

Monografia

O Laboratório Clínico Perante A Lesão Hepática



MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

ORIENTAÇÃO:

Prof.^a Dr.^a MARIA CRISTINA MARQUES

Cristina Maria Prata Furtado

2015

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix

LISTA DE ABREVIATURAS

5'NTD – 5' Nucleotidase

α 1-AT – Alfa-1-Antitripsina

AASLD – *American Association for the Study of Liver Disease*

ALB – Albumina

ALP – Fosfatase Alcalina

ALT – Alanina Aminotransferase

AMP – Adenosina-5-monofosfato

ANA – Anticorpos Anti Nucleares (do inglês, *anti-nuclear antibodies*)

ANCA – Anticorpos Anti Citoplasma dos Neutrófilos (do inglês, *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*)

Anti-ASGP-R – Autoanticorpos Anti Receptor Hepático da Asialoglicoproteína

Anti-HAV – Anticorpos anti Vírus da Hepatite A

Anti-HBc – Anticorpos anti-antigénio do core do HBV IgM + IgG

Anti-HBc IgM – Anticorpos IgM anti-antigénio do core do HBV

Anti-HBe – Anticorpos anti-antigénio de replicação viral

Anti-HBs – Anticorpos anti-antigénio de superfície do HBV

Anti-CMV – Anticorpos anti Citomegalovírus

Anti-HCV – Anticorpos anti Vírus da Hepatite C

Anti-EA – Anticorpos anti antigénios precoces do vírus Epstein-Barr

Anti-EBNA1 – Anticorpos anti antigénios nucleares do vírus Epstein-Barr

Anti-HEV – Anticorpos anti Vírus da Hepatite E

Anti-LC1 – Autoanticorpos Anti Citosol Hepático

Anti-LKM – Anticorpos Anti-Microsossomais Hepáticos e Renais (do inglês, *anti-liver, kidney microsomal antibodies*)

Anti-LMA – Autoanticorpos Anti Membrana Hepática

LISTA DE ABREVIATURAS (Continuação)

Anti-LSP – Autoanticorpos Anti Proteína Hepática Específica

Anti-SLA/LP – Autoanticorpos Anti Antígeno Hepático Solúvel e Autoanticorpos Anti Fígado e Pâncreas

Anti-VCA – Anticorpos anti antígenos da cápside viral do vírus Epstein-Barr.

APCA – Anticorpos Anti Células Parietais Gástricas (do inglês, *anti-parietal cell antibodies*)

ASMA – Anticorpos Anti Músculo Liso (do inglês, *anti-smooth muscle antibodies*)

AST – Aspartato Aminotransferase

ATP – Adenosina Trifosfato

BD – Bilirrubina Direta

BI – Bilirrubina Indireta

BT – Bilirrubina Total

CBP – Cirrose Biliar Primária

CEP – Colangite Esclerosante Primária

CHC – Carcinoma Hepatocelular

CLIA – Imunoensaio por Quimioluminescência “Flash” (do inglês, *chemiluminescent immunoassay*)

CMV – Citomegalovírus

CREST – Acrónimo para

CV% - Coeficiente de Variação

DHA – Doença Hepática Alcoólica

DHGNA – Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

DHL – Desidrogenase Láctica

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)

EA-D – Antígenos precoces localizados no citoplasma do vírus Epstein-Barr

LISTA DE ABREVIATURAS (Continuação)

EBV – Vírus Epstein-Barr

EHNA - Esteato-Hepatite Não Alcoólica

ES – Erro Sistemático

ET – Erro Total

Fig. – Figura

γ GT – γ -Glutamil Transferase

HA – Hepatite Alcoólica

HAI – Hepatite Autoimune

HAV – Vírus da Hepatite A (do inglês, *Hepatitis A virus*)

HBeAg - Antígeno de replicação viral

HBV – Vírus da Hepatite B (do inglês, *Hepatitis B virus*)

HBsAg – Antígeno de superfície do HBV

HCV – Vírus da Hepatite C (do inglês, *Hepatitis C virus*)

HDV – Vírus da Hepatite D (do inglês, *Hepatitis D virus*)

Hep-2 – Células Hep-2 (do inglês, *Human epithelial cell line: type 2*)

HEV – Vírus da Hepatite E (do inglês, *Hepatitis E virus*)

HFV – Vírus da Hepatite F (do inglês, *Hepatitis F virus*)

HGV – Vírus da Hepatite G (do inglês, *Hepatitis G virus*)

IFCC – *Internacional Federation of Clinical Chemistry*

IFI – Imunofluorescência Indireta

IMC – Índice de Massa Corporal

INR – Rácio Internacional Normalizado

ISI – *International Sensitivity Index*

LPS – Lipopolissacáridos Bacterianos

LISTA DE ABREVIATURAS (Continuação)

