidade de DNA e de proteína é usada como parâmetro para avaliação da qualidade do DNA/RNA extraído → grau de pureza = OD 260nm / OD280nm Razão = 1,7 – 2,0 (ideal).

4. PRÁTICA: Duplicação de DNA *in vitro*: reação de polimerização em cadeia (PCR)

A técnica de PCR foi descoberta por Kary Mullis na década de 80, servindo para amplificar exponencialmente o número de cópias de fragmentos de DNA. A PCR tornou-se um divisor de águas nas análises moleculares, pois devido à sua descoberta é possível a análise de mutações, produção de bibliotecas de DNA, análise de expressão gênica, detecção de doenças infectocontagiosas etc. Durante a PCR, alta temperatura é usada para separar as moléculas de DNA em fitas simples e sequências sintéticas de DNA fita simples (20-30 nucleotídeos) servem como primers. Duas sequências diferentes de primers são usadas e delimitam a região-alvo. Para realizar uma reação de PCR, uma pequena quantidade do DNA alvo é adicionada em um tubo teste com um tampão contendo a DNA polimerase termoestável, sequencias de oligonucleotídeos como primers, os 4 desoxirribonucleotídeos trifosfatados (unidades do DNA) e o cofator MgCl₂. A mistura de reagentes da PCR é colocada em ciclos de replicação que consistem de:

- *desnaturação*: um a muitos minutos em 94 a 96°C, durante o qual o DNA é desnaturado em fitas simples;
- *pareamento ou hibridização, chamado de anelamento*: um a muitos minutos, a temperatura deverá ser calculada baseada na sequência de nucleotídeos dos primers (em geral é entre 50 a 65°C). Nesta etapa os primers pareiam com a sequência complementar em ambos lados das sequências do DNA alvo;
- *extensão, polimerização*: um a muitos minutos a 72°C durante o qual a DNA polimerase se liga e inicia a extensão (polimerização) da fita complementar a partir da hidroxila (OH⁻) na extremidade 3' de cada primer.

PCR para amplificação do gene VEGF (fator de crescimento vasoendotelial):

VEGF	Sequência	Tamanho do produto	Referência
Sense	5' AAGGAAGAGGAGACTCTGCGCAGAGC 3'	208 pb	Barreiro, 2009
Antisense	5' TAAATGTATGTATGTGGGTGGGTGTGTCTAGAG 3'		

Materiais:

- Pipetadores de todos os volumes;
- Caixas de ponteiras azuis, amarelas e cristal;
- Microtubos eppendorf de 2,0 mL e de 0,2 mL;
- Estante para microtubos;
- Água ultrapura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato);
- Frasco para descarte;
- Isopor com gelo;

- Agitador de tubos do tipo vórtex;
- EPIs (Luvas de látex, máscara, avental);
- Termociclador;
- Enzima taq DNA polimerase;
- Primers para o gene VEGF na concentração de 1 nmol;
- Desoxirribonucleotídeos trifosfatados na concentração de 10 mM;
- Cloreto de magnésio na concentração de 50 mM;
- PCR buffer 10X (acompanha a enzima);
- DNA;
- Microcentrífuga de bancada

Procedimentos:

1. Preparar tubos eppendorfs (0,2 ml) numerados ou identificados segundo as amostras;
2. Colocar as amostras de DNA no gelo e os componentes da Mix;
3. Calcular os volumes dos reagentes conforme tabela abaixo:

Observação: Preparar a Mix sempre para tubos a mais, por exemplo, para 8 tubos, calcular os reagentes para 10 tubos.

	Mix inicial (µL)	Pós Hot- Start (µL)
Água DEPC	32,8	5,3
PCR Buffer 10X	4	1
MgCl ₂ 50 mM	1,2	0,3
DNTP Mix 10 mM	--	1
Primer Sense	--	1
Primer Antisense	--	1
DNA	- pipetar em cada tubo 2 µL	--
Taq DNA polim		0,4
VOLUME TOTAL	50 µl	10 µl

Dica: Os valores dos volumes acima são para um tubo, lembrar de multiplicar os valores pelo número de tubos para preparar a mix e a pós.

4. Dar um spin em todos os reagentes e no DNA;
5. Preparar a Mix Inicial no tubo de 2,0 mL
6. Adicionar a cada tubo 38 µl da Mix Inicial em cada tubo de 0,2 mL;
7. Preparar a Pós, sem adicionar a enzima Taq Polimerase;
8. Adicionar a cada tubo 2 µl do DNA de cada amostra;

Dica: Se pipetar várias amostras, sempre trocar a ponteira.

Observe: Cuidado com a contaminação, caso a ponteira encoste fora do tubo troque!

9. Colocar na máquina de PCR localizando o Programa VEGF e pressione: RUN;

10. Enquanto a máquina aquece, terminar de preparar a pós adicionando a enzima na pós. Manter o tubo no gelo até a hora de pipetar, pois pode ocorrer a formação de dímeros de primers;
11. Após a desnaturação inicial dar *PAUSE* no programa, abrir a máquina retirar os tubos colocando-os no gelo por 1 minuto;
12. Adicionar 10 µL da pós em cada tubo (*sempre trocar de ponteira*);
13. Fechar os tubos e colocar novamente na máquina;
14. Apertar *UNPAUSE*;
15. O programa pode ficar de um dia para outro na máquina.

Observe: Cuidar para os tubos estarem bem fechados e sem bolhas, pois isso pode prejudicar a reação de PCR.

Programa para amplificação do gene VEGF

1- Desnaturação inicial: 94°C 5min

35 ciclos de:

2- Desnaturação: 94°C 1min

3- Anelamento: 60°C 1min

4- Extensão: 72°C 2min

5- Extensão final: 72°C 5min

6- END ou manter na máquina 10° por 24h.

Analisar a amplificação através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo.

Responda as seguintes perguntas:

- 1) Quais as aplicações da técnica de PCR para a área da saúde?
- 2) O que são primers? Como se obtém?
- 3) Por que a enzima Taq DNA polimerase é adicionada sempre por último?
- 4) Como se garante a especificidade da reação de PCR evitando a contaminação e resultados falsos positivos ou falsos negativos?

5. PRÁTICA: Eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose

Uma propriedade das cargas elétricas em solução é que quando uma diferença de potencial é aplicada à solução - ou seja, quando os polos de uma bateria são conectados à solução as cargas positivas são atraídas pelo polo negativo e as cargas negativas, pelo polo positivo, deslocando-se em direção a eles. Os ácidos nucleicos, como são carregados negativamente, propriedade conferida pelo grupamento fosfato, e desta forma migram em direção ao polo positivo. Essa migração das cargas quando são submetidas a uma diferença de potencial é chamada de eletroforese. A eletroforese deve ser realizada em matrizes rígidas, como os géis de agarose e poliacrilamida para minimizar alterações que a solução na qual a corrente elétrica será aplicada poderia sofrer. O principal fator que deve ser observado na técnica é o tamanho do fragmento a ser analisado, pois isso interfere em sua velocidade de migração. Em geral, quanto maior a macromolécula, menor a sua velocidade de migração

em direção ao polo de sinal oposto e vice-versa. Desta forma quanto maior o fragmento a ser analisado, menos concentrado deve ser o gel, pois isso limitaria sua migração. Se o fragmento for menor, o gel deve ser mais concentrado, pois sua velocidade de migração será maior.

Materiais:

- Cuba de eletroforese;
- Fonte de energia;
- Suporte para gel com pente;
- Erlenmeyer ou Becker;
- Proveta;
- Pipetador automático P20;
- Ponteiras amarelas;
- Plástico-filme;
- Forno micro-ondas;
- Balança de pesagem;
- Papel alumínio;
- Tampão TBE1x;
- Brometo de etídio em solução de 2mg/mL;
- Amostra de PCR;
- Tampão de carregamento (ou de corrida);
- Marcador de peso molecular (em geral se usa de 100 pares de bases);

Preparo de TBE 10X Para 1 litro:

- 1 litro de água destilada (Mili-Q)

- 55 g de ácido bórico; 108 g de trisbase; 9,25 g de EDTA

Pesar os sais e dissolvê-los em parte da água (em um becker, com barrinha magnética)

O pH deve ser 8,6. Verificar com a fita de pH, que deve estar entre 8 e 9

Distribuir em duas garrafas de meio litro e autoclavar. Deixar esfriar e estocar em temperatura ambiente.

Obs.: se o pH não estiver entre 8 e 9, desprezar o tampão e fazê-lo novamente.

Preparo de brometo de etídio 2 mg/mL

- 70 mg de brometo de etídio

- 35 mL de água sem DEPC

Colocar o brometo e a água em um tubo falcon de 50 mL e fechar bem. Agitar no vórtex. Embalar o tubo com papel alumínio e estocar em temperatura ambiente.

Tampão de carregamento:

Para 5 mL de type III (usado para fragmentos maiores, acima de 300 pb)

0,0125 g de xylene cyanol, 0,0125 g de azul de bromofenol, 1,5 mL de glicerol, 3,5 mL de água Mili-Q.

Pesar os corantes e colocá-los em um Becker com uma barrinha magnética. Adicionar a água. Adicionar o glicerol (cuidado ao pipetar, líquido bastante viscoso);

Agitar até dissolver

Distribuir em 5 eppendorfs e armazenar na geladeira

Para 5 mL de Tampão Xylene (usado para fragmentos pequenos, menores que 300 pb)

Usa-se os mesmos componentes que para o Type III, exceto o azul de bromofenol.

Procedimentos:

Preparo do Gel de Agarose

1. Diluir o tampão TBE 10 x para obter TBE 1x
 - 100 mL de TBE 10x
 - 900 mL de água autoclavada sem DEPC
2. Para preparo de um Gel Médio (1%), usar uma cuba de 100 mL, montando a cuba com o pente;
3. Pesar 1g de agarose na balança utilizando um papel alumínio;
4. Medir com a proveta 100 mL de TBE 1x;
5. Adicionar ao erlenmeyer a agarose e o TBE 1X e agitar levemente.
6. Fazer uma marca no menisco da solução para completar o volume após a fervura;
7. Tapar o recipiente com plástico-filme de polietileno (*fazer uns furinhos com a tesoura*);
8. Ferver em micro-ondas até dissolver a agarose (*cuidando para não derramar*) na potência alta;
9. Ferver até agarose dissolver completamente;
10. Retirar o plástico, *cuidado com queimaduras*;
11. Completar o volume evaporado;
12. Aguardar o resfriamento parcial (cerca de 40°C) e acrescentar 7 µL de Brometo de Etídio;

Cuidado! O brometo de etídio é potencialmente carcinogênico. Cuidado ao manusear e evite inalação.

13. Homogeneizar e verter na forma com o cuidado de não formar bolhas

Dica: Caso forme bolhas, estoure com uma ponteira ou arraste para a lateral da cuba.

14. Aguardar a polimerização para desenformar o gel.
15. Colocar o gel na cuba que deve estar completa de tampão TBE 1X;

16. Usar um pedaço de parafilm ou microtubos e pipetar 5 μL de tampão de corrida (Type III ou Xylene) conforme o número de amostras e depois 7 μL de amostra de PCR. Não precisa misturar.
17. Pipetar o volume final (12 μL) de cada amostra em cada poço do gel;
18. Sempre o primeiro poço deve ser reservado para o marcador de peso molecular. Pipetar no final 2 μL .
19. Fechar a cuba, conectar os eletrodos e ligar a fonte 100mV, 300mA por aproximadamente 1 hora (o tempo depende o fragmento a ser analisado e da concentração do Gel).

Cuidados: Não pipetar rápido, pois pode aspirar o volume errado e formar bolhas. Não furar o gel: entrar lentamente no poço na posição vertical e sentir a tensão do gel. Verificar se o tampão da cuba cobre todo o gel principalmente os poços.

20. Tirar o gel da cuba e analisar no transluminador UV.

Cuidado: Utilizar óculos de proteção, pois pode haver risco de queimaduras.

Referências

ALBERTS, Bruce. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

BARREIRO, Erica G. *Polimorfismos gênicos do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em gestantes com distúrbios hiperglicêmicos*. 2009. 66f. Dissertação - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/.../42/.../EricaGiovanaBarreiro_Mestrado.pdf>. Acesso em: 17 set. 2012.

CHOMCZYNSKI, P. AND N. SACCHI. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1): 156-9, 1987.

GHISLENI, MM; BIOLCHI, B; JORDON BC; REMPEL C, GENRO JP and POZZOBON, A. Association study of C936T polymorphism of the VEGF gene and the C242T polymorphism of the p22phox gene with diabetes mellitus type 2 and distal diabetic polyneuropathy. *Molecular Medicine Reports* 12: 4626-4633, 2015

LAHIRI DK, NURNBERGER JIJR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, 19: 5444. 1991.

MULLIS, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin* 48 (8): 579-82, 1990.

POZZOBON, A; SCHNEIDER, L; BRUN, IS. Androgen-modulated p21 and p53 gene expression in human non-transformed epithelial prostatic cells in primary cultures. *international journal of molecular medicine*. 30: 967-973, 2012.

ROBERTIS, Eduardo M. F. De; HIB, José. **Bases da Biologia Celular e Molecular**. 4. ed. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, **Biologia Molecular Básica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

CAPITULO IV

BIOQUÍMICA

Geórgia Muccillo Dexheimer

Jairo Luís Hoerlle

Vanderlei Biolchi

A bioquímica é uma ciência que visa ao estudo de biomoléculas, ou seja, moléculas envolvidas com a formação e a viabilidade da célula e estuda processos químicos relacionados aos organismos vivos.

Esta área de estudo está envolvida significativamente com a estrutura, função e interação de macromoléculas biológicas, como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios, os quais fornecem às células sua estrutura e executam funções para a sua sobrevivência.

ENZIMAS

1. PRÁTICA: Efeito da variação de temperatura na velocidade da reação enzimática

Esta prática tem por objetivo identificar a temperatura ideal da enzima e reconhecer temperaturas de desnaturação enzimática.

A velocidade de qualquer reação química aumenta, mesmo mantendo fixa a concentração dos reagentes, com o aumento da temperatura, por dois motivos, basicamente:

- Aumento dos choques entre as moléculas dos reagentes;
- Aumento do número de ligações intramoleculares que se tornam suscetíveis de transformação.

A energia necessária para que os reagentes ultrapassem o “estado de transição” é a energia de ativação da reação. A presença de um catalisador diminui a energia livre de ativação. Em uma faixa que varia de zero a 50°C, a velocidade da reação vai aumentando até atingir um máximo em torno dos 50°C (ativação térmica). Após este valor a atividade cai bruscamente, ocorrendo a inativação progressiva da enzima, por desnaturação.

A maioria das proteínas, incluindo as enzimas, é sensível à desnaturação quando submetidas a temperaturas de 40° a 50°C por possuírem um alto coeficiente de desnaturação térmica.

Procedimento:

1. Pipetar os tubos conforme esquema a seguir:

	Branco	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Temperatura	37 °C	Gelo	Ambiente	37°C	80°C
Solução padrão de glicose	-	0,01 mL	0,01 mL	0,01 mL	0,01 mL
Reagente	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

- Misturar e incubar os tubos de acordo com suas respectivas temperaturas durante 10 minutos;
- Determinar as absorbâncias em 505 nm, ajustando o zero com o branco.
- Construir gráfico da temperatura (eixo x) X absorbância (eixo y).
- Identificar a temperatura ideal da enzima. Discutir a diferença encontrada nos valores da absorbância da glicose em cada uma das temperaturas de incubação.

2. PRÁTICA: Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação enzimática

Esta prática tem como objetivo reconhecer a importância da concentração de substrato na atividade enzimática.

Em condições de excesso de cofatores e de enzima, a velocidade da reação enzimática é determinada pela concentração do substrato [S]. O aumento da velocidade é diretamente proporcional ao [S] para concentrações baixas de substrato. Em altas concentrações de substrato, a enzima está saturada e a atividade não depende do [S]. Essa relação se expressa por um gráfico hiperbólico quando se mede a variação da velocidade em função do [S]. As duas constantes V_{max} (velocidade máxima) e K_m (Constante de Michaelis-Menten) podem ser determinadas experimentalmente. V_{max} corresponde à velocidade atingida na saturação da enzima pelo substrato. Pode ser expressa como a quantidade de produto formado ou substrato consumido na unidade de tempo. K_m corresponde à concentração de substrato na qual a reação enzimática atinge a metade da velocidade máxima.

Procedimento:

1. Sistema de incubação

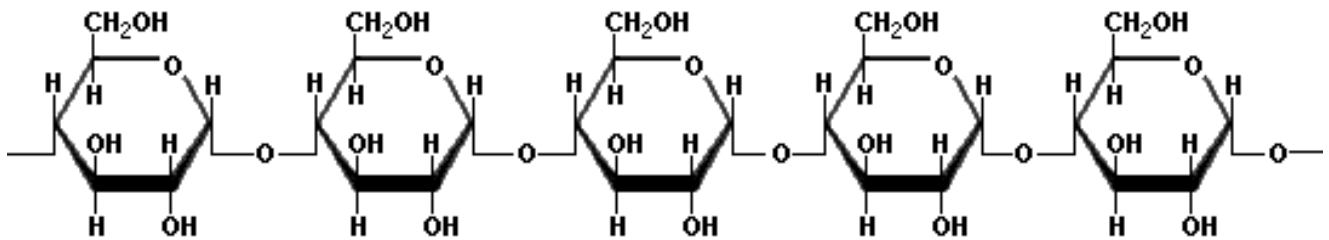
Reagentes	Branco	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
Sol.glicose 5mg/dL	-	0,02 mL	-	-	-	-	-	-
Sol.glicose 10mg/dL	-	-	0,02 mL	-	-	-	-	-
Sol.glicose 25mg/dL	-	-	-	0,02 mL	-	-	-	-
Sol.glicose 50mg/dL	-	-	-	-	0,02 mL	-	-	-
Sol.glicose 100mg/dL	-	-	-	-	-	0,02 mL	-	-
Sol.glicose 200mg/dL	-	-	-	-	-	-	0,02 mL	-
Sol.glicose 400mg/dL	-	-	-	-	-	-	-	0,02 mL
Reagente colorimétrico	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Absorbância								

2. Misturar e incubar os tubos a 37°C por 10 minutos;

3. Determinar a absorvância no espectrofotômetro em 505 nm, ajustando o zero com o branco.
4. Traçar um gráfico com as absorvâncias (eixo y) X concentração de glicose em mg/dL (eixo x).
5. Discutir os resultados obtidos no experimento.

3. PRÁTICA: Atividade catalítica da amilase salivar

O amido é um polissacarídeo formado pela junção de várias moléculas de glicose através de ligações glicosídicas.



Fonte: www.scientificpsychic.com

Formado por cadeias de alfa-D-glicose, estas costumam se enrolar formando um espiral onde as hidroxilas estão voltadas para o exterior. Por isto, o lugol cora o amido, pois o iodo fica “preso” no interior do espiral.

Nos carboidratos complexos ramificados (amilopectina), os pontos de ramificação (pontes 1:6) dão origem a cadeias laterais cujas extremidades são não redutoras. Durante o processo de digestão, a alfa-amilase quebra as pontes osídicas 1:4, mas não as 1:6, resultando numa estrutura bastante ramificada chamada dextrina-limite. Somente a amilo-1:6 glicosidase (enzima desramificadora) é capaz de hidrolisar essas pontes 1:6, permitindo a completa digestão da amilopectina. A hidrólise também pode ocorrer pela ação de ácidos fortes. O objetivo desta prática é realizar a hidrólise química e enzimática do amido.

Procedimento:

Hidrólise Química:

1. Identificar um erlenmeyer para a análise ácida (amido+HCl)
2. Com o auxílio de uma proveta, adicionar 30 mL da solução de amido a 1%
3. Acrescentar 3 mL de HCl 1:2
4. Identificar três tubos de ensaio com AA1, AA2 e AA3, cada um deles contendo 5 mL de água destilada;
5. No tubo de ensaio AA1 pipetar no tempo 0' uma alíquota de 5 mL do erlenmeyer e deixar em banho de gelo;
6. No tubo de ensaio AA2 pipetar uma alíquota de 5 mL do erlenmeyer, levar para o banho de água fervente em tempo 10' e depois levar para o banho de gelo;
7. No tubo AA3 pipetar uma alíquota de 5mL do erlenmeyer, levar para o banho de água fervente em tempo 20' e depois levar para o banho de gelo.
8. Retirar os tubos do gelo;

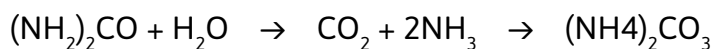
9. Quando todos os tubos estiverem em temperatura ambiente, adicionar 10 gotas de solução de lugol em cada tubo.

Hidrolise enzimática

1. Identificar um erlenmeyer para a análise enzimática (amido+sol. saliva)
2. Adicionar com auxílio de uma proveta 30 mL da solução de amido a 1%
3. Acrescentar 1 mL de sol. de saliva a 1%
4. Identificar três tubos de ensaio em AE1, AE2 e AE3, cada um deles contendo 5 mL de água destilada.
5. No tubo de ensaio rotulado em AE1, em tempo 0' pipetar uma alíquota de 5 mL do erlenmeyer e deixar em banho de gelo.
6. No tubo de ensaio rotulado em AE2 pipetar uma alíquota de 5 mL do erlenmeyer, deixar em temperatura ambiente pelo tempo 10' e depois levar para o banho de gelo.
7. No tubo de ensaio rotulado em AE3 pipetar uma alíquota de 5 mL do erlenmeyer, deixar em temperatura ambiente pelo tempo 20' e depois levar para o banho de gelo.
8. Retirar os tubos de banho de gelo
9. Quando todos os tubos estiverem em temperatura ambiente adicionar 10 gotas de solução de lugol em cada tubo.

4. PRÁTICA: Caracterização da urease

A urease é a enzima responsável pela catálise da ureia em amônia e dióxido de carbono:



Sua caracterização pode ser realizada a partir da reação de Biureto ou também pela reação de Heller. Esta prática tem como objetivo demonstrar a natureza proteica desta enzima.

Reação de Heller

Procedimento:

1. Em um tubo de ensaio, colocar 4 gotas de solução de urease e 2 mL de água destilada.
2. Agitar;
3. Manter o tubo inclinado e adicionar escorrendo pela parede 1 mL de ácido nítrico concentrado, sem agitar.
4. O surgimento de um anel branco na interface de reação dos líquidos confere o resultado positivo da reação;

5. PRÁTICA: Oxiredutases - Polifenol Oxidase

Estas enzimas são relacionadas às reações de óxido-redução em sistemas biológicos. A polifenol oxidase é responsável pela oxidação de compostos fenólicos. Frutas e vegetais que contêm compostos polifenólicos, quando cortados e expostos ao ar sofrem escurecimento, causando pela ação da polifenol oxidase sobre os compostos fenólicos que são oxidados a ortoquinonas. Essas, por sua vez, polimerizam com facilidade formando compostos escuros, as

melaninas. Essas reações de escurecimento enzimático podem ser mais facilmente observadas em vegetais de cores claras como batatas, bananas e maçãs.

Os compostos produzidos na reação absorvem luz na região do espectro entre 320 a 450 nm e, portanto, pode-se avaliar espectrofotometricamente a atividade da polifenol oxidase.

Esta prática tem por objetivo extrair e avaliar a atividade da polifenol oxidase na banana.

Procedimento

1. Extração da polifenol oxidase da banana

Pesar 23 g de banana e homogeneizar em um liquidificador juntamente com 100 mL de tampão citrato-fostato (ácido cítrico 0,1M + K_2HPO_4 0,1M, pH 6,0). Centrifugar a 3000 rpm por 20 min. O sobrenadante é um substrato aquoso que contém a polifenol oxidase.

2. Determinação da atividade da polifenol oxidase

Preparar 2 tubos de ensaio contendo em cada um deles 2,0 mL de pirogalol 0,1M e 3 mL do tampão citrato-fosfato, pH 6,0. Um tubo será o branco (B) e o outro tubo teste (T).

Tubos	Substrato - pirogalol (mL)	Tampão Cítrico-Fosfato pH 6,0 (mL)	H ₂ O (mL)
B	2,0	3,0	-
T	2,0	3,0	-
C	-	3,0	2,0

Observação: Zerar o espectrofotômetro com água em 390 nm.

Fazer as seguintes adições, na ordem:

Tubo B (branco) – 0,1 mL de água

Tubo C (controle) – 0,1 mL do extrato (não contém o substrato)

Tubo T (teste) – 0,1 mL do extrato. Disparar imediatamente o cronômetro e proceder à leitura das absorvâncias nos tempos indicados na tabela:

Tempo (min.)	Teste - Absorbâncias (390nm)
0,5 (30seg)	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Terminada a leitura de todos os tempos indicados proceder a leitura dos tubos branco (B) e controle (C).

Para cada um dos tempos fazer a seguinte subtração:

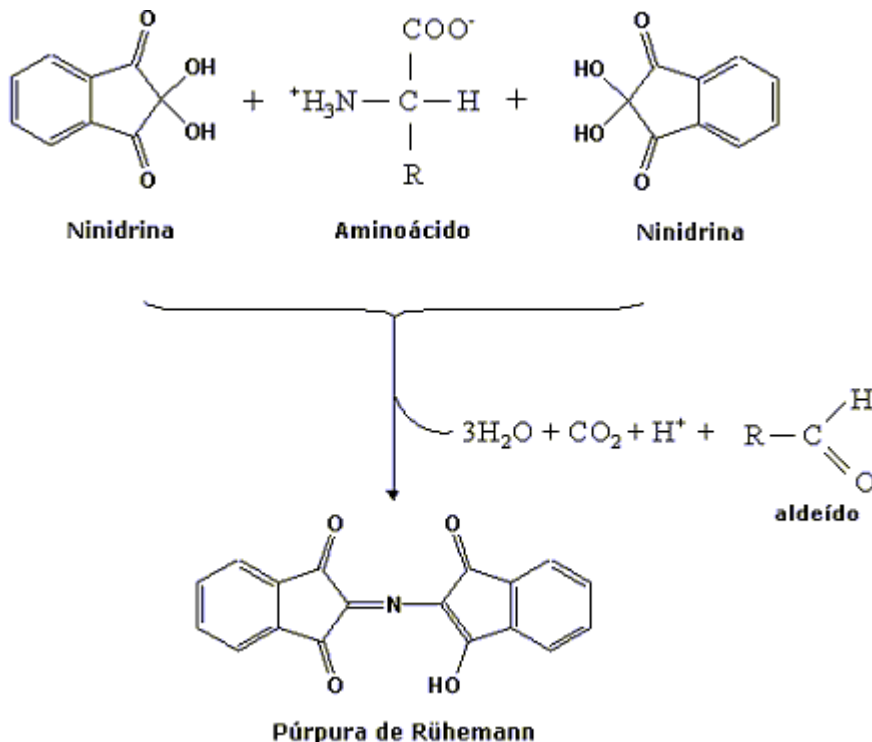
Abs = (Abs. teste – Abs. branco) e (Abs. controle – Abs. branco)

Fazer uma representação gráfica da absorbância em função do tempo.

6. PRÁTICA: Reações de coloração de aminoácidos e proteínas

Esta prática tem por objetivo caracterizar a presença de proteínas em materiais biológicos, reconhecer diferentes métodos de identificação colorimétrica de aminoácidos e proteínas e identificar diferenças entre as técnicas de detecção de aminoácidos e proteínas utilizadas.

Aminoácidos que apresentam grupo α -amino livre, quando aquecidos em presença de ninidrina, formam um produto de coloração púrpura. A coloração obtida é proporcional à concentração de aminoácidos existente. Esta reação dá resultado positivo para aminoácidos, proteínas e outras aminas primárias. Prolina e hidroxiprolina, por serem aminoácidos, dão coloração amarela. Durante a reação, há formação de CO_2 e amônia. Pode-se determinar a quantidade de aminoácidos medindo-se as quantidades que se produzem destas duas substâncias. Outra forma de medir a concentração de aminoácidos é através da intensidade de cor produzida, utilizando-se o método colorimétrico.



Fonte: http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_proteinas/reacoes_coradas.htm

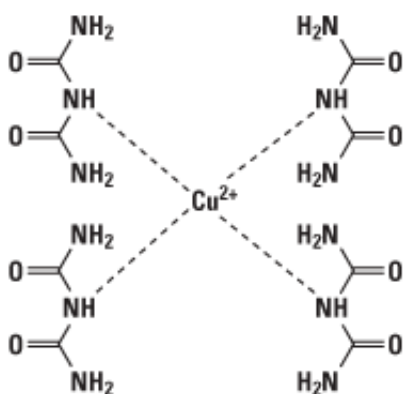
Procedimento:

1. Preparar um banho-maria fervente
2. Colocar em um tubo de ensaio 3,5 mL de solução de ovoalbumina
3. Adicionar 0,5 mL de solução de ninidrina
4. Misturar por inversão

5. Aquecer em banho-maria fervente por 5 minutos
6. Anotar a coloração desenvolvida
7. Observar e interpretar.

6.1. Reação de Biureto

Essa reação identifica a presença de ligações peptídicas na molécula em estudo. O reativo de Biureto é composto por sulfato de cobre e tartarato de sódio e potássio alcalinizados. A positividade da reação verifica-se pelo aparecimento de uma coloração que varia da cor rosa ao violeta. Em meio alcalino, o íon cúprico do reativo forma um complexo com compostos que contém dois grupos carbamilas ($-\text{CONH}_2$) unidos diretamente através de um átomo de carbono ou nitrogênio. O aparecimento da coloração deve-se à formação de um complexo de coordenação do íon cúprico com átomos de nitrogênio da ligação peptídica. Essa reação só será positiva quando o material analisado for composto de pelo menos duas ligações peptídicas (tripeptídeos). As soluções de polipeptídeos ou proteínas por apresentarem várias ligações peptídicas dão reação positiva.



Fonte: ADAPTADO de <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html>

Procedimento:

1. Colocar em um tubo de ensaio 3 mL da solução de ovoalbumina
2. 1 mL do reativo de Biureto
3. Misturar por inversão
4. Observar a coloração desenvolvida
5. Observar e interpretar.
6. A formação de coloração violácea indica positivo para proteína.

6.2. Reação Xantoproteica

Essa reação tem como finalidade identificar a presença de aminoácidos que possuem anel benzênico substituído na molécula. Radicais aromáticos reagem com o ácido nítrico para formar nitroderivados que se tornam alaranjados em meio alcalino. A reação é positiva quando aparece uma coloração alaranjada no tubo de ensaio onde ocorreu a reação. Os aminoácidos que respondem positivamente a este teste são a tirosina e o triptofano. Nas condições em que

a reação xantoproteica é realizada, o benzeno da fenilalanina não é reativo o suficiente para reagir positivamente a este teste.

Procedimento:

1. Colocar em um tubo de ensaio 3 mL da solução de ovoalbumina.
2. Adicionar 1 mL de ácido nítrico concentrado e observar a formação de um precipitado branco.
3. Aquecer com cuidado, observar o que ocorre com a cor do precipitado e anotar.
4. Esfriar em água corrente
5. Gotejar hidróxido de sódio a 40% até o surgimento da cor laranja
6. Observar e interpretar.
7. A reação é positiva quando ocorre formação de uma solução amarelada.

6.3. Reação de Millon

As proteínas que apresentam aminoácidos com grupo fenólico na sua estrutura, na presença do reativo de Millon, desenvolvem coloração vermelha. A reação ocorre mediante aquecimento. O reagente de Millon é preparado através da dissolução de mercúrio em ácido nítrico concentrado. Desta forma, a solução obtida deve conter nitrato mercurioso com traços de ácido nitroso.

Procedimento:

1. Colocar em um tubo de ensaio 2 mL da solução de ovoalbumina
2. 5 gotas de reagente de Millon
3. Aquecer em banho-maria fervente durante 2 minutos
4. Observar e interpretar.
5. A solução torna-se roxa avermelhada quando positiva.

6.4. Método de Heller - Determinação de Albumina na urina

Nesta reação ocorre a coagulação da proteína presente na urina através do ácido nítrico. Esta coagulação ocorre pela perda da solubilidade da proteína no estado desnaturado. Esta prática tem por objetivo evidenciar a presença de proteinúria pela desnaturação com ácido nítrico.

Procedimento:

1. Em um tubo de ensaio, pipetar 3 mL de urina filtrada e adicionar 2 mL de ácido nítrico lentamente no fundo do tubo, de modo que os dois líquidos não se misturem;
2. A formação de anel branco e leitoso na superfície de contato dos dois líquidos demonstra resultado positivo.

6.5. Método Sulfossacílico - Determinação de Albumina na urina

Nesta reação ocorre a desnaturação da proteína pelo ácido com formação de metalproteína.

Procedimento:

1. Em um tubo de ensaio identificado, limpo e seco, colocar 5 mL de urina filtrada e adicionar 5 gotas de solução de ácido sulfossalicílico e misturar.
2. Turvação ou precipitação são resultados positivos.

7. PRÁTICA: Reações de Precipitação de Proteínas

7.1. Precipitação por Sais

Altas concentrações de sais precipitam proteínas de suas soluções. Este fenômeno é denominado de precipitação por sais. Os sais desidratam as proteínas, atraindo as moléculas de água do meio, de modo a ficar menos água disponível para as moléculas proteicas. A solubilidade de uma proteína depende da quantidade de água disponível para as moléculas proteicas. A solubilidade de uma proteína depende da quantidade de água disponível ao redor de seus grupos iônicos (quanto menor for o número de moléculas de água, menor será a solubilidade). Por outro lado, baixas concentrações de sais podem aumentar a solubilidade de muitas proteínas. É o fenômeno conhecido como solubilização por sais. Isso pode ser explicado através da interação entre os íons salinos e as cargas iônicas das proteínas, aumentando, assim, o número efetivo de cargas (a tendência de ionização dos grupos dissociáveis das proteínas) e a quantidade de moléculas de água fixadas à ionosfera proteica. De modo geral, pequenos aumentos da força iônica solubilizam melhor as proteínas, enquanto que aumentos maiores provocam a precipitação das mesmas.

Procedimento:

1. Pipetar em um tubo de ensaio 1 mL de ovoalbumina
2. Adicionar 1 mL de solução saturada de sulfato de amônia
3. Misturar por inversão. Observar e anotar o resultado
4. Adicionar 1 mL de água destilada
5. Misturar por inversão. Observar e interpretar o resultado
6. Observar e interpretar
7. O resultado positivo ocorre quando há formação de uma solução leitosa com precipitados brancos.

7.2. Precipitação por Ácidos Fortes

A solubilidade de uma molécula depende da interação entre os grupos polares dos radicais -R e as moléculas de água através de pontes de hidrogênio. Grandes variações de pH modificam a ionização destes grupos e, portanto, a interação da proteína com o meio. Nos seres vivos, as proteínas estão em contínua modificação de sua conformação, uma vez que as concentrações locais de íons, o pH e o poder redutor sofrem pequenas variações, alterando a interação dos vários grupos reativos das proteínas entre si e com o meio. Valores extremos de pH afetam bruscamente estas interações, causando uma mudança radical na conformação da proteína para um estado conformacional biologicamente inativo. Quando uma proteína é modificada em sua conformação, de tal modo que perde sua função biológica, ela é dita desnaturada. A desnaturação é um fenômeno que não envolve clivagem da estrutura primária da proteína (ruptura das ligações peptídicas), mas sim, um rompimento das estruturas

secundária, terciária e quaternária. A desnaturação é um rearranjo da conformação proteica numa maneira não natural e de escassa ou nula função biológica. Esse fenômeno pode ser acompanhado através de modificações das propriedades físico-químicas da proteína, como solubilidade: uma proteína desnaturada é insolúvel em água e precipita em solução. Além de valores extremos de pH, a desnaturação pode ser causada por muitos agentes físicos, como temperaturas elevadas e raios UV, e químicos, como ácido tricloroacético (TCA), desnaturam as proteínas, precipitando-as.

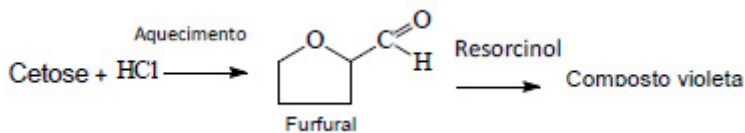
Procedimento:

1. Pipetar em um tubo de ensaio 1 mL de ovoalbumina
2. Adicionar 0,5 mL de solução de TCA 10% (Ácido Tricloroacético)
3. Observar o resultado e anotar
4. Adicionar 2,5 mL de água destilada. Observar e anotar o resultado.
5. Observar e interpretar.
6. O resultado positivo ocorre quando há formação de uma solução leitosa com precipitados brancos.

8. PRÁTICA: Identificação de Carboidratos

Esta prática tem por objetivo executar testes qualitativos para reconhecimento de carboidratos

Os carboidratos podem ser identificados por meio de várias reações. Algumas dessas reações envolvem a formação de complexos corados e a especificidade da identificação depende da estrutura dos carboidratos. Assim, há reações gerais e outras para estruturas mais específicas, como aquelas, para aldoses, cetoses, mono e dissacarídeos redutores etc.



Fonte: Adaptado:http://adamogama.blogspot.com.br/2012/07/teste-de-seliwanoff_27.html

8.1. Diferenciação entre Aldoses e Cetoses - Reação de Seliwanoff

O reagente de Seliwanoff é uma solução que contém 0,05 g de resorcinol em 100 mL de HCl diluído. O HCl é obtido diluindo-se o concentrado com água destilada na proporção de 1:1.

Este teste permite diferenciar aldoses de cetoses, que sob a ação desidratante do HCl são transformadas em derivados de furfural, que se condensam com o resorcinol formando um composto vermelho de composição incerta.

A reação com cetose é rápida e mais intensa pela facilidade de formação do derivado furfural. A sacarose dá reação positiva: sua hidrólise, pelo HCl do reagente, explica o fato. Mesmo as aldo-hexoses, se o aquecimento for prolongado, dão reações positivas, pois sob a ação catalítica do HCl, a glicose se transforma em frutose, nestas condições.

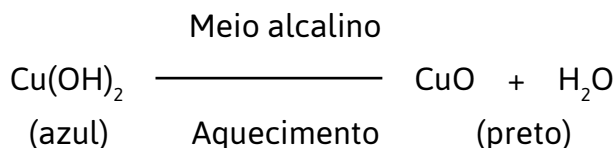
Procedimento:

1. Preparar os seguintes tubos de ensaio, contendo:
Tubo 1: 3 mL de Seliwanoff + 5 gotas de água destilada.
Tubo 2: 3 mL de Seliwanoff + 5 gotas de frutose 2 %.
Tubo 3: 3 mL de Seliwanoff + 5 gotas de glicose 2 %.
Tubo 4: 3 mL de Seliwanoff + 5 gotas de sacarose 2 %.
2. Colocar em banho-maria fervente até completar a reação.
3. Observar de três em três minutos, durante aproximadamente 10 minutos. Explicar o que ocorre.
4. A mudança de cor para vermelho significa resultado positivo.

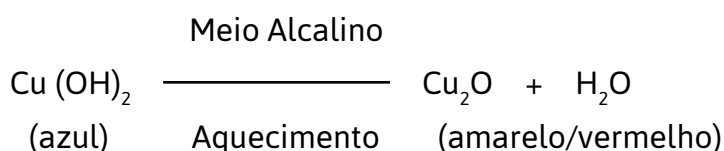
8.2. Identificação de açúcares redutores - Reação de Benedict

Utilizada para identificação de carboidratos redutores. Íons de metais como, cobre, prata, ferro, mercúrio etc., são reduzidos por grupos aldeídos ou cetônicos livres de vários carboidratos. Colocando-se hidróxido de cobre II, $\text{Cu}(\text{OH})_2$, de cor azul, em meio alcalino, forma-se uma suspensão que, sob aquecimento, se precipita como óxido de cobre II, CuO de cor preta. Mas se compostos redutores forem acrescentados à suspensão, o $\text{Cu}(\text{OH})_2$ é reduzido a Cu_2O , que se precipita e cuja cor se situa entre o amarelo e o vermelho. As reações abaixo mostram o que ocorre o $\text{Cu}(\text{OH})_2$ na presença e na ausência de agentes redutores, em meio alcalino e a quente.

Ausência de composto redutor:



Presença de composto redutor:



Como não é prático utilizar uma suspensão de Cu^{2+} , e também para evitar que o CuO (preto) mascare o resultado da reação, acrescenta-se ao meio da reação um composto orgânico solubilizador que, em meio alcalino adequado, reage com os íons metálicos, formando um complexo iônico solúvel. Este complexo se dissocia em grau suficiente para que haja, no meio da reação, íons metálicos disponíveis para se reduzirem. No caso do reagente de Benedict (qualitativo), emprega-se CuSO_4 2% solubilizado por citrato de Na^+ 20%, dissolvidos em Na_2CO_3 2 M.

Os testes de carboidratos redutores são positivos para compostos com grupamento $-\text{OH}$ glicosídico livre, mas negativos para polímeros de cadeias longas. Assim, amido não dá reação positiva, a não ser após a sua hidrólise, e a reação é tanto mais positiva quanto maior a extensão da hidrólise.

Procedimento:

1. Colocar em tubo de ensaio 2,0 mL do reagente de Benedict e 1,0 mL da amostra a ser analisada.
2. Ferver durante 3 minutos em banho-maria.
3. Anotar o resultado.

O aparecimento de um precipitado de coloração vermelho-tijolo indica que os íons Cu^{2+} do reagente de Benedict foram reduzidos a Cu^+ , indicando presença de açúcar redutor. Relatar a positividade da reação, em cruces, de acordo com o aparecimento da cor final seguindo instrução a seguir:

Azul - 0

Verde - 1+

Amarelo - 2+

Laranja - 3+

Tijolo - 4+

Responder:

Por que houve variação na cor e nem todas as amostras apresentaram reação?

8.3. Detecção de polissacarídeos - Reação do Lugol

O reagente de lugol (5g de I_2 + 10 g de KI em 100 mL de H_2O) diluído 20 vezes com H_2O dá, com o amido, um complexo de cor azul e com o glicogênio, um complexo de cor vermelha. A composição desses compostos não está definida. Celulose, mono e dissacarídeos não dão coloração com iodo.

Procedimento:

1. Preparar a seguinte série de tubos contendo:

Tubo 1: 1 mL de água

Tubo 2: 1 mL de glicose 2%

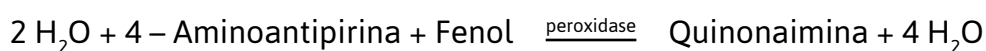
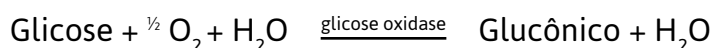
Tubo 3: 1 mL de sacarose 2%

Tubo 4: 1 mL de amido 2%

2. Acrescentar, a cada tubo, 2 gotas do reagente de lugol. Observar e explicar o ocorrido em cada tubo.

8.4. Dosagem de Carboidrato – Glicose

A glicose presente na amostra origina, segundo as reações descritas abaixo, um complexo colorido que se quantifica por espectrofotometria.



O complexo corado (vermelho) apresenta absorvância proporcional à concentração de glicose na amostra analisada.

Procedimento:

1. Comprimento de onda em espectrofotômetro: 505 nm
2. Temperatura: 37°C
3. Para cada série de análises deve ser processado um padrão de trabalho.

	B (branco)	P (padrão)	T (teste)
Reagente glicose	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Padrão de glicose	-	0,01 mL	-
Amostra	-	-	0,01 mL

Dica: Misturar bem e incubar durante 5 minutos a 37°C. Ajustar o equipamento em zero utilizando o tubo B. Determinar a absorbância da solução padrão e da amostra, e proceder aos cálculos. A reação mantém-se estável por 60 min.

Cálculos

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste} \times 100}{\text{Absorbância do padrão}}$$

Onde: 100 é a concentração do padrão em mg/dL

Podendo-se calcular o fator de calibração através da seguinte fórmula:

$$\text{Fator} = 100 / \text{Absorbância do Padrão}$$

Usando-se o fator de calibração: Glicose (mg/dL) = Fator x absorbância do teste.

Observe: Caso o valor do padrão de Glicose não seja 100 mg/dL, atribuir o valor de bula ou rótulo do mesmo.

AMOSTRAS TESTE: Observar os achados de glicose nos seguintes materiais:

Urina;

Adoçante;

Refrigerante Normal;

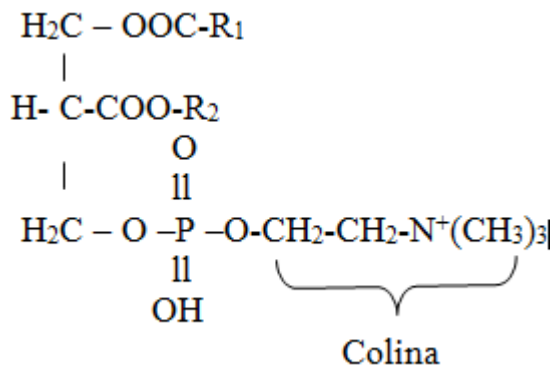
Refrigerante Light;

Responder:

Avalie as cores dos frascos contendo padrão e amostra. Qual está mais forte? O que significa?

9. PRÁTICA: Extração de lecitina e identificação de seus produtos de hidrólise

A lecitina (fosfatidil-colina) é um tipo de fosfoglicerídeo que contém duas moléculas de fosfoglicerídeo que contém duas moléculas de ácido graxo, um saturado e um insaturado, que esterificam as hidroxilas dos C₁ e C₂ do glicerol, respectivamente. A hidroxila do C₃ é esterificada com ácido fosfórico que está unido a um álcool aminado (colina).



A fosfatidil-colina faz parte da composição molecular das membranas biológicas e está também presente nas lipoproteínas do plasma sanguíneo e tem ação detergente. Nos mamíferos, apenas 20% da necessidade de fosfatidil-colina é suprida pela “Biossíntese de novo”. A biossíntese ocorre no fígado, a partir de fosfatidiletanolamina + 3 moléculas de S-adenosilmetionina, doadoras de radical metila (-CH₃). Os demais 80%, são obtidos pela “via de salvação”, na qual a colina proveniente da dieta é fosforilada por ação da colina quinase, formando fosfocolina, que é precursora da fosfatidil-colina.

Uma dieta deficiente de colina, e com baixo teor de proteína, faz com que haja formação do chamado “fígado gordo”. Uma das formas de exportar ácidos graxos para fora do fígado se dá sob a forma de constituintes de lipoproteínas. Quando há diminuição na síntese de fosfatidil-colina, a velocidade com que os ácidos graxos são transportados para fora do fígado sob esta forma diminui, com conseqüente acúmulo de triglicerídeos.

Uma das grandes fontes de lecitina da dieta é a gema de ovo. À venda, existem cápsulas de lecitina de soja e medicamentos contendo colina e metionina (auxiliam na prevenção do fígado gordo).

9.1. Extração da Lecitina da gema do ovo

A lecitina é isolada da gema de ovo através de tratamentos sucessivos com acetona e clorofórmio. A acetona desidrata as proteínas, desnaturando-as, extrai pigmentos e a maioria dos lipídios da gema, com exceção dos fosfolídeos (lecitina). O tratamento do resíduo cetônico obtido, com clorofórmio, permite a extração dos fosfolídeos, ou seja, da lecitina.

Procedimento:

1. Colocar a terça parte de uma gema de ovo em um copo de Becker de 100 mL;
2. Adicionar 15 mL de acetona, misturar bem com bastão de vidro e deixar em repouso por alguns minutos;
3. Decantar o sobrenadante para um balão Erlenmeyer com o auxílio de um bastão de vidro, procurando reter o resíduo no copo;
4. Tornar a adicionar 10 mL de acetona ao resíduo. Misturar bem e decantar, repetindo esta operação mais 4 ou 5 vezes, até que o precipitado se torne esbranquiado. Adicionar finalmente, 5 mL de acetona e filtrar através de um papel filtro. Os sucessivos sobrenadantes de acetona devem ser desprezados.
5. Abrir o papel filtro, contendo o resíduo cetônico, sobre uma placa impermeável (azulejo);

6. Secar o resíduo, espalhando-o sobre o papel filtro, com o auxílio de um bastão de vidro. A secagem pode ser acelerada pressionando o resíduo com outros pedaços de papel filtro;
7. Passar o resíduo seco para o copo de Becker usado anteriormente e adicionar 10 mL de clorofórmio. Misturar bem com bastão de vidro;
8. Filtrar através de papel filtro, recolhendo o extrato clorofórmico em um tubo de ensaio grande (para obter uma filtração rápida, utilizar filtro de pregas);
9. Retornar o resíduo para o copo de Becker e adicionar ao mesmo mais 5 mL de clorofórmio. Misturar e filtrar para o mesmo tubo de ensaio usado anteriormente. Desprezar o precipitado remanescente;
10. Reduzir o filtrado clorofórmico ao menor volume possível (1/5 do volume inicial) por evaporação em banho-maria (em capela com exaustor);
11. O resíduo líquido obtido contém a lecitina parcialmente purificada.

9.2. Caracterização química através da Lecitina

Hidrólise Alcalina da Lecitina

Os fosfoglicerídeos são lipídeos que dão por hidrólise: ácido fosfórico, compostos nitrogenados de caráter básico, ácidos graxos e glicerol. Em presença de hidróxido de sódio, os ácidos graxos formarão sais alcalinos (sabões).

Procedimento:

1. Adicionar 5 mL de etanol ao resíduo de lecitina obtido no processo de extração, aquecendo o tubo de ensaio em banho-maria a 100°C para auxiliar a emulsificação;
2. Adicionar 5 mL de NaOH 10 N e mais 10 mL de água destilada;
3. Misturar bem e levar ao banho-maria por 15 minutos, agitando ocasionalmente e com cuidado, com o bastão de vidro (cuidado para não derramar);
4. Resfriar o hidrolisado e acrescentar, com pipeta, ácido acético glacial até franca reação ácida ao papel tornassol ($\pm 2,5$ mL). É importante evitar o excesso de ácido, pois poderá ser prejudicial às reações de caracterização. Verificar a reação ao papel tornassol após a adição de cada 0,5 mL de ácido;
5. Reaquecer a solução acidificada, em banho-maria por 1 minuto e filtrar em papel filtro umedecido com água destilada. Assim, os ácidos graxos obtidos pela saponificação da lecitina e liberados pela acidificação, ficam retidos no papel filtro;

Dica: Usar o filtrado para as reações seguintes, de identificação da colina e fosfato.

9.3. Identificação de Colina e Fosfato Inorgânico Livre

Detecção de colina

Procedimento:

1. Colocar uma gota do filtrado sobre uma lâmina;
2. Adicionar uma gota de lugol (KI + I₂) concentrado;
3. Cobrir com uma lamínula e levar ao congelador por 10 minutos;

4. Examinar ao microscópio o produto da reação entre o iodo e a colina, o qual precipita sob forma cristalina (cristais de Florence), a temperaturas inferiores a 15 °C.
5. Detecção de Fosfato: Método de Fiske-Subbarow
6. Colocar 3 mL de filtrado em tubo de ensaio;
7. Adicionar 1 mL da solução de molibdato de amônio a 2,5g% em ácido sulfúrico 5N;
8. Aquecer suavemente, em banho-maria, durante alguns minutos. O produto formado será fosfomolibdato de amônio (amarelado);
9. Adicionar 0,4 mL de reagente redutor (ácido amino-naftol sulfônico + NaHSO₃ + Na₂SO₃);
10. Observar a coloração azul, devido à formação de “óxidos de molibdênio”, resultantes da reação com fosfomolibdato de amônio. A cor azul evidencia, indiretamente a presença de fosfato inorgânico.

10. PRÁTICA: Rancificação de Óleos Vegetais

Esta prática tem por objetivo avaliar quantitativamente a rancidez de óleos vegetais.

Quando expostas ao ambiente, as gorduras sofrem o processo de rancificação, o qual altera sua natureza química e modifica suas propriedades organolépticas. A rancificação pode ser hidrolítica (catalisada por enzimas, que liberam os ácidos graxos, aumentando a acidez da gordura) ou auto-oxidativa (pelo O₂ do ar). A rancidez oxidativa ocorre em óleos e gorduras que contém ácidos graxos insaturados, levando à formação de compostos que os tornam impróprios para o consumo. Quando o O₂ é adicionado às cadeias de ácidos graxos insaturados, peróxidos e hidroperóxidos são formados. Estes compostos são degradados a aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, álcoois, que são responsáveis pelas características organolépticas, físicas e químicas associadas à rancificação oxidativa.

Reações de rancificação tem sido objeto de muita atenção no plano químico, visto que ocorrem através de mecanismos que envolvem radicais livres e estes são responsáveis pela degradação de moléculas orgânicas através de sua auto-oxidação. A determinação da acidez pode nos fornecer dados valiosos sobre o estado de conservação de um óleo ou gordura, pois um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera a concentração de íons H⁺.

Materiais:

- Diferentes tipos de óleo;
- solução de éter etílico e etanol 95%, na proporção de 1:1;
- fenolftaleína 1%;
- NaOH 0,1M;
- béqueres;
- buretas;
- suportes para buretas.

Procedimento:

1. Depois de rotular os béqueres, pesar 25 g de amostra de óleo em Becker de 250 mL.

2. Adicionar 50 mL da mistura éter/etanol (proporção 1:1) e 3 gotas de fenolftaleína.
3. Titular com NaOH 0,1M até o aparecimento de coloração rósea (a coloração deve persistir por, no mínimo, 30 segundos para que seja considerado o fim da titulação).
4. Anotar o volume de base gasto para cada amostra.
5. Calcular o índice de acidez livre:

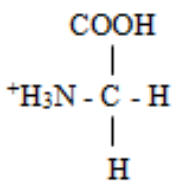
$$IA = \text{mg de base} / \text{g de óleo}$$

Limites de acidez aceitáveis para óleos refinados: máximo de 0,6 mg base/g óleo.

11. PRÁTICA: Neutralização da Glicina

Esta prática tem como objetivo reconhecer as propriedades acidobásicas de um aminoácido, identificar as zonas de tamponamento da glicina e estabelecer a relação entre os valores de pH do meio e as formas iônicas da glicina correspondentes.

Colocando a glicina em meio de ácido clorídrico 0,1 N todos os seus grupos ionizáveis ficam protonados:



Fonte: Adaptado de <http://www.engquimicasantosp.com.br/2014/03/glicina-aminoacido.html>

Ao adicionar lentamente NaOH a este meio, à medida que a base for sendo adicionada, os prótons hidrogênio do meio vão sendo neutralizados pelas oxidrilas da base. Em consequência, diminui a concentração dos prótons, o que se comprova com o aumento do pH.

Quando o pH da solução se aproxima de 2,0 (HCl 0,1 N tem pH= 1,0) os grupos <-carboxila se dissociam e a base passa a neutralizar os prótons dissociados deste grupo e não os do meio. Assim, o pH do meio não se eleva. Isto se denomina de efeito tampão do grupo <-carboxila do aminoácido.

À medida que o pH da solução for se afastando de 2,0, a concentração dos <-COOH vai diminuindo e a base volta a neutralizar os H⁺ do meio, diminuindo a sua concentração, o que novamente pode ser comprovado pelo aumento do pH.

Quando o pH da solução se aproximar de 9,6, os grupos <-amino começam a dissociar, passando a base adicionada a neutralizar os prótons provenientes da dissociação deste grupo. Assim novamente o pH do meio não se eleva. Isto se denomina de efeito tampão do grupo <-amino dos aminoácidos. À medida que o pH da solução se afastar de 9,6, a concentração dos grupos <-amino vai diminuindo e a base volta, novamente, a neutralizar os H⁺ do meio.

O aminoácido glicina possui dois grupos com capacidade tamponante: <-COOH em pH ácido (2,3) e <-NH₃ em pH alcalino (9,6).

A capacidade tamponate de cada grupo inicia 1 unidade antes e termina 1 unidade após o pH indicado. A capacidade tamponante máxima do grupo <-carboxila ocorre, justamente, quando o pH da solução atinge o valor de 2,3 e a capacidade tamponante máxima do grupo <-amino é atingida quando o pH da solução atinge o valor de 9,6.

Vê-se nos pKs a capacidade tamponante dos grupos ionizáveis, tanto para a adição de ácidos como de bases.

Entre os valores extremos de pH ácido e básico de uma curva de neutralização da glicina, há um pH onde a maioria das estruturas moleculares está sob forma de íon anfotérico.

Procedimento:

1. Pipetar em dois béqueres 20 mL de solução de glicina 0,05 M.
2. Medir o pH e registrar.
3. Adicionar ao primeiro frasco, com pipeta, NaOH 0,1 M de 0,5 em 0,5 mL, agitar cuidadosamente, medindo e anotando o pH na tabela específica após cada adição.
4. Adicionar ao outro frasco, com pipeta, HCl 0,1 N, de 0,5 em 0,5 mL e agitar medindo e anotando na tabela específica o pH após cada adição.
5. Traçar a curva de titulação, colocando nas ordenadas os pHs e nas abcissas os mLs de base ou ácido gastos.
6. Indicar no gráfico os pKs e zonas de tamponamento.
7. Calcular o pI.

Responda:

1. Por que razão a curva sofreu um achatamento nas regiões de pK1 e pK2 e qual o estado de ionização da glicina no pK1 e pK2?
2. Quais as estruturas iônicas predominantes da glicina nos pHs 1,9 ; 5,2 e 10?
3. Todos os aas devem apresentar curva de titulação semelhante à da glicina? Por quê?

mL de NaOH																				
pH																				

mL de HCl																				
pH																				

12. PRÁTICA: Extração de suco de frutas usando a enzima pectinase

Esta prática tem como objetivo comparar o volume de suco extraído da polpa de frutas, com e sem pectinase.

A pectina é um carboidrato vegetal complexo que forma parte da parede das células. Em contato com líquidos, a pectina tem a capacidade de absorver água e formar gel, sendo esta propriedade utilizada na indústria de geleias. Numerosos microrganismos produzem pectinases, que são enzimas que degradam a pectina. Como a pectina forma parte da parede vegetal e da lamela mediana entre células adjacentes, sua degradação favorece a decomposição natural dos vegetais. Na produção industrial de sucos de frutas e vegetais, a pectina deve ser eliminada devido a sua capacidade de reter líquido e turvar o produto. Por

sua ação pectinolítica, as pectinases liberam o suco retido na pectina das paredes celulares vegetais, aumentando o rendimento do processo de extração de suco e melhorando sua qualidade.

Materiais:

- 80g de polpa de frutas,
- 1 mL de solução de pectinase (concentração 10.000U/mL),
- 2 béqueres,
- 2 colheres de plástico,
- 2 provetas,
- 2 funis,
- 2 filtros.

Procedimento:

1. Rotular os béqueres,
2. Distribuir 80g de polpa de frutas em cada um deles.
3. Acrescentar 1 ml de solução de pectinase (+ 19 mL de água) em um dos béqueres e 20 mL de água no outro. Misturar bem.
4. Incubar à temperatura ambiente durante 1 hora e 30 minutos.
5. Colocar os funis sobre as provetas e filtrar o conteúdo dos béqueres.
6. Medir o volume filtrado depois de 1, 5, 10, 15, 30, 60 e 90 minutos.
7. Comparar o rendimento (quantidade de suco, velocidade de extração) obtido sem e com pectinase.
8. Explicar o que aconteceu e montar um gráfico do Volume de Suco Extraído (ml) em relação ao Tempo (minutos).

13. PRÁTICA: Identificação de lipídios

Lipídeos são substâncias orgânicas com caráter hidrofóbico. Estes podem ser extraídos das células e dos tecidos por meio de solventes apolares como clorofórmio e éter.

13.1. Teste da Solubilidade

Neste teste vamos identificar a presença de lipídios em amostras diversas (óleo vegetal, óleo mineral, soro humano). Para isso utilizamos algumas substâncias como éter, clorofórmio, água e hidróxido de sódio. Sabendo que os lipídios são moléculas apolares e conhecendo a lei de dissolução “semelhante dissolve semelhante”, certamente as amostras que contém lipídios formarão soluções de apenas uma fase com as substâncias apolares; e com as substâncias polares soluções onde observaremos mais de uma fase.

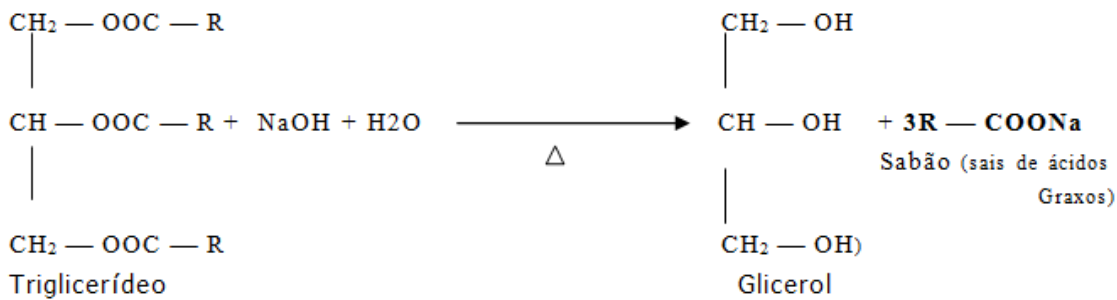
Procedimento:

1. Colocar 5 gotas da amostra em cada um de 3 tubos de ensaio.
2. Acrescentar 2 mL dos seguintes solventes: no primeiro, água (H₂O), no segundo, éter etílico (H₃C-CH₂-O-CH₂-CH₃) e no terceiro, hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N.

3. Agitar e observar a solubilidade da amostra nos respectivos solventes.
4. Executar a prática com as amostras de óleo vegetal, óleo mineral e soro humano.

13.2. Saponificação – lipídios

Os sabões são obtidos a partir da hidrólise alcalina de triglicerídeos por ação de uma base forte em banho-maria fervente. Os óleos e as gorduras, quando tratados com soluções concentradas alcalinas, se hidrolisam, produzindo glicerol e sais de ácidos graxos. Estes sais de ácidos graxos (sabões) apresentam um caráter anfipático que quando em solução aquosa, diminuem a tensão superficial da água formando espuma sob agitação.



Fonte: Adaptado de <http://manualdaquimica.uol.com.br/curiosidades-quimica/composicao-quimica-sabao.htm>

Procedimento:

1. Colocar 1,0 mL de banha fundida em um copo de Becker de 100 mL;
2. Acrescentar 4 mL de NaOH 10 N e 20 mL de etanol absoluto. Agitar bem;
3. Colocar o copo de Becker na chapa de aquecimento, agitando ocasionalmente com um bastão de vidro. O etanol deve ser reduzido à 1/5 do volume original através de evaporação (tempo estimado 15 a 20 minutos).

Cuidado! *Pode existir o risco de projeção do líquido.*

4. Adicionar 3 gotas de glicerina;
5. Resfriar o copo de Becker em água, agitando energicamente até a formação de uma pasta de sabão;
6. Adicionar 60 mL de água destilada e reaquecer o copo de Becker na chapa de aquecimento, até dissolver o sabão.

13.3. Estabilização da Emulsão

O sabão por apresentar um grupo polar e um grupo apolar é capaz de estabilizar emulsões.

1. Colocar em um tubo de ensaio 10 gotas de óleo de soja.
2. Adicionar 5 mL de água destilada. Agitar e observar o que ocorre após esse tempo.
3. Em um segundo tubo, colocar 10 gotas de óleo de soja.
4. Acrescentar 5 mL da solução de sabão preparada anteriormente. Agitar o tubo.
5. Deixar em repouso por 10 minutos e observar o que ocorre após esse tempo.

13.4. Teste de Liberação dos Ácidos Graxos

A adição de um ácido forte fornecerá prótons que irão forçar a liberação dos ácidos graxos sob a forma associada.

1. Pipetar em um tubo de ensaio 5 mL do sabão preparado anteriormente.
2. Adicionar, gota a gota, HCl concentrado. Observar e explicar.

13.5 Teste de Formação de Sabões Insolúveis

Os sabões de cálcio ou magnésio se dissociam muito pouco, e por este motivo os sabões destes metais alcalinos terrosos são insolúveis. Os sabões insolúveis são obtidos a partir de sabões solúveis pela adição de sais de cálcio ou magnésio.

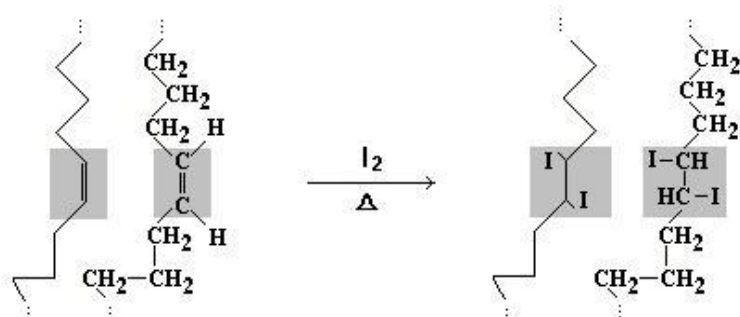
1. Pipetar, em dois tubos de ensaio, 3 mL de sabão.
2. Adicionar, gota a gota, no tubo 1, a solução de CaCl_2 ; no tubo 2 a solução de MgSO_4 .

Responda:

1. Comente o processo de saponificação, destacando os mecanismos químicos desta reação.
2. Explique de que forma ocorre a emulsão.
3. Onde se pode aplicar o processo de emulsificação nos organismos vivos.

13.6. Teste do Iodo

Este teste identifica a presença de ácido graxo insaturado. Ocorre uma reação de halogenação, em que o iodo reage com as duplas ligações do ácido graxo insaturado. Halogenação é a reação do ácido graxo insaturado com um halogênio, formando ácido graxo saturado halogenado.



Fonte: http://www.dbm.ufpb.br/DBM_bioquimica_monitoria.htm

Se houver dupla ligação, o iodo será consumido e a coloração característica da solução de iodo diminuirá de intensidade.

Procedimento:

Colocar num tubo de ensaio 1 mL de óleo vegetal, adicionar 3 gotas de lugol e aquecer direto na chama **cautelosamente**. Observar a mudança de coloração do sistema.

Responda:

1. Comente o processo de saponificação, destacando os mecanismos químicos desta reação.

2. Explique de que forma ocorre a emulsão.
3. Onde se pode aplicar o processo de emulsificação nos organismos vivos.
4. Como ocorre o processo de eliminação da “sujeira” (gordura)?

13.7. Detecção do Colesterol - Método de Salkowski

O colesterol tem na sua estrutura o anel ciclopentanoperidro fenantreno, graficamente representado por quatro anéis fundidos. Embora apresente propriedades de solubilidade semelhante à dos lípidios, os esteroides como o colesterol apresentam estruturas e propriedades químicas diferentes e pode ser diferenciado por meio da reação de coloração. Neste método, ocorre a desidratação na insaturação formando um composto colorido.

Procedimento:

1. Identificar um tubo de ensaio;
2. Pipetar 1 mL da solução clorofórmica de colesterol e adicionar 1 mL de ácido sulfúrico concentrado cuidadosamente pela parede.
3. A reação é positiva quando há formação de composto vermelho amarronzado.

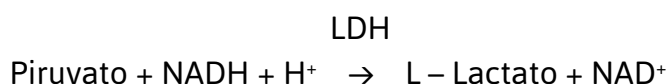
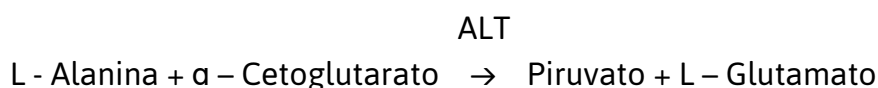
14. PRÁTICA: Oxidação e redução

Esta prática tem como objetivo a determinação da ocorrência das reações de oxidação e redução em compostos enzimáticos com a presença de NAD e NADH.

14.1. Determinação cinética de Alanina Aminotransferase (ALT) ou Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP)

Princípio de ação

Determinação cinética (UV) da ALT, segundo a reação:



A ALT catalisa a transferência do grupamento amina da Alanina para α - Cetogluturato, formando Piruvato e Glutamato. O Piruvato em presença de LDH (lactato desidrogenase) reage com o NADH reduzindo-se a Lactato e o NADH oxida-se a NAD^+ . A velocidade de oxidação é proporcional à atividade da ALT na amostra.

Aplicação clínica

O aumento da atividade das enzimas Aspartato Amino Transferase - AST (de localização citomitocondrial) e, Alanina Amino Transferase - ALT (de origem citoplasmática) refletem alterações de vários tecidos. ALT - Maior atividade desta enzima está localizada no tecido hepático. Menores atividades ocorrem no músculo esquelético, coração, rins e pâncreas. Sua atividade encontra-se aumentada na hepatite viral e tóxica [30 - 50 ou 100 vezes os valores de referência (VR)] bem como em outras doenças hepáticas (DH), associadas à necrose hepática. Nas DH crônicas associadas à necrose celular devido ao aumento da liberação de AST -

mitocondrial, podendo ocorrer inversão da relação ALT/AST. Ocorre ainda aumento de seus níveis na mononucleose infecciosa, nas colestases intra e extra - hepáticas.

Componentes do kit

Número 1 - Substrato - conservar entre 2 e 8 °C. Contém: NADH 0,18 mmol/L, LDH 1200 U/L, L Alanina 500 mmol/L, Tampão Tris 100 mmol/L, pH - 7,8, Azida sódica 15,38 mmol/L.

Número 2 - Coenzima - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: NADH 0,18 mmol/L, Alfa Cetogluturato 15 mmol/L.

Procedimento:

Preparação do Reagente de Trabalho

Misturar 9 partes do Reagente nº 1 com uma parte do Reagente nº 2. O Reagente de Trabalho é estável 72 horas entre 15 e 30 °C e 14 dias entre 2 e 8 °C.

Procedimento Manual

1. É condição indispensável o uso de cubeta termostaticada a 37 °C e leitura em 340 nm (334 - 365).

2. Adicionar 100 µL de amostra a 1,0 mL do Reagente de Trabalho, misturar e transferir para cubeta termostaticada à 37 °C e esperar 1 minuto.

3. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

4. Calcular a média das diferenças de absorvância por minuto ($\Delta A/\text{min.}$) e utilizar para cálculo do resultado.

Cálculos (Os resultados serão expressos em U/L).

ALT (U/L) 340 nm = $\Delta A/\text{min.} \times 1746$

334 nm = $\Delta A/\text{min.} \times 1780$

365 nm = $\Delta A/\text{min.} \times 3235$

Valores de Referência

Os valores de referência em U/L para o presente método foram obtidos através da determinação de ALT em populações sadias do sexo masculino e feminino.

Soro ou Plasma: 10 a 40 U/L a 37 °C

Observe: Estes valores devem ser usados como orientação, sendo que cada laboratório deverá criar sua faixa de valores de referência, de acordo com a população atendida.

14.2 Determinação cinética de aspartato aminotransferase (AST) ou transaminase glutâmico oxaloacética (TGO)

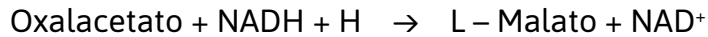
Princípio de ação

Determinação cinética (UV) da AST segundo a reação:

AST

L - Aspartato + α - Cetogluturato \rightarrow Oxalacetato + L - Glutamato

MDH



A AST catalisa a transferência de grupos amina do aspartato para o α - Cetogluturato, levando à formação de Glutamato e Oxalacetato. O Oxalacetato em presença do MDH reage com o NADH, reduzindo-se a Malato e o NADH oxida-se a NAD⁺. A velocidade de oxidação é proporcional à atividade da AST na amostra.

Aplicação clínica

O aumento da atividade das enzimas Aspartato Amino Transferase - AST (de localização citomitocondrial) e, Alanina Amino Transferase - ALT (de origem citoplasmática) refletem alterações de vários tecidos. AST - Esta enzima encontra-se em alta concentração no coração, fígado, músculo esquelético, rins e pâncreas; sua atividade no plasma aumenta 6 a 8 horas após infarto do miocárdio, alcançando um pico em 24 a 48 horas, após o acometimento. Consideráveis aumentos ocorrem em hepatites virais, tóxicas, doenças necróticas hepáticas - 3 a 50 ou 100 vezes os valores de referência (VR), mononucleoses (20 vezes os VR), colestase intra-hepática (20 vezes os VR) e distrofias musculares (8 vezes os VR).

Componentes do kit

Número 1 - Substrato - conservar entre 2 e 8 °C. Contém: LDH 800 mmol/L, MDH 600 U/L, L-Aspartato 200 mmol/L, Tampão Tris 80 mmol/L, pH 7,8, Azida sódica 15,38 mmol/L.

Número 2 - Coenzima - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: NADH 0,18 mmol/L, Alfa Cetogluturato 12 mmol/L.

Procedimento:

Preparo do Reagente de Trabalho

Misturar 9 partes do Reagente n° 1 com uma parte do Reagente n° 2. O Reagente de Trabalho é estável 72 horas entre 15 e 30 °C e 14 dias entre 2 e 8 °C.

Procedimento Manual

1. É condição indispensável o uso de cubeta termostaticada a 37 °C e leitura em 340 nm (334 - 365).

2. Adicionar 100 µL de amostra a 1,0 mL do Reagente de Trabalho, misturar e transferir para cubeta termostaticada à 37 °C e esperar 1 minuto.

3. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

4. Calcular a média das diferenças de absorvância por minuto ($\Delta A/\text{min.}$) e utilizar para cálculo do resultado.

Cálculos (Os resultados serão expressos em U/L).

$$\text{AST (U/L) } 340 \text{ nm} = \Delta A/\text{min.} \times 1746$$

$$334 \text{ nm} = \Delta A/\text{min.} \times 1780$$

$$365 \text{ nm} = \Delta A/\text{min.} \times 3235$$

Valores de Referência

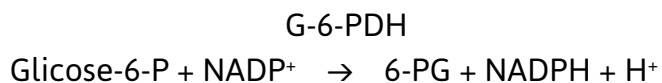
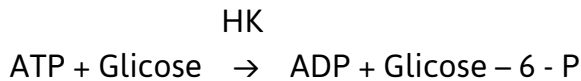
Os valores de referência em U/L para o presente método foram obtidos através da determinação de ALT em populações sadias do sexo masculino e feminino.

Soro ou Plasma: 5 a 38 U/L a 37 °C

Observe: Estes valores devem ser usados como orientação, sendo que cada laboratório deverá criar sua faixa de valores de referência, de acordo com a população atendida.

14.3. Determinação cinética da Creatina Quinase (CK).

Princípio de ação



Legenda:

CK – Creatina Quinase

HK- Hexokinase

G-6-PDH- Glicose- 6-fosfato-desidrogenase

6-PG – 6-fosfogluconato

Observação: A velocidade da redução do NADP^+ a NADPH é proporcional à atividade do CK na amostra.

Aplicação clínica

Os valores de CK estão elevados em presença de lesões musculares como no infarto do miocárdio. Em seguida ao infarto, a concentração sérica desta enzima eleva-se rapidamente (3 a 6 horas), alcança um pico máximo após 12 a 24 horas e permanece elevada por um período curto de 2 a 3 dias. Outras fontes potenciais de elevação da CK total são: hipotireoidismo, doença muscular (miopatias, polimiosite), acidente vascular cerebral, convulsões, cateterismo cardíaco, politraumatismo, exercício físico intenso, imobilização prolongada.

Componentes do kit

Número 1 - Enzima - Substrato - conservar entre 2 e 8°C.

Contém: Glicose 6 Fosfato desidrogenase 2000 U/L, Creatina Fosfato 30 mmol/L, ADP 2 mmol/L, AMP 5 mmol/L, Diadenosina pentafofato 10 mmol/L.

Número 2 - Tampão - conservar entre 2 e 8°C.

Contém: Acetato de Imidazol (pH 6,7) 100 mmol/L, Glicose 20 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, NADP^+ 2 mmol/L, Hexoquinase 3500 U/L, Acetato de Magnésio 10 mmol/L, N-acetilcisteína 20 mmol/L.

Procedimento:

Preparação do Reagente de Trabalho

Misturar 1 parte do reagente nº 2 com 4 parte do reagente nº 1. Estável durante 2 dias nas temperaturas de 15 a 30° C e 15 dias de 2 a 8° C.

Procedimento Manual

1. É condição indispensável o uso de cubeta termostatzada a 37 °C e leitura em 340 nm (334 - 365).