LSR – Limite Superior de Referência

MELD – *Model for End-Stage Liver Disease*

NACB – *National Academy of Clinical Biochemistry*

NAFLD – *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*

NASH – *Non Alcoholic Steato hepatitis*

NH₃ – Amônia

OFRs – *Open Reading Frames*

PTGO – Prova de Tolerância Oral à Glucose

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

PELD – *Pediatric End-Stage Liver Disease*

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic Acid*)

Seg. – Segundos

SHR – Síndrome Hepato-Renal

TIMP – Inibidores da Matriz das Metaloproteinases

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

TP – Tempo de Protrombina

UV – Ultra Violeta

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ácino Hepático - unidade estrutural do fígado.	188
Figura 2. Metabolismo da Bilirrubina.	194
Figura 3. Perfil serológico de uma infeção a HAV.	199
Figura 4. Perfil serológico de uma infeção por HBV.	201
Figura 5. Perfil serológico dos marcadores de infeção a HCV.	202
Figura 6. Resumo esquemático da infeção pelo CMV.	205
Figura 7. Resposta imunológica típica à infeção por EBV.	205
Figura 8. Algoritmo para o diagnóstico diferencial da Hepatite Viral Aguda.	213
Figura 9. Características dos principais vírus hepatotrópicos específicos.	214
Figura 10. Marcha de diagnóstico diferencial de hepatite viral aguda.	214
Figura 11. Perfil serológico numa infeção por HBV: à esquerda infeção aguda, à direita infeção crónica.	215
Figura 12. Variação da transaminase alanina aminotransferase (ALT) em relação aos outros marcadores de infeção a HCV.	217
Figura 13. Caracterização de uma infeção por HCV - Hepatite C.	217
Figura 14. Fluxograma de identificação de uma infeção aguda por HDV.	218
Figura 15. Eventos clínicos e serológicos na Hepatite D (co-infeção).	218
Figura 16. História natural da DHGNA.	219
Figura 17. Um dos modelos explicativos, que reúne maior consenso, da fisiopatologia da EHNA.	220
Figura 18. Exemplo de um fluxograma que orienta para o diagnóstico diferencial, a partir do resultado laboratorial dos parâmetros bioquímicos hepáticos de rotina.	229

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Provas bioquímicas para a valorização da função e da lesão hepática.	199
Tabela 2. Antígenos alvo e padrão de fluorescência dos ANCA.	207
Tabela 3. Resumo das provas hepáticas e suas alterações, exequíveis numa primeira abordagem a um paciente com suspeita de lesão hepática.	209
Tabela 4. Marcadores serológicos da Hepatite B (HBV) associados aos diferentes perfis de infecção.	216
Tabela 5. Interpretação serológica da Hepatite D.	219
Tabela 6. Recomendações das entidades reguladoras para avaliação da severidade da lesão hepática aguda.	230
Tabela 7. Dados publicados sobre especificações de qualidade e imprecisão para provas hepáticas.	233

RESUMO

A hepatite, denominação geral atribuída às enfermidades que acometem o fígado, pode apresentar diversas etiologias: vírus, uso abusivo de álcool, determinados medicamentos, drogas ou outras substâncias tóxicas, doenças hereditárias e de carácter autoimune. As de maior incidência são normalmente de cariz agudo com bom prognóstico, mas algumas podem convergir para a cronicidade podendo cursar com cirrose, que potencia o desenvolvimento de carcinoma hepático ou em última instância, uma falha hepática fatal.

O laboratório clínico, crucial para o diagnóstico e monitorização desta patologia, baseia-se em três tipos de ensaios: testes bioquímicos, serológicos e de biologia molecular, que englobam perfis de *screening*, de evolução e severidade da doença e de diagnóstico diferencial.

A rastreabilidade e fiabilidade dos resultados laboratoriais bem como a standardização e uniformização das metodologias empregues para a sua determinação, são cada vez mais um objetivo a alcançar de modo a que os clínicos obtenham informações laboratoriais de qualidade, reduzindo a incerteza das decisões a tomar quanto ao diagnóstico, prognóstico e terapêuticas a serem instituídas. Neste sentido, a *National Academy of Clinical Biochemistry* (NACB), uma associação profissional de cientistas doutorados ativos no campo da bioquímica clínica, e mais especificamente na área da hepatologia a *American Association for the Study of Liver Disease* (AASLD), uma organização de cientistas e profissionais de saúde comprometidos com a prevenção e cura de doenças do fígado, formularam um conjunto de diretrizes e recomendações que atualmente são seguidas na maioria dos laboratórios clínicos e que são referenciadas neste trabalho.