2. Adicionar 20 µL de amostra a 1,0 mL do Reagente de Trabalho, misturar e transferir para cubeta termostatzada à 37 °C e esperar 2 minutos.

3. Fazer a leitura inicial, disparando o cronômetro. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

4. Calcular a média das diferenças de absorbância por minuto ($\otimes A/\text{min}$) e utilizar este valor para cálculo do resultado.

Cálculos

$$\text{CK (U/L) 340 nm} = \otimes A/\text{min} \times 8095$$

Valores de Referência

Os valores de referência, para o presente método, foram obtidos através da determinação de CK em populações sadias do sexo masculino e feminino.

	<u>25 °C</u>	<u>30 °C</u>	<u>37 °C</u>
Homens:	10-80 U/L	15-130 U/L	24-195 U/L
Mulheres:	10-70 U/L	15-110 U/L	24-170 U/L

Observe: Estes valores devem ser usados como orientação, sendo que cada laboratório deverá criar sua faixa de valores de referência, de acordo com a população atendida.

Responda:

1. Nas reações da prática 1 e 2, houve redução ou oxidação do NADH?
2. O que você entende por atividade enzimática e reação enzimática?
3. Por que, se modificarmos o comprimento de onda, os fatores de multiplicação mudam também nas reações 1 e 2?
4. Na reação da prática 3, houve redução e oxidação do NADPH?
5. Por que há valores diferenciados por temperatura, para a referência da CK?
6. Nas reações 1 e 2, está sendo quantificado o consumo do NADH ou a formação do NAD⁺? E na reação 3, está sendo quantificado o consumo de NADP⁺ ou a formação de NADPH?

Referências

ALBERICI, R.M., PONTES, F.F.F. de. Reciclagem de óleo comestível usado através da fabricação de sabão – Espírito Santo do Pinhal: Eng Ambiental, Vol.1 No.1 pg 73-6, 2004.

BALDASSO, E., PARADELA, A.L., HUSSAR, G.J. Reaproveitamento do óleo de fritura na fabricação de sabão – Espírito Santo do Pinhal: Eng Ambiental, Vol.7 No.1 pg 216-28, 2010.

BERGMEYER HU. **Methods of Enzymatic Analysis**, 3^a. edição, Vol VI, Deerfield Beach: VCH, 1986.

CISTERNAS, J. R., MONTE, O., VARGA, J. **Fundamentos de bioquímica experimental**. 2. ed. São Paulo: Atheneo, 2001. 276p

DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 6. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2007. 1186p.

DICK, T. **Introdução à Bioquímica** – Práticas I. Editora Meridional "EMMA". 2ª Ed., 1971.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: SARVIER, 2006.

NEPOMUCENO, M.F; RUGGIERO, A.C. **Manual de Bioquímica: Roteiros de Análises Bioquímicas Qualitativas e Quantitativas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2004.

REMÃO, J.O.R.; SIQUEIRA, A.J.S.; AZEVEDO, PONZIO A.M. **Bioquímica: Guia de Aulas práticas**. PUCRS: Porto Alegre, 2003.

SOARES, B.G.; SOUSA, N.A.; PIRES, D.X. **Química orgânica: teoria e técnicas de preparação, purificação e identificação de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro, Guanabara. 1988.

CAPÍTULO V

HEMATOLOGIA

Adriane Pozzobon

Geórgia Muccillo Dexhmeier

Welton Lüdtko

O sangue é um tecido fluido que circula dentro dos vasos do sistema circulatório. É composto por 55% de plasma e 45% de células. O plasma é a porção fluida do sangue não coagulado, constituído por proteínas, fatores de coagulação, água, moléculas orgânicas, minerais e íons. As células presentes no sangue dividem-se em três grandes grupos: glóbulos vermelhos, hemácias ou eritrócitos; glóbulos brancos ou leucócitos; e plaquetas ou trombócitos.

Os glóbulos vermelhos são células pequenas, arredondadas e apresentam formato de disco bicôncavo e não apresentam núcleo. São as células de maior quantidade do sangue. Quando liberadas no sistema sanguíneo, podem circular por até 120 dias. Nestas células encontra-se a proteína hemoglobina, que além de conferir a coloração específica, tem a função de transportar oxigênio e gás carbônico, ou seja, realizar as trocas gasosas.

Os glóbulos brancos são células envolvidas no sistema imune do organismo. São diferenciados em polimorfonucleares, compreendendo os neutrófilos (bastonetes e segmentados), eosinófilos, basófilos, e mononucleares, compreendendo os linfócitos e monócitos. As plaquetas ou trombócitos são pequenos fragmentos anucleados que participam do processo de coagulação sanguínea.

Pode-se ainda, separar o soro do sangue, que corresponde à porção líquida após o processo de coagulação sanguínea. Nesta fração, são encontrados sais minerais, lipídeos, vitaminas, glicídios, proteínas, hormônios, produtos anabólicos e catabólicos. Porém, diferentemente do plasma, não se pode encontrar a maioria dos fatores de coagulação.

1. PRÁTICA: Contagem de hemácias em câmara de Neubauer

Tem por objetivo realizar a contagem global das hemácias para evidenciar alterações patológicas como policitemias e anemias.

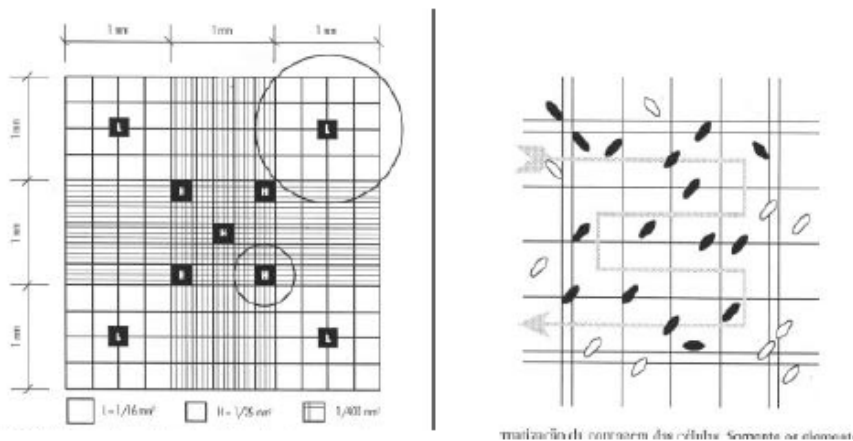
Materiais:

- Solução fisiológica 0,85% ou líquido de Hayen;
- Tubo de ensaio;
- Pipetas;
- Ponteiras;
- Papel absorvente;
- Tubos eppendorf;
- Câmara de Neubauer;
- Lamínula;
- Luvas;

- Jaleco;
- Amostra de sangue em tubo com EDTA;
- Microscópio

Procedimentos:

1. Pipetar 3,98mL de solução fisiológica 0,85% em um tubo de ensaio;
2. Transferir 0,02mL de sangue para o tubo de ensaio limpando a parede externa da ponteira com um papel absorvente e lavando o interior da ponteira por aspiração e expulsão do líquido. Desta forma tem-se uma diluição de 1:200.
3. Agitar suavemente por inversão.
4. Com o auxílio de uma pipeta, preencher o retículo da câmara de Neubauer evitando o extravasamento de líquido e bolhas sob a lamínula aderida à câmara.
5. Deixar repousar por 2 minutos.
6. Observar em microscópio óptico com aumento de 400X.
7. Fazer a contagem de todas as hemácias encontradas nos quadrantes dos cantos e o central (ver figura abaixo).



Fonte: <http://www.aa.med.br/upload/biblioteca/Manual%20de%20Hematologia.pdf>

Cálculo: Hemácias por μL de sangue = hemácias x 5 x 10 x 200.

Os resultados são em mm^3 .

Valores de Referência :

Homens: 4,5 a 5,5 milhões/ mm^3

Mulheres; 4,0 a 5,0 milhões/ mm^3

Recém-nascidos: 5,5 a 7,0 milhões/ mm^3

Dica: Valores aumentados são encontrados em policitemias e valores diminuídos em anemias. Esta prática oferece grande variabilidade de erros, sendo preferível a contagem em aparelhos automatizados.

2. PRÁTICA: Determinação do Microhematócrito

Esta prática serve para a determinação do volume ocupado pelas hemácias em um volume de sangue total. Valor expresso em percentual.

Materiais:

- Amostra sanguínea com EDTA;
- Agitador hematológico;
- Centrifuga de microhematócrito;
- Capilar de microhematócrito;
- Bico de Bunsen;
- Régua para microhematócrito;
- Luvas;
- Jaleco

Procedimentos:

1. Homogeneizar a amostra sanguínea em agitador hematológico por pelo menos 5 minutos.
2. Preencher no mínimo 2/3 do capilar com o sangue homogeneizado.
3. Limpar o lado externo do capilar para não ficar resíduo de sangue.
4. Fechar uma das pontas do capilar com o auxílio do bico de Bunsen, confirmar se está corretamente fechada, invertendo o capilar. O sangue não poderá mover-se.
5. Colocar o capilar na centrifuga de microhematócrito com a ponta fechada voltada para a periferia da centrífuga.
6. Colocar os demais capilares, de tal forma que a centrifuga fique equilibrada;
7. Ligar a centrifuga e programa-la para centrifugar as amostras a 11.000 rpm durante 5 minutos.
8. Efetuar a leitura das amostras na régua apropriada.

Valores de referência: Homens 40 a 52%, Mulheres 37 a 47%.

Índices hematológicos ou hematimétricos são determinados a partir da contagem global dos eritrócitos, taxa de hemoglobina e determinação do hematócrito. Tais elementos deverão ser padronizados pelo laboratório, fornecendo-se sempre resultados na unidade de percentagem do normal.

Temos:

1. Volume corpuscular médio (VCM): É o volume médio das hemácias expresso em fentolitros. Representa, portanto, o quociente de um determinado volume de hemácias pelo número de células contidas no mesmo volume. Calculado pela fórmula:

$$\text{V.C.M.} = \frac{\text{Hematócrito}}{\text{Eritócitos}} \times 10$$

2. Hemoglobina corpuscular média (HCM): É o conteúdo médio de hemoglobina nas hemácias expresso em picogramas. Representa, portanto, o quociente de conteúdo

de hemoglobina em um determinado volume de hemácias pelo nº de células contidas no mesmo volume. Calculado pela fórmula:

$$\text{H.C.M} = \frac{\text{Hemoglobina}}{\text{Eritrócitos}} \times 10$$

3. Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM): É a percentagem de hemoglobina em 100 mL de hemácias. Calculada pela fórmula:

$$\text{C.H.C.M} = \frac{\text{Hemoglobina}}{\text{Hematócrito}} \times 100$$

4. Amplitude de distribuição dos eritrócitos -RDW / (red blood cell distribution width): É um subproduto da medida eletrônica do volume dos eritrócitos; ou seja, só pode ser detectado por equipamento automatizado. O seu valor normal está entre 11 e 14 %. Valores encontrados abaixo do normal indicariam hemácias mais homogêneas. Valores acima de 14 indicam excessiva heterogeneidade da população (anisocitose) sendo notada durante o exame direto no microscópio.

A tabela abaixo apresenta algumas condições em que os índices hematológicos estão alterados:

Tipo de Anemia	VCM	CHCM
Macroscítica normocrômica	>98	32 a 35
Normocítica normocrômica	80 a 98	32 a 35
Microscítica normocrômica	< 80	32 a 35
Microscítica Hipocrômica	< 80	27 a 32

3. PRÁTICA: Dosagem de hemoglobina método da cianometemoglobina

A hemoglobina (Hb) é a proteína presente em abundância no interior da hemácia. Seu percentual é reduzido em anemias e pode ter sua conformação alterada devido à combinação com outros compostos. A molécula de Hb é formada por uma parte proteica constituída de quatro cadeias de globina e uma parte não proteica que contém o íon ferro denominada grupo heme. O íon ferro se combina de maneira reversível ao oxigênio, e assim cada molécula de hemoglobina pode carregar quatro moléculas de oxigênio. O princípio da prática descrita abaixo se deve à formação de metahemoglobina em combinação com o ferrocianeto e posterior combinação com o cianeto para formação da cianometahemoglobina. É feita a leitura da absorbância no espectrofotômetro e a absorbância desenvolvida é diretamente proporcional à concentração de hemoglobina na amostra.

Materiais:

- Sangue total colhido com EDTA 0,2%. O conteúdo hemoglobínico no sangue será estável por sete dias a 4°C;
- Reativo de cor (concentrado): Reagente composto por: Ferrocianeto de potássio, cianeto de potássio, tampão e tensoativo. **CUIDADO: Tóxico!**
- Padrão: Solução de cianeto de hemoglobina, equivalente a 10 g/dL de hemoglobina, na metodologia utilizada;

- Água destilada;
- Espectrofotômetro com filtro para 540 nm, ou filtro verde;
- Luvas;
- Jaleco;
- Tubos de ensaio;
- Pipetas;
- Ponteiras

Procedimentos:

1. Diluir o reativo de cor (concentrado) para 1.000mL com água destilada. Se o volume desejado for menor, dilua o concentrado na proporção de 1:100. Manter sob refrigeração (4°C) e ao abrigo da luz.
2. Homogeneizar, repousar 5 minutos em temperatura ambiente e proceder às leituras de absorvância, acertando o zero com água destilada. Preparar o padrão e a amostra teste conforme tabela abaixo:

Tabela para preparo das amostras a serem dosadas:

	Padrão	Teste
Reagente de trabalho	5,0 mL	5,0mL
Padrão	0,02 mL	-
Amostra	-	0,02 mL

3. Proceder à leitura da absorvância da solução padrão em 540 nm ou filtro verde (520-550 nm), acertando o zero com água destilada. O padrão está pronto para uso, portanto não deverá ser diluído com o reagente de trabalho.
4. Anotar os valores das absorvâncias e aplicar na fórmula abaixo:

$$\text{Concentração amostra} = \frac{\text{Abs. Amostra}}{\text{Abs. padrão}} \times \text{Concentração do padrão}$$

Valores de referência: Homens 13,5 a 18 g/dL; Mulheres 11,5 a 16 g/dL

Observação: esta dosagem também pode ser feita em equipamento automatizado para hematologia.

Algumas situações que podem aparecer:

Pecilocitose ou poiquilocitose: presença de formas anormais dos eritrócitos. Deve ser sempre mencionado quando observado na lâmina. Entre as formas anormais temos: Eliptócitos ou ovalócitos (eritrócitos ovais, elípticos), Estomatócitos (eritrócitos cuja membrana retraiu-se em cúpula), Esferócitos (eritrócitos praticamente esféricos), Drepanócitos ou eritrócitos falciformes (eritrócitos em forma de foice, devido á hemoglobina S), Hemácias em alvo (eritrócitos mais delgados que o normal que, quando corados, exibem uma borda periférica de hemoglobina com uma área central escura), Equinócitos (ou hemácias crenadas), Esquizócitos: (pedaços de eritrócitos cortados pelo trauma).

Macrocitose: É a elevação do VCM acima de 98 fL. Geralmente acompanha uma população normocítica ou microcítica concomitante; ou quando o VCM estiver acima

de 110 fL. Geralmente presente no alcoolismo, uso de antiretrovirais como o AZT, anemia aplásica, doenças do fígado e esplenectomia e também na anemia megaloblástica.

Microcitose: É a diminuição do VCM abaixo de 80. Ela indica uma capacidade diminuída dos precursores das hemácias de produção de hemoglobina. Isto pode resultar de ferro insuficiente como na anemia ferropriva.

Hipocromia: É a redução da coloração do eritrócito retratada com um aumento da palidez central, que ocupa a área superior ao terço do diâmetro do eritrócito. A hipocromia pode ser geral ou pode existir em algumas células do paciente.

4. PRÁTICA: Contagem de reticulócitos

Os reticulócitos são células precursoras das hemácias, os quais apresentam em sua constituição uma ribonucleoproteína que não apresenta afinidade pelos corantes comuns. Este teste permite avaliar a produção dos glóbulos vermelhos. Em geral estão aumentados e situações como: drepanocitose, eritroblastose fetal, anemia aguda pós-hemorrágica, anemia hemolítica autoimune adquirida, hemoglobinúria paroxística noturna e resposta terapêutica satisfatória nas anemias carenciais. Dentre as causas de diminuição temos: anemia aplástica, crise aplástica de anemia hemolítica e anemias megaloblásticas.

Materiais:

- Amostra de sangue em tubo com EDTA;
- Pipeta automática 50µL;
- Ponteiras;
- Banho Maria 37° C;
- Agitador hematológico;
- Lâminas;
- Luvas;
- Jaleco;
- Tubo vidro com tampa para diluição e homogenização;
- Capilar de microhematócrito;
- Microscópio;
- Corante Azul de Cresil brilhante

Procedimentos:

1. Homogeneizar a amostra sanguínea em agitador hematológico por pelo menos 5 minutos.
2. Três gotas de sangue são misturadas com três gotas de azul de Cresil brilhante em um tubo.
3. Homogeneizar bem e incubar a 37° C durante 30 minutos.
4. Retirar do banho-maria, homogeneizar bem e confeccionar extensões sanguíneas (esfregaços em lâmina)

5. Observar ao microscópio óptico no aumento de 1.000X com óleo de imersão e contar em pelo menos 10 campos com 100 eritrócitos, anotando o número de reticulócitos contados. Calcular a porcentagem de reticulócitos para expressar o resultado.

Número de Reticulócitos em 10 campos = % de reticulócitos

10

Dica: Se houver necessidade a lâmina pode ser corada com o corante usual da hematologia, melhorando a visualização. **Valores de referência: entre 0,5 e 1,5%**

5. PRÁTICA: Velocidade de Hemossedimentação (VHS)

Avaliação do grau de sedimentação espontânea dos glóbulos vermelhos em uma amostra de sangue durante um período estabelecido de tempo. Auxilia na indicação de doenças inflamatórias e malignas. O princípio se baseia no fato que como o plasma é menos denso, favorece a sedimentação dos glóbulos pela ação da gravidade, quando colocados numa pipeta graduada chamada de pipeta de Westergren.

A sedimentação possui velocidade variável em função da concentração de proteínas plasmáticas, do tamanho e forma das hemácias e alterações elétricas do plasma e dos glóbulos. É um teste de laboratório usado rotineiramente, simples e de baixo custo geralmente empregado como marcador de resposta inflamatória. Todavia, o exame apresenta à baixa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico preciso, devendo ser associado a outros parâmetros e exames.

Materiais:

- Amostra de sangue em tubo com EDTA;
- Pipeta de Westergren;
- Agitador hematológico;
- Lâminas;
- Luvas;
- Jaleco;
- Cronômetro

Procedimentos:

1. Amostra de 5 mL de sangue em frasco com EDTA. **Note:** o sangue deve ser coletado em jejum de pelo menos 8h.
2. Agitar o tubo;
3. Com pipeta de Westergren aspirar sangue até exatamente a marca zero.
4. Colocar a pipeta no suporte de modo a permanecer na posição vertical
5. Marcar o tempo no cronômetro (60 minutos).
6. Realizar a leitura em milímetros após o tempo esgotado, ao nível da separação do plasma e hemácias.

Valores de referência:

> 50 anos: Homens até 15 mm/hora, mulheres até 20 mm/hora.

50 a 85 anos: Homens até 20 mm/hora, mulheres até 30 mm/hora.

< 85 anos: Homens até 30 mm/hora, mulheres até 42 mm/hora.

Observe:

Alguns erros analíticos podem acelerar a VHS levando a resultados falso-positivos. A inclinação do tubo provoca separação do plasma e das hemácias, o que promove a formação de rouleaux e aumento da sedimentação. Uma inclinação de apenas 3° pode provocar aumento de até 30% na VHS.

Uma concentração de anticoagulante maior que a recomendada e temperatura ambiente elevada (>25°C), também aumentam a VHS.

O uso de medicamentos, especialmente heparina e contraceptivos orais, é, também, capaz de aumentar a VHS.

6. PRÁTICA: Contagem de leucócitos

Os leucócitos são as células menos abundantes, envolvidos no sistema de defesa do organismo contra doenças e infecções. São transportados pelo sangue para todo o corpo, a partir da medula óssea, onde são formados. Normalmente existem cerca de 4.000 a 10.000 leucócitos por milímetro cúbico de sangue em adultos. O leucograma corresponde a contagem global e específica dos leucócitos em câmara de Neubauer para evidenciar alterações patológicas.

Materiais:

- Amostra de sangue com EDTA;
- Pipetas automáticas;
- Ponteiras;
- Papel absorvente;
- Câmara de Neubauer;
- Lamínula;
- Luvas;
- Jaleco;
- Agitador hematológico;
- Tubo vidro com tampa para diluição e homogeneização;
- Capilar de microhematócrito;
- Líquido de Turk;
- Microscópio.

Procedimentos:

1. Homogeneizar a amostra sanguínea em agitador hematológico por pelo menos 5 minutos.
2. Diluir a amostra 1:20 (50µL da amostra + 0,95 mL Líquido de Turk).
3. Homogeneizar em agitador mecânico por 5 minutos a diluição para lise dos eritrócitos.

4. Cobrir a Câmara de Neubauer com lamínula.
5. Com o auxílio de um tubo capilar retirar a solução diluída e com a ponta do capilar tocar na ranhura entre a câmara e a lamínula nas duas extremidades, o líquido por capilaridade preencherá o espaço, não deixar transbordar ou criar bolhas.
6. Deixar as células na câmara em repouso por 5 minutos.
7. Contar os quatro quadrantes laterais da câmara dos dois lados, utilizando objetiva de 10X e diafragma parcialmente fechado.

Dica: Para evitar confusão na contagem de células que ficam nas linhas divisórias, proceder da seguinte maneira: As células que tocam qualquer uma das três linhas ou a linha única da esquerda, ou no topo das divisórias dos quadrados pequenos devem ser contadas como se estivessem dentro dos quadrados, mas as linhas que tocam qualquer das linhas à direita e em baixo das divisórias, não devem ser contadas.

Cálculo:

$$\text{Leucócitos por mm}^3 = \frac{\text{N}^\circ \text{ leucócitos contados na câmara}}{\text{N}^\circ \text{ quadrados grandes contados}} \times \text{diluição} \times 10$$

O número 10 corresponde ao fator que transforma o valor de um quadrado grande (1/10mm³) para o volume em mm³

Valores de referência adulto: 4.000 a 10.000 mm³

7. PRÁTICA: Contagem diferencial de leucócitos

Consiste na contagem de 100 leucócitos em esfregaço sanguíneo diferenciando-os de acordo com suas variedades morfológicas. Importante para determinação do processo infeccioso e do agente envolvido, bem como para avaliação de leucemias e linfomas.

Materiais:

- Amostra de sangue com EDTA;
- Pipetas automáticas;
- Ponteiras;
- Papel absorvente;
- Lamínula;
- Lâmina;
- Luvas;
- Jaleco;
- Agitador hematológico;
- Capilar de microhematócrito;
- Corante Panótico;
- Microscópio.

Procedimentos:

1. Com um tubo capilar colocar uma gota de sangue na extremidade de uma lâmina histológica limpa;
2. Utilizando-se de outra lâmina histológica, fazer corretamente o esfregaço deixando uma película de sangue sobre a lâmina; proceder da seguinte forma:
 - Segurar a lâmina, contendo a gota de sangue, com os dedos polegar e indicador da mão esquerda;
 - Inclinar outra lâmina histológica a 45°, segurando com os dedos polegar e indicador, da mão direita. Levar a lâmina inclinada até o início da gota de sangue;
 - Quando a lâmina toca na gota, o sangue escorre em seu bordo. Nest ponto deve-se fazer voltar a lâmina inclinada para trás, formando-se a película de sangue.
 - Deixar a lâmina secar ao ar ambiente antes de proceder a coloração.
3. Realizar a coloração com o corante panótico, lavar em água corrente após a coloração e deixar secar.
4. Analisar ao microscópio ótico no aumento de 1.000X para observação da morfologia celular.
5. Feito isto, iniciar a contagem diferencial dos leucócitos com o aumento de 400X, conforme técnica abaixo até contar 100 células.
6. Após a contagem, determinar a contagem absoluta destes leucócitos, através de regra de três simples.

Por exemplo: A contagem total de leucócitos foi de 10.000 por mm^3 e a contagem diferencial de linfócitos foi de 30%, então a contagem absoluta de linfócitos é de 3.000 por mm^3 .

Observação: *Se forem observadas células anormais, estas devem ser analisadas com objetiva de 100.*

Dica: *Durante a contagem diferencial, também podemos realizar uma avaliação da contagem total de leucócitos e plaquetas, mesmo sendo grosseira, muitas vezes permite detectar erros na contagem total.*

Algumas alterações na contagem de leucócitos:

Neutrocitose ou Neutrofilia: aumento dos neutrófilos. Pode ser provada por: neutrofilia hereditária, infecções bacterianas agudas e crônicas, algumas infecções virais como varicela, herpes simples, raiva, poliomielite; algumas infecções fúngicas como a actinomicose; algumas parasitoses, como amebíase hepática, a filariase. Também ocorre por dano tecidual como trauma, cirurgia, queimaduras, infarto agudo do miocárdio, infarto pulmonar, inflamação aguda e crônica grave (gota, febre reumática, artrite reumatoide). Também ocorre em leucemias e síndromes mieloproliferativas ou pela administração de drogas como corticóides, lítio, intoxicações por agentes químicos, envenenamentos por picada de insetos etc.

Neutropenia ou Neutrocitopenia: diminuição do número de neutrófilos; pode ser um fenômeno isolado ou fazer parte de uma pancitopenia. São causas de neutropenia: agranulocitose, infecções virais, dengue, infecção pelo HIV, infecções bacterianas como febre tifóide, brucelose, infecções por protozoários como a malária, irradiação, anemia megaloblástica e anemia aplástica, alcoolismo, hipertireoidismo.

Eosinofilia: aumento do número de eosinófilos, geralmente causado por doenças alérgicas, hipersensibilidade medicamentosa, infecções parasitárias e doenças cutâneas. Ainda pode ocorrer eosinofilia na leucemia mielóide crônica.

Eosinopenia: redução do número de eosinófilos, geralmente causada por estresse agudo, incluindo trauma cirúrgico, queimaduras, convulsões, inflamação aguda, drogas incluindo os corticóides.

Linfocitose: aumento do número de linfócitos. Bebês e crianças possuem normalmente contagem mais elevada. Pode ocorrer devido a infecções virais, esplenectomia, reações alérgicas a drogas e na leucemia linfóide.

Linfopenia: redução do número de linfócitos. É comum como parte da resposta aguda ao estresse. Pode ocorrer devido à insuficiência renal incluindo aguda e crônica, carcinomas, AIDS, estágio final da doença, artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico.

Monocitose: aumento do número de monócitos. Em recém-nascidos é comum ter monocitose. São causas de monocitose: infecção crônica, como a sífilis, condições inflamatórias crônicas, carcinoma, condições leucêmicas e mieloproliferativas, leishmaniose, hanseníase, tuberculose.

Basofilia: É comum observar um aumento acentuado nas contagens de basófilos nas doenças mieloproliferativas, em algumas leucemias e em choque anafilático.

8. PRÁTICA: Contagem de plaquetas

As plaquetas são fragmentos celulares de pequeno tamanho, e por isso possuem tendência a aderir a superfícies estranhas ao endotélio vascular para formação de coágulo, com posterior desintegração. Desta forma, a contagem de plaquetas não é fácil. Ela pode ser feita por métodos diretos e indiretos. O método direto é feito em câmara de Neubauer, e o método indireto (de Fônio) plaquetas são contadas no esfregaço. A contagem global da quantidade de plaquetas é importante para evidenciar doenças hemorrágicas ou leucemias.

8.1. PRÁTICA: Contagem direta pela câmara de Neubauer (método de Rees-Ecker)

Materiais:

- Tubo de vidro com tampa para diluição e homogeneização;
- Pipetas;
- Ponteiras;
- Papel absorvente;
- Agitador hematológico;
- Câmara de Neubauer;
- Lamínula;
- Luvas;
- Jaleco;

- Amostra de sangue em tubo com EDTA;
- Microscópio
- Capilar de microhematócrito
- Líquido de Staven.

Procedimentos:

1. Homogeneizar a amostra sanguínea em agitador hematológico por pelo menos 5 minutos.
2. Diluir a amostra 1:200 (10 µL da amostra + 2 mL do Líquido de Staven)
3. Homogeneizar em agitador mecânico por 5 minutos a diluição para lise dos eritrócitos.
4. Cobrir a Câmara de Neubauer com lamínula.
5. Com o auxílio de um tubo capilar retirar a solução diluída e com a ponta do capilar tocar na ranhura entre a câmara e a lamínula nas duas extremidades, o líquido por capilaridade preencherá o espaço, não deixar transbordar ou criar bolhas.
6. Sedimentar as plaquetas, repousando a preparação por 30 minutos em uma placa de Petri, contendo um pedaço de algodão umedecido em água (câmara úmida) e em local isento de vibrações;
7. Fazer a contagem no microscópio com aumento de 400X, conforme indicado para hemácias.

Cálculo:

Número de plaquetas por mm^3 = Número de plaquetas contados x 10 x 200

10= Fator da câmara

200= Fator de diluição

Valores de referência adulto: 140.000 a 440.000 μL

8.2. PRÁTICA: Contagem de plaquetas em esfregaço sanguíneo pelo método de Fônio

Baseia-se na contagem de plaquetas no esfregaço sanguíneo, sendo possível também a visualização de leucócitos e hemácias. Defeitos qualitativos das plaquetas, como formas gigantes e bizarras, são identificados.

Materiais:

- Lâmina;
- Papel absorvente;
- Agitador hematológico;
- Luvas;
- Jaleco;
- Amostra de sangue em tubo com EDTA;
- Microscópio
- Capilar de microhematócrito

- Coloração May-Grunwald-Giemsa

Procedimentos:

1. Preparar uma lâmina de esfregaço, como descrito anteriormente;
2. Realizar a coloração de May-Grunwald-Giemsa;
3. Secar e observar ao microscópio no aumento de 100x com óleo de imersão;
4. Contar mil hemácias e, ao mesmo tempo, as plaquetas encontradas, anotando seu número. A contagem é realizada em vários campos sucessivos seguindo linhas longitudinais em relação à lâmina.
5. Realizar a contagem de hemácias em câmara de Neubauer, conforme descrito anteriormente para aplicar na fórmula.

Cálculo:

$$\text{Plaquetas por microlitro de sangue} = \frac{\text{N}^\circ \text{ P contadas} \times \text{Contagem total de Hm (microlitro)}}{\text{N}^\circ \text{ Hm contadas}}$$

Onde:

P = Plaquetas

Hm = Hemácias

Valores de referência: 140.000 a 440.000 μL

Observe: A trombocitopenia é a redução nas plaquetas abaixo de 150.000, ela pode ocorrer pela formação deficiente de plaquetas ou pela destruição aumentada de plaquetas na circulação e no baço. Um aumento do número de plaquetas é denominado trombocitose, e correlaciona-se com formação de trombos intravasculares.

9. PRÁTICA: Coagulação

Hemostasia é obtida por uma série de interações complexas pelos quais o sangue é mantido fluido no sistema vascular; desta forma são prevenidos processos hemorrágicos espontâneos e contidos sangramentos traumáticos. A hemostasia depende da resistência dos vasos, da atividade plaquetária normal, de um sistema adequado de coagulação e da estabilidade do coágulo. Com o processo de coagulação do sangue é obtido um coágulo sólido de fibrina através da interação de plaquetas, fatores plasmáticos, seus inibidores e ativadores. Quando ocorre a ruptura de um vaso, imediatamente ocorre vasoconstrição reflexa reduzindo o fluxo sanguíneo local. Posteriormente, ocorre a adesão plaquetária e agregação, ocorrendo a formação do tampão hemostático. Em conjunto ocorre a ativação da protrombina, através das vias de coagulação (extrínseca e intrínseca) e a protrombina é convertida em trombina que atua sobre o fibrinogênio para formar a rede de fibrina e conseqüentemente a formação de um coágulo sólido. Finalmente ocorre a dissolução do coágulo e o reestabelecimento do fluxo sanguíneo normal.

A avaliação laboratorial das vias de coagulação é importante no diagnóstico de doenças que podem provocar hemorragias

9.1. Determinação do Tempo de Protrombina (TP)

O TP mede a via extrínseca de coagulação, prolongando-se nas deficiências seletivas ou conjuntas dos fatores de coagulação (II, V, VII e X) ou podem estar alterados em hepatopatias e durante o tratamento com anticoagulantes orais. A técnica baseia-se no princípio de que se ao adicionar a tromboplastina ao plasma e ocorrendo a formação de coágulo, determina-se a atividade da protrombina no sangue.

Materiais:

- Amostra sanguínea com citrato de sódio 3,2 ou 3,8%;
- Pipeta automática 100µL;
- Pipeta automática 200µL;
- Ponteiras;
- Banho maria 37° C;
- Cronômetro;
- Tubo vidro;
- Reativo TP;
- Centrífuga;
- Luvas;
- Jaleco

Procedimentos:

1. Centrifugar a amostra durante 10 minutos a 2.000 rpm;
2. Aquecer a amostra e o reativo a 37°C;
3. Transferir 200 µL do reativo para um tubo;
4. Adicionar 100µL da amostra, disparar o cronômetro e homogeneizar;
5. Inverter o tubo constantemente até visualizar o início da coagulação, neste momento travar o cronômetro;
6. Anotar o tempo;
7. Calcular a atividade da protrombina, baseado na padronização e valores de referência do laboratório.

Valores de referência: 12 a 13 segundos

Dica: O TP é útil para o diagnóstico da coagulação intravascular disseminada. É usado para monitoramento do tratamento com varfarina. O seu tempo está prolongado em paciente em uso de varfarina, depleção do fibrinogênio e doenças hepáticas.

9.2. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPa)

Este teste avalia a via intrínseca de coagulação. A avaliação é semelhante à técnica de avaliação da TP. O tempo de tromboplastina parcial corresponde ao tempo gasto para ocorrer a coagulação do plasma recalcificado em presença de um fosfolípide ou tromboplastina parcial.

Materiais:

- Amostra sanguínea com citrato de sódio 3,2 ou 3,8%;
- Pipeta automática 100µL;
- Pipeta automática 200µL;
- Ponteiras;
- Banho maria 37° C;
- Cronômetro;
- Tubo vidro;
- Reativo TTPa;
- Centrífuga.
- Luvas;
- Jaleco;

Procedimentos:

1. Em um tubo de ensaio aquecido a 37° C colocar 0,1mL de plasma normal e 0,1mL do reativo TTPa (cefalina- caolin);
2. Agitar uma vez e incubar a 37° C por três minutos.
3. Após os 3 minutos, adicionar 0,1 mL da solução de cloreto de cálcio rapidamente e ao mesmo tempo acionar o cronômetro.
4. Agitar no banho por 25 segundos. Retirar o tubo do banho-maria e invertê-lo a cada segundo, observando o momento em que houver a coagulação. Neste instante parar o cronômetro. O tempo gasto em segundos para ocorrer a coagulação é o tempo de tromboplastina parcial.

Dica: O TTPa mede a via intrínseca de coagulação, prolongando-se nas hemofilias e na maioria das demais coagulopatias, com exceção das deficiências dos fatores VII e XII, também é utilizado para monitorar o tratamento com heparina.

Referências

BERNARD, J.J. **Manual de Hematologia**. São Paulo: 3ª ed. Masson do Brasil, 1986.

FAILACE, R. **Hemograma**: manual de interpretação. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995.

HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. Editora Manole, 1999.

LIMA; et al. **Métodos de laboratórios aplicados à clínica**. 7ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1992.

MELO, M.A.W., SILVEIRA, C.M. **Laboratório de hematologia: teorias, técnicas e atlas**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2015.

VIVAS, W.L.P. Manual prático de Hematologia. Disponível em: <<http://www.aa.med.br/upload/biblioteca/Manual%20de%20Hematologia.pdf>>.

CAPITULO VI

IMUNOLOGIA

Adriane Pozzobon

Andréa Horst

A imunologia é uma ciência recente, teve sua descoberta por volta de 1976 e revolucionou a área médica, pois surgiu, pela primeira vez, a intervenção no ser humano para prevenção de doenças, e não somente o tratamento, com o uso das vacinas.

O sistema imune é um conjunto de órgãos, tecidos, células e moléculas que o corpo humano utiliza para combater organismos e moléculas estranhas. Tem como função primária a defesa contra microrganismos infecciosos. Porém, moléculas não infecciosas, também podem ativar o sistema imunológico, como no caso de alergias ou até mesmo em transplantes. O sistema imune é composto por dois órgãos linfóides primários, local onde ocorre a produção e maturação das células do sistema imune que são, ossos chatos e epífises de ossos longos e o timo. E os órgãos e tecidos linfáticos secundários, onde ocorre a maior parte das respostas imunes que são: linfonodos, baço e nódulos linfáticos. As células do sistema imune são divididas inicialmente em dois grupos, as responsáveis pela imunidade inata, ou natural (Células NK) e as células que pertencem ao grupo da imunidade adquirida (Linfócitos B e Linfócitos T). Abaixo segue a tabela com o detalhamento dos tipos celulares:

TIPO CELULAR	FUNÇÃO	PERCENTAGEM DO TOTAL DE LINFÓCITOS		
		SANGUE	LINFONODO	BAÇO
Linfócitos T auxiliares	Estímulo para diferenciação de Linfócitos B Ativação de macrófagos	50-60	50-60	50-60
Linfócitos T citolíticos	Destruição de células infectadas por vírus, células tumorais, rejeição de transplantes	20-25	15-20	10-15
Linfócitos B	Produção de anticorpos	10-15	20-25	40-45
Células NK	Destruição de células infectadas por vírus, células tumorais, toxicidade celular dependente de anticorpos	10	Raro	10

Os exames laboratoriais sempre foram uma importante ferramenta para a definição de um diagnóstico mais preciso da presença, ou não, de uma determinada doença no ser humano. O anticorpo, devido a sua capacidade de ligar-se com grande especificidade ao antígeno e a sua fácil manipulação, tornou-se um instrumento importante, e hoje imprescindível, de diagnóstico laboratorial. Em um teste imunodiagnóstico é importante observar dois fatores essenciais para a obtenção de um resultado correto: a sensibilidade e a especificidade do teste. A sensibilidade diz respeito ao número de indivíduos efetivamente doentes que são detectados pelo teste diagnóstico. A sensibilidade está ligada a fatores como concentração do antígeno/anticorpo a ser detectado ou variabilidade imunogênica do organismo infeccioso. A especificidade refere-se ao número de indivíduos que efetivamente não têm a doença e que dão resultado negativo no teste. A especificidade está ligada às possíveis reações cruzadas. Testes imunodiagnósticos podem ser de dois tipos quanto ao resultado observado: qualitativo ou quantitativo. Nos testes qualitativos, a observação de um resultado positivo

ou não, depende da observação visual de uma reação. Alguns testes qualitativos podem ter uma natureza semi-quantitativa baseada em diluição de reagentes. Como exemplos temos, reações de precipitação ou aglutinação. Nos testes quantitativos, por outro lado, é possível medir um parâmetro determinado como concentração de anticorpos ou antígenos, número de células, intensidade de fluorescência.