Palavras Chave: hepatite, marcadores hepáticos, avaliação laboratorial, controlo de qualidade.

ABSTRACT

Hepatitis, general description applied to diseases that affect the liver, may have different etiologies: viruses, alcohol abuse, certain medications, drugs or other toxic substances, hereditary diseases and autoimmune character. Higher incidence of are usually acute in nature with good prognosis, but some may converge to chronicity. This may lead to cirrhosis, which encourages the development of liver carcinoma or ultimately fatal liver failure.

The clinical laboratory, vital for the diagnosis and monitoring of this condition, based on three kinds of tests: biochemical tests, serological and molecular biology, which comprise screening profiles, evolution and disease severity and differential diagnosis.

Traceability and reliability of laboratory results as well as the standardization and harmonization of methodologies used for their determination are increasingly a goal to be achieved so that clinicians obtain quality laboratory information, reducing the uncertainty of decisions to be taken regarding the diagnosis, prognosis and treatment to be instituted. In this sense, the National Academy of Clinical Biochemistry (NACB), a professional association of PhD active scientists in the field of clinical chemistry, and more specifically in the field of hepatology American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), an organization of scientists and health professionals committed to preventing and curing liver disease, formulated a set of guidelines and recommendations that are currently followed in most clinical laboratories and are referenced in this work.

Keywords: hepatitis, hepatic markers, laboratory evaluation, quality control.

1. INTRODUÇÃO

As doenças hepáticas estão entre as enfermidades mais frequentemente observadas na prática clínica. São causas muito comuns de morbidade e de mortalidade, e conseqüentemente, o conhecimento sobre estas patologias tem vindo a aumentar exponencialmente, com a ampliação do número de análises laboratoriais disponíveis para o seu diagnóstico e monitorização nas suas diferentes etiologias: viral, metabólica e imunológica. [1, 2]

Na maioria dos casos, um diagnóstico de doença hepática pode realizar-se com precisão através de um historial clínico cuidadoso, da realização de exames físicos e da aplicação de testes laboratoriais, num ambiente de cuidados de saúde primários. A *National Academy of Clinical Biochemistry* (NACB) tem desenvolvido de alguns anos a esta parte, guias de prática clínica segundo a medicina baseada na evidência para o diagnóstico e monitorização de determinadas patologias. Neste sentido, também a *American Association for the Study of Liver Disease* (AASLD) tem publicado diretrizes para a abordagem ao tratamento de pacientes com enfermidades hepáticas. Estas entidades sugerem abordagens preferenciais quanto aos aspetos de *screening*, diagnóstico e monitorização destes pacientes, postando ainda recomendações quanto às especificações de qualidade das provas hepáticas nos ensaios e nos métodos laboratoriais, visando a rastreabilidade e qualidade dos resultados analíticos dos parâmetros de avaliação hepática, nomeadamente: Imprecisão, Inexatidão ou *Bias* e Erro Total Aceitáveis. [4, 5, 6, 7]

Para avaliar a enfermidade hepática é necessário detetá-la, avaliar a sua gravidade, a efetividade da terapêutica e estimar prognósticos. Diante das múltiplas funções hepáticas, as avaliações fornecidas pelo laboratório clínico através da existência de testes de diagnóstico da função e lesão hepática, precisos e sensíveis, são de extrema relevância para a clínica médica, pois raros são os sinais e sintomas clínicos evidentes nos pacientes com hepatopatias. Em várias formas de doença hepática, os níveis séricos de enzimas citosólicas, mitocondriais e associadas a membrana, estão aumentadas, sendo a especificidade das enzimas que se elevam características de um tipo de doença. Os testes da função hepática são úteis na deteção, diagnóstico, avaliação do grau de severidade da doença, monitorização da terapêutica e para o prognóstico de doença hepática e sua disfunção. Qualquer lesão do fígado que cause histólise e necrose celular, ao nível do hepatócito, faz com que haja libertação de várias enzimas (alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST medição no soro em conjunto com outros analitos (bilirrubinas, proteínas séricas, tempo de protrombina), permit), γ -glutamyl transferase (γ GT), fosfatase alcalina (ALP), desidrogenase láctica (DHL)), cuja e avaliar a extensão do dano hepático e diferenciar a patologia hepatocelular (funcional) da obstrutiva (mecânica). [6, 7, 8, 9]