1 PRÁTICA: Tipagem sanguínea (Sistema ABO)

Os grupos sanguíneos A, B e O foram descritos por Landsteiner em 1900 e em 1902 o grupo AB por De Costello e Starli. Os grupos sanguíneos são constituídos por antígenos que são a expressão de genes de origem materna e paterna. Quando um antígeno está presente, isto significa que o indivíduo herdou o gene de um ou de ambos os pais, e que este gene poderá ser transmitido à prole. Estes genes codificam glicoproteínas presentes na superfície das hemácias. O sistema ABO inclui o carboidrato H e duas variantes parecidas com estas, que se chamam A e B. Um indivíduo pode ser por isso A, B, AB ou O (se só tiver o carboidrato H). Cada indivíduo possui anticorpos específicos para os carboidratos que não possui, ou seja, um indivíduo A possui anticorpos anti-B, um indivíduo O possui anticorpos anti-B e anti-A, e um indivíduo AB não possui nenhum dos anticorpos. A importância do sistema ABO na prática transfusional está relacionada à gravidade das reações transfusionais hemolíticas devido à presença regular no plasma do receptor de anticorpos “naturais” contra os antígenos A e B..

Os genes ABO não codificam diretamente seus antígenos específicos, eles codificam as enzimas que tem a função de transportar os carboidratos específicos, e desta forma gerar os antígenos ABO. Um organismo que possua o tipo sanguíneo AB, possui uma cópia do gene A e uma do gene B, sendo um herdado da mãe e o outro do pai. Ele possui nos seus glóbulos vermelhos os antígenos A e B, seu genótipo é AB. No caso do grupo O, foi herdado do pai e da mãe o mesmo gene O. O gene O não produz antígeno perceptível. As células de grupo O são reconhecidas pela ausência de antígeno A ou B. Quando o gene O é herdado ao lado de A, apenas o gene A se manifesta; e se é herdado ao lado do gene B apenas o gene B se manifesta. Na prática laboratorial não é possível diferenciar os indivíduos BO e BB, e nem AO e AA. Os símbolos A e B, quando nos referimos a grupos, indicam fenótipos, enquanto que AA, BO etc. são genótipos. As pessoas de tipo AB não possuem anticorpos anti-A ou anti-B e assim, elas podem receber, por transfusão, sangue de qualquer tipo. Essas pessoas são chamadas de receptores universais e os portadores de sangue tipo O são doadores universais. Isso significa que eles podem doar sangue para qualquer pessoa, uma vez que suas hemácias não possuem antígenos. A tabela abaixo mostra a classificação do grupo sanguíneo conforme a presença/ ausência de antígenos e anticorpos.

TIPO SANGUÍNEO	AGLUTINOGENOS OU ANTIGENOS (NAS HEMÁCIAS)	AGLUTININAS OU ANTICORPOS (NO PLASMA)
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A e B	Nenhum
O	Nenhum	Anti-A e anti-B

A tipagem sanguínea do sistema ABO pode ser realizada através das provas direta e reversa. Na prova direta pesquisa-se os antígenos do sistema ABO que estão presentes nas hemácias do indivíduo, enquanto que, na prova reversa procura-se determinar os anticorpos do sistema ABO que estão presentes no soro ou no plasma do indivíduo.

Tipagem sanguínea direta em lâmina:

Materiais:

- Luvas;
- Jaleco;
- Lâminas escavadas;
- Pipetadores;
- Ponteiras;
- Algodão;
- Álcool 70%;
- Lanceta ou agulha estéreis;
- Kit contendo os soros Anti-A, Anti-B e Anti-AB

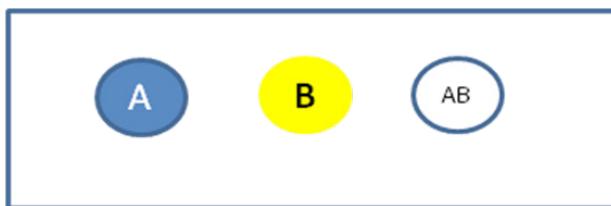
Procedimentos:

1. Em uma lâmina escavada adicionar:

10 µL soro Anti A (azul)

10 µL soro Anti B (amarelo)

soro Anti AB (incolor)



2. Fazer assepsia com álcool 70% na polpa do dedo indicador e perfurar com a lanceta;
3. Aplicar uma gota de sangue sobre os anti-soros e misturar bem com a ponteira;
4. Verificar as aglutinações;
5. Anotar os resultados obtidos.

2 PRÁTICA: Determinação do Fator Rh

O fator Rh foi descoberto na década de 40, sendo um dos sistemas de maior interesse clínico, por seu envolvimento na doença hemolítica perinatal, reações transfusionais hemolíticas e nas anemias hemolíticas auto-imunes. Existem mais de 40 antígenos diferentes no sistema Rh, contudo costuma-se classificá-lo pela presença ou ausência do antígeno D, onde se ele estiver presente é classificado como Rh positivo, se ausente, como Rh negativo. Ainda, um indivíduo sem o antígeno D não possui anticorpos anti-D se nunca tiver sido exposto ao antígeno. O antígeno D só é produzido após o contato.

Materiais:

- Luvas;
- Jaleco;
- Lâminas escavadas;

- Pipetadores;
- Ponteiras;
- Algodão;
- Álcool 70%;
- Lanceta ou agulha estéreis;
- Soro Anti- Rh (D)

Procedimentos:

1. Colocar uma gota de soro Anti-Rh (D) na lâmina.
2. Fazer assepsia com álcool 70% na polpa do dedo indicador e perfurar com a lanceta;
3. Aplicar uma gota de sangue sobre o anti-soro e misturar bem com a ponteira;
4. Verificar as aglutinações e anotar os resultados obtidos.

Observe: O tempo máximo para se observar a aglutinação é de 2 minutos. Realizar a técnica ABO e Rh em temperatura ambiente.

Correlação Clínica: Doença hemolítica do recém-nascido

O antígeno Rh pode ser responsável por reações transfusionais. Apesar de não existir anticorpos naturais contra antígeno Rh, indivíduos que não expressam o antígeno Rhesus D, aproximadamente 15% da população, podem ser sensibilizados contra esse antígeno se receberam transfusões a partir de um doador que expressa Rh, a reação ocorrerá após uma segunda transfusão de Rh-positivo, pois o sistema imune irá atacar e promover a hemólise dessas células que expressarem o fator Rh. Esse é o princípio da Eritroblastose fetal, ou doença hemolítica do recém-nascido. Mães Rh-negativo, gestando filho Rh-positivo pode ser sensibilizada pelas hemácias do feto e produzir anticorpos. Essa sensibilização normalmente ocorre no momento do parto, logo o filho da primeira gestação não será afetado. Gestações seguintes, com fetos Rh-positivos irão desencadear a doença, promovendo a hemólise do sangue fetal e podendo levar ao óbito. Essa doença pode ser evitada pela administração de anticorpos anti-Rh dentro de 72 horas após o parto, que irão destruir as hemácias Rh positivas que estão na circulação materna, impedindo a sensibilização.

3. PRÁTICA: Pesquisa de anticorpos irregulares (PAI ou coombs indireto)

O teste de coombs indireto serve para identificar se uma amostra de soro tem anticorpos dirigidos contra uma hemácia em particular, além de assegurar que também vai detectar anticorpos não-aglutinadores potenciais na amostra. É um teste importante na prática gestacional e obrigatoriamente deve ser realizada no soro de todos os pacientes antes de qualquer transfusão.

Este teste é feito incubando as células vermelhas sanguíneas com a amostra de soro, lavando-se para retirar quaisquer anticorpos não ligados e depois adicionando um segundo reagente anti-imunoglobulina para fazer ligação cruzada com as células. Geralmente, a detecção de anticorpos é realizada testando o soro do paciente contra 2 e/ou 3 células de hemácias de reagentes de doadores fenotipados para a maioria dos antígenos comuns, preparadas comercialmente.

Materiais:

- Luvas;
- Jaleco;
- Tubos de ensaio;
- Pipetadores;
- Ponteiras
- Bio PEG® (polietilenoglicol))
- Amostra de soro;
- Reagente de hemácia;
- Antigamaglobulina anti-IgG;
- Centrífuga;
- Banho Maria a 37°C;
- Solução Salina

Procedimentos:

1. Identificar dois tubos: I, II como amostra teste.
2. Em cada tubo, adicionar 2 gotas de soro do paciente + 1 gota do reagente de hemácia de triagem I e II, respectivamente.
3. Acrescentar 2 gotas de Bio PEG®, homogeneizar e não centrifugar.

Dica: O Bio PEG® (polietilenoglicol) é uma macromolécula que retira a água do meio de suspensão das hemácias permitindo uma maior concentração dos anticorpos ao redor das hemácias em suspensão, favorecendo a aglutinação.

4. Incubar a 37°C por 15 minutos.
5. Lavar as hemácias 3 vezes com solução salina.

Dica: sempre que desprezar os sobrenadantes, agitar os tubos para que ocorra o desprendimento total do precipitado no fundo do tubo; só depois acrescentar novamente a salina.

6. Desprezar o sobrenadante final, desprender o precipitado formado e adicionar 1 gota de soro antigamaglobulina anti-IgG;
7. Homogeneizar e centrifugar por 15 segundos a 3.400 rpm;
8. Examinar a aglutinação das hemácias e registrar os resultados de acordo com a ausência ou presença de aglutinação, anotando sempre a intensidade de aglutinação.

Observe: Se o resultado for negativo é preciso realizar a validação da reação com controle de Coombs, enquanto que se os testes forem positivos devem ser encaminhados para laboratório especializado para realização da identificação(s) do(s) anticorpo(s).

4. PRÁTICA: Coombs Direto

Quando anticorpos se ligam a eritrócitos, eles nem sempre resultam em aglutinação. Isso pode se dever à relação antígeno/anticorpo, em que o antígeno em excesso, o anticorpo em excesso ou em alguns casos cargas elétricas nas hemácias prejudicam a eficiência da ligação cruzada entre as células. Esses anticorpos se ligam, mas não causam aglutinação das hemácias. Para detectar a presença destes anticorpos não-aglutinadores nas hemácias, basicamente se adiciona um segundo anticorpo diretamente contra a imunoglobulina (anticorpo) que cobre as hemácias. Esta anti-imunoglobulina pode agora fazer reação cruzada com os eritrócitos e levar à aglutinação. Este teste é conhecido como teste de Coombs Direto.

Materiais:

- Luvas;
- Jaleco;
- Tubos de ensaio;
- Pipetadores;
- Ponteiras
- Bio PEG® (polietilenoglicol))
- Amostra de soro;
- Suspensão de hemácias;
- Soro antiglobulina IgG
- Centrífuga;
- Banho Maria a 37°C;
- Solução Salina

Procedimentos:

1. Lavar as hemácias da amostra teste 3 a 4 vezes em salina preparar uma suspensão de 3 a 5% de hemácias em salina;
2. Identificar dois tubos (IgG, Poli) e acrescentar 1 gota de suspensão de hemácias em cada tubo;
3. Adicionar de 1 a 2 gotas do soro antiglobulina correspondente a cada tubo;
4. Misturar e centrifugar de 3.000 a 3.600 rpm por 15-20 segundos;
5. Ressuspender gentilmente e examinar a aglutinação. Registrar os resultados.

Observe! Quando o Coombs direto for negativo com a leitura imediata, deixar 15 minutos em temperatura ambiente, centrifugar e ler novamente. Os resultados negativos deverão ser confirmados adicionando o controle de Coombs, centrifugando e observando a aglutinação: se o controle de Coombs for positivo valida o resultado negativo do Coombs direto; se o controle de Coombs for negativo invalida a reação e indica que o resultado do Coombs direto é falso-negativo. Neste caso é necessário repetir a técnica.

Observação: Os testes positivos devem ser encaminhados para laboratório especializado para realização de estudos. A presença de aglutinação indica que as hemácias podem estar sensibilizadas por anticorpos ou por componentes do complemento.

Importante: Anticorpos contra o fator Rh geralmente não aglutinam células vermelhas sanguíneas. Portanto, hemácias de crianças Rh+ nascidas de mães Rh- que têm anticorpos anti-Rh, devem estar cobertas por esses anticorpos. Para verificar isso, é realizado um teste de Coombs direto. Para ver se a mãe tem anticorpos anti-Rh no seu soro se realiza um teste de Coombs Indireto.

5 PRÁTICA: Determinação do fator reumatoide (FR) pela técnica de Látex (Aglutinação Passiva)

Doenças autoimunes são doenças onde o organismo cria anticorpos que atacam os próprios tecidos. A artrite reumatoide é um tipo de doença autoimune comprometendo as articulações. A maioria dos soros de pacientes portadores de artrite reumatoide apresenta imunoglobulinas tipo IgG, e por isso o corpo produz outra imunoglobulina (do tipo IgM), conhecida por Fator Reumatoide para combater este “auto-anticorpo” que age como uma “antígeno”. Deste modo a interação entre elas é uma reação é do tipo antígeno-anticorpo. A presença da artrite reumatoide pode ser confirmada pela positividade da prova de látex, método que avalia o Fator Reumatoide.

O reativo látex FR é uma suspensão de partículas de látex sensibilizadas com IgG humana. As partículas de látex formam a reação antígeno-anticorpo se ocorrer a presença do Fator Reumatoide no soro, produzindo aglutinação.

Materiais:

- Luvas;
- Jaleco;
- Cartão para teste de aglutinação;
- Kit do Fator reumatoide;
- Haste para homogeneização;
- Soro do paciente;
- Cronômetro;
- Pipetadores;
- Ponteiras;
- Palito descartável.

Procedimentos:

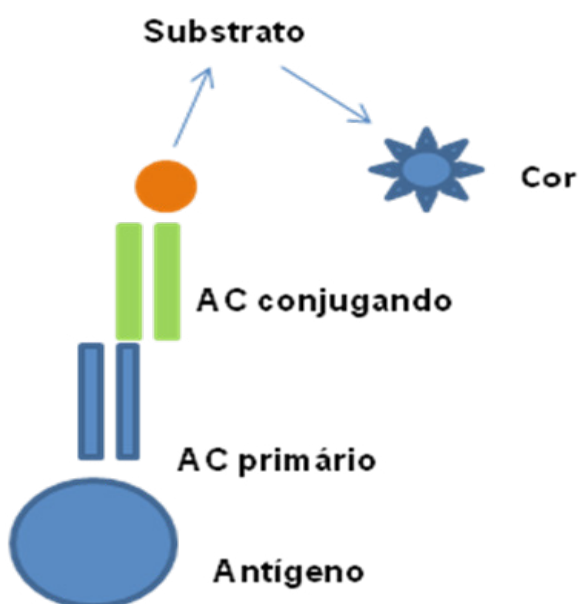
1. Estabilizar o reativo látex, o controle negativo e o controle positivo à temperatura ambiente (20-30°C), para sua utilização;
2. Homogeneizar o reativo látex suavemente, para dispersar e ressuspender as partículas de látex na solução. **Importante:** Evitar uma agitação violenta do reativo;
3. Colocar 25 µL de controle positivo, controle negativo e de soro em secções individuais na placa;
4. Colocar 1 gota do reativo junto a cada gota de controle e soro;

5. Misturar ambas com um palito descartável, procurando estender a mistura por toda a superfície interior do círculo. **Importante:** *Empregar palitos distintos para cada amostra e/ou controle;*
6. Agitar a placa com um suave movimento de rotação seja manualmente durante 2 minutos;
7. Observar a presença ou ausência de aglutinação no soro, comparando com o controle negativo e positivo;
8. Análise os resultados:
 - a) A presença de aglutinação indica um conteúdo de Fator Reumatóide no soro igual ou superior a 20 UI/mL;
 - b) A ausência de aglutinação indica um conteúdo de Fator Reumatóide no soro inferior a 20 UI/mL

Valor de referência: inferior a 20 UI/ml

6. PRÁTICA: ELISA- teste enzimático: Formação de complexo antígeno- anticorpo *in vitro*

O método de ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) baseia-se nas reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. A enzima mais comumente utilizada nestas provas é a peroxidase, que catalisa a reação de desdobramento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em H_2O mais O_2 . Neste método a amostra é diluída no suporte no qual se encontra o antígeno imobilizado. Se a mesma contiver os anticorpos específicos, estes formarão um complexo com os antígenos e permanecerão unidos. A fração não unida é eliminada por lavagem, posteriormente é acrescentado os anticorpos anti-imunoglobulina humana marcados pela enzima peroxidase (chamado de anticorpo conjugado). Caso ocorra a reação na primeira etapa do processo, o conjugado se unirá ao anticorpo da amostra. Ao adicionar-se o substrato apropriado para a enzima (isto é, H_2O_2 dissolvida em uma substância química que dá uma reação colorida quando H_2O_2 é desdobrada) (ver figura abaixo). Os locais da placa onde ocorreu a reação antígeno-anticorpo apresentarão uma coloração (variável dependendo do substrato). A reação se detém com ácido sulfúrico (reagente de parada).



Materiais:

- Luvas;
- Jaleco;
- Pipetadores;
- Ponteiras;
- Leitora de microplaca de Elisa;
- Kit para dosagem da Eritropetina (Epo) por ELISA.
- Amostra de Soro;
- PBS (tampão de lavagem).

Procedimentos:

1. Estabelecer o plano de distribuição e identificação das amostras e dos controles na microplaca de Elisa.
2. Abrir a embalagem que contém a microplaca. Retirar as strips de poços em excesso e guardá-las na embalagem que contém o dissecante e voltar a selá-la.
3. Pipetar 100 μ L de Diluente de Ensaio Epo para cada poço.
4. Adicionar 100 μ L de padrão, controle ou amostra por poço. Bater levemente na microplaca durante cerca de 1 minuto para misturar o conteúdo dos poços. Cobrir a microplaca com a película fornecida.
5. Incubar durante 2 horas à temperatura ambiente.
6. Aspirar bem o conteúdo de cada poço. Secar bem invertendo a microplaca sobre toalhas de papel.
7. Não lavar.
8. Adicionar 200 μ L de Conjugado Epo a cada poço. Cobrir a placa com uma nova película adesiva.
9. Incubar durante 2 horas à temperatura ambiente.
10. Aspirar cada poço e lavar, repetindo o processo três vezes, num total de 4 lavagens. A lavagem efetua-se enchendo cada poço com Tampão de Lavagem (400 μ L), usando pipetador automático. A remoção completa do líquido, em cada passo, é essencial.
11. Após a última lavagem, remover qualquer vestígio de Tampão de Lavagem por aspiração, ou invertendo a placa de encontro a uma toalha de papel.
12. Adicionar 200 μ L de Solução Substrato a cada poço (Nota: a Solução Substrato deve ser utilizada no prazo de 15 minutos após preparação).
13. Incubar durante 20-25 minutos à temperatura ambiente (20-25° C).
14. Adicionar 100 μ L de Solução Stop a cada poço. Se a mudança da cor não parecer uniforme, agitar a placa com cuidado para assegurar uma boa mistura.
15. Determinar a absorbância de cada poço no prazo de 15 minutos, utilizando uma leitora ou espectrofotômetro de placa regulado a 450 nm.
16. Avaliar a concentração de Epo conforme protocolo do kit.

Referências

BRASIL. **Guia para uso de hemocomponentes**. Ministério da Saúde. Brasília, 2009.

HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. Editora Manole, 1999.

JANEWAY, Charles A. et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 6^a.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

LIMA; et al. **Métodos de laboratórios aplicados à clínica**. 7 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1992.

CAPÍTULO VII

ANÁLISES DE LÍQUIDOS CORPORAIS

Adriane Pozzobon

Geórgia Muccillo Dexheimer

Welton Ludtke

Existem diversos líquidos corporais que podem ser analisados, além do sangue. Frequentemente, estes líquidos podem ser testados para fornecer resultados diretamente relacionados com o que ocorre no corpo humano. Alguns testes incluem análise de urina, sêmen, cloretos no suor, líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido sinovial, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido peritonal e fibronectina fetal.

1. PRÁTICA: Exame Qualitativo de Urina (E.Q.U)

A análise da urina deu início à medicina laboratorial, pois na antiguidade através da análise da cor, odor, turvação, volume e açúcar, os médicos diagnosticavam as doenças. Atualmente o exame qualitativo de urina (E.Q.U) é um dos exames mais solicitados aos laboratórios de análises clínicas, por ser de baixo custo e simplicidade de execução e útil para detecção de doenças renais, hepáticas e *diabetes mellitus*.

Tipos de amostras utilizadas:

- a) Aleatórias: São usadas para exames de triagem, para detectar anormalidades bem evidentes.
- b) Primeira urina da manhã: Ideal para os exames de rotina, esta amostra é mais concentrada, permitindo a detecção de elementos que não apareceriam nas amostras aleatórias, visto que a mesma se encontra mais diluída.
- c) Amostra de 24 horas: Usada para determinar quantitativamente substâncias químicas presentes na urina.
- d) Amostra coletada por cateter ou sonda: Urina coletada diretamente da bexiga.
- e) Coleta do jato médio: Paciente faz a higiene genital, despreza o primeiro jato e coleta o jato intermediário.
- f) Aspiração suprapúbica: Introdução de uma agulha do meio externo até o interior da bexiga, sendo aspirada urina.
- g) Amostras pediátricas: É realizada com o auxílio de sacos coletores.

O *exame qualitativo de urina* é composto pelo exame físico, químico e microscópico. No exame físico são realizadas análises para determinar as seguintes características da urina, como:

- Cor: Normalmente apresenta-se do amarelo claro ao amarelo citrino. A existência de urina com cor âmbar e a formação de espuma amarela quando agitada é indicativo da presença de bilirrubinas. A presença da cor vermelha, na urina, é indicativa da presença de sangue.

- Aspecto: Transparente, opaca ou turva.
- Densidade: É realizado com o auxílio de um urodensímetro, refratômetro ou através das fitas.

O exame químico é realizado através da avaliação visual de uma fita reativa que contém vários quadrados específicos para as respectivas análises que serão realizadas, como pH, proteínas, glicose, cetonas, sangue, bilirrubina, urobilinogênio, nitrito, leucócitos e densidade.

Os resultados devem ser analisados conforme a indicação da tira reativa para emissão do laudo. Ver parâmetros a seguir:

- a) Esterase de leucócitos: Avaliação de processos infecciosos e inflamatórios do trato urinário (ITU). Pode ocorrer com ou sem bacteriúria. Valor de referência: negativo. Quando positivo: + a +++.
- b) Nitritos: Avaliação de processos infecciosos do trato urinário (ITU) Valor de referência: negativo.
- c) Urobilinogênio: Avaliação de distúrbios hepáticos e hemolíticos. Valor de referência: <1mg/dL. Quando positivo: descrever o valor em mg/dL.
- d) Proteínas: Proteinúria: Indicador de doença renal. Valor de referência: Negativo. Quando positivo: + a ++++.
- e) pH: Detecção de possíveis distúrbios eletrolíticos sistêmicos de origem metabólica ou respiratória e infecção urinária. Valores de referência: 5,5 a 6,5.
- f) Sangue: Detecção e avaliação das hematúrias. Valor de referência: negativo. Quando positivo: + a ++++.
- g) Densidade: Avaliação da capacidade renal de reabsorção e concentração. Valores de referência: 1015 a 1025. Laudar conforme a fita.
- h) Cetonas: Avaliação de *Diabetes mellitus*, jejum prolongado. Valor de referência: negativo. Quando positivo: Traços, pequena, moderada e grande quantidade.
- i) Bilirrubina: Indicação precoce de hepatopatias. Valor de referência: negativo. Quando positivo: + a +++.
- j) Glicose: Avaliação de *Diabetes mellitus*, e distúrbios de reabsorção tubular. Valor de referência: Negativo. Quando positivo: + a ++++ ou mg/dL.

Para a realização do exame microscópico é necessária a centrifugação da urina e o sedimento é examinado, coberto com lamínula, em microscopia ótica. Nesta análise pode-se verificar a presença de eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, cilindros, cristais, bactérias, leveduras, parasitas e muco. A quantidade média por campo é anotada.

Materiais:

- Centrífuga;
- Lâmina;
- Lamínula 22 x 22 cm;
- Luva;
- Jaleco;
- Microscópio;

- Amostra de urina;
- Tira reagente;
- Tubo de ensaio tipo falcon 15 mL;
- Estante para tubos;
- Pipeta Pasteur de plástico;

Procedimentos:

A amostra coletada deve ser analisada até 1 hora após a coleta, os procedimentos a serem seguidos são os seguintes:

1. Homogeneizar a amostra e avaliá-la conforme seu aspecto físico;
2. Transferir 10 a 15 mL da amostra para um tubo cônico;
3. Mergulhar a fita reativa na urina;
4. Aguardar alguns segundos e retirar a fita. Retira-se o excesso de urina, através da fricção da fita no tubo;
5. Efetuar a leitura da fita após 1 minuto e antes de 2 minutos, comparando-a com os padrões de cores presentes no frasco e anotar os resultados;
6. Centrifugar durante 5 minutos a 1.500 rpm;
7. Desprezar o sobrenadante;
8. Ressuspender o sedimento com uma pipeta pasteur e colocar uma gota em uma lâmina e cobrir com lamínula 22 X 22 mm;
9. Observar ao microscópio com objetiva de 10X para a procura de cilindros e 40X para leucócitos, hemácias, cristais, etc. Vascular a lâmina e contar os elementos e reportar a média de elementos por campo.

2. PRÁTICA: Espermograma

A realização do espermograma é importante para a função reprodutiva masculina. Serve para avaliação das glândulas seminais, fertilidade e monitoramento após procedimento de vasectomia. O preparo e coleta da amostra são pontos fundamentais para um resultado fiel.

Preparo e coleta da amostra:

- Abstinência sexual: o período mínimo é de dois dias e máximo de sete, sendo que o ideal é uma abstinência sexual de 5 dias.
- A coleta deve ser realizada e encaminhada ao laboratório com um prazo máximo de 1 hora.
- Antes da realização da coleta deve-se realizar a higiene das mãos e do pênis.
- O material deve ser acondicionado em frascos limpos e estéreis fornecidos pelo laboratório.
- É importante anotar o horário exato da coleta.

2.1. Exame macroscópico

Realizado após a liquefação do líquido seminal em banho Maria a 37°C durante 1 hora.

Materiais:

- Banho-maria;
- Bastão de vidro;
- Luva;
- Jaleco;
- Amostra;
- Tira de pH;
- Tubo de ensaio tipo falcon 15 mL;
- Estante para tubos.

Procedimento:

1. Transferir a amostra para um tubo cônico graduado e anotar o volume. Valores normais estão entre 1,5 e 5,0 mL. Volumes inferiores a 0,5 mL são casos patogênicos, porém, volumes acima de 5,0 não são considerados patogênicos.
2. Analisar o aspecto de liquefação, processo fisiológico que ocorre de forma espontânea entre 5 a 60 minutos após a ejaculação.
3. Anotar a cor. Quando normal, apresenta uma opalescência ligeiramente acinzentada ou esbranquiçada. Cor amarelada pode ser considerada leucospermia e cor avermelhada, hemospermia.
4. Medir o pH através de fitas apropriadas. Valores normais encontram-se entre 7,5 a 8,2.
5. Levando-se um bastão de vidro o esperma é aderido podendo avaliar a viscosidade. O valor considerado normal é de 2 cm de altura, sendo que viscosidade acima deste valor são consideradas aumentadas, abaixo deste valor são consideradas diminuídas ou nulas.
6. Avaliar a consistência, que deve ser gelatinosa ou mesmo fluída, semifluída e grumosa.

2.2. Exame microscópico

É realizada a contagem em câmara de Neubauer, através da diluição de 1:100 ou mais, caso necessário, e avaliar os critérios abaixo, como motilidade, viabilidade, índice de viabilidade e contagem global.

Materiais:

- Lâmina;
- Lamínula;
- Luva;
- Jaleco;
- Amostra;
- Microscópio.

2.2.1 Motilidade: É fundamental para a fertilidade

Procedimento:

1. Após homogeneização do líquido seminal, coloca-se uma gota numa lâmina e cobre-se com lamínula;
2. Observar o movimento ao microscópio óptico em aumento de 40x. A classificação da motilidade é:

I - Lateral: movimento ondulante;

II - Progressivo lento: movimento quase ondulante (lento);

III - Progressivo - movimento rápido com direção específica;

IV - Ativo: movimento rápido, mas sem direção específica;

Note: Os movimentos I e II são considerados anormais, sendo relacionados à baixa fertilidade. Os tipos II, III e IV são predominantes.

2.2.2. Vitalidade

Vitalidade é a relação entre a quantidade de espermatozoides vivos e mortos na amostra analisada. Os resultados são expressos em percentual de espermatozoides vivos. Deve ser feita a contagem em 4 a 8 campos no centro da lâmina, como a tabela e cálculo abaixo, por exemplo:

Campo	Vivos	Mortos	Total
1	20	10	30
2	18	18	36
3	28	06	34
4	28	02	30
5	94	36	130

Total de espermatozoides: 130

Total de espermatozoides vivos: 94

Cálculo de vitalidade:

130 ---- 100%

94 ----- x%

x - 72% de vivos

2.2.3. Índice de motilidade

Índice de motilidade é dado pelo produto do resultado da motilidade e o percentual da vitalidade.

Exemplo de cálculo:

Motilidade tipo III

Vitalidade 72%

Índice de motilidade: $72 \times \text{III} = 216$

Valores de referência considerados normais: 150 a 400

2.2.4. Contagem global de espermatozoides

Materiais:

- Câmara de Neubauer;
- Solução isotônica NaCl ou água destilada;
- Luva;
- Jaleco;
- Amostra;
- Microscópio;

Procedimento:

1. Diluir com solução fisiológica, solução isotônica de NaCl ou água destilada.
2. Diluir 1:100;
3. Colocar em câmara de Neubauer;
4. Observar ao microscópio com aumento de 1000x (objetiva de 100)
4. Contar 8 grupos de quadrados nos dois lados da câmara;
5. Total de células nos 8 grupos de quadrados multiplicado por 1.000.000

Valores de referência: Acima de 20.000.000/mL

Dica: Nesta técnica, também podem ser realizadas a contagem de leucócitos, com menos de 1 milhão/mL e avaliação da morfologia, que deve ser com valores maiores de 14% com cabeça oval sem defeitos na peça intermediária ou cauda.

Grupos	Total de espermatozoides	Típicos	Atípicos
1	40	30	10
2	38	32	06
3	36	30	06
4	44	44	00
5	40	36	04

Total de espermatozoides: 198

Total de espermatozoides típicos: 172

198 --- 100%

172 --- x%

x = 87% típicos

13 % atípicos

3. PRÁTICA: Análise de Líquor (LCR)

O procedimento para coleta de LCR é invasivo e apresenta riscos para o paciente, desta forma só pode ser realizado por profissional médico habilitado e após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), pelo paciente ou por seu representante legal, de acordo com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Existem três vias clássicas para coleta, sendo a lombar a mais utilizada na rotina, seguida pela suboccipital ou cisternal e, por último, a via ventricular. Cabe destacar a necessidade de a amostra destinada à análise laboratorial ser de qualidade, assegurando a confiabilidade dos resultados.

O LCR deve ser coletado em três tubos sem anticoagulante e seguramente estéreis, devendo ser devidamente identificados com os números 1, 2 e 3, na ordem em que são obtidos. A amostra do primeiro tubo deverá ser usada para a realização das análises bioquímicas e sorológicas. O segundo será utilizado para os exames microbiológicos, e o terceiro destina-se às contagens celulares, em virtude da menor probabilidade de conter material, particularmente células sanguíneas, introduzidas acidentalmente no momento da punção.

Caso a amostra tenha sido coletada apenas em um único frasco, ele deve ser enviado, primeiramente, à seção de bacteriologia; em seguida, à seção de hematologia e, posteriormente, à seção de bioquímica/imunologia. Amostras coletadas em tubos inadequados, sem identificação ou envelhecidas devem ser rejeitadas. Cabe ressaltar que a amostra coletada deve chegar ao laboratório o mais rápido possível, no máximo em 2 horas, pois, após esse tempo, pode ocorrer degradação e/ou alterações morfológicas de hemácias, leucócitos e outros tipos celulares, diminuição da glicose, aumento de concentração das proteínas e de bactérias prejudicando as análises e o resultado.

O líquido fresco deve ser armazenado entre 5°C e 12°C, para minimizar danos às células, pois temperaturas muito baixas podem conduzir a lise pelo frio, e temperaturas mais altas provocam degradação celular. Finalmente destaca-se que após a realização das análises, uma pequena porção do LCR centrifugado deve ser devidamente identificada e armazenada a 4°C, durante 30 dias, pois caso seja necessário realizar outras dosagens evita-se uma coleta para o paciente.

Preparo da amostra para análise:

A amostra de LCR deve ser fresca e centrifugada, para a análise visual, e fresca, não centrifugada e devidamente homogeneizada, para a contagem de leucócitos e hemácias em câmaras específicas. Para a confecção da lâmina, deve ser utilizada a amostra total ou o sedimento obtido por centrifugação em baixa rotação.

3.1. Exame físico

A observação visual do LCR pode fornecer importantes informações diagnósticas, desta forma avalia-se inicialmente o volume, coloração e aspecto do líquido.

- Volume:

	Volume mínimo adequado
Recém-nascido	3 mL
Crianças	5 mL
Adultos	10 mL
Suspeita de BK	13 mL

- Aspecto:

O aspecto da amostra deve ser observado em local com boa iluminação e pode ser definido como límpido, em casos de LCR normal ou com celularidade de até 200 leucócitos/ μL ou 400 hemácias/ μL , ou como levemente turvo, turvo ou turvo-leitoso, em virtude da presença de células sanguíneas, microrganismos ou taxas elevadas de proteínas ou lipídios. A tabela abaixo mostra os valores de referência para indicação do aspecto.

Aspecto	Número células
Límpido	Até 45 células
Levemente turvo	46 a 300 células
Turvo/Opalescente	301 a 6.000 células
Purulento	Acima de 6.000 células

Importante: Cuidar se ocorre formação de coágulo, pois pode ocorrer em decorrência de acidente de punção, bloqueio espinhal completo (síndrome de Froin) e meningite tuberculosa e supurativa. Esse coágulo formado pode interferir na exatidão das contagens de células, por capturarem células inflamatórias.

- Cor:

O líquido, em condições normais, é incolor (como água de rocha), porém, em condições patológicas, pode apresentar alteração na coloração. A coloração deve ser registrada antes e depois do processo de centrifugação. A amostra é considerada xantocrômica quando, após centrifugação, tem tonalidade que varia entre rosa, amarelo ou laranja, o que ocorre pela presença de hemoglobina ou pelas concentrações elevadas de proteínas ou bilirrubina. A possibilidade de existência de outras substâncias como iodo, caroteno ou melanina, deve ser considerada. A amostra também pode se apresentar hemorrágica, esbranquiçada e esverdeada, dependendo da quantidade de componentes e da condição patológica.

Dica: Em recém-nascidos, prematuros, é comum observar xantocromia, em virtude da imaturidade da função hepática no processo de eliminação da bilirrubina.

Cuidado: Se a coloração for hemorrágica, tem que cuidar se não ocorreu sangramento na coleta. Para esclarecer esta dúvida pode-se utilizar o método dos três tubos, onde após a centrifugação a coloração torna-se límpida.

3.2. Exame Hematológico

Usado para contagem de células como hemácias e leucócitos.

3.2.1. Contagem global de células

A contagem global de leucócitos e hemácias da amostra pode ser realizada em qualquer tipo de câmara de contagem, porém, rotineiramente, utiliza-se a câmara de Fuchs-Rosenthal, a qual tem altura de 0,2 mm, área total de 16,0 mm², volume total de 3,2 mm³ e é dividida em 16 quadrados, que são subdivididos em 16 quadrados menores cada um. Para a diferenciação de hemácias, leucócitos e células teciduais durante a contagem na câmara de Fuchs-Rosenthal, deve-se conhecer as características de cada uma dessas células. Os eritrócitos se apresentam com um contorno regular, com halos e centro da célula limpo. Os leucócitos, por sua vez, apresentam um aspecto granular e são levemente refringentes. Células teciduais, que são

geralmente grandes e granulares e com contorno irregular, bem como células lisadas, não devem ser incluídas na contagem.

Materiais:

- Câmara de Fuchs-Rosenthal;
- Luva;
- Jaleco;
- Amostra;
- Microscópio;
- Líquido de Turk;
- Pipetas;
- Ponteiras;
- Lamínula;
- Tubo capilar;
- Centrífuga.

Procedimentos:

1. Homogeneizar bem a amostra;
2. Centrifugar 5-10 minutos 1.000 rpm.
3. Separar o sobrenadante para as análises bioquímicas e imunológicas.
4. Ressuspender o sedimento.
5. Quando a amostra tiver muitas células, podem ser feitas diluições.
6. Aplicar a lamínula limpa posicionada para que cubra ambas as áreas quadriculadas da câmara de contagem. A lamínula confina o líquido na câmara e regula a profundidade do líquido. A profundidade é 0,2 mm. O volume é 3,2 (16 mm² x 0,2 mm).
7. A câmara é preenchida tocando a ponta de uma micropipeta ou tubo capilar no ponto onde a lamínula e a plataforma se encontram em um lado. O líquido da pipeta (aproximadamente 10 µL) é deixado fluir por ação capilar.
8. Cuidar o excesso ou falta de líquido ou presença de bolhas de ar que prejudicam o bom enchimento.
9. Analisar a lâmina no microscópio focando na área quadriculada com a objetiva de 10x e o botão de ajuste máximo. Com o botão de ajuste mínimo ajustar o foco. A área quadriculada fica mais visível quando o condensador é baixado e a intensidade da luz diminuída.
10. Trocar para a objetiva de 40x e contar as células da esquerda para direita e da direita para a esquerda (como uma serpente).
11. Cálculo para o número de células:
 - a) Se toda a área quadriculada for contada sem diluição da amostra, dividir o número final de células contadas por 3,2.

b) Caso seja feita diluição calcular da seguinte forma:

Células por mm^3 (μL) = n° de células contadas x diluição

Observação: A Contagem de hemácias pode ser feita em câmara de Neubauer da seguinte forma:

• As hemácias devem ser contadas colocando a amostra diretamente nos nove quadrantes da Câmara de Neubauer.

• Caso houver sobreposição de células, pode-se diluir a amostra com solução salina (NaCl a 0.9%).

Para o cálculo usa-se a seguinte fórmula:

$$\text{Número de células/mL} = \frac{\text{N total de células}}{\text{N de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

3.2.2. Contagem de leucócitos em câmara de Neubauer:

Materiais:

- Câmara de Neubauer;
- Luva;
- Jaleco;
- Amostra;
- Microscópio;
- Líquido de Turk;
- Pipetas;
- Ponteiras;
- Lamínula;
- Tubo capilar;
- Centrífuga

Procedimentos:

1. Homogeneizar e centrifugar a amostra em baixa rotação por 5-10 minutos.
2. Diluir a amostra 1:2 (50 μL da amostra + 50 μL Líquido de Turk)
3. Homogeneizar a diluição para lise dos eritrócitos.
4. Cobrir a Câmara de Neubauer com lamínula.
5. Com o auxílio de um tubo capilar retirar a solução diluída e com a ponta do capilar tocar na ranhura entre a câmara e a lamínula nas duas extremidades, o líquido por capilaridade preencherá o espaço.

Dica: não deixar transbordar ou criar bolhas

6. Deixar as células na câmara em repouso por 5 minutos.
7. Contar os quatro quadrantes laterais da câmara nos 2 lados, utilizando objetiva de 10X e diafragma parcialmente fechado.

8. Para evitar conflito na contagem de células que ficam nas linhas divisórias, proceder da seguinte maneira: As células que tocam qualquer uma das 3 linhas, ou a linha única da esquerda, ou no topo das divisórias dos quadrados pequenos devem ser contadas como se estivessem dentro dos quadrados, mas as que tocam qualquer das linhas à direita e em baixo das divisórias, não devem ser contadas.

9. Calcular conforme fórmula abaixo:

$$\text{Leucócitos por mm}^3 = \frac{\text{N}^\circ \text{ leucócitos contados na câmara} \times \text{diluição}}{\text{N}^\circ \text{ quadrados grandes contados} \times 0,1}$$

0,1 – Volume de 1 quadrante da câmara (0,1 μL)

Observe: Para contagem de leucócitos pode-se realizar a lise das hemácias através da adição de ácido acético glacial a 3% para melhor visualização e novamente transferir para a Câmara de Neubauer. Realizar a contagem nos nove quadrantes.

Valores de referência:

Líquor Celularidade: Adultos: 0 a 5 leucócitos / μL .

Recém-nascido: 0 a 30 leucócitos / μL

3.2.3. Contagem diferencial por citocentrifugação:

A contagem diferencial de leucócitos é uma etapa fundamental da análise laboratorial, pois, conforme a linhagem celular predominante nessa contagem estabelece-se uma conduta terapêutica adequada, de acordo com o significado clínico. A confecção da lâmina para leitura pode ser feita de diferentes formas: por centrifugação em tubo, em câmara de Suta ou por citocentrifugação.

Materiais:

- Luva;
- Jaleco;
- Amostra de líquido puro;
- Microscópio;
- Corante panótico;
- Pipetas;
- Ponteiras;
- Lâmina;
- Lamínula;
- Tubo capilar;
- Centrífuga

Procedimentos:

1. Centrifugar a amostra a 1.200 rpm por 10 minutos;
2. Realizar o esfregaço em lâmina;

3. Realizar a coloração com o corante panótico. Este deve ser realizado com 500 µL da amostra citocentrifugada;
4. Observar no aumento de 400X;
5. Realizar a contagem de 100 células no aumento de 100X e classificá-las de acordo com sua morfologia em percentual.

3.3. Exames Bioquímicos

Podem ser realizadas dosagens bioquímicas, como:

- Proteínas: sua elevação é observada com mais frequência nos quadros patológicos. Dentre as prováveis causas de elevação, estão: meningite, hemorragias, produção de imunoglobulinas no sistema nervoso central, redução da depuração das proteínas normais e degeneração do sistema neural.
- Glicose: valores elevados correspondem às elevações no plasma, porém, valores diminuídos são importantes no diagnóstico de agentes causadores de meningites, associados aos valores de leucócitos e sua contagem diferencial. São considerados valores normais com até 2/3 do valor do plasma.
- Ainda pode ser dosado, ureia, cloretos e atividade enzimática de TGO (transaminase glutâmico-oxalacética) LDH (lactato desidrogenase) e ADA (adenosina deaminase).

As dosagens bioquímicas são realizadas conforme o protocolo do kit comercial. A tabela abaixo apresenta os valores de referência para algumas análises do líquor.

Critério	Valores de referência
Aspecto e cor	Límpido e incolor
Número global de células	Até 4/mm ³
Perfil Celular	Linfócitos (50-70%) e monócitos (30- 50%)
Proteínas	Recém-nascido: até 120mg/dL 2- 4 semanas: até 80 mg/dL 2 meses: até 60 mg/dL 3 meses: até 50 mg/dL 4- 6 meses: até 40 mg/dL
Glicose	2/3 da glicemina
Cloretos	680- 750 mEq/dL
Ureia	Até 40 mg/dL
LDH	Até 35 UI/L
TGO	Até 10 UI/L
ADA	Até 4,4 UI/L

3.4. Exame Microbiológico

Podem ser realizados testes para a identificação de agentes etiológicos de meningites, como cultura e coloração de gram, entre outros. Os métodos são descritos no capítulo de bacteriologia.

4. PRÁTICA: Análise do Líquido Sinovial

O líquido sinovial é um líquido presente na cavidade das articulações sinoviais, ou diartroses, ou seja, aquelas articulações que permitem movimentos. A avaliação do líquido sinovial pode fornecer de várias doenças articulares, como: artrite infecciosa, doença articular degenerativa, osteocondrite dissecante, artropatia inicial ou em regressão, osteoartropatia hipertrófica, sinovite vilonodular pigmentada, artrite reumatoide e sinovite. Também pode servir para o diagnóstico de espondilite anquilosante, febre reumática, lúpus eritematoso, esclerose sistêmica, infecções bacterianas piogênicas, traumas dentre outras. Os casos mais comuns de acúmulo de líquido sinovial são de origem traumática ou infecciosa após procedimentos como a videoartroscopia de joelho. A coleta deve ser feita por artrocentese sob anestesia, por profissional médico habilitado, onde uma agulha estéril é inserida na cavidade articular e aspirado uma amostra do líquido para análise. Os testes mais importantes a serem feitos no líquido sinovial, são a citologia total e diferencial, a pesquisa de cristais e bacteriologia.

O material colhido é distribuído em 3 tubos com 3 mL:

1 tubo com anticoagulante EDTA: para análises de citologia;

1 tubo sem anticoagulante: para exames bioquímicos e/ou imunológicos;

1 Tubo estéril: para exame microbiológico.

4.1. Análise macroscópica:

O líquido sinovial é normalmente claro, transparente ou levemente amarelo. A turvação pode se dar pela presença de células (leucócitos e hemácias) ou pela presença de cristais ou fibrina.

Cor: normal: transparente ou levemente amarelo.

Caso esteja avermelhada, pode ser provocada por um acidente durante a punção ou pode ser uma hemartrose verdadeira. A diferenciação se dá pelo fato de que, nos casos de acidente de punção, a coloração varia, clareando no fim da coleta, além da presença de coágulos. A coloração esverdeada pode ser observada em artrites sépticas.

Dica: *A presença de coágulos é outro dado importante da avaliação. Em condições normais, o líquido sinovial não coagula. Portanto, a presença de coágulos é indicativa de processos inflamatórios*

Viscosidade: normal: alta viscosidade

A viscosidade está diretamente relacionada à quantidade de ácido hialurônico e encontra-se diminuída nos processos inflamatórios. A observação se faz durante a coleta do material, pela velocidade de queda pela agulha de punção e analisada laboratorialmente pelo teste da mucina.

Teste da mucina: Acrescentar 1 gota da amostra a uma solução de ácido acético a 5% e observar a formação do coágulo: bom (sólido), regular (mole), ruim (frágil) e péssimo (ausência de coágulo). Este teste analisa a viscosidade do líquido, que deve ser viscoso e desta forma o coágulo deve ser sólido. Doenças inflamatórias diminuem a produção de ácido hialurônico e a viscosidade do líquido sinovial.

4.2. Análises citológicas

A avaliação citológica auxilia no diagnóstico diferencial de inflamações e infecções. O Líquido Sinovial normalmente é quase que acelular. Possui cerca de 20% de células polimorfonucleares (basófilos, neutrófilos e eosinófilos) e os demais 80% de mononucleares (monócitos, linfócitos). Um aumento de polimorfonucleares aparece na gota e nas artrites sépticas, já na artrite reumatoide pode-se observar o predomínio de linfócitos. As análises citológicas (contagem de hemácias, leucócitos, diferencial) são realizadas da mesma forma que foram descritas na análise do líquido. Os valores de referência estão listados a seguir:

Hemácias (contagem em câmara de Neubauer): < 150/mL

Leucócitos (contagem em câmara de Neubauer): < 200/mL

Contagem diferencial: (Esfregaço de 500 ml da amostra citocentrifugada)

Neutrófilos: < 25%

Linfócitos: > 75%

Monócitos: < 20%

Ainda, durante a análise microscópica, é avaliada através da análise de uma gota do líquido colocado em uma lâmina coberta com lamínula e observada no microscópio, a presença de cristais. Os cristais podem estar livres ou no interior das células, podendo ajudar no diagnóstico de artropatias induzidas por cristais. Permite também identificar os cristais como os de urato monossódico (presentes na gota), pirofosfato de cálcio (presente na condrocalcinose ou pseudogota) e outros, como apatita e oxalato de cálcio.

4.3. Análises bioquímicas

As análises bioquímicas são feitas de acordo com o protocolo dos kits empregados. Normalmente se analisa a glicose e proteínas.

Com relação à glicose, sua concentração no líquido sinovial normal é semelhante à plasmática. Desta forma, para a interpretação adequada dos valores de glicose do líquido sinovial é necessária comparar os valores encontrados com os níveis séricos da glicose em jejum. Em condições normais e na maioria das condições não inflamatórias, a diferença é menor que 10 mg/dL. Diferenças significativas são encontradas nos processos inflamatórios e infecciosos.

A concentração normal de proteínas varia de 1,2 a 2,5 g/dL. Valores aumentados são encontrados em processos inflamatórios e sépticos.

4.4. Exame Microbiológico

Podem ser realizados testes para a identificação de agentes etiológicos, como cultura e coloração de gram, entre outros. Os métodos são descritos no capítulo de bacteriologia.

5. Análise de líquidos serosos (ascítico, pleural)

Líquido ascítico

O líquido ascítico ou peritoneal é utilizado para o diagnóstico das peritonites. Homens saudáveis apresentam pouco ou nenhum fluido intraperitoneal, mas as mulheres podem normalmente conter até 20 mL, dependendo da fase do ciclo menstrual. As causas do acúmulo

de líquido ascítico geralmente incluem a hipertensão portal secundária a doenças crônicas do fígado, contudo também pode ocorrer em infecções, malignidade intra-abdominal, enfermidades inflamatórias do peritônio e lesões ductais (quilosa, pancreática, biliar).

A avaliação laboratorial do líquido ascítico inclui:

a) Contagem de células: Valor normal: < 250 leucócitos/ μ L e menos de 150 polimorfonucleares/ μ L. Em inflamações estes valores estão elevados, sendo que números maiores que 150 polimorfonucleares são sugestivos de peritonite bacteriana. Já, uma contagem de leucócitos elevada com predomínio de linfócitos pode ser suspeita de tuberculose ou carcinomatose peritoneal. A análise citológica é feita da mesma forma que o descrito para o líquido.

b) Dosagens bioquímicas: feitas conforme protocolo do kit utilizado.

Proteína total e albumina: O diagnóstico laboratorial inicial visa definir se o líquido é um transudato ou exsudato. Em geral compara-se os níveis séricos e peritoneais de proteínas totais (PT) e da enzima desidrogenase láctica (DHL ou LDH). Para ser considerado exsudato os valores de PT peritoneal/sérico devem ser maiores que > 0,5; ou os valores de DHL peritoneal/sérico maiores que 0,6. Uma vez definido o exsudato, outros parâmetros bioquímicos podem e devem ser avaliados para elucidação da etiologia da ascite. O gradiente albumina sérica-ascite é o melhor teste isolado para classificação da ascite em causas hipertensivas portal e não hipertensivas portal. O gradiente é calculado subtraindo-se a albumina do líquido ascítico da albumina sérica. Um gradiente maior que 1,1 g/dL sugere fortemente hipertensão portal subjacente, enquanto gradientes menores que 1,1 g/dL implicam em causas não hipertensivas portais da ascite. A proteína total fornece pistas adicionais. Um gradiente de albumina sérica - ascite elevado e um nível elevado de proteínas (> 2,5 g/dL) são vistos na maior parte dos casos de congestão hepática secundária à doença cardíaca ou síndrome de Budd-Chiari. Dois terços dos pacientes com ascite por malignidade apresentam nível de proteína >2,5 g/dL. Também é feita a dosagem de glicose, LDH e amilase, que são úteis na distinção entre peritonite bacteriana espontânea e peritonite bacteriana secundária. Os níveis de glicose estão reduzidos em pacientes com peritonite tuberculosa e a amilase elevada pode sugerir ascite por problemas pancreáticos.

c) Análises bacteriológicas: Coloração de Gram e cultura: usados com a finalidade de detectar peritonites bacterianas. A sensibilidade da cultura aumenta muito quando o laboratório faz a cultura diretamente em frascos de hemocultura.

Líquido pleural

O líquido pleural é, em geral, obtido através da toracocentese realizada pelo profissional médico. A análise do líquido pleural se inicia pelo aspecto da amostra, onde em condições normais é límpido, com coloração amarelo claro. As análises citológicas, bioquímicas e bacteriológicas seguem o que foi descrito para o líquido, destacando-se a dosagem de proteínas/albumina, desidrogenase láctica e glicose, citologia diferencial e oncológica e microbiologia. A glicose pleural tem relação direta com a glicemia, e suas alterações podem ser por aumento no consumo ou diminuição do transporte para o líquido pleural. Dentre as doenças que consomem mais glicose as infecciosas e as neoplásicas merecem atenção, embora as colagenoses e o hemotórax também apresentem importante redução por disfunção no seu transporte.

Outros exames laboratoriais podem ser solicitados, conforme a hipótese diagnóstica, como a amilase, útil nos derrames por lesões esofágicas ou ainda na suspeita de pancreatite.

Exames mais específicos como dosagem de fator reumatoide, anticorpos antinucleares, complemento, imunocomplexos ou pesquisa de células LE devem ser solicitados no líquido pleural se a suspeita é derrame pleural devido à doença do colágeno como, por exemplo, o lúpus eritematoso sistêmico (LES) ou artrite reumatoide (AR).

Referências

COMAR, SR et al. Análise citológica do líquido cefalorraquidiano. *Estud Biol.* 2009; 31(73/74/75) 93-102.

STRASSINGER, S.K. **Uroanálise e fluídos biológicos**. São Paulo: Panamericana, 2000.

HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. Editora Manole, 1999.

CAPÍTULO VIII

MICOLOGIA

Gabriela Kniphoff da Silva Lawisch

A Micologia é a ciência que estuda os fungos, organismos que fazem parte do nosso dia a dia, mesmo sem percebermos. É um grupo de organismos eucarióticos imóveis, que não possuem clorofila, logo não realizam fotossíntese e suas células têm paredes rígidas, mas que não são formadas por celulose (como as plantas) e sim por quitina (como alguns animais). Por ter características tão específicas, são classificados como organismos pertencentes ao Reino Fungi.

Os fungos podem trazer inúmeros benefícios: estão presentes na produção de pães, medicamentos, queijos, vinhos, cervejas, auxiliam na fertilidade do solo, controle biológico de pragas, além de viver em simbiose (relação mutuamente vantajosa) com plantas e algas. Esses organismos são considerados ubíquos, pois podem viver no solo (geofílicos), parasitando animais (zoofílicos) ou parasitando os seres humanos (antropofílicos). E quando os fungos estão vivendo como parasitas de animais ou seres humanos é que eles nos trazem mais prejuízos. Os fungos são agentes de infecções humanas e animais, conhecidas como micoses.

Os fungos começaram a ganhar importância no cenário médico-hospitalar como doença grave a partir das décadas de 40/50, quando se introduziu o uso generalizado de antibióticos de amplo espectro, e concluiu-se que o uso de alguns antibióticos pode inibir o crescimento da microbiota bacteriana, reduzindo a competição por alimentos, favorecendo a proliferação local e disseminação de fungos. Outros avanços médicos da época (como terapias imunossupressoras) também contribuíram para o aumento da sobrevivência de pacientes, aumentando também, a susceptibilidade a infecções oportunistas, e muitos pacientes passaram a apresentar infecções fúngicas graves.

Nesse contexto, a Micologia Médica começou a ganhar importância, e juntamente, a necessidade de diagnóstico desses organismos. A Micologia Clínica é a área de estudo do diagnóstico das micoses, mais especificamente, do agente causador de cada micose.

Existem inúmeras técnicas de diagnóstico em Micologia (bioquímicas, sorológicas, moleculares, etc.), mas apenas as principais técnicas de identificação fúngica utilizadas na rotina laboratorial serão abordadas ao longo desse capítulo, com o objetivo de auxiliar no diagnóstico dos diferentes gêneros e/ou espécies de fungos causadores de doenças humanas.

PRINCIPAIS FUNGOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA

Existe mais de um milhão de espécies de fungos no mundo, dessas, aproximadamente 80 mil são conhecidas, e cerca de 200 são patogênicas. Devido a grande diversidade de fungos existentes, a classificação taxonômica torna-se complexa, e por isso, surgiu uma nova classificação que inclui apenas os fungos relacionados com as principais micoses que atingem os humanos e alguns animais. A tabela abaixo inclui a classificação das micoses, de acordo com as suas principais características clínicas, o nome das doenças, e os principais fungos causadores de cada micose.

Tabela 1. Classificação das micoses de acordo com os principais fungos causadores:

Classificação	Micose	Agente etiológico
Micoses Superficiais	Ptíriase Versicolor	<i>Malassezia</i> spp.
	Tinea Nigra	<i>Hortaea werneckii</i>
	Piedra Negra	<i>Piedraia hortae</i>
	Piedra Branca	<i>Trichosporon</i> spp.
Micoses Cutâneas	Dermatofitoses	<i>Microsporum</i> spp.
		<i>Trichophyton</i> spp.
		<i>Epidermophyton</i> spp.
Micoses Subcutâneas	Candidíase cutânea	<i>Candida</i> spp.
	Esporotricose	<i>Sporothrix schenckii</i>
	Micetomas	<i>Curvularia</i> spp.
		<i>Fusarium</i> spp.
		<i>Acremonium</i> spp.
	Micoses Sistêmicas	Cromoblastomicose
		<i>Phialophora verrucosa</i>
		<i>Cladosporium carrionii</i>
Micoses Oportunistas	Histoplasmose	<i>Histoplasma capsulatum</i>
	Blastomicose	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
	Paracoccidioidomicose	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
	Coccidioidomicose	<i>Coccidioides immitis</i>
Micoses Oportunistas	Candidíases	<i>Candida</i> spp.
	Criptococose	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	Aspergilose	<i>Aspergillus</i> spp.
	Fusariose	<i>Fusarium</i> spp.
	Zigomicoses	<i>Mucor</i> spp. <i>Rhizopus</i> spp.

Biossegurança

Pessoas que trabalham em laboratório de Micologia estão em risco de se expor e adquirir uma infecção fúngica. A exposição aos diferentes tipos de fungos pode ocorrer através de inalação, ingestão ou inoculação direta. Para evitar ou diminuir os riscos, deve-se estar atento às medidas de biossegurança. Para isso, devem ser obedecidas às normas e procedimentos das Boas Práticas de Laboratório (BPL), propostas por cada laboratório e devem ser utilizados equipamentos de proteção individual (EPIs). Cuidados mais específicos incluem:

- Utilizar tubos com meio inclinado, ao invés de placas de Petri;
- Manipulação de fungos patogênicos em cabine de segurança biológica;
- Todas as operações envolvendo manipulação de meios de cultura deverão ser efetuadas na área de proteção conferida pela chama do bico de Bunsen;
- Flambar a boca dos frascos e tubos antes e depois das inoculações, evitando a contaminação da cultura/material a ser analisado e garantindo que somente o fungo desejado será inoculado;

- Esterilizar adequadamente todo material (alças e fios) antes e depois de seu uso;
- Autoclavar materiais contaminados ou potencialmente infecciosos antes de serem lavados ou descartados. Padrão: 121°C por 15-30 minutos.

Diagnóstico Micológico

O diagnóstico laboratorial dos fungos de importância médica, em muitos casos, não é uma tarefa tão simples. É necessário ter amplo conhecimento das estruturas fúngicas, a fim de reconhecê-las macro e microscopicamente, identificando o fungo presente na amostra, e conhecer as diferentes espécies de fungos, para ter a capacidade de diferenciar fungos contaminantes, oportunistas ou patogênicos. Para a liberação de laudos confiáveis, também tem grande importância o bom relacionamento do laboratorista com a equipe médica, técnicos de laboratório e demais integrantes da equipe, pois dessa maneira, será possível obter informações precisas sobre o estado clínico do paciente e a coleta do material clínico.

Note: *O diagnóstico do fungo presente na amostra, para liberação de um laudo confiável, é baseado na união dos conhecimentos obtidos a partir dos dados clínicos do paciente com os dados laboratoriais.*

Coleta de materiais clínicos

A coleta de amostra com suspeita de infecção fúngica é a primeira etapa no diagnóstico laboratorial. O ideal é que a coleta seja realizada no próprio laboratório, caso não seja possível, a amostra deve ser armazenada em local adequado, e transportada ao laboratório o quanto antes.

É muito importante verificar, antes da coleta, se o paciente está fazendo uso de medicação antifúngica, já que o uso pode comprometer os resultados, gerando falso-negativos. O paciente deve ser orientado pelo seu médico a suspender a medicação por 15 dias (em caso de uso tópico) ou por 30 dias (em caso de uso sistêmico), e após esse período, realizar a coleta do material. A coleta deve ser feita por profissional treinado, e acompanhada de uma ficha contendo informações clínicas do paciente.

O primeiro passo consiste em realizar a antisepsia do local da lesão com álcool 70%, para evitar contaminação com a microbiota. A seguir, são adotadas técnicas específicas (descritas abaixo) dependendo do local da lesão.

Lesões na pele (descamativas):

1. Raspar as bordas das lesões com lâmina ou bisturi sem fio;
2. Acondicionar em placas de Petri estéreis.

Dica: *Não é necessário fazer raspagem profunda porque o fungo se encontra na camada mais superficial da pele. Quando houver dificuldade para obter escamas, pode-se pressionar sobre a lesão um pedaço de fita adesiva (com a parte adesiva voltada para a lesão) e após colocá-la sobre uma lâmina estéril.*

Lesões de pele (úmidas):

1. Raspar a lesão com swab;
2. Acondicionar em tubo com solução salina (NaCl a 0,9%).

Lesões de pele (vesículas e pústulas):

1. Puncionar com seringa e agulha ou pressionar usando o swab, desprezando o teto as vesículas.

2. Armazenar em tubo com salina.

Cabelos e pelos:

1. Localizar regiões representativas de infecção (alopecia ou inflamação);
2. Remover os pelos com uma pinça flambada. Se a lesão for ao longo do cabelo ou pelo (nódulos), esses devem ser cortados com tesoura.
3. Acondicionar em placas de Petri estéreis.

Unhas:

1. Cortar com tesoura e desprezar a parte descolada da unha,
2. Com o bisturi, raspar as áreas mais profundas e armazenar em placa de Petri.

Dica: Procurar penetrar bem e colher sempre na região limite entre a parte saudável e a afetada pelo fungo. Em casos de paroníquia (lesões na região da cutícula), colhem-se as escamas e, se possível, o pus, com um swab. Se as lesões são manchas esbranquiçadas na superfície da unha, raspar por cima com bisturi, removendo as escamas em placa de Petri.

Mucosas e secreções:

1. Raspar a região com swab estéril;

Observação: Devem ser realizadas duas coletas da região afetada (um swab será usado para realizar o exame direto e o outro servirá para o cultivo da amostra).

2. Armazenar em tubo com salina e acondicionar em refrigeração a 4°C.

Escarro:

1. Realizar rigoroso saneamento bucal (gargarejo com água limpa e fervida);
2. Coletar a expectoração natural (1ª da manhã) em frasco estéril.

Dica: Não é recomendado refrigerar.

Urina:

1. Fazer a degermação da região genitourinária externa com água e sabão neutro e colher amostra de 20 a 30 mL do jato intermediário da urina, em frasco estéril (não refrigerar).

Dica: Amostras de urina colhidas por sonda ou punção suprapúbica têm se mostrado melhores espécimes clínicos, pode-se coletar de 3 a 5 mL.

Fezes:

1. Após degermação da região anal com água e sabão, coletar a amostra em frasco estéril, armazenar em refrigeração e levar para a análise laboratorial o quanto antes (deve ser processado em um período máximo de 2 horas).
2. Ou proceder a coleta utilizando swab retal profundo, nesse caso, armazenar em tubo com salina e acondicionar em refrigeração a 4°C.

Pus e líquidos corporais:

1. Puncionar o abscesso ou o líquido;
2. Armazenar em tubo estéril e acondicionar em refrigerador por um período máximo de 24h.

Líquor:

1. Realizar punção lombar (apenas profissionais médicos qualificados) e coletar de 3 a 5 mL em tubo estéril,
2. Armazenar em temperatura ambiente até a realização da análise laboratorial, que deve ser realizada imediatamente, devido à gravidade de infecções no líquido.

Sangue periférico:

1. Coletar de 5 a 10 mL de sangue com anticoagulante (ou conforme recomendação do fabricante, em caso de sistema automatizado).
2. Injetar no meio de cultivo. A última gota do material pode ser utilizada para preparo de lâmina, para a realização do exame direto.

Medula óssea: mesmo procedimento descrito para sangue periférico, mas realizada apenas por profissional médico.

Biópsia de tecidos ou órgãos: a coleta deve ser feita exclusivamente por profissional habilitado e então armazenada em solução salina, a temperatura ambiente.

Conjuntiva e córnea: Deve ser feito apenas pelo médico oftalmologista.

1. Retirar material das áreas de ulcerações e supurações;
2. Inocular diretamente no meio de cultura e aguardar o crescimento.

Processamento das amostras

Após a realizar a coleta, as amostras devem ser processadas o mais rápido possível. A rotina de um laboratório de Micologia Clínica não necessita de equipamentos de alto custo, nem de técnicas complicadas ou de longa execução, apenas de um equipamento microscópio, lâminas, meios de cultivo, alças, bico de Bunsen e um ótimo profissional. As técnicas mais utilizadas para diagnóstico micológico pelos laboratórios são o exame direto e o cultivo.

1. Exame direto

Ao receber o material clínico com suspeita de infecção fúngica no laboratório, o profissional deve pensar, em primeiro lugar, em realizar o exame direto. É um exame simples, rápido, e de elevada importância, pois através dele, muitas vezes, já podemos dar um diagnóstico positivo para fungo em poucas horas. Para algumas micoses, como Ptíriase Versicolor, Criptococose (Meningite Criptocócica) e Paracoccidiodomicose, o exame direto é o diagnóstico definitivo. O preparo do exame direto varia de acordo com o material clínico, a maior parte dos procedimentos é feita utilizando uma solução de hidróxido de potássio (KOH), na concentração de 10 a 40%, que tem a função de clarificar o material clínico, facilitando a visualização das estruturas fúngicas, quando presentes. Os métodos mais utilizados estão listados abaixo.

Importante: lembrar que após o exame direto, também é realizado o cultivo do material, por isso, o material clínico deve ser dividido, metade para ser usado no exame direto, e metade para ser usado no cultivo (sem nenhum tratamento prévio).

1.1. Exame direto em escamas de pele, unhas, pelos, cabelos, pus e fragmentos de tecido

Materiais:

- Lâmina;
- Lamínula;
- KOH 10 a 40%;
- Alça ou fio em L;
- Bico de Bunsen;
- Microscópio;
- Luvas;
- Jaleco.

Procedimentos:

1. Flambar a alça ou fio e deixar esfriar um pouco;
2. Pingar duas gotas de KOH 10 a 40% na lâmina;
3. Molhar levemente a alça ou fio na lâmina para pegar o material clínico (fragmentos de tecido devem ser previamente cortados em pequenos pedaços);
4. Colocar o material clínico sobre o KOH e cobrir com lamínula;
5. Aguardar cerca de 15 minutos para analisar a lâmina em microscópio, com aumento de 40X (caso não haja visualização de estruturas fúngicas, deve-se esperar até 24 horas e realizar nova análise).

1.2. Exame direto em sangue e medula óssea:

Pode ser preparada uma lâmina utilizando centrifugação e coloração de Giemsa, porém, como a sensibilidade é muito baixa, normalmente não é realizado exame direto nesse material.

1.3. Exame direto em urina, escarro, secreções e líquidos corporais:

Materiais:

- Lâmina;
- Lamínula;
- KOH 10 a 40%;
- Alça ou fio em L;
- Bico de Bunsen;
- Microscópio;
- Luvas;
- Jaleco;
- Centrífuga.

Procedimentos:

1. Centrifugar a amostra a 2.000 rpm durante 10 minutos (De acordo com a ANVISA, os materiais coletados em swabs devem ser imersos em salina para a centrifugação);
2. Desprezar o sobrenadante;
3. Colocar duas gotas de KOH 10 a 40% em uma lâmina;
4. Flambar a alça e deixar esfriar;
5. Pegar uma alíquota do sedimento e colocar sobre o KOH;
6. Cobrir com a lamínula;
7. Aguardar cerca de 15 minutos para analisar a lâmina em aumento de 40X (caso não haja visualização de estruturas fúngicas, deve-se esperar até 24 horas e realizar nova análise).

Dica: as amostras podem ser coradas pela coloração de Gram ou Giemsa ao invés de KOH.

1.4. Exame direto em líquido**Materiais:**

- Lâmina;
- Lamínula;
- KOH 10 a 40%;
- Alça ou pipeta Pasteur;
- Bico de Bunsen;
- Microscópio;
- Centrífuga;
- Luvas;
- Jaleco;
- Tinta da China.

Procedimento:

1. Centrifugar a amostra a 2.000 rpm durante 10 minutos;
2. O sobrenadante deve ser separado caso seja necessário para outras análises laboratoriais;
3. Pegar uma alíquota do sedimento com pipeta Pasteur ou alça e colocar em uma lâmina, e cobrir com KOH e lamínula;
4. Pegar uma nova alíquota, colocar em lâmina e cobrir com uma gota de tinta da China e lamínula (pesquisa específica de *Cryptococcus* fungo mais comum nessa amostra);
5. Fazer a análise em microscópio, em aumento de 400X.

1.5. Exame direto em fezes

Materiais:

- Lâmina;
- Lamínula;
- KOH 10 a 40%;
- Alça ou pipeta Pasteur;
- Bico de Bunsen;
- Microscópio;
- Centrífuga;
- Luvas;
- Jaleco;
- Reagentes para coloração de Gram.

Procedimentos:

1. Colocar duas gotas de KOH em uma lâmina;
2. Flamba a alça;
3. Pegar uma alíquota de fezes e diluir com o KOH;
4. Cobrir com lamínula;
5. Pegar outra alíquota de fezes e colocar em outra lâmina;
6. Realizar a coloração de Gram;
7. Analisar ambas as lâminas em microscópio, com aumento de 400X.

2. Cultivo

O cultivo é a segunda etapa do diagnóstico micológico. Esse exame tem maior sensibilidade do que o exame direto, e através dele normalmente é possível identificar o gênero ou espécie do fungo. Em decorrência disso, se houver muito pouca quantidade de material clínico, deve-se optar pela realização do cultivo da amostra, e não do exame direto.

Existe uma grande variedade de meios de cultivo para fungos; apesar disso, um meio básico normalmente é utilizado: ágar Sabouraud dextrose (ASD), um meio não seletivo, que permite o crescimento de qualquer fungo. O ASD normalmente é acrescido de cloranfenicol, para impedir o crescimento bacteriano, evitando contaminações, e em casos específicos, pode ser acrescido de cicloeximida, para evitar o crescimento de fungos contaminantes. Como fungos contaminantes pode se tornar oportunistas em casos de pacientes imunodeprimidos, a escolha de uso desse meio deve ser cuidadosa, de acordo com o quadro clínico do paciente. Se houver suspeita de *Pitiríase Versicolor*, o ASD deve ser acrescido de óleo de oliva.

Os meios de ASD podem ser adquiridos comercialmente e hidratados no laboratório, conforme recomendação do fabricante, mas algumas medidas devem ser adotadas:

- Distribuir os meios em tubos, e não em placas;
- Esterilizar por autoclavagem a 121°C por 15 minutos;

- Deixar solidificar com o tubo inclinado, deixando espaço de aproximadamente 2 a 3 centímetros no final do tubo, para evitar contaminação;
- Fechar os tubos com algodão ou tampa de rosca levemente fechada;
- Após solidificar, os meios devem ser armazenados em sacos plásticos fechados e mantidos a temperatura ambiente durante sete dias, para confirmar a esterilidade (meios com crescimento fúngico devem ser descartados).

Materiais:

- Alça ou fio em L;
- Bico de Bunsen;
- Luvas;
- Jaleco;
- Meios de cultivo;
- Amostra clínica;
- Estufa.

Procedimentos:

Com os meios de cultivo previamente preparados, o isolamento primário do fungo pode ser feito da seguinte maneira:

1. Separar metade do material clínico (outra metade para o exame direto);
2. Flambar a alça ou fio em L;
3. Flambar a boca do tubo do meio de cultivo ao abrir e segurá-lo próximo à chama do bico de Bunsen;
4. Pegar o material clínico.

Dica: A alça pode ser umedecida no meio para facilitar na manipulação de escamas de pele, unhas e pelos ou cabelos;

Materiais líquidos podem ser manipulados com pipeta Pasteur;

Materiais coletados com swab devem ser manipulados com o próprio swab;

5. Com a alça ou fio, semear o material clínico na superfície do meio, com movimentos de estrias em zigue-zague (se houverem fragmentos de material, devem ser dispostos no meio em pontos equidistantes);
6. Flambar novamente a boca do tubo, e fechá-lo;
7. Se houver excesso de material clínico, podem ser semeados dois meios de cultura;
8. Incubar o meio de cultura entre 25 e 30°C (em estufa ou à temperatura ambiente);
9. Fazer verificações periódicas nos meios para visualizar se há crescimento fúngico, o que pode ocorrer em 24 a 72 horas para fungos leveduriformes ou em até 30 dias para fungos filamentosos;

Observe: Se não houver crescimento fúngico após 30 dias, o meio pode ser descartado.

Análise dos resultados:

Análise da macromorfologia → é feita a análise da colônia fúngica a olho nu. As características macroscópicas de alguns fungos são bem distintas, podendo auxiliar no diagnóstico. Pode-se observar o tamanho da colônia, características das bordas, textura (algodonosa, aveludada, arenosa, glabra etc.), relevo (cerebriforme, apiculada, rugosa, lisa ou crateriforme) e cor.

Análise da micromorfologia → é feita a análise da colônia no microscópio:

1. Flambar a alça ou fio e a boca do tubo do meio de cultura;
2. Deixar esfriar um pouco;
3. Raspar no meio de cultivo para pegar uma alíquota da colônia;
4. Colocar sobre uma lâmina limpa;
5. Pingar 1 ou 2 gotas de KOH ou lactofenol azul de algodão;
6. Cobrir com lamínula;
7. Analisar no microscópio na busca de estruturas fúngicas específicas (macro e microconídios, hifas em espiral, células leveduriformes etc).

Importante: certificar de que a cultura esteja pura, para que contaminações não confundam o diagnóstico.

3. Diagnóstico Micológico (Laudo)

Para chegar à conclusão final do diagnóstico, devem-se reunir todas as informações possíveis, evitando erros ou confusões. Possuindo as características da lesão ou do estado clínico do paciente, o resultado do exame direto e os resultados da macro- e micromorfologia após o cultivo do fungo, tem-se informações para elaboração de um laudo confiável. O laudo contendo o diagnóstico micológico deve ser simples, contendo a descrição morfológica das principais estruturas fúngicas observadas e sugestão do patógeno relacionado, quando possível.

Após análise do material clínico, normalmente pode-se chegar a três situações:

- a) Não foi observada nenhuma estrutura fúngica no exame direto e não houve crescimento de colônia no meio de cultivo. Nesse caso, o laudo pode ser: *“Não foram visualizadas estruturas fúngicas na amostra analisada”*.
- b) Foram observadas estruturas fúngicas, mas nenhuma que fosse específica de um determinado fungo, impossibilitando a identificação do agente causador. Nesse caso, devemos descrever com clareza os achados laboratoriais, sugerindo um grupamento fúngico, ou sem sugestão de fungo, por exemplo: *“Presença de hifas hialinas septadas, sugestivas de dermatófitos”*. Ou *“Presença de hifas demáceas septadas, com ramificações”*.
- c) Foram observadas estruturas fúngicas específicas o suficiente para fazer a identificação do gênero ou espécie do fungo. Nesse caso, os laudos podem ser, por exemplo: *“Presença de blastoconídios sugestivos de Candida sp.”* ou *“Isolamento de Trichophyton rubrum”*.

4. Identificação de fungos dimórficos

Uma das primeiras características microscópicas que se observa no diagnóstico laboratorial micológico é a morfologia celular. Alguns fungos são unicelulares, conhecidos como leveduras, enquanto outros fungos têm uma estrutura multicelular mais complexa, são compostos por um conjunto de células tubulares, que formam as hifas, e são chamados de fungos filamentosos. Porém, existe um grupo de fungos que pode assumir a forma de levedura ou de fungo filamentoso, dependendo da temperatura, e por isso são chamados de fungos dimórficos.



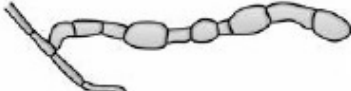







Os fungos dimórficos, quando expostos à temperatura de 25°C, crescem como filamentosos, e quando estão à temperatura de 37°C, crescem como leveduras. Esse grupo de fungos geralmente causa micoses graves, o que torna o diagnóstico correto mais importante. Para fazer a identificação desses fungos, usa-se a característica dimórfica deles para fazer a confirmação da espécie, conforme descrito abaixo.

Suspeita de fungo dimórfico:

- a) Em material clínico analisado pelo exame direto, aparecerão fungos leveduriformes, pois é a morfologia de fungos dimórficos a 37°C, temperatura do corpo humano;
- b) A amostra será então semeada em meio de cultivo, onde crescerá colônia fúngica na temperatura de 25°C;
- c) Após verificação da macro e micromorfologia, serão visualizadas hifas, e conclui-se se tratar de um fungo filamentoso, com estruturas morfológicas semelhantes à um fungo dimórfico;

Confirmação de fungo dimórfico e identificação da espécie:

- a) Com auxílio de alça ou fio flambado, pegar uma alíquota da colônia;
- b) Semear em um novo meio de cultivo enriquecido, tais como ágar sangue ou ágar infusão cérebro coração (BHI);
- c) Incubar em uma estufa a 37°C;
- d) Após crescimento fúngico, analisar macro e micromorfologia;
- e) A identificação do gênero e espécie do fungo é feita pela visualização do aspecto microscópico característico de cada fase, que se apresenta, na maioria dos casos, conforme imagens a seguir:

Fungo	25°C	37°C
<i>Blastomyces dermatitidis</i>		
<i>Coccidioides immitis</i>		
<i>Histoplasma capsulatum</i>		
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>		
<i>Sporothrix schenkii</i>		

Fonte: adaptada de KAMESWARAN, 2009.

5. Teste do tubo germinativo

O teste do tubo germinativo é o principal método laboratorial utilizado para identificação presuntiva de *Candida albicans*. É importante fazer essa identificação, pois algumas espécies possuem resistência intrínseca a alguns antifúngicos, dessa maneira, a identificação da espécie ajuda a nortear a conduta terapêutica.

O tubo germinativo é um brotamento em forma de pseudo-hifa que se forma nas células leveduriformes de *Candida albicans*, quando incubadas a 37°C, e pode ser facilmente visualizado em microscópio.

Materiais:

- Lâmina;
- Lamínula;
- Alça ou fio em L;
- Pipeta pasteur;
- Bico de Bunsen;
- Luvas;
- Jaleco;
- KOH 10 a 40%;
- Soro humano;
- Microscópio;
- Estufa.

Procedimento:

1. Colocar 0,5 mL de soro humano em um tubo de ensaio;

2. Pegar uma alçada da colônia de *Candida* sp. isolada;
3. Fazer uma suspensão no tubo de ensaio contendo soro humano;
4. Incubar em estufa a 37°C durante 1 a 3 horas (máximo de 3 horas);
5. Com a pipeta Pasteur, depositar uma gota sobre lâmina-lamínula;
6. Examinar ao microscópio óptico, em aumento de 400X.
7. Análise do resultado:

Resultado negativo: ausência de tubo germinativo. São visualizados apenas blastoconídios, e não é possível identificar a espécie de *Candida*. **Laud:** “Isolamento de *Candida* sp.”.

Resultado positivo: presença de tubo germinativo, na forma de pequeno filamento que brota do blastoconídio, sem formar constrição com a célula-mãe. **Laud:** “Isolamento de *Candida albicans*”.

Dica: Outra maneira de fazer identificação das espécies de *Candida* é adquirir comercialmente os meios CHROMagar, nesses meios, a amostra clínica é semeada em placa, e cada espécie cresce em uma colônia com coloração diferente, sendo possível identificar a espécie simplesmente pela cor visualizada a olho nu na placa.

6. Prova da urease

Alguns testes bioquímicos podem ser utilizados para auxiliar no diagnóstico laboratorial, quando não é possível fazer a identificação através do exame direto ou cultivo do material clínico. Existem testes que avaliam a assimilação de carbono e nitrogênio, chamados de auxanogramas, e testes que verificam a fermentação de açúcares, conhecidos como zimogramas. Como esses testes são apenas auxiliares, e, laboriosos, necessitando de reagentes específicos, muitas vezes não são realizados.

O teste da urease se baseia na capacidade de alguns fungos em hidrolisar a ureia, o ágar utilizado para esse teste muitas vezes está disponível no laboratório de microbiologia, o que o torna mais utilizado. Fungos que hidrolisam a ureia tornam o meio alcalino, e há mudança de cor devido ao indicador de pH presente no meio. Esse teste pode ser utilizado quando for isolado o gênero *Trichophyton* no cultivo, mas sem estruturas específicas para fazer a identificação da espécie, o *Trichophyton mentagrophytes* é capaz de hidrolisar a ureia (teste positivo), o *Trichophyton rubrum* não (teste negativo). O teste da ureia também pode ser usado na diferenciação de leveduras, onde os gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* são positivos, enquanto *Candida* e *Geotrichum* são negativos.

Materiais:

- Alça ou fio em L;
- Pipeta pasteur;
- Bico de Bunsen;
- Luvas;
- Jaleco;
- Estufa;
- Ágar de Christensen ureia.

Procedimento:

1. Pegar uma alçada da colônia previamente isolada;
2. Fazer o repique no ágar de Christensen ureia;
3. Incubar em estufa a 25°C ou temperatura ambiente;
4. Aguardar até 5 dias;
5. Verificar se houve mudança na coloração do meio e analisar o resultado:

Resultado negativo: o meio, que originalmente é da cor amarelo (alaranjado), continua da mesma cor, significa que não houve mudança de pH, pois o fungo não hidrolisa ureia.

Resultado positivo: o meio vai trocar de amarelo para rosa forte devido a alteração do pH, provocada pela hidrólise da ureia.

7. Técnica de microcultivo

Quando não foi possível fazer a identificação do fungo presente na amostra, utilizando as metodologias abordadas anteriormente, pode ser utilizada a técnica de microcultivo.

Através dessa técnica, utiliza-se uma pequena placa de ágar, sobre uma lâmina, onde é feito o “microcultivo”. Essa montagem é utilizada para visualização no microscópio. Dessa maneira, as estruturas fúngicas permanecem íntegras, tornando a visualização e identificação mais fáceis. Como previamente mencionado, o ASD é o mais frequente na rotina laboratorial, mas além dele, o ágar dextrose batata e o ágar Fubá também são indicados para o microcultivo, por estimularem maior produção de macro e microconídios, que auxiliam na identificação. O procedimento deve ser realizado em cabine de segurança biológica, para evitar contaminação.

Materiais:

- Lâmina;
- Lamínula;
- Alça ou fio em L;
- Bico de Bunsen;
- Luvas;
- Jaleco;
- Algodão;
- Placas de petri;
- Microscópio;
- Estufa;
- Água destilada estéril;
- Pinça;
- Ágar Sabouraud ou ágar Fubá ou ágar dextrose batata;
- Corante lactofenol azul de algodão;
- Autoclave;
- Cabine de segurança biológica.

Procedimento:

1. Separar o cultivo que se deseja identificar;
2. Esterilizar placas de Petri com 3 lâminas no interior (duas servem para suporte e a outra para realizar o microcultivo);
3. Preparar ágar em placa;
4. Cortar em cubos;
5. Colocar um cubo de ágar no centro da lâmina do microcultivo;
6. Com a alça, retirar pedaços bem pequenos da colônia que se deseja identificar;
7. Semear os fragmentos retirados nas extremidades do ágar que está sobre a lâmina;
8. Cobrir com lamínula estéril, pressionando levemente;
9. Colocar um pouco de água destilada estéril no algodão e colocar dentro da lâmina (para não secar o cubo de meio);
10. Incubar a 25°C, repondo a água estéril, sempre que necessário;
11. Quando for visualizado que há crescimento fúngico, fazer a montagem da lâmina;
12. Colocar uma ou duas gotas de lactofenol azul de algodão sobre uma lâmina limpa;
13. Retirar a lamínula que está cobrindo o microcultivo e colocar sobre o lactofenol da lâmina;
14. Visualizar no microscópio, em aumento de 400X.

Observação: A lâmina que serviu de suporte para o cubo de ágar também pode ser analisada, é só retirar o pagar, pingar uma gota de lactofenol, cobrir com lamínula e observar ao microscópio.

Referências

ANVISA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde.** Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/czDH>>.

KAMESWARAN M, RAGHUNANDHAN S. Saprophytic Mycotic Infections of the Nose and Paranasal Sinuses. **Otorhinolaryngology Clinics: An International Journal.** v. 1, p. 25-31, 2009.

MEZZARI A, FUENTEFRÍA, AM. **Micologia no laboratório clínico.** Barueri, SP: Manole, 2012.

SIDRIM JJC, ROCHA, MFG. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

CAPÍTULO IX

PARASITOLOGIA

Gabriela Kniphoff da Silva Lawisch

Geórgia Muccillo Dexheimer

Jairo Luis Hoerlle

O EPF (Exame parasitológico de fezes) é uma análise laboratorial utilizada para pesquisa e identificação de ovos ou larvas de helmintos e cistos, trofozoítos ou oocistos de protozoários que parasitam o intestino. O exame deve ser realizado a partir de uma ou mais amostras de fezes, devidamente coletadas em frasco adequado fornecido pelo laboratório sem contato com o vaso sanitário. É importante que o frasco seja identificado corretamente e fechado. Caso este não seja direcionado imediatamente ao laboratório, deve ser refrigerado. Da mesma forma, a amostra deve ser mantida sob refrigeração no laboratório até o momento de sua análise.

Antes da análise microscópica, deve-se avaliar a amostra macroscopicamente, a fim de observar características como cor, odor, consistência presença de sangue ou muco. Além disso, podem-se encontrar vermes adultos, como proglotes de *Taenias* sp., *Enterobius vermicularis* que migram para o ânus, *Ascaris lumbricoides* que também podem ser eliminados inteiros nas fezes. Estes dados são importantes para o resultado final do exame.

É importante ressaltar que a presença de um parasita no intestino não levará obrigatoriamente a um resultado laboratorial positivo, pois a presença de cistos ou ovos dependerá do ciclo em que o parasita se encontra. Por isso, é indicada a realização de exame de fezes de três amostras, sendo estas coletadas com intervalos de 2 a 3 dias entre elas.

No laudo devem conter todos os parasitas encontrados na análise, contendo o nome científico de cada um e o estágio do parasita (por exemplo: ovos, larvas ou cistos).

Existem diferentes técnicas para a detecção de parasitas, sendo cada uma destas elaboradas para facilitar a visualização de estruturas específicas. Alguns métodos são gerais, permitindo observar diferentes parasitas, como o método de Hoffman, Pons e Janer e também o método de Richie.

1. Exame Direto de fezes

Este é um procedimento simples que permite a visualização de trofozoítos vivos. Porém, é utilizada uma pequena quantidade de amostra fecal, tornando o teste pouco sensível. Assim, devido à pequena quantidade de fezes examinada por esta técnica, ela somente é recomendada para fezes líquidas (que podem conter trofozoítos de protozoários).

Materiais:

- Lâminas;
- Lamínulas;
- Água ou solução salina (0,85%);
- Bastão de vidro ou palito;

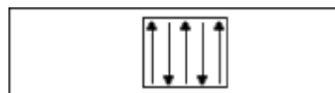
- Lugol;
- Microscópio;
- Amostra de fezes frescas (não preservadas);
- Luvas;
- Jaleco.

Procedimentos:

1. Coloque uma pequena quantidade de fezes (grão de arroz) em uma lâmina.
2. Diluir a amostra em 1 gota de água sobre a lâmina.
3. Adicionar 1 gota de lugol, homogeneizar. A suspensão deve ter espessura fina o suficiente para permitir a passagem da luz. Procure não deixar uma porção não misturada de fezes no centro. A suspensão deve ser homogênea. Observe a imagem abaixo:



4. Cobrir com lamínula.
5. Examine a lâmina com uma objetiva de 10X e, posteriormente, mude para a objetiva de 40X. A inspeção da lâmina deverá ser feita escolhendo-se um canto e então movendo a lâmina para o canto oposto, em um movimento de ida e volta, procurando sobrepor parcialmente os campos microscópicos, de acordo com a imagem abaixo.



6. Após a análise de toda a lâmina, o resultado deve ser reportado no laudo da amostra de acordo com as estruturas visualizadas e identificadas.

2. Método de Lutz (1919) ou de Hoffmann, Pons e Janer (1934), ou Técnica de Sedimentação Espontânea

Método de concentração que permite a visualização de ovos e larvas de helmintos e de cistos e oocistos de protozoários.

Materiais:

- Água corrente ou destilada;
- Microscópio;
- Amostra de fezes frescas (não preservadas);
- Luvas;
- Jaleco;
- Cálice de sedimentação (cônico);
- Copo descartável;

- Peneira ou peneira coprológica;
- Gaze;
- Espátula de madeira (tipo abaixador de língua);
- Pipetas Pasteur ou pipeta de vidro
- Lâmina;
- Lamínula.

Procedimentos:

1. Colocar cerca de 5g de fezes, coletados de várias partes do bolo fecal, em um frasco pequeno (copo descartável).
2. Colocar cerca de 30 mL de água e homogeneizar com a espátula (dissolver bem).
3. Filtrar essa suspensão através de uma peneira coprológica (ou peneira coberta com gaze dobrada 4 vezes), recolhendo-a em um cálice de sedimentação.
4. Adicionar água corrente, até completar aproximadamente $\frac{3}{4}$ do volume do copo cônico.
5. Deixar a suspensão em repouso em superfície firme e livre de vibrações durante 1 a 2 horas (até 24h).
6. Recolha uma porção do sedimento com uma pipeta Pasteur.

Dica: *colher amostras adicionais do centro e do fundo do sedimento.*

7. Para evitar contaminação, parte do líquido pode ser descartada antes da coleta do sedimento.
8. Coloca-se o líquido entre lâmina e lamínula.
9. Examinar ao microscópio, utilizando o aumento de 40X.
10. A inspeção da lâmina deverá ser feita escolhendo-se um canto e então movendo a lâmina para ao canto oposto, em um movimento de ida e volta, procurando sobrepor parcialmente os campos microscópicos.

Em caso de sobrenadante muito sujo, MELVIN & BROOKE, (1982) e ASH & ORIHEL (1987) apresentaram a seguinte conduta alternativa, depois de concluída a etapa 5:

- a) *Desprezar com cuidado 2/3 do líquido sobrenadante sem perder nenhuma porção do sedimento;*
- b) *Ressuspender o sedimento em água corrente, e deixar a suspensão em repouso por mais 1 h;*
- c) *Esse procedimento de lavagem pode ser repetido até o líquido sobrenadante fique relativamente claro. Após, seguir as demais etapas na técnica acima descrita.*

3. Método de Ritchie (1948) ou Técnica de Centrífugo-Sedimentação (formol-éter)

Método baseado na sedimentação através de centrifugação. Utilizado para visualização de ovos e larvas de helmintos, cistos e oocistos de protozoários.

Materiais:

- Água corrente ou destilada;
- Microscópio;
- Amostra de fezes frescas (não preservadas);
- Luvas;
- Jaleco;
- Funil
- Tubos tipo Falcon de 15 mL;
- Proveta;
- Copo descartável;
- Peneira ou peneira coprológica;
- Gaze;
- Espátula de madeira (tipo abaixador de língua);
- Pipetas Pasteur ou pipeta de vidro;
- Lâmina;
- Lamínula;
- Pipeta de vidro;
- Pera de borracha;
- Formol a 10%;
- Éter PA;
- Centrífuga;
- Lugol.

Procedimentos:

1. Colocar cerca de 5 g de fezes, coletados de várias partes do bolo fecal, em um frasco pequeno (copo descartável).
2. Colocar 10 mL de água e homogeneizar com a espátula (dissolver bem).
3. Transferir para um tubo tipo Falcon de 15 mL, filtrando com um funil e gaze dobrada 2 vezes.
4. Centrifugar em 1500 rpm por 2 minutos.
5. Desprezar o sobrenadante.
6. Adicionar mais 10 mL de água.
7. Centrifugar em 1500 rpm por 2 minutos.

8. Repetir esse processo até o sobrenadante ficar claro.
9. Após desprezar o último sobrenadante, adicionar 10 mL de formol 10%.
10. Homogeneizar por inversão, ou utilizando o agitador de tubos.
11. Esperar 10-20 min.
12. Adicionar 3 mL de éter e agitar bem por inversão.
13. Centrifugar a 1.500 rpm por 2 minutos.
14. Formam-se quatro camadas:
 - a) Sedimento no fundo do tubo contendo parasitas.
 - b) Camada de formol.
 - c) Camada de detritos fecais.
 - d) Camada de éter na superfície.
15. Desprezar o sobrenadante (3 camadas superiores).
16. Com a pipeta Pasteur, pegar uma porção do sedimento, colocar na lâmina.
17. Adicionar uma gota da solução de lugol.
18. Colocar a lamínula.
19. Examine a lâmina com uma objetiva de 10X e, posteriormente, mude para a objetiva de 40X. A inspeção da lâmina deverá ser feita escolhendo-se um canto e então movendo a lâmina para ao canto oposto, em um movimento de ida e volta, procurando sobrepor parcialmente os campos microscópicos.

4. Método de Willis (1921), ou Técnica de Flutuação Simples

Método utilizado para visualização de estruturas parasitárias leves, como cistos e oocistos de protozoários e ovos leves de helmintos, principalmente ancilostomídeos.

Materiais:

- Tubos tipo Borrel;
- Espátula de madeira (tipo abaixador de língua);
- Lâmina;
- Lamínula;
- Solução saturada de NaCl;
- Luvas;
- Jaleco;
- Amostra de fezes frescas;
- Lugol;
- Microscópio.

Procedimentos:

1. Colocar cerca 5 g de fezes em um frasco Borrel (pode ser usado o próprio frasco no qual as fezes foram enviadas).

2. Com o palito, diluir as amostras em solução saturada de açúcar ou sal (NaCl) até total homogeneização.
3. Completar o volume até a borda do frasco.
4. Colocar na boca do frasco uma lâmina, que deverá estar em contato com o líquido.
5. Deixar em repouso por 15 minutos.
6. Ao final do tempo, retirar rapidamente a lâmina, voltando a parte molhada para cima.
7. Cobrir com lamínula, corar com Lugol e examinar ao microscópio (o uso de lugol e de lamínula é facultativo).

Observações: *Os ovos não flutuam na superfície do reagente quando a homogeneização do material fecal é incompleta, havendo uma imperfeita separação dos ovos e dos detritos fecais. A flutuação pode não ocorrer se o tempo for muito curto (menos de 30 minutos), ou muito longo (mais de 60 minutos). Nesse caso os ovos que flutuam na superfície podem descer para o fundo da pequena cuba (Suzuki, 1980).*

5. Método de Faust (1938), Técnica de Centrífugo-Flutuação

Método utilizado para visualização de cistos e oocistos de protozoários e ovos leves de helmintos.

Materiais:

- Copos de plástico;
- Espátula de madeira (tipo abaixador de língua);
- Tubos tipo Falcon de 15 mL;
- Funil;
- Lâmina;
- Lamínula;
- Centrífuga;
- Solução de sulfato de zinco;
- Copos cônicos;
- Peneiras;
- Alças de platina;
- Luvas;
- Jaleco;
- Água corrente ou destilada;
- Amostra de fezes fresca;
- Alça de arame.

Procedimentos:

1. Colocar 1 ou 2 g de fezes coletadas de várias partes do bolo fecal em frasco.
2. Adicionar água corrente e homogeneizar a amostra com a espátula.

3. Filtrar essa suspensão através de uma peneira coprológica em um tubo cônico.
4. Com o auxílio de um funil, transferir o conteúdo para um tubo tipo Falcon.
5. Adicionar água corrente até completar 10 mL.
6. Centrifugar a 2.500 rpm por 1 minuto.
7. Descartar o sobrenadante.
8. Adicionar 1 a 2 mL de água corrente ao sedimento e ressuspendê-lo.
9. Completar com água corrente até 10 mL, agitar por inversão ou com o auxílio do agitador de tubos, e centrifugar novamente.
10. Repetir as etapas 7, 8 e 9, até que o sobrenadante se apresente relativamente claro.
11. Depois que o último sobrenadante é descartado, homogeneizar o sedimento (agitando levemente o tubo).
12. Completar com sulfato de zinco até 0,5 cm da borda do tubo e centrifugar.
13. Cuidadosamente, remover o tubo da centrífuga e, sem agitação e colocá-lo em uma estante em posição vertical.
14. Com uma alça de arame (diâmetro de 5 a 7 mm) tocar no centro da membrana formada na superfície, transferido várias alçadas para uma lâmina de microscopia.
15. No microscópio, no aumento de 400X, procurar ovos, larvas e cistos.

Observações: *Alguns pesquisadores preferem a sobreposição de uma lamínula na borda do tubo à remoção da película com alça. Para isso, após a etapa 11, encher o tubo até a borda com sulfato de zinco, colocar uma lamínula na superfície do tubo, deixar em contato por 10 minutos. Remover a lamínula e colocar sobre uma lâmina, para então fazer a análise microscópica (BURROWS, 1965; MELVIN & BROOKE, 1982).*

6. Método de Baermann (1917) e Moraes (1948) ou Técnica de Concentração de Larvas

Este método é utilizado para a visualização de larvas de helmintos através de migração ativa por hidrotropismo e termotropismo das larvas que saem do material, migrando para a água quente; por densidade, se depositam no fundo do funil. As fezes devem ser frescas e sem conservantes. Costuma-se construir um pequeno suporte de tábua, com vários furos circulares para receberem os funis, facilitando o trabalho.

Materiais:

- Luvas;
- Jaleco;
- Funil com tubo de látex;
- Erlenmeyer;
- Água destilada ou corrente a 40°C;
- Gaze;
- Clips;
- Tubo cônico (Falcon) de 15 mL;

- Microscópio;
- Lâmina;
- Lamínula;
- Centrífuga;
- Lugol.

Procedimentos:

1. Montar o material de trabalho:
 - a) Pegar o funil, dobrar o tubo de látex e prender com *clips*.
 - b) Colocar o funil dentro de um erlenmeyer.
 - c) Colocar a gaze dobrada sobre o funil.
2. Encher o funil com água corrente, aquecida a 40-45°C.
3. Colocar 8 a 10 g de fezes, sobre gaze dobrada quatro vezes e, se necessário, juntar mais água, até que as fezes fiquem submersas.
4. Deixar em repouso durante 60 minutos.
5. Levantar o funil, colocar um tubo cônico (Falcon) abaixo do tubo de látex.
6. Abrir o *clips* e coletar parte do líquido no tubo cônico.
7. Centrifugar (2.000 rpm por 1 min).
8. Desprezar o sobrenadante.
9. Colocar o sedimento entre lâmina e lamínula com uma gota de lugol (importante para identificação das larvas).
10. Examinar ao microscópio com os aumentos de 100 e 400X.

7. Método de Ritchie, 1948; modificado por Allen & Ridley, 1970. Técnica de Centrífugo-Sedimentação Modificada

O método de Ritchie modificado tem a finalidade de diminuir os artefatos fecais. Permite a visualização de ovos e larvas de helmintos, cistos e oocistos de protozoários.

Materiais:

- Luvas;
- Jaleco;
- Copos de plástico;
- Espátula de madeira (tipo abaixador de língua);
- Tubos tipo Falcon de 15 mL;
- Funil;
- Lâmina;
- Lamínula;
- Centrífuga;

- Solução de sulfato de zinco;
- Copos cônicos;
- Peneiras;
- Alças de platina;
- Amostras frescas de fezes ou formolizadas;
- Solução de formaldeído a 10%;
- Éter absoluto;
- Swab de algodão;
- Coloração de Giemsa ou Henriksen e Pohlenz.

Procedimentos:

1. A técnica de Ritchie, modificada por Allen & Ridley, é a que apresenta os melhores resultados. A concentração pode ser realizada a partir de fezes frescas ou formolizadas.

Dica: Sendo a amostra mucosa, ela deverá ser fluidificada, sob agitação, com algumas gotas de hidróxido de potássio a 10%.

2. Diluir 1 ou 2 g de fezes frescas ou formolizadas em 7mL de solução de formaldeído a 10 %.
3. Filtrar em gaze dobrada quatro vezes e receber o filtrado em tubo cônico de centrífuga de 15 mL.
4. Adicionar 3 mL de éter, fechar o tubo e agitar vigorosamente, na posição invertida, por 30 segundos. Remover a tampa com todo cuidado.
5. Centrifugar a 500 xg por 2 min. Quatro camadas se formarão: (1) sedimento no fundo do tubo contendo os parasitas; (2) camada de forrmalina; (3) tampão de detritos fecais, e (4) camada de éter na superfície.
6. Afrouxar e separar o tampão de detritos das paredes do tubo com estilete fino, e com cuidado decantar as três camadas superiores. Limpar com swab de algodão as paredes do tubo, removendo os detritos remanescentes.
7. Uma pequena quantidade de líquido permanece nas paredes do tubo, escorrendo para o fundo junto ao sedimento. Misturar o líquido e o sedimento e preparar as lâminas para a pesquisa de ovos, larvas e cistos.
8. Corar o sedimento pelos métodos de Giemsa ou de Henriksen e Pohlenz.

Observação: Adicionar 10 gotas de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 10% ao sedimento, quando este se apresentar mucoide (RITCHIE, 1948; LEMETEIL, 1987).

9. Observar no microscópio com aumentos de 100 e 400X.

8. Métodos de Coloração Derivados de Ziehl – Neelsen. Técnica de Pesquisa de Coccídeos

Esta técnica é baseada na coloração álcool-ácido-resistente dos parasitas e pode ser utilizada como auxílio na detecção de oocistos de *Isospora belli* e também *Cryptosporidium* spp. A diferenciação depende do corante, de ensaios preliminares sobre fezes positivas para adaptar a concentração do ácido a ser utilizada, e da definição dos tempos de diferenciação.

Current (1990) usa a solução aquosa de ácido sulfúrico a 10% na etapa 6 e os corantes *light green SF (Solid Form) yellowish* (CI 42095) ou azul-de-metileno a 0,3% (CI 42780) diluídos em água destilada - deionizada na etapa 8. Outros autores preferem lavar o esfregaço na etapa 7 com álcool etílico a 50% (v/v). Alguns procedimentos usam o método a quente. Entretanto, a coloração a frio apresenta os melhores resultados. O escarro deverá ser tratado com solução de formaldeído a 10% e processado como as amostras fecais.

Materiais:

- Luvas;
- Jaleco;
- Lâmina;
- Lamínula;
- Álcool metílico;
- Alças de platina;
- Amostras frescas de fezes ou preservadas;
- Corante de Kinyoun (solução de Fucsina fenicada);
- Solução aquosa de ácido sulfúrico a 2 %;
- Verde de malaquita a 5 %;
- Água corrente ou destilada.

Procedimentos:

1. Preparar o esfregaço com fezes frescas ou preservadas.
2. Deixar secar à temperatura ambiente.
3. Fixar com álcool metílico por 5 minutos e deixar secar à temperatura ambiente.
4. Corar com o corante de Kinyoun (a frio) durante 1 hora.
5. Lavar com água corrente.
6. Diferenciar com solução aquosa de ácido sulfúrico a 2%.
7. Lavar com água corrente.
8. Corar o fundo com solução de verde de malaquita a 5% por 8 minutos.
9. Lavar com água corrente e secar.
10. Observar em Microscópio com os aumentos de 100 e 400X.

9. Método de Rugai, Mattos & Brisola (1954)

Este método é utilizado para a visualização de larvas de helmintos através de migração ativa por hidrotropismo e termotropismo. As fezes devem ser frescas e sem conservantes. Indicado para a pesquisa de larvas de *Strongyloides stercoralis*.

Materiais:

- Luvas;
- Jaleco;

- Lâmina;
- Lamínula;
- Copo cônico de sedimentação;
- Gaze;
- Alças de platina;
- Amostras frescas de fezes;
- Água corrente ou destilada aquecida a 40°C;
- Pipeta capilar;
- Lugol.

Procedimentos:

1. Estender, sobre a abertura de um recipiente contendo fezes, gaze dobrada quatro vezes, e repuxar as extremidades para trás;
2. Encher, com aproximadamente 70 a 100 mL de água corrente aquecida a 40-45°C, um copo cônico de sedimentação (capacidade de 125 mL);
3. Transferir o recipiente com as fezes para o interior do copo cônico de sedimentação, de modo que o líquido alcance toda a extensão da abertura do recipiente, cuidando para não formar bolhas de ar;
4. Deixar em repouso durante 60 minutos.
5. Colher o sedimento, no fundo do copo cônico, com pipeta capilar longa.

Dica: *Alguns autores recomendam retirar o recipiente do copo Cônico antes da colheita do sedimento. Entretanto, outros preferem manter o recipiente, para evitar o revolvimento do líquido.*

6. Corar a preparação com solução de lugol.
7. Observar ao microscópio com os aumentos de 100 e 400X.

10. Pesquisa de Sangue Oculto Nas Fezes

A presença de Sangue Oculto nas fezes está diretamente associada com desordens gastrointestinais como hemorroidas, fissura anal, diverticulite, pólipos, Doença de Crohn, câncer coloretal, úlceras gástricas ou duodenais, infecção intestinal, dentre outras. Quantidades pequenas de sangue nas fezes ou sangramentos detectáveis somente após a limpeza do ânus com papel higiênico são as formas mais comuns de sangramento retal. Em 90% dos casos, a etiologia é benigna e corresponde principalmente a hemorroidas e fissuras anais. Quando a quantidade de sangue nas fezes é moderada ou grande, ou quando há melenas (fezes com sangue digerido), a origem do sangramento costuma ser é mais interna, geralmente cólon ou estômago. O câncer coloretal é uma das principais causas.

Materiais:

- Amostra de fezes frescas;
- Luvas;
- Jaleco;

- Papel filtro;
- Água oxigenada;
- Solução de benzidina.

Procedimentos:

1. Espalhar pequena quantidade de fezes sobre o papel de filtro limpo;
2. Colocar duas gotas de água oxigenada sobre o esfregaço;
3. Adicionar duas gotas de solução de benzidina;
4. Observar imediatamente a cor.
5. Analisar o resultado:

Dica: reação de benzidina é sensível, mas as gorduras podem torná-la positiva.

Se não houver nenhuma mudança de cor o resultado é **negativo**. Caso ocorra a presença de cor esverdeada o resultado indica a presença de **Traços**.

Caso a coloração seja verde ou azul o resultado é **positivo**, observar os tons para o laudo:

Verde claro- +

Verde escuro- ++

Verde azulado- +++

Azul intenso- ++++

Referências

ALLEN, A.V.H., RIDLEY, D.S. 1970. Further observations on the formol etherconcentration technique parasites. *J. Clin. Pathol.*, 23:545-546.

DURSO, S.C., JANET A. Y. Atlas de Manifestações Orais das Doenças Sistêmicas. *Gastrenterologia e Hepatologia de Harrison-2 (2014): 16.*

FAUST, E.C. et al. 1938. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces I. Preliminary communication. *American Journal of Tropical Medicine.* 18:169-183.

HENRIKSEN S.A., POHLENZ J.F.L. 1981. Staining of Cryptosporidia by a Modified Ziehl-Neelsen Technique. *Acta Veterinaria Scandinavia*, 22:594-596.

HOFFMANN, W.A., PONS, J.A., JANER, J.L. 1934. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. *Journal of Publications in Health Tropical and Medicine, Puerto Rico*, 9:283-298.

LUTZ, A. 1919. Schistosoma mansoni and schistosomiasis observed in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 11:121-125.

MORAES, R.G. 1948. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidose no Brasil. *Rev. Serv. Esp. Saúde Pública.* 1:507-624.

RITCHIE, L.S. 1948. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bulletin of the United States Army Medical Department*. 8:326.

RUGAI, E., MATTOS, T., BRIZOLA, A.P. 1954. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes; modificações do método de Baermann. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 14: 5-8.

WILLIS, I.I. 1921. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Med. J. Aust.*, 8:375-376.

CAPÍTULO X

BACTERIOLOGIA

Geórgia Muccillo Dexheimer

Jairo Luís Hoerlle

Johan Prediger

A Bacteriologia Clínica tem como objetivo isolar e identificar bactérias de importância clínica, bem como avaliar os seus perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos. O valor clínico tem grau de dependência com o sítio anatômico a partir do qual a bactéria foi isolada, sendo necessário avaliar se a mesma está infectando, colonizando ou se faz parte da microbiota normal do local em estudo.

TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE PARA BACTERIOLOGIA CLÍNICA

A patogenicidade das bactérias está na capacidade que elas têm de causar infecções e está intimamente relacionada com o local (sítio) onde estão presentes. Em diversos sítios anatômicos existem bactérias que são consideradas da microbiota normal podendo inclusive atuar na defesa do local, oprimindo o crescimento de bactérias contaminantes ou ainda colonizando de forma saprófita. Em raras exceções, porém, estas bactérias podem causar uma infecção.

A resistência bacteriana a diferentes antimicrobianos tem se tornado um problema mundial, uma vez que diminui as possibilidades de tratamento, leva a um aumento no tempo de internação, nas taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes e nos custos terapêuticos. O reconhecimento correto do microrganismo responsável pelo quadro infeccioso e a indicação de um medicamento eficiente para tratamento é de extrema importância para o bem-estar do paciente. Além disso, evita que antimicrobianos sejam utilizados de maneira indiscriminada e incorreta, podendo levar ao desenvolvimento e à disseminação da resistência microbiana.

A realização correta das práticas em um laboratório de Bacteriologia é de fundamental importância para o combate das infecções bacterianas. O avanço da medicina moderna e a maior eficácia no tratamento de infecções possibilita um aumento na qualidade de vida da população, bem como contribui para a diminuição da possibilidade de infecções associadas a comorbidades.

Observações importantes:

No laboratório de Bacteriologia Clínica, o usuário deve ter dois cuidados imprescindíveis:

1. Não se contaminar com as amostras. Para isso, deve-se fazer uso de todos os EPIs necessários, lembrando-se sempre que o manuseio de amostras patogênicas pode levar a um alto risco de contaminação.
2. Manter o material clínico íntegro. O material deve ser preservado sem modificações para que não ocorram alterações que modifiquem os resultados reais.

Antes de qualquer procedimento ser realizado na bancada, deve-se ter conhecimento e seguir as normas do laboratório. Adicionalmente deve-se:

1. Lavar as mãos;
2. Colocar as luvas, jaleco e máscara;
3. Desinfetar a superfície com álcool;
4. Acender a chama do bico de Bunsen;
5. Realizar todo o procedimento próximo à chama;
6. Desligar a chama após a realização do procedimento;
7. Desinfetar a superfície com álcool novamente;
8. Lavar as mãos e realizar a antissepsia com álcool.

1. Preparo de Meios de Cultura

1.1. Produção de ágar Chocolate

Meio de Ágar Chocolate é amplamente utilizado para o cultivo de microrganismos exigentes, embora seja possível o crescimento de quase todos os tipos de microrganismos. Importante para o crescimento de microrganismos exigentes como: *Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.*, *Branhamella catarrhalis* e *Moraxella spp.*

À base do meio, é adicionado sangue de cavalo, carneiro ou coelho em temperatura alta, fazendo com que as hemácias lisem, liberando hemina e hematina, compostos fundamentais para o crescimento dos microrganismos exigentes.

Observação: Se utilizar sangue de carneiro ou coelho no lugar do sangue de cavalo, adicionar os suplementos à base de NAD (coenzima I) e cisteína após resfriar a base achocolatada à aproximadamente 50°C.

Materiais:

- Álcool 70%;
- Luvas;
- Bico de Bunsen;
- Alça de inoculação;
- Jaleco;
- Sabonete líquido;
- Máscaras;
- Autoclave;
- Copo Becker;
- Placas de Petri;
- Pipetas de vidro ou descartáveis;
- Proveta;
- Estufa bacteriológica;
- Meios comerciais: BHI Ágar, Columbia Ágar Base, Blood Ágar Base, Mueller Hinton Ágar;
- Sangue de cavalo, carneiro ou coelho desfibrinado;

- Água deionizada.

Dica: Recomenda-se o uso da base de BHI Ágar, por apresentar melhor crescimento das cepas exigentes, principalmente cepas de *Haemophilus spp.*

Procedimentos:

1. Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
2. Esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C, 1 atm;
3. Esfriar a base à temperatura de aproximadamente 80°C;
4. Adicionar 5 mL de sangue desfibrinado de cavalo para cada 100 ml de base;
5. Homogeneizar bem até lisar totalmente as hemácias e o meio apresentar uma cor castanho escuro (chocolate);
6. Distribuir em placas de Petri de 90 mm de diâmetro.
7. Para o controle de qualidade, observar o crescimento da cepa padrão: *Haemophilus influenzae* ATCC 10211.

Conservação e validade: Conservar de 4 a 10°C por 4 meses.

Inoculação:

- Estriar a superfície do meio, usando a técnica de semeadura para isolamento;
 - Incubar a 35°C por 24 horas.
8. Interpretando o resultado:
- Cor original do meio: castanho escuro (chocolate).
 - Colônias de tamanho pequeno a médio, com pigmento amarelo: sugestivo de *Neisseria spp.*, *Branhamella catarrhalis* ou *Moraxella spp.*
 - Colônias pequenas e delicadas, com pigmento creme claro: sugestivo de *Haemophilus spp.*

Recomendações

- Lembrar que é um meio rico e crescem vários tipos de microrganismos.
- Fazer esfregaço de todas as colônias suspeitas e corar pela técnica de Gram, para confirmar ou não *Neisseria spp.*, *Branhamella catarrhalis* ou *Moraxella spp.* (cocos Gram negativos reniformes) ou *Haemophilus spp.* (bacilos Gram negativos delicados e pleomórficos).
- Não usar sangue de cavalo vencido.
- Por ser um meio rico, o crescimento a partir de materiais biológicos em geral costuma ser abundante. Sempre que necessário, isolar a colônia em estudo para os procedimentos de identificação, para não correr o risco de trabalhar com cepas misturadas.

1.2. Produção do ágar MacConkey

O cristal violeta inibe o crescimento de microrganismos Gram positivos especialmente enterococos e estafilococos.

A concentração de sais de bile é relativamente baixa em comparação com outros meios, por isso não é tão seletivo para Gram negativos como, por exemplo, o ágar SS. Este meio serve para isolar bacilos Gram negativos (enterobactérias e não fermentadores) e verificar a fermentação ou não da lactose.

Materiais:

- Álcool 70%;
- Luvas;
- Bico de Bunsen;
- Alça de inoculação;
- Jaleco;
- Sabonete líquido;
- Máscaras;
- Autoclave;
- Copo Becker;
- Placas de Petri;
- Pipetas de vidro ou descartáveis;
- Proveta;
- Estufa bacteriológica;
- Meios comerciais: Ágar MacConkey;
- Água deionizada.

Procedimentos:

1. Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
2. Esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C, 1 atm.
3. Resfriar até 50°C e distribuir 20 a 25 mL em placas de Petri 90 mm estéreis.
4. Deixar em temperatura ambiente até resfriar.
5. Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira de 4 a 8°C.
6. Para o controle de qualidade observar o crescimento da cepa padrão:
 - Controle Positivo: *Proteus mirabilis* ATCC 12453 (não fermentador de lactose).
 - Controle Positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922 (fermentador de lactose).
 - Controle Negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
7. Inocular as placas e incubar a 35°C ±2 por 18 a 24 horas.
8. Se negativo após 24 horas, reincubar por mais 24 horas.
9. Interpretando o resultado:
 - Cor original do meio: rosa avermelhado.
 - Crescimento de bacilos Gram negativos.
 - Colônias cor de rosa: fermentadoras de lactose.

- Colônias incolores: não fermentadoras de lactose.
- Não há crescimento de cocos Gram positivos.

Conservação e validade: Conservar de 4 a 8°C por até 3 meses.

1.3. Produção do ágar Sangue

O meio de Ágar sangue, usando uma base rica como abaixo descrita, oferece ótimas condições de crescimento à maioria dos microrganismos. A conservação dos eritrócitos íntegros favorece a formação de halos de hemólise nítidos, úteis para a diferenciação de *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.* Este meio é usado para o isolamento de microrganismos não fastidiosos e para verificação de hemólise dos *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.* Usado na prova de satelitismo (para identificação presuntiva de *Haemophilus spp.*).

Materiais:

- Álcool 70%;
- Luvas;
- Bico de Bunsen;
- Alça de inoculação;
- Jaleco;
- Sabonete líquido;
- Máscaras;
- Autoclave;
- Copo Becker;
- Placas de Petri;
- Pipetas de vidro ou descartáveis;
- Proveta;
- Estufa bacteriológica;
- Água deionizada;
- Meios comerciais: Blood Ágar Base, Columbia Ágar Base, BHI Ágar, Mueller Hinton Ágar; TSA Agar.
- Sangue desfibrinado de carneiro ou coelho: 5 mL para cada 100 mL de meio base.

Procedimentos:

1. Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
2. Esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C, 1 atm.
3. Esfriar a base a +/- 50°C.
4. Adicionar 5 mL de sangue desfibrinado de carneiro para cada 100 mL de base.
5. Homogeneizar delicadamente para não formar bolhas.
6. Distribuir em placas de Petri de 90 mm de diâmetro.

7. Para o controle de qualidade observar o crescimento da cepa padrão:

- *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 ou *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com Hemólise beta hemolítica;
- *Streptococcus* do grupo *viridans* ou *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 com Hemólise alfa hemolítica;
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ou *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 com Hemólise gama, ou seja, sem hemólise

Conservação e validade: Conservar de 4 a 10°C por 4 meses.

8. Estriar a superfície do meio, usando a técnica de semeadura para isolamento;

9. No final da semeadura, com o auxílio de uma agulha para semeadura picar o meio de forma alinhada para verificar hemólise em profundidade;

10. Incubar a 35 °C por 24 horas.

11. Interpretando o resultado:

- Cor original do meio: vermelho.
- Beta hemólise: presença de halo transparente ao redor das colônias semeadas (lise total dos eritrócitos).
- Alfa hemólise: presença de halo esverdeado ao redor das colônias semeadas (lise parcial dos eritrócitos).
- Gama hemólise (sem hemólise): ausência de halo ao redor das colônias (eritrócitos permanecem íntegros).

Recomendações:

- *Não usar sangue de carneiro vencido, pois o meio fica hemolisado ou com cor muito escura, dificultando o estudo de hemólise.*
- *Não usar sangue humano, pois alguns microrganismos não apresentam hemólise.*
- *Não adicionar o sangue na base do meio quente, pois as hemácias se rompem, dificultando o estudo de hemólise.*
- *Por ser um meio rico, o crescimento a partir de materiais biológicos em geral costuma ser abundante, sempre que necessário, isolar a colônia em estudo para os procedimentos de identificação, para não correr o risco de trabalhar com cepas misturadas.*

1.4. Produção do ágar CLED – Cystine Lactose Electrolyte Deficient

Usado para isolamento e quantificação de microrganismos presentes em amostras de urina. A deficiência de eletrólitos inibe o véu de cepas de *Proteus*. O meio serve para isolar e quantificar microrganismos Gram positivos, Gram negativos e leveduras.

Materiais:

- Álcool 70%;
- Luvas;
- Bico de Bunsen;

- Alça de inoculação;
- Jaleco;
- Sabonete líquido;
- Máscaras;
- Autoclave;
- Copo Becker;
- Placas de Petri;
- Pipetas de vidro ou descartáveis;
- Proveta;
- Estufa bacteriológica;
- Meios comerciais: Ágar Cled;
- Água deionizada.

Procedimentos:

1. Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
2. Esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C, 1 atm.
3. Resfriar à +/- 50°C e distribuir de 20 a 25 mL em placas de Petri 90 mm estéreis.
4. Deixar em temperatura ambiente até resfriar.
5. Homogeneizar delicadamente para não formar bolhas.
6. Para o controle de qualidade observar o crescimento da cepa padrão:
 - Controle Positivo:
 - *Escherichia coli* ATCC 25922: crescimento moderado a denso, colônias médias ou grandes amareladas, após 48 horas de incubação. Lactose positiva.
 - *Proteus vulgaris* ATCC 8427: crescimento moderado a denso, colônias azuis translúcidas. Lactose negativa
 - Controle Negativo: ausência de crescimento.
7. Para a inoculação verificar o item 2.3 para a técnica de semeadura quantitativa.
8. Interpretação do resultado:
 - Cor original do meio: azul claro.
 - Colônias lactose positiva: cor amarela.
 - Colônias lactose negativa: cor azul.

DICA: Características de crescimento de alguns microrganismos:

- *Escherichia coli*: colônias opacas, amarelas com ligeira cor amarelo escuro no centro, com cerca de 1,25 mm de diâmetro, as não fermentadoras de lactose colônias azuis.
- Espécies de *Klebsiella*: colônias muito mucosas, cor variável de amarelo a branco azulado - Espécies de *Proteus*: colônias azul translúcidas, geralmente menor que *E.coli*.

- Espécies de *Salmonella*: colônias planas, cor azul.
- *Enterococcus faecalis*: colônias amarelas, com cerca de 0,5 mm de diâmetro.
- *Staphylococcus aureus*: colônias amarelas, com cerca de 0,75 mm de diâmetro.
- *Staphylococcus coagulase negativa*: colônias amarelo-palha e brancas.
- *Corynebacterium*: colônias pequenas de cor cinza.
- *Lactobacilos*: colônias pequenas e com superfície rugosa
- *Pseudomonas aeruginosa*: colônias verdes, com superfície prateada e periferia rugosa

Conservação e validade: Conservar embalado e 4 a 8°C por até 3 meses.

Recomendações: Organismos que fermentam lactose baixam o pH e mudam a cor do meio de verde para amarelo, podendo assim verificar se o microrganismo é lactose negativa ou positiva. Espécies de *Shigella* não crescem em meios deficientes em eletrólitos.

1.5. Produção do caldo BHI – *Brain Heart Infusion*

O BHI é um meio derivado de nutrientes de cérebro e coração, peptona e dextrose. A peptona e a infusão são fontes de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas. A dextrose é um carboidrato que os microrganismos utilizam para fermentação. É um meio para o cultivo de estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos. Pode ser utilizado na preparação do inóculo para teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, para realização de teste de coagulase em tubo, para teste de crescimento bacteriano a 42 e 44°C e para teste de motilidade em lâmina.

Materiais:

- Álcool 70%;
- Luvas;
- Bico de Bunsen;
- Alça de inoculação;
- Jaleco;
- Sabonete líquido;
- Máscaras;
- Autoclave;
- Copo Becker;
- Placas de Petri;
- Pipetas de vidro ou descartáveis;
- Proveta;
- Estufa bacteriológica;
- Meios comerciais: Caldo BHI (infusão de cérebro e coração);
- Água deionizada.

Procedimentos:

1. Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
2. Distribuir 3,0 ml em tubos com tampa de rosca.
3. Esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C, 1 atm.
4. Retirar os tubos da autoclave e deixar esfriar em temperatura ambiente.
5. Para o controle de qualidade observar o crescimento da cepa padrão:
 - Controle Positivo: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 e *Candida albicans* ATCC 10231;
 - Controle Negativo: sem crescimento.
6. Com o auxílio de uma alça ou fio bacteriológico, inocular a colônia ou o material a ser testado - realizar o teste com colônias puras de 18 a 24 horas.
7. Incubar a 35°C ±2 por 24 a 48 horas.
8. Para isolamento de fungos incubar em estufa micológica a 35°C ±2 por até 5 dias.
9. Interpretação:
 - Cor original do meio: amarelo claro, límpido.
 - Positivo: presença de turvação = crescimento bacteriano.
 - Negativo: ausência de turvação.

Conservação e validade: Conservar de 4 a 10°C por 6 meses.

Recomendações: Para cultivo de anaeróbios, acrescentar 0,1% de ágar. Para crescimento de *Haemophilus* e outros fastidiosos é necessária a adição de suplementos a base de L-cisteína, NAD (fator V) e hemina (fator X).

1.6. Produção do meio *Skim Milk*

É um meio derivado de nutrientes de leite. Utilizado para o armazenamento de cepas.

Materiais:

- Álcool 70%;
- Luvas;
- Bico de Bunsen;
- Alça de inoculação;
- Jaleco;
- Sabonete líquido;
- Máscaras;
- Autoclave;
- Copo Becker;
- Placas de Petri;
- Pipetas de vidro ou descartáveis;

- Proveta;
- Estufa bacteriológica;
- Leite em pó desnatado de boa procedência;
- Água deionizada.

Procedimentos:

1. Dissolver 20 g de leite em pó desnatado em 100 mL de água deionizada.
2. Distribuir 0,5 mL em tubos Eppendorf ou tubos de “biofreezer”.
3. Autoclavar a 110°C por 10 minutos com as tampas semi rosqueadas.
4. Retirar da autoclave, rosquear e deixar esfriar a temperatura ambiente.

Conservação e validade: Conservar a -6 °C por 12 meses.

2. Semeadura em Meios de Cultura

2.1. Procedimentos para Semeadura Qualitativa:

- Organizar as placas, pré-aquecidas em estufa (ideal para fastidiosos), ou à temperatura ambiente, sobre a bancada conforme o material a ser semeado.
- Identificá-las com o número da amostra e iniciais do paciente.
- Separar as lâminas correspondentes a cada exame, a serem preparadas e identificá-las.
- Homogeneizar o material, quando líquido (urina, LCR, sangue, pleural etc.).
- Escolher a porção mais purulenta no caso de secreções, ou no caso de fezes, a parte com sangue, muco ou pus.
- Os swabs deverão ser rolados sobre os meios de cultura, seguindo a sequência dos mais ricos para os mais seletivos (Ágar Chocolate, Ágar Sangue, Mac Conkey).
- Com material muito líquido (LCR, pleural não purulento) concentrar o material por centrifugação a 2.500 rpm (1500 g) por 10-15 minutos e semear o sedimento.
- Na semeadura de rotina podem-se utilizar placas com divisões de dois e três compartimentos para racionalização de gastos, mas seu uso exige maior habilidade na semeadura a fim de se obter colônias isoladas. Exemplos:
 - hemocultura em placa tríplice: Ágar sangue, Ágar chocolate e Ágar Mac Conkey.
 - secreções em placa dupla: Ágar sangue e Ágar Mac Conkey, proceder uma semeadura que permita o crescimento de colônias isoladas etc.

2.2. Técnica de Semeadura Qualitativa:

A semeadura para cultivo qualitativo pode ser feito com o próprio swab (do meio de transporte), ou amostra do material removida com alça (estérel) flambada e semeada de forma a obter um gradiente decrescente de concentração do inóculo, que permita o isolamento de todas as colônias diferentes. Recomenda-se que a semeadura e a leitura das placas sejam realizadas pelo mesmo profissional para aprimorar a técnica de semeadura e isolamento

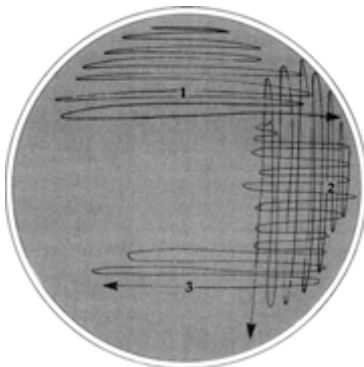
de colônias. Materiais indicados ou recomendados para este tipo de semeadura: Urina, BAL (lavado bronco alveolar), aspirado traqueal, Biópsia de tecido, líquido de diálise, Secreção prostática, Cateter (técnica de Maki e outras).

Materiais:

- Álcool 70%;
- Luvas;
- Bico de Bunsen;
- Alça de inoculação;
- Jaleco;
- Sabonete líquido;
- Máscaras;
- Autoclave;
- Placas de Petri com o meio de cultura selecionado;
- Estufa bacteriológica.

Procedimentos:

1. Descarregar o material num canto da placa.
2. Flambar a alça.
3. Esfriar a alça em um canto do ágar.
4. Semear partindo da ponta da primeira semeadura.
5. A cada mudança de direção flambar a alça e esfriá-la.
6. Observe a figura abaixo:



Fonte: Levy, 2004.

2.3. Técnica de Semeadura Quantitativa:

O cultivo quantitativo baseia-se na semeadura de um volume conhecido de material e a contagem do número de UFC (unidades formadoras de colônia) obtidas após incubação. Utilizam-se dois artifícios para o efeito de diluição do material:

- Uso de pequenos volumes: normalmente de 1, 10 ou 100 μ L. O número de UFC obtido deverá ser multiplicado pelo fator de correção para 1 mL, relativo ao volume

inoculado; 1.000, 100 ou 10, respectivamente. Pode ser realizada utilizando-se volume de material definido por alça calibrada ou pipeta com ponteira estéril.

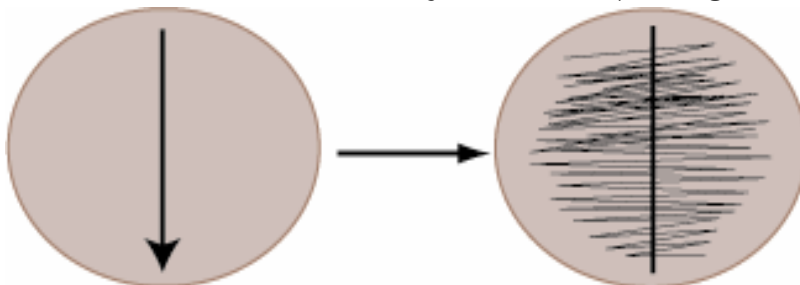
- Técnicas dilucionais: costuma-se utilizar a diluição seriada do material em escala decimal, isto é, 1:10, 1:100, 1:1.000 etc. O número de UFC obtido deverá ser multiplicado pelo fator de correção para 1 mL, relativo à diluição utilizada.

Materiais:

- Álcool 70%;
- Luvas;
- Bico de Bunsen;
- Alça de inoculação calibrada;
- Pipetadores automáticos de todos os volumes;
- Ponteiras;
- Jaleco;
- Sabonete líquido;
- Máscaras;
- Autoclave;
- Placas de Petri com o meio de cultura selecionado;
- Estufa bacteriológica;
- Agitador de tubos tipo vórtex.

Procedimento:

1. Homogeneizar o material com agitação manual em diferentes direções ou em vórtex (mixer).
2. Obter o volume definido pela técnica com o auxílio de uma pipeta com ponteira estéril ou alça calibrada. No caso da alça, observar a integridade da película formada até depositá-la na parte superior da placa. Ainda com a alça, sem flambar até o final da sementeira, distribuir o material em linha reta até a outra extremidade. Perpendicularmente, distribuir o material por toda a superfície de maneira uniforme.
3. Repetir o mesmo procedimento por 3 vezes, ou até que a superfície da placa esteja seca, alterando a direção da estria (vide figura abaixo).



a) Inóculo Inicial

b) Espalhamento

Fonte: Levy, 2004.

Recomendações: Evitar o uso de placas úmidas e, depois de semeada, não incubar caso haja umidade na superfície do ágar.

Evitar o rompimento do ágar, estriando o material suavemente.

Uma suspensão com 10⁵ UFC/ml deve resultar em um tapete de colônias que cubra toda a superfície do ágar de maneira uniforme, com colônias confluentes.

4. A incubação deve seguir alguns parâmetros determinados, conforme abaixo:

Atmosfera

- Para bactérias não exigentes em secreções, urina, fezes, etc. incubar em estufa em atmosfera ambiente.
- Para bactérias exigentes tais como: pneumococos, hemófilos e Neisserias ou fastidiosos incubar em microaerofilia (Jarra com vela acesa de modo a obter 3 a 5% de CO₂).
- Para *Campylobacter* é necessária tensão de 5 a 10% de CO₂ e restrição de O₂ sendo conveniente o uso de geradores específicos.
- Para bactérias anaeróbias, incubar em sistema de anaerobiose estrita.

Temperatura

- 36°C +/- 1°C é a temperatura para a grande maioria das bactérias da rotina, incluindo os anaeróbios e micobactérias.
- Fungos podem ser cultivados a 30°C ou 25 e 35°C.
- Temperatura à 42°C pode ser necessário para isolar espécies de *Campylobacter*, *Acinetobacter baumannii*, e algumas espécies de *Pseudomonas*.

Umidade

- Bactérias fastidiosas e exigentes (neisserias patogênicas e hemófilos) crescem melhor se forem incubadas num recipiente com tensão de 5% de CO₂ com um chumaço de algodão embebido em água estéril.

Tempo

- Em geral a primeira leitura é realizada com 18 a 24 horas de incubação ou em casos de urgência para iniciar a identificação e antibiograma, a partir de 6 horas é possível visualizar crescimento de algumas enterobactérias.
- Para anaeróbios é recomendável a primeira leitura com 48 a 72 horas de incubação.
- Para bactérias exigentes ou de crescimento lento o período de incubação pode ser bastante prolongado: Micobactérias de 3 a 45 dias; *Nocardia*, 4 a 7 dias; *Brucella* 3 a 7 dias (hemoculturas até 45 dias).

3. Coloração de Gram

A coloração de Gram é a principal técnica de identificação bacteriana. Com a coloração é possível visualizar a morfologia individual e as reações tintoriais nas quais as bactérias reagem frente aos corantes. A amostra utilizada deve ser o material coletado de sítio anatômico com suspeita de infecção ou colônia bacteriana isolada.

Materiais:

- Lâminas;
- Água ou solução salina (0,85%);
- Bico de Bunsen;
- Alça de inoculação;
- Microscópio;
- Violeta de Genciana;
- Lugol;
- Álcool;
- Fucsina;

Procedimentos:

1. Com uma agulha microbiológica estéril, pegar pequena porção de uma colônia isolada ou amostra coletada e passar para uma lâmina limpa e identificada.
2. Para facilitar a leitura, pode-se homogeneizar o material com uma gota de solução salina estéril em movimentos centrífugos, se necessário;
3. Aguardar para que seque e fixar rapidamente sobre a chama.
4. Cobrir o esfregaço com solução de Violeta de Genciana por um minuto.

Dica: *Cuidado para não colocar a lâmina invertida.*

5. Retirar o corante em água corrente.
6. Cobrir o esfregaço com Lugol durante um minuto.
7. Retirar com água corrente.
8. Gotejar o álcool rapidamente.
9. Repetir o passo 8 até notar que não remove mais o excesso de corante.
10. Cobrir o esfregaço com Fucsina durante 30 segundos.
11. Retirar o corante com água corrente examinar o esfregaço no aumento de 100X.
Lembrar de usar o óleo de imersão.

Observação microscópica:

- Gram Positivo: roxo;
- Gram Negativos: rosa;

Gram Positivos

Cocos	<u>Cadeias longas</u> – estreptococos aeróbios e anaeróbios
	<u>Cachos</u> – estafilococos e peptococos (aeróbio)
	<u>Cachos e tétrades</u> – <i>Micrococcus</i> , <i>Stomatococcus</i> , <i>Aerococcus</i> spp.
	<u>Aos pares</u> – <i>Enterococcus</i>
Coco-bacilo (Podem formar cadeias curtas)	<u>Gram variável</u> - <i>Gardnerella</i>
	<u>Em chama de vela</u> – <i>S. pneumoniae</i>
	<u>Retos e curtos</u> - <i>Lactobacillus</i> , <i>Erisipelotix</i> , <i>Listeria</i> , <i>Rhodococcus</i>
Bacilos	<u>Ramificados</u> – <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Propionibacterium</i> (anaeróbio)
	<u>Difteroides</u> – <i>Corynebacterium</i>
	<u>Esporulados</u> – <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>

Gram Negativos

Cocos (visualizados aos pares)	<i>Neisseria</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Branhamella</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Veillonella</i> (anaeróbio)
Coco-bacilo	<i>Haemophilus</i> (pleomórfico: ora coco-bacilo, ora bacilo), <i>Brucella</i> , <i>Bordetella</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Actinobacillus</i> , <i>Bacteroides</i> (anaeróbios), Enterobactérias
Bacilos	<u>Curvos</u> – <i>Campylobacter</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Vibrio</i>
	<u>Helicoidais</u> – <i>Arcobacter</i> e <i>Borrelia</i> . <i>Leptospira</i> e <i>Treponema</i> (não visíveis ao Gram)
	<u>Retos</u> – Enterobactérias, não fermentadores
	<u>Extremidades afiladas</u> – <i>Fusobacterium</i> (anaeróbio)
	<u>Extremidade bifurcada</u> – <i>Bifidobacterium</i> (anaeróbio)

4. Coloração de Ziehl-Neelsen

Esta coloração é específica para a observação de algumas espécies bacterianas, o principal exemplo são as micobactérias, como a *Mycobacterium tuberculosis*, causadora da tuberculose.

Materiais:

- Lâminas;
- Água ou solução salina (0,85%);
- Bico de Bunsen;
- Alça de inoculação;
- Microscópio;
- Solução de Carbolfulcscina;
- Ácido-álcool;
- Álcool;
- Coloração de fundo.

Preparação dos reagentes:**Solução de carbolfucsina:**

Fucsina básica	0,3 g
Álcool etílico a 95%	10 ml
Cristais de fenol derretidos	5 ml
Água destilada	95 ml

Dissolver a fucsina básica no álcool e o fenol na água. Misturar as duas soluções. Deixar repousar por vários dias antes de usar.

Ácido-álcool:

Álcool etílico	97 ml
Ácido clorídrico concentrado	3 ml

Coloração de fundo (azul-de-metileno):

Azul-de-metileno	0,3 ml
Água destilada	100 ml

Procedimentos:

1. Cobrir a superfície da lâmina com a solução de carbolfucsina.
2. Aquecer a lâmina coberta com o corante, lentamente com auxílio de um bico de Bunsen ou vela, até a emissão de vapores, tomando o cuidado para não deixar ferver.
3. Aquecer com calor baixo ou intermitente por um período de três a cinco minutos.
4. Deixar a lâmina esfriar.
5. Lavar a lâmina com água corrente.
6. Cobrir a lâmina com solução de álcool-ácido a 3% e descorar o esfregaço até que o corante não drene mais da lâmina.
7. Lavar a lâmina com água corrente e esgotando todo resíduo da mesma.
8. Cobrir a lâmina com o corante de contraste (azul de metileno), por 20 a 30 segundos.
9. Lavar a lâmina com água corrente e deixar secar naturalmente sem forçar com papel de filtro.
10. Examinar o esfregaço com objetiva de imersão no aumento de 100X.
11. Para observação microscópica a lâmina deve ser avaliada por inteira, se houver a presença de pelo menos um bacilo rosado a amostra é considerada positiva.

5. Teste da Catalase

A catalase é uma enzima presente em diversas bactérias, conferindo uma resistência ao peróxido de hidrogênio. Sua principal função é auxiliar a identificação bacteriana, principalmente diferenciando os gêneros *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Materiais:

- Água oxigenada (Peróxido de hidrogênio);

- Lâminas;
- Bico de Bunsen;
- Alça de inoculação;
- Luvas;
- Jaleco;
- Álcool.

Procedimentos:

1. Escolher uma colônia bem isolada na placa com a bactéria suspeita;
2. Coletar com o auxílio de uma alça e colocar sobre uma lâmina;
3. Pingar 2 ou 3 gotas de água oxigenada sobre a colônia na lâmina;
4. Aguardar e observar. Se houver Formação de bolhas (ferver) indica que o microrganismo é Catalase positivo. Se não houver formação de bolhas o microrganismo é Catalase negativo.

6. Teste da coagulase

O teste da coagulase é utilizado para a identificação bacteriana. Esta enzima tem a capacidade de coagular o plasma sanguíneo de maneira similar à cascata de coagulação natural. A principal identificação realizada por este teste é a diferenciação do gênero *Staphylococcus* spp.

Materiais:

- Plasma de coelho;
- Pipeta e ponteiras;
- Alça de inoculação;
- Tubo de ensaio estéril de 5 mL;
- Bico de Bunsen;
- Luvas;
- Jaleco;
- Álcool;

Procedimentos:

1. Pipetar 300 µL de plasma de coelho no tubo de ensaio;
2. Escolher cerva de 5 colônias de *Staphylococcus* spp. bem isoladas na placa;
3. Coletar as colônias com o auxílio de uma alça e misturar com o plasma de coelho dentro do tubo;
4. Incubar de 35° C a 37° C durante aproximadamente 4 horas.
5. Observar o resultado. Se houver a formação de coágulo indica que o microrganismo é Coagulase positiva, indicativo da presença de *Staphylococcus aureus*. Se não formar coágulo indica que o microrganismo é Coagulase negativa, indicativo da presença de *Staphylococcus coagulase* negativa.

7. Teste da CAMP

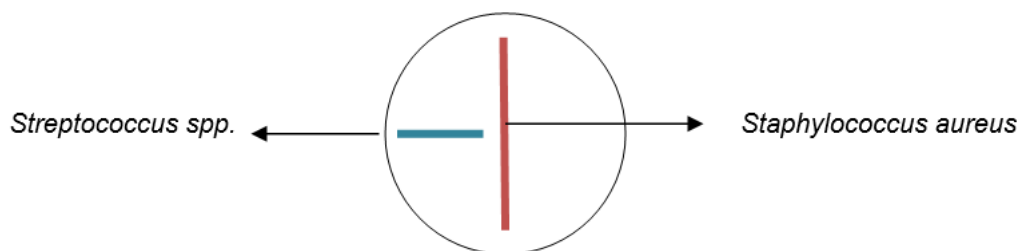
Este teste é utilizado na identificação de *Streptococcus* α hemolítico do Grupo B (*Streptococcus agalactiae*) a partir de amostras clínicas contendo microbiota mista, especificamente para coleta de material vaginal e anorretal.

Materiais:

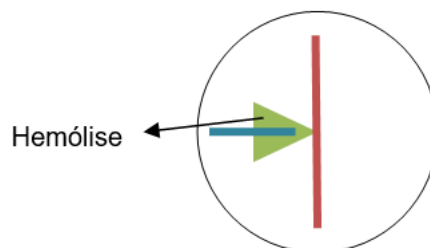
- Pipeta e ponteiras;
- Alça de inoculação;
- Bico de Bunsen;
- Placas de Petri com meio de cultura Ágar sangue;
- Luvas;
- Jaleco;
- Álcool;
- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ou cepa de *S. aureus* com duplo halo de hemólise);

Procedimentos:

1. Semear a cepa de *S. aureus* de uma extremidade a outra da placa, formando uma linha reta;
2. Semear uma cepa de *Streptococcus* spp. perpendicularmente a um ângulo de 90°, também em linha reta e sem tocar na outra cepa (Observar a figura abaixo).



3. Incubar de 35° C a 37° C durante aproximadamente 24 horas.
4. Observar o resultado. Se ocorrer a formação de hemólise no meio de cultura com o formato de triângulo ou flecha o teste é considerado positivo, indicativo da presença de *Streptococcus agalactiae*;



Se não ocorrer a formação de hemólise no meio de cultura com o formato de triângulo ou flecha o teste é considerado negativo, indicativo da presença de outra espécie *Streptococcus* spp.

8. Antibiograma

Técnica destinada à determinação da sensibilidade bacteriana in vitro frente a agentes antimicrobianos, também conhecidos por Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA).

Materiais:

- Bico de Bunsen;
- Luvas;
- Jaleco;
- Álcool;
- Placas de Petri com ágar Mueller Hinton;
- Swab da amostra;
- Pinça;
- Alça de inoculação;
- Tubo de ensaio estéril de 5 mL;
- Discos de papel impregnados com antibióticos;
- Tubos com escala de 0,5 MacFarland, correspondendo a uma quantidade aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC.

Procedimentos:

Primeiramente deve-se efetuar o Método do Crescimento, realizado conforme abaixo:

1. Pelo menos de três a cinco colônias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico são selecionadas da placa de ágar. A superfície de cada colônia é tocada com uma alça, e os microrganismos são transferidos para um tubo contendo 4-5 mL de um meio de cultura adequado, como caldo de soja tríptica;
2. Incuba-se a cultura em caldo, a 35°C , até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5 (em geral, de duas a seis horas);
3. Ajusta-se a turbidez da cultura em crescimento com solução salina estéril ou caldo, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de McFarland a 0,5. Isso resulta numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL. Para realizar esta etapa corretamente, usa-se um espectrofotômetro ou, quando executado a olho nu, deve ter luz suficiente para comparar o inóculo do tubo ao da solução padrão de McFarland a 0,5 utilizando um cartão de fundo branco com linhas contrastantes pretas ao fundo;

Como alternativa conveniente para o método de crescimento, pode-se preparar o inóculo fazendo uma suspensão direta, em caldo ou solução salina, de colônias isoladas selecionadas numa placa de ágar de 18-24 horas (deve-se usar um meio não seletivo, como ágar sangue). A suspensão é ajustada para que sua turbidez coincida com a da solução padrão de McFarland 0,5. Este método é conhecido como Método de Suspensão Direta das Colônias. É o método recomendado para testar os organismos fastidiosos como *Haemophilus* spp. e *Neisseria gonorrhoeae*, bem como os estreptococos e para testar possível resistência dos estafilococos à meticilina ou à oxacilina.

Inoculação das Placas de Teste

1. Em condições ideais, mergulha-se um swab de algodão estéril na suspensão ajustada, até 15 minutos após ajustar a turbidez da suspensão de inóculo. O swab deve ser girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido. Isso ajudará a retirar qualquer excesso de inóculo no swab;
2. A superfície seca da placa de ágar Mueller Hinton é inoculada esfregando o swab em toda a superfície estéril do ágar.
3. Repete-se o procedimento esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passa-se um swab na margem da placa de ágar;
4. A tampa pode ser deixada entreaberta de três a cinco minutos, embora nunca mais de 15 minutos, de maneira a permitir que qualquer excesso de umidade seja absorvido antes de se aplicar os discos impregnados de droga.

Observação: *Devem-se evitar densidades extremas de inóculo. Nunca use culturas em caldo, não-diluídas, do dia anterior, ou outros inóculos não padronizados para semear as placas.*

Aplicação de Discos a Placas de Ágar Inoculadas

1. Um conjunto predeterminado de discos antimicrobianos é colocado na superfície de uma placa de ágar semeada. Cada disco deve ser pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície de ágar. Independentemente de serem aplicados individualmente ou com dispensador, os discos devem ser distribuídos por igual, de maneira que a distância de centro para centro não exceda 24 mm. Em geral, deve-se colocar 12 discos, no máximo, numa placa de 150 mm, ou cinco discos numa placa de 100 mm. Uma vez que algumas drogas se difundem quase instantaneamente, o disco não deve ser reaplicado após ter entrado em contato com a superfície do ágar. Em vez disso, coloque um novo disco em outra parte da placa.
2. As placas devem ser invertidas e colocadas numa estufa, a 35° C, até 15 minutos após a aplicação dos discos.

Importante: *Com exceção de Haemophilus spp., N. gonorrhoeae e dos estreptococos, as placas não devem ser incubadas em atmosfera enriquecida com CO₂, porque os padrões de interpretação foram desenvolvidos usando incubação em ar ambiente, e o CO₂ irá alterar significativamente o tamanho dos halos de inibição de alguns agentes.*

Leitura das Placas e Interpretação dos Resultados

Após 16-18 horas de incubação, examina-se cada placa. Se a placa foi satisfatoriamente semeada, e o inóculo era correto, os halos de inibição resultantes serão uniformemente circulares e haverá um tapete confluyente de crescimento. Se colônias individuais forem aparentes, o inóculo era demasiado leve e o teste deverá ser repetido.

Os diâmetros dos halos de inibição total (julgadas a olho nu) são mensurados, incluindo o diâmetro do disco. Os halos são medidos em milímetros usando um paquímetro ou uma régua, que é encostado na parte de trás da placa de Petri invertida.

Deve-se segurar a placa de Petri poucas polegadas acima de um fundo não refletor, iluminando-a com luz refletida. Se tiver sido acrescentado sangue à base de ágar (como ocorre com os estreptococos), os halos deverão ser medidos a partir da superfície superior do ágar iluminada com luz refletida, uma vez retirada a tampa.

Se oxacilina estiver sendo testada contra *Staphylococcus* spp., ou vancomicina contra *Enterococcus* spp., serão necessárias 24 horas de incubação antes de se poder considerar o microrganismo sensível; outros agentes podem ser lidos, e os resultados liberados, em 16-18 horas.

Emprega-se luz transmitida (colocando a placa na contraluz) para verificar se há crescimento discreto de colônias resistentes à meticilina ou à vancomicina, nos halos de inibição de oxacilina e vancomicina, respectivamente. Qualquer crescimento discernível dentro do halo de inibição é indicativo de resistência à meticilina ou à vancomicina.

O halo de inibição será considerado a área sem crescimento detectável a olho nu. O crescimento de pequenas colônias, detectável apenas com lente de aumento, na margem do halo de inibição do crescimento deve ser ignorado. Entretanto, no caso de crescimento discreto de colônias dentro de um halo de inibição evidente, o teste deverá ser repetido com uma cultura ou subcultura pura de uma única colônia, isolada da placa de cultura primária. Se pequenas colônias continuarem a crescer no halo de inibição, o halo de inibição livre de colônias deve ser medido.

Algumas vezes, as cepas de *Proteus* spp. podem se espalhar para as áreas do halo de inibição de certos agentes antimicrobianos. Com *Proteus* spp., o tênue véu de crescimento, dentro de um halo de inibição evidente deve ser ignorado. Quando se usa um meio suplementado com sangue para testar estreptococos, o halo de inibição do crescimento deve ser medido, ao invés da zona de hemólise.

Com o trimetoprim e as sulfonamidas, os antagonistas no meio podem permitir um crescimento discreto; portanto, não considere qualquer crescimento discreto (20% ou menos da zona de crescimento) e meça a margem mais aparente para determinar o diâmetro do halo de inibição;

Interprete os tamanhos dos halos de inibição se reportando às tabelas de sensibilidade dos discos de antibióticos, classificando os organismos, nos relatórios, como sensíveis, intermediários, ou resistentes aos agentes testados. Alguns agentes só podem ser registrados como sensíveis, visto que apenas os pontos de corte de sensibilidade são fornecidos.

Interpretação dos Resultados dos Testes de Disco-Difusão

Padrões de Interpretação do Diâmetro dos Halos

As tabelas de sensibilidade dos discos de antibióticos indicam os critérios de interpretação do diâmetro dos halos de inibição de maneira a classificar com precisão os níveis de sensibilidade dos organismos a diversos agentes antimicrobianos. Para a maioria dos agentes, essas categorias foram desenvolvidas comparando, inicialmente, os diâmetros dos halos às CIMs (concentrações inibitórias mínimas) de um grande número de isolados, incluindo aqueles com mecanismos de resistência conhecidos e relevantes para a classe específica de droga antimicrobiana. Posteriormente, estas CIMs e os diâmetros dos halos correlacionados foram analisados em relação à farmacocinética da droga em regimes terapêuticos normais. Sempre que possível, os critérios interpretativos determinados *in vitro* são analisados em relação a estudos de eficácia clínica no tratamento de patógenos específicos.

Categorias Interpretativas

- **Sensível:** A categoria “sensível” significa que uma infecção por uma determinada cepa pode ser tratada adequadamente com a dose do agente antimicrobiano recomendada para esse tipo de infecção e patógeno, exceto quando contraindicado.
- **Intermediária:** A categoria “intermediária” inclui isolados com CIMs do agente antimicrobiano que se aproximam de níveis sanguíneos e tissulares atingíveis e para os quais as taxas de resposta podem ser inferiores às aquelas apresentadas por isolados sensíveis. A categoria “intermediária” implica eficácia clínica nos sítios corpóreos, onde as drogas se concentram fisiologicamente (ex.: quinolonas e β -lactâmicos na urina) ou quando for possível utilizar uma dosagem maior da droga que a normal (ex.: β -lactâmicos). Essa categoria também inclui uma zona-tampão, a qual deverá impedir que pequenos fatores técnicos não sujeitos a controle causem discrepâncias importantes na interpretação, especialmente no caso de drogas com pequenas margens de farmacotoxicidade.
- **Resistente:** As cepas “resistentes” não são inibidas pelas concentrações sistêmicas dos agentes antimicrobianos geralmente atingíveis nos regimes terapêuticos habituais; e/ou podem ter os diâmetros do halo de inibição dentro de uma faixa de maior probabilidade de ocorrência de mecanismos específicos de resistência microbiana (ex.: β -lactamases), além de a eficácia clínica não ter sido confiável nos estudos terapêuticos.

Pontos de Corte Equivalentes à CIM: *Os diâmetros dos halos de inibição nos testes de disco-difusão estão inversamente correlacionados às CIMs dos testes de diluição padronizados. As tabelas de sensibilidade dos discos de antibióticos relacionam os pontos de corte das CIMs que correspondem aos critérios interpretativos dos diâmetros dos halos de inibição. Esses correlatos das CIMs se baseiam em comparações entre os diâmetros do halo e as CIMs e, em geral, são idênticos aos critérios interpretativos das CIMs. Pode haver algumas pequenas discrepâncias devidas a diferenças técnicas nas bases de dados originais.*

9. Teste de aproximação de discos para ESBL

ESBL é a sigla para Enzima Beta-lactamase de espectro entendido, uma enzima produzida por bactérias capaz de hidrolizar o anel betalactâmico de penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (antibióticos betalactâmicos). O teste é similar ao antibiograma, modificando somente a posição dos discos de antibióticos.

Materiais:

- Bico de Bunsen;
- Luvas;
- Jaleco;
- Álcool;
- Placas de Petri com ágar Mueller Hinton;
- Swab;
- Pinça;
- Alça de inoculação;

- Tubo de ensaio estéril de 5 mL;
- Discos de papel impregnados com antibióticos;
- Tubos com escala de 0,5 Macfarland;

Procedimentos:

1. Fazer inoculação da cepa no ágar idem ao processo do antibiograma;
2. Posicionar o disco de amoxicilina e ácido clavulânico (AMC) no centro da placa. Os antimicrobianos aztreonam (ATM), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) e cefepime (CPM) formam uma cruz ao redor e ficam distantes aproximadamente 3 cm do disco central;
3. Incubar de 35° C a 37° C durante aproximadamente 24 horas.
4. Observe o resultado, se houver a formação de um halo fantasma ou deformação do halo entre os discos indica que o microrganismo é ESBL positivo. Se houver a formação de halos íntegros sem deformação ou microrganismo é ESBL negativo.

Referências

- BIER, Otto. **Bacteriologia e imunologia em suas aplicações a medicina e a higiene**. 16. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1975.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S23. Wayne, PA, USA, 2015.
- ESTRIDGE, Barbara H.; REYNOLDS, Anna P. **Técnicas básicas de laboratório clínico**. 5. ed. Porto Alegre: ArteMed, 2011.
- GUERREIRO, Milton G.; OLIVEIRA, Sergio J. de; SARAIVA, Danilo. **Bacteriologia especial: com interesse em saúde animal e saúde pública**. Porto Alegre: Sulina, 1984.
- HENRY, John Bernard. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20. ed. Barueri: Manole, 2008.
- KONEMAN, Elmer W.; ALLEN, Stephen D.; JANDA, William M. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.
- LEVY, C. E., VON NOWAKONSKI, A., MENDES, C. M. F., OPLUSTIL, C., ZOCCOLI, C. M., MARFFEI, C. M., ... & PETRIDIS, H. (2004). **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. Módulo III. Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde.
- OPLUSTIL, Carmen Paz; ZOCCOLI, Cassia Maria; TOBOUTI, Nina Reiko. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2004.
- RAVEL, Richard. **Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

CAPÍTULO XI

IMAGENOLOGIA

Fernanda Rocha da Trindade

PROTOCOLOS DE IMAGENS RADIOLÓGICAS

Na Radiologia, a imagem é formada através da interação de feixes de raios X que saem de um tubo e atingem o paciente na área de interesse. Este feixe irá atravessar o corpo do paciente interagindo com os seus átomos e depois irá atingir uma placa contendo um filme radiográfico, formando assim a imagem médica. Essa imagem também poderá ser digital, neste caso, o filme desaparece e a imagem vai direto para o computador. O feixe de raios X, ao interagir com os átomos do corpo do paciente, causa ionizações, ou seja, tem energia suficiente para arrancar elétrons das camadas eletrônicas dos átomos. A radiologia abrange diferentes áreas como: Radiografia, Mamografia, Densitometria Óssea, Fluoroscopia e Tomografia Computadorizada. Todos estes tipos de exames envolvem a utilização de um tubo de raios x, mas cada um de forma diferente. Estas áreas avaliam a anatomia do paciente.

1. Protocolo de Imagem Radiológica de Tórax

Patologia demonstrada: Derrames pleurais, pneumotórax, atelectasia e sinais de infecção.

Fatores Técnicos: Tamanho do receptor de imagem – 35 x 43 cm, longitudinal ou transversal; Grade móvel ou fixa; Variação de 110 a 125 kV

Incidência PA

Proteção: Utilizar avental plumbífero ao redor da cintura.

Posicionamento do paciente: Paciente de pé, pés levemente afastados, peso igualmente distribuído em ambos os pés; Queixo elevado, repousando no receptor de imagem. Mãos nos quadris inferiores, palmas para fora, cotovelos parcialmente flexionados.

A partir destas informações, responda:

- 1) O que é o receptor de imagem? Por que deve ser deste tamanho?
- 2) Por que o receptor de imagem pode ser longitudinal ou transversal?
- 3) O que é a grade?
- 4) O que é o kV? Por que possui estes valores para o tórax?
- 5) Explique a incidência PA.

6) Forme grupo de até três alunos (um será o paciente e os outros dois os profissionais) e reproduza o posicionamento citado acima.

2. Protocolo de Imagem Radiológica de Ossos da Face e Seios Paranasais

Perfil direito e esquerdo – Ossos faciais

Patologia demonstrada: Fraturas e processos neoplásicos e inflamatórios dos ossos faciais, órbitas e mandíbula.

Fatores Técnicos: Tamanho do receptor de imagem – 18 x 24 cm, longitudinal; Grade móvel ou estacionária; Variação de 65 a 80 kV; Ponto focal pequeno

Posicionamento do paciente: remover todos os objetivos metálicos ou plásticos da cabeça e pescoço. O paciente deve ficar em posição ereta ou em semidecúbito ventral.

A partir destas informações, responda:

- 1) Por que os valores de kV diminuiriam em relação ao exame de tórax?
- 2) Por que o receptor de imagem deverá ficar apenas no sentido longitudinal?
- 3) O que significa ponto focal pequeno? Para que serve?
- 4) Por que o paciente não pode ter objetos metálicos ou plásticos durante o exame?

IMAGENS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Na Ressonância Magnética a imagem é formada através da utilização de um alto campo magnético, gerado pelo equipamento, que irá orientar os átomos, geralmente de hidrogênio, do corpo humano. Além do uso de campo magnético, utilizam-se também pulsos de radiofrequência. A radiação envolvida nesse tipo de exame é a não ionizante. A característica deste tipo de radiação é aumentar a energia interna do átomo porque a energia gerada não é suficiente para arrancar os elétrons dos átomos.

1. Características das Imagens de Ressonância Magnética:

Selecionar uma imagem de Ressonância Magnética disponível no ambiente virtual. Abrir a imagem pelo software *ImageJ* e realizar as seguintes análises:

1) Mudar a imagem para 8 bits/pixel e responder:

- Para que serve esta função? Descreva o que aconteceu com a imagem.
- Analisar o histograma destas imagens após a alteração.

2) A partir destas duas imagens, altere o brilho/contraste das duas e responda:

- Para que serve esta função? Descreva o que aconteceu nas duas imagens. (Salve as imagens antes e depois explicando a sua alteração).

3) Adicionar ruído a imagem e responder:

- Para que serve esta função? Utilizando o histograma das duas imagens, explique o que aconteceu com a imagem original.

4) Anote as informações contidas na imagem. Que informações são essas?

5) Uma imagem de 8 bits/pixel poderia ser transformada em uma imagem de 16 bits/pixel? Explique.

2. Protocolo de Ressonância Magnética de Seios da Face/Face/Base do crânio:

Indicações do exame: Obstrução nasal; Polipose nasossinusal; Sinusopatia inflamatória em geral; Trauma.

Contraste: Não

Protocolo: Rotina sem contraste

Sequência:

1. Sagital T1 SE (incluir crânio e face)
2. Axial T1 SE 4/1 mm (espess/espacem): do mento até o topo do seio frontal
3. Axial T2 FSE com fat sat 4/1 mm (espess/espacem): do mento até o topo do seio frontal
4. Coronal T1 4/1 mm (espess/espacem): desde a ponte até a parede anterior do seio maxilar
5. Coronal T2 FSE com fat sat 4/1 mm desde a ponte até a parede anterior do seio maxilar

Observe: 1. *Paciente usa metal dentário?*

2. *Checar FOV adequado.*

A partir do protocolo acima, responda:

- 1) O que significa os termos sagital, axila e coronal? O que deve ser modificado para obter estes parâmetros?
- 2) O que é T1 e T2?
- 3) O que significa “espess” e “espacem”?
- 4) Qual a importância das observações? Por que é questionado sobre o metal dentário?

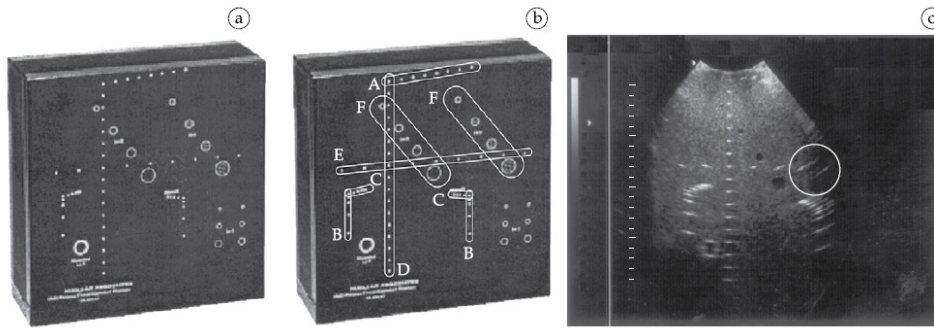
IMAGENS POR ULTRASSOM

No Ultrassom a imagem é formada utilizando pulsos onda sonora de alta frequência, ou seja, frequências superiores a 20.000 Hz. O som é a propagação de energia através da matéria por ondas mecânicas. Uma onda sonora é caracterizada pela sua necessidade de um meio para se propagar. O diagnóstico por ultrassom utiliza dispositivos que emitem feixes de ultrassom e registram os ecos refletidos pela incidência destes feixes em diferentes interfaces do corpo. O emissor de ultrassom é denominado transdutor. Os diferentes equipamentos de ultrassom incluem os exames: Convencionais e tipo Doppler.

1. Qualidade da Imagem por Ultrassom

Pesquise e responda as seguintes questões:

- 1) O que é um Programa de Garantia da Qualidade?
- 2) O que pode ocorrer se não há um Programa de Garantia da Qualidade implementado em uma Instituição que possua equipamentos de ultrassom?
- 3) O que é um fantoma (phantom) e para que serve?
- 4) Identifique na imagem abaixo os parâmetros de profundidade e objetos que simulam lesões císticas e sólidas.



5) Os testes abaixo são exigidos em equipamentos de ultrassom modo B, cite a importância de cada um deles:

- a) Inspeção física e mecânica
- b) Teste de uniformidade da imagem ecográfica
- c) Profundidade de visualização
- d) Exatidão da medida de distância horizontal
- e) Exatidão da medida de distância vertical
- f) Discernimento de massas de baixo contraste
- g) Resolução de detalhe axial
- h) Resolução de detalhe lateral
- i) Resolução de alto e baixo contraste

2. Ultrassom para: Tratamento, Diagnóstico e Estética:

1) Complete as tabelas abaixo (mínimo dois de cada) com as características dos procedimentos que utilizam ultrassom em diagnóstico, estética e tratamento:

Diagnóstico	
Nome do exame:	
Objetivo	
Tipo de Transdutor	
Valor da Frequência	
Características	

Estética	
Nome do procedimento:	
Objetivo	
Tipo de Transdutor	
Valor da Frequência	
Características	

Tratamento	
Nome do tratamento:	
Objetivo	
Tipo de Transdutor	
Valor da Frequência	
Características	

2) Através destas informações, responda:

a) Qual é a principal diferença das características do ultrassom utilizado em diagnóstico, estética e tratamento?

MEDICINA NUCLEAR

Uma imagem digital pode ser considerada como uma matriz cujos índices de linhas e colunas identificam um ponto na imagem, e o correspondente valor do elemento da matriz identifica o nível de cinza daquele ponto. Os elementos dessa matriz são chamados de elementos da imagem, elementos da figura ou pixels. Numericamente, a escala de cinza da imagem varia de 0, definido como preto, até um valor máximo, definido como branco. A imagem digital também pode ser colorida. Neste caso, no lugar de uma única matriz, teremos três matrizes diferentes que representarão as cores vermelho, verde e azul (RGB – Red, Green, Blue). Cada matriz terá seu valor correspondente e juntas formarão a imagem colorida.

Uma imagem digital de alta qualidade é aquela que possui um número alto de pixels na sua matriz, com isso, ela apresenta mais detalhes sobre o que está sendo avaliado. As operações matemáticas ou lógicas são utilizadas para o melhoramento e análise das imagens. O melhoramento da imagem pode ser realizado através do contraste, do brilho, da diminuição do ruído e correção de distorções. O contraste é um parâmetro que pode ser utilizado para avaliar a qualidade de uma imagem. Ele pode ser definido de diferentes maneiras, mas consiste essencialmente na diferença entre os níveis de cinza da região de interesse (T) e o valor

no fundo (B): $C = \frac{T - B}{B}$. O Sinal de uma imagem pode ser calculado através da expressão: $S = T - B$. O ruído de uma imagem pode ser calculado através da expressão: $N = \sqrt{B}$. A relação

sinal-ruído de uma imagem pode ser calculada através da expressão: $SNR = \frac{S}{N} = Cx\sqrt{B}$.

1. Análise da imagem de uma Cintilografia Renal de alta e baixa contagem

Através do programa ImageJ, abrir as imagens disponíveis no ambiente virtual de cintilografias renais de alta e baixa contagem.

a) Passar de escala de cinza para escala de cores.

b) Cortar a imagem apenas nas regiões dos rins e fazer uma análise do seu histograma.

c) Crie duas tabelas com o número de contagem das duas imagens. Compare-as.

d) Calcule os valores do sinal, contraste, ruído e relação sinal-ruído separadamente para cada rim. Lembre-se que deve selecionar uma região de interesse do rim e calcular os parâmetros assim como a radiação de fundo – background. Compare os resultados.

e) Complete a Tabela a seguir:

	Alta Contagem (Imagem 2)		Baixa Contagem (Imagem 1)	
Tamanho da ROI				
	Alta Contagem		Baixa Contagem	
Parâmetro	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
Sinal (S)				
Contraste (C)				
Ruído (R)				
Relação Sinal-Ruído (SNR)				

2. Métodos de Aquisição da Imagem

Diferencie a Cintilografia, SPECT e PET-CT em relação:

- Tipo e características do radionuclídeo utilizado
- Tipo de partículas emitidas por este radionuclídeo
- Meia-vida dos radionuclídeos utilizados
- Meio de utilização (ingerir, inalar ou intravenoso)
- Formação da imagem
- Tipos de exames que são realizados a partir deste equipamento.
- Proteção Radiológica do paciente e dos trabalhadores para realizar este exame.

3. Terapia com Medicina Nuclear

Um paciente de 46 anos, diagnosticado com câncer de tireoide, irá realizar seu tratamento. O planejamento prescrito envolveu uma dose de 2200 MBq. A partir destas informações, responda:

- a) Qual tipo de tratamento este paciente irá realizar?
- b) O paciente ficará internado no hospital? Justifique.
- c) Como o elemento radioativo será eliminado do seu corpo?
- d) É utilizado algum fármaco neste procedimento? Justifique.

4. Legislação e Controle de Qualidade

Você trabalha na Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e deverá realizar uma vistoria em um Serviço de Medicina Nuclear. Crie um instrumento de avaliação com os itens de deverão estar em conformidade com as Normas da CNEN. Estes itens devem incluir: a) Salas do Serviço de Medicina Nuclear; b) Banheiros; c) Áreas Livres e Supervisionadas; d) Manipulação de Radiofármacos; e) Salas de exames/Testes necessários; f) Quarto terapêutico; g) Rejeitos Radioativos; h) Depósitos.

RADIOTERAPIA

A Radioterapia é a única área que envolve radiação na qual o objetivo é causar um efeito biológico, mas apenas, na área que engloba o tumor. O tratamento emprega feixe de radiação ionizante (de fótons ou elétrons) de alta energia capaz de destruir células tumorais. Uma dose pré-calculada de radiação ionizante é aplicada, em um determinado tempo, a um volume de

tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais. A radioterapia é dividida em Teleterapia e Braquiterapia.

1. Planejamento do Tratamento:

1.1 A partir do esquema abaixo, qual é o SAD e SSD? Explique as siglas e justifique.

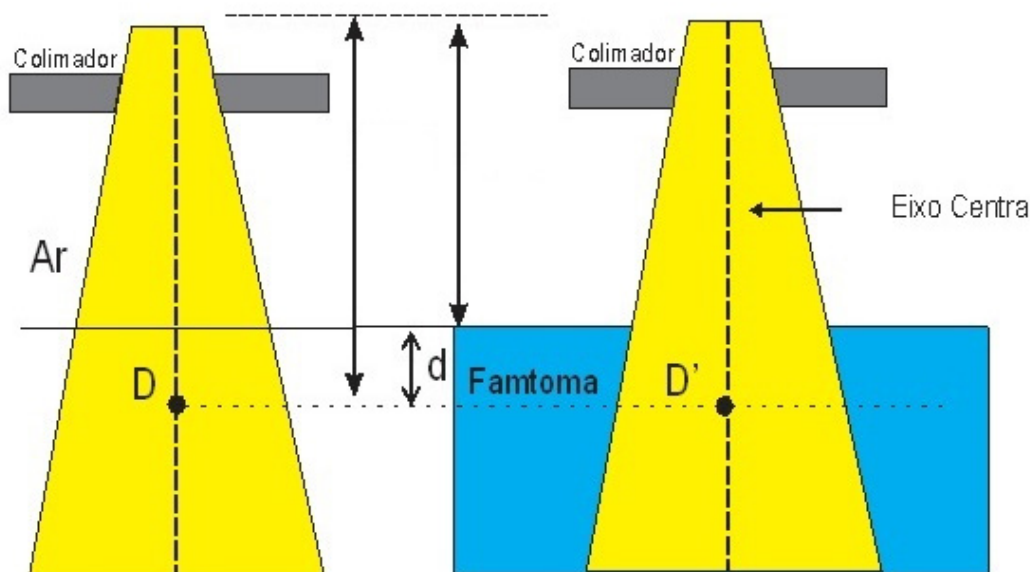


Figura: Modificada de <http://fisicamedica.webnode.com.br/funcoes-dosimetricas/>. Acesso em jul 2017.

1.2 Defina e diferencie, com imagens e características, os tipos de tratamento com radioterapia:

1. Radioterapia Convencional ou 2D
2. Radioterapia Conformada 3D
3. IMRT
4. Radioterapia Estereotáxica
5. Braquiterapia

1.3 Qual número da imagem abaixo representa o PTV, GTV e CTV? Justifique, explique as siglas e a importância de cada um para o planejamento.

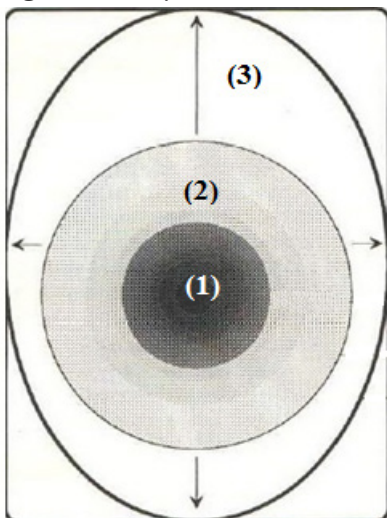
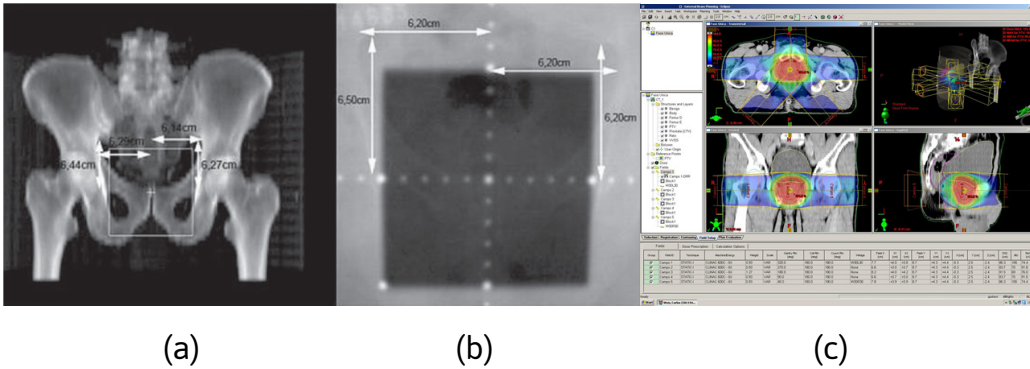


Figura: Modificada de <http://www.florence-expo.com/show/project.asp?idut=2626>, 2017.

1.4 O que representam as imagens abaixo?



Fonte: (a) e (b) GIORDANI, Adelmo José; DIAS, Rodrigo Souza; SEGRETO, Helena Regina Comodo and SEGRETO, Roberto Araujo. Acurácia na reprodutibilidade do posicionamento diário de pacientes submetidos a radioterapia conformada (RT3D) para câncer de próstata. *Radiol Bras*[online]. 2010, vol.43, n.4. (c) Disponível em: <http://www.oncologiacentenario.com.br/Historia_da_radioterapia-3D-IMRT-IGRT-Convencional-Oncologia-Centerio-Centro-Cancer.php>. Acesso em jul de 2017.

Relato de Caso:

Considerando os melhores resultados no tratamento cirúrgico, decidiu-se pelo tratamento com radioterapia conformada exclusiva(a) motivada pela localização, tipo histológico e por sua invasividade restrita ao sítio envolvido. Foi administrada dose radical (b) com intenção paliativa, (b) de 70Gy, 2Gy diários, (c) cinco dias por semana, em nove semanas. O volume tumoral incluiu a nasofaringe e as cadeias de drenagem linfática contíguas, apesar da ausência de comprometimento. Foram distribuídos três campos isocêntricos(d) de fótons de 15Mv, um anterior e dois paralelos opostos latero-laterais(e) com filtros de 60°(f). Foram analisados os histogramas dose-volume com limitação de dose em: órbitas e cristalinos(g).

A partir do relato de caso, responda:

- O que significa radioterapia conformada? Explique como ela é planejada.
- O que significa dose radical? Por que ela é utilizada com intenção paliativa? O que significa o termo paliativo?
- O que significa 70 Gy e 2 Gy? Qual foi o número de frações utilizadas no tratamento?
- O que significa campo isocêntrico? Que tipo de modalidade de tratamento foi utilizada? Justifique.
- Desenhe (como esquema) os campos: anterior e látero-lateral.
- Para que servem os filtros (bloco) de 60°?
- Por que estas regiões tiveram a sua dose limitada?

Referências

BONTRAGER, KL. **Tratado de posicionamento radiográfico e anatomia associada**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

BUSHONG, SC. **Ciência. Radiológica Para Tecnólogos**, editora: Elsevier, 9ª Ed., 728 pp., 2010

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 3. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2008.

GONZALES, R. **Processamento de Imagens Digitais**. Edgar Blucher, 2000.

HORNAL, Joseph P. The Basics of MRI. Disponível em: <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/>. Acesso em 24 jul. 2017.

KREMKAU, FREDERICK W. **Diagnóstico por Ultra-som: princípios e instrumentos**. 4ª edição, Porto Alegre: Artes Médicas, 1986.

ROSA AA, COSTA ES, BEZERRA JUNIOR ML, CORDEIRO DE RESENDE LMM. Tumor carcinóide de nasofaringe: relato de caso. Revista Brasileira de Cancerologia, 2002, 48(4): 545-549.

WESTBROOK, C, ROTH CK, TALBOT, J. **MRI in Practice**, 4ª Ed., Wiley-Blackwell.

CAPÍTULO XII

FISIOLOGIA

Andréa Horst

1. PRÁTICA: Sistema respiratório: estudo dos volumes e capacidades pulmonares

A respiração tem por objetivo a obtenção do oxigênio e a remoção do dióxido de carbono. Para a realização dessa atividade é necessário que ocorra a ventilação dos alvéolos. Processo que ocorre devido a atuação da musculatura esquelética. Vários fatores podem interferir na ventilação pulmonar como doenças obstrutivas crônicas (DPOC), complacência e elasticidade do pulmão. A ventilação pulmonar pode ser estudada por meio da mensuração dos volumes de ar que entram e saem das vias respiratórias através da espirometria.

Volumes e capacidades pulmonares: Em cada movimento respiratório normal, movimenta-se um volume de ar que se conhece com o nome de volume corrente (VC), ou seja, é o volume de ar inspirado ou expirado em cada respiração normal, perfazendo cerca de 500 mL no homem adulto jovem normal. Ao final de uma expiração normal (posição expiratória de repouso), ficam nos pulmões cerca de 2.300 mL de ar, este volume é denominado capacidade residual funcional. Volume de reserva expiratório (VRE) é a quantidade de ar que ainda pode ser expirada, pela expiração forçada, após o término da expiração corrente normal, normalmente cerca de 1.100 mL. Volume residual (VR) é o volume de ar que ainda permanece no pulmão após uma expiração forçada, é em média de 1.200 mL. Volume de reserva inspiratório (VRI) é o volume extra de ar que pode ser inspirado, além do volume corrente normal, em geral é de 3.000 mL. A capacidade inspiratória é o volume máximo que pode ser inspirado a partir da posição expiratória de repouso, distendendo os pulmões ao máximo. Compreende, portanto a soma do volume corrente e do volume de reserva inspiratório, ou seja, cerca de 3.500 mL. O volume que é possível expulsar durante uma expiração forçada consecutiva a inspiração máxima é denominado de capacidade vital, que corresponde a 4.500 mL, o que significa o maior volume de ar que pode ser movimentado num único movimento respiratório e compreende a soma de volume corrente, volume de reserva inspiratório e o expiratório. A capacidade pulmonar total é o volume máximo a que os pulmões podem ser expandidos com o maior esforço respiratório possível (cerca de 5.800 mL), é igual a capacidade vital mais o volume residual. Todos os volumes e capacidades pulmonares são cerca de 20 a 25% menores na mulher do que no homem, e evidentemente apresentam valores maiores em pessoas grandes e atléticas do que nas pessoas sedentárias e pequenas. A tabela abaixo mostra os valores e a soma dos volumes correspondentes às capacidades:

Capacidade	Somatório dos volumes	Valor
Vital (CV)	VC+ VRI+ VRE	4.500 mL
Inspiratória	VC+ VRI	3.500 mL
Residual funcional	VRE + VR	2.500 mL
Pulmonar total	CV+ VR	5.800 mL

Materiais:

- Espirômetro;
- Jaleco;
- Álcool 70% para limpeza do bocal ou bocais descartáveis;
- Algodão.

Procedimentos:

1. Com o auxílio do espirômetro realizar a mensuração dos volumes pulmonares de três colegas.
2. Após a mensuração calcule as capacidades pulmonares e preencha o quadro abaixo.

	Volume Corrente	Volume de Reserva Inspiratório	Volume de Reserva Expiratório	Capacidade Vital	Capacidade Inspiratória	Capacidade Expiratória	Capacidade Pulmonar Total
Aluno 1							
Aluno 2							
Aluno 3							

Responda as perguntas a seguir:

1. Quais foram as diferenças encontradas nas medições entre os colegas?
2. Explique as principais diferenças, utilizando para isso os artigos científicos como base.

2. PRÁTICA: Sistema cardiovascular

As diversas funções do corpo humano são decorrentes de processos físicos e químicos que continuamente ocorrem para se adaptar frente as alterações do meio interno e externo. Essas atividades fisiológicas têm por objetivo manter a homeostasia do organismo. A função da circulação é a de suprir as necessidades dos tecidos corporais, transportar até eles nutrientes e eliminar os produtos do metabolismo. A intensidade do fluxo sanguíneo que passa pelos tecidos é controlada, sobretudo em resposta à sua demanda metabólica. A prática a seguir tem como objetivo determinar a pressão sanguínea arterial no homem, mediante o método indireto, em distintas situações e verificar a frequência cardíaca através do pulso radial.

Materiais:

- Esfigmomanômetros;
- Jaleco;
- Estetoscópios;
- Cronômetros.

Procedimentos:

1. Dividir a turma em grupos;
2. Identificar a presença do pulso radial.

Dica: pode-se usar o tendão do músculo flexor radial do carpo como guia para a localização da artéria; e medir a frequência cardíaca (contam-se os batimentos em 60s ou contam-se os batimentos durante 15s e depois se multiplica o valor obtido por 4).

3. Um colega deverá medir a pressão do outro, sendo que um aluno o coloca no braço de um colega sentado, este com as pernas descruzadas e o braço relaxado.
4. Posicionar a braçadeira ao redor do braço;
5. Inflar o manguito com a válvula fechada até aproximadamente 200 mmHg;
6. Posicionar o estetoscópio próximo à artéria braquial;
7. Ir abrindo a válvula lentamente, observando no ponteiro o ponto em que se começa a ouvir os sons de korotkoff, representando a pressão sistólica. Quando os sons desaparecem registrar o valor, pois será a pressão diastólica;
8. Após esta aferição em repouso, solicitar que o aluno escolhido realize atividade física aeróbica por 5 minutos;
9. Realizar novamente as medições;
10. Esperar mais 2 minutos em repouso e realizar novamente as medições;
11. Esperar mais 8 minutos e fazer as medições;
12. Registrar os valores obtidos no quadro abaixo;

	Antes	Logo após	2 minutos após	10 minutos após
Frequência cardíaca				
Pressão sistólica				
Pressão diastólica				

Responda as seguintes questões:

- a) Quais as alterações detectadas no experimento?
- b) Qual é a finalidade das alterações provocadas pelo organismo?
- c) Qual é o principal sistema regulador que foi ativado durante o teste?

3. PRÁTICA: Sistema renal

O rim é um órgão que atua na manutenção do volume hídrico do organismo assim como eliminar resíduos e metabólitos indesejáveis para o organismo. O fluxo sanguíneo renal é por volta de 20% do débito cardíaco, o que lhe confere alta capacidade de filtração glomerular podendo controlar com alta precisão os volumes dos líquidos corporais e concentração de solutos, mantendo a homeostasia do organismo.

O teste da fita reagente é comumente utilizado para avaliação bioquímica de urina. É um teste de triagem utilizado para distúrbios metabólicos, renais e infecções urinárias. É feito através da coleta de 40-50 mL de urina em um pequeno pote de plástico esterilizado. Normalmente solicitamos que se use a primeira urina da manhã, desprezando o primeiro jato. Esta pequena quantidade de urina desprezada serve para eliminar as impurezas que possam estar na uretra e região adjacente. Cada fita possui vários quadradinhos coloridos compostos por substâncias químicas que reagem com determinados elementos da urina. Os resultados são qualitativos ou semi-quantitativos e não quantitativos, isto é, a fita identifica a presença

dessas substâncias, mas a quantificação é apenas aproximada. O resultado é normalmente fornecido em uma graduação de cruzes de 1 a 4.

Materiais:

- Luvas;
- Jaleco;
- Amostra de urina;
- Tiras reativas;
- Tubos falcon de 15 mL;
- Estante para tubos;

Procedimentos:

1. Na aula anterior à prática devem ser distribuídos os recipientes de coleta de urina. As amostras serão divididas da seguinte forma:
 - Amostra 1: Indivíduos que normalmente bebem pouca água (menos de 500 mL/dia);
 - Amostra 2: Indivíduos que normalmente bebem muita água (mais de 2.000 mL/dia);
 - Amostra 3: Indivíduos que ingeriram bebida alcoólica no dia anterior;
 - Amostra 4: Indivíduo diabético descompensado;
2. No dia do experimento as amostras serão identificadas apenas com números, sem que os alunos saibam qual amostra pertence a cada indivíduo;
3. Submergir a fita na urina, retirar e deixar reagir por um minuto;
4. Após o tempo de reação, analisar o resultado comparado a coloração da fita com o gabarito presente na embalagem do produto.
5. Preencha a tabela abaixo conforme os resultados encontrados.

AMOSTRA	1	2	3	4
Leucócitos				
Nitritos				
Urobilinogênio				
Proteína				
pH				
Sangue				
Densidade				
Cetonas				
Bilirrubina				
Glicose				

6. Classifique as amostras de acordo com os possíveis indivíduos listados acima.

Responda a seguinte questão:

a) Quais foram as principais alterações encontradas? Como você justificaria essas alterações? Utilize os dados do quadro abaixo para responder.

pH: A urina é naturalmente ácida, já que o rim é o principal meio de eliminação dos ácidos do organismo. Enquanto o pH do sangue costuma estar em torno de 7,4, o pH da urina varia entre 5,5 e 7,0, ou seja, bem mais ácida.

Densidade: A densidade da água pura é igual a 1000. Quanto mais próximo deste valor, mais diluída está a urina. Os valores normais variam de 1005 a 1035. Urinas com densidade próximas de 1005 estão bem diluídas; próximas de 1035 estão muito concentradas, indicando desidratação. Urinas com densidade próxima de 1035 costumam ser muito amareladas e normalmente possuem odor.

Proteína: Ausentes na urina normal. Presentes em diversas doenças renais e diabetes.

Glicose: Ausente na urina normal. Presente em pacientes diabéticos e casos de glicosúria renal.

Cetonas (Corpos Cetônicos): Presentes em pacientes diabéticos ou após jejum prolongado.

Hemoglobina (sangue): Ausente na urina normal. Presente nas hemorragias de qualquer causa que atinjam o sistema urinário (Infecções urinárias, cálculo renal etc).

Bilirrubina: É a substância resultante do metabolismo da hemoglobina e que dá à urina coloração muito amarela. Valores altos indicam doenças hepáticas e biliares, neoplasias hepáticas ou do trato biliar.

Urubilinogênio: Também é substância resultante do metabolismo da hemoglobina. Valores anormais indicam doenças no fígado, distúrbios hemolíticos.

Nitrito: Ausente na urina normal. Sua presença indica presença de alguns tipos de bactérias na urina.

4. PRÁTICA: Sistema nervoso: somestesia e reflexos

O sistema nervoso central contém bilhões de células que se diferenciaram para as funções de excitação e condução de estímulo. Estas células denominadas neurônios, constituem a unidade morfológica e funcional do sistema nervoso. Ele recebe continuamente várias informações sensoriais provenientes do meio externo ou interno, integra essas informações para determinar respostas mantendo a homeostasia do corpo. A presente prática tem como objetivo possibilitar o entendimento do mecanismo de ação do sistema nervoso, entender sobre as sensações térmicas e analisar o papel dos reflexos somáticos e autonômicos e a importância deles para a homeostasia.

Materiais:

- Jaleco;
- Copo Becker;
- Água quente;
- Água gelada;
- Água corrente;
- Estesiômetro;
- Martelo neurológico.

Procedimentos:

Sensação térmica

1. Solicitar a um aluno que realize as seguintes etapas:
 - a) Colocar a mão em um becker com água quente por 1 minuto;
 - b) Em seguida em outro becker com água em temperatura ambiente por mais 1 min;
 - c) E mais 1 minuto em água gelada.
 - d) Logo após colocar a mão na água à temperatura ambiente novamente.
2. Explique a variação térmica observada no experimento.
3. Explique que tipos de receptores interagem com o corpo humano para resultar nesta sensação.

Campo receptivo:

1. Com o auxílio do estesiômetro, faça a estimulação de dois pontos na ponta do dedo indicador com uma distância de 1 mm entre cada ponto.
2. Repita o procedimento com uma distância de 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, 10 mm, 15 mm. Repita o teste na região anterior do braço. A cada estímulo pergunte para o colega que está sendo estimulado quantos pontos ele é capaz de perceber.
3. Monte uma tabela com os resultados
4. Qual foi o local com maior campo receptivo? Por quê?

Reflexo patelar:

1. Solicitar que um aluno sente na cadeira com as pernas pendidas;
2. Outro colega deve dirigir-se ao aluno sentado, encontrar o tendão patelar do mesmo e aplicar o estímulo com o martelo neurológico;
3. Responda as questões abaixo:
 - a) Explique o arco-reflexo.
 - b) Qual foi o receptor envolvido no reflexo testado?

Referências

BEAR, Mark F., BARRY W. Connors, Michael A. Paradiso. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 3ª ed. Artmed, 2008.

GUYTON, Arthur C e HALL John. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda, 2006.

Corrêa Da Silva LC, Rubin AS, Corrêa Da Silva LM, Fernandes JC. Espirometria na prática médica. Revista AMRIGS, 49 (3): 183-194, 2005.

VANDER, Sherman. **Fisiologia Humana, os mecanismos das funções corporais**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.



UNIVATES

R. Avelino Talini, 171 | Bairro Universitário | Lajeado | RS | Brasil
CEP 95914.014 | Cx. Postal 155 | Fone: (51) 3714.7000
www.univates.br | 0800 7 07 08 09