2. FUNÇÃO HEPÁTICA

2.1 – Fisiologia

O fígado é o maior e mais complexo dos órgãos internos. Localiza-se no hipocôndrio direito imediatamente abaixo do diafragma, chegando a pesar no indivíduo adulto cerca de 1,2 a 1,5 Kg. Está estrategicamente situado no sistema circulatório recebendo um suprimento sanguíneo duplo: artéria hepática e veia porta. Esta particularidade permite ao fígado controlar as substâncias que são absorvidas em todo o intestino e determinar quais delas vão entrar, e como vão entrar, na circulação sistêmica. O fígado é um órgão multifuncional que envolve um elevado número de funções metabólicas, de síntese e de excreção. Atua como órgão de armazenamento, produção de componentes sanguíneos e fatores da coagulação exercendo influência na homeostase, síntese de ácidos biliares, catabolismo de hormonas, metabolismo de nutrientes, minerais e toxinas, metabolismo dos hidratos de carbono e lipídios e ainda no metabolismo de xenobióticos. [1, 2]

O fígado é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo (cápsula de Glisson). O parênquima hepático é constituído principalmente por hepatócitos, responsáveis pela maioria das funções metabólicas e de síntese, os quais se agrupam em placas que se anastomosam formando os lóbulos hepáticos. Entre as placas de hepatócitos situam-se os sinusóides, cujas paredes são revestidas por células endoteliais típicas e pelas células de Kuppffer (células fagocitárias). No estreito espaço entre os sinusóides e os hepatócitos, Espaço de Disse, localizam-se as células de Ito ou esteladas que armazenam vitamina A e sintetizam, em situações patológicas, colagénio. Do ácino hepático (unidade funcional do fígado) faz ainda parte o sistema porta. [1, 2, 10, 11]

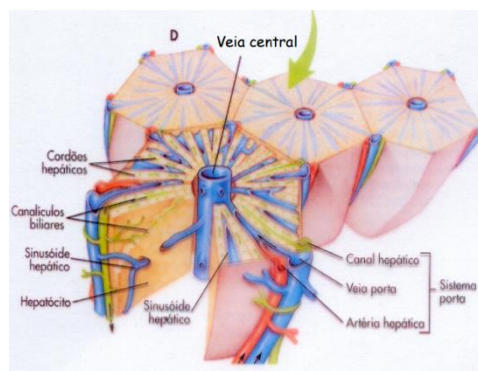


Figura 1 - Ácino Hepático - unidade estrutural do fígado. Retirado de [10]

2.2 – Fisiopatologia

Qualquer alteração difusa do parênquima hepático, com inflamação e alteração do hepatócito, provoca um quadro patológico que se designa por Hepatite. Dependendo da sua etiologia, que pode ser viral (por vírus hepatotrópicos específicos da Hepatite A, B, C, D e E, e outros inespecíficos como o Citomegalovírus e Epstein-Barr), metabólica (por efeitos do álcool, medicamentos ou outras substâncias tóxicas, baixo aporte de

sangue e deficiências hereditárias) e imunológica (resultado de um desequilíbrio do sistema imunitário com produção de autoanticorpos contra as células hepáticas), a gravidade da lesão bem como o seu prognóstico e a evolução para a cura são de grau variável. Assim, as hepatopatias podem manifestar-se de modos bastante distintos. São vários os sintomas e sinais que podem surgir e que apesar de característicos são inespecíficos, entre os quais: icterícia (o mais específico), fadiga, náuseas, vômitos, mal-estar geral, anorexia, prurido, hepatomegalia e dor no hipocôndrio direito. [1, 2, 10, 11]

De um modo geral, as enfermidades hepáticas são classificadas do seguinte modo: [1, 2, 10, 11]

- **Patologia Hepatocelular** – predominância de características de lesões hepáticas, com inflamação e necrose dos hepatócitos que origina um padrão hepatocelular no qual se evidencia o aumento destacado das transaminases. Exemplos: Hepatite Viral, Hepatite Autoimune, Hepatite Tóxica/Medicamentosa e Hepatite Isquêmica.
- **Patologia Colestática (obstrutiva)** – predominância de características de inibição do fluxo da bÍlis ou da incapacidade dos hepatócitos em excretarem bilirrubina ou ácidos biliares, originando um padrão colestático associado a um aumento desproporcionado da ALP e γ GT relativamente ao aumento das transaminases. Exemplos: cálculos na vesícula biliar, obstrução maligna, Cirrose Biliar Primária.
- **Patologia Mista** – de padrão misto com elevação concomitante das transaminases e da ALP.

De acordo com a extensão e gravidade dos danos hepáticos e com a duração da patologia, esta pode ser definida como sendo aguda ou crónica. Clinicamente, a lesão hepática aguda pode reconhecer-se pela presença súbita de icterícia ou sintomas inespecíficos de patologia aguda, acompanhados laboratorialmente pelo incremento da actividade das transaminases ALT e/ou AST. As recomendações da NACB e AASLD para o diagnóstico de lesão hepática aguda são as seguintes: [1, 4, 5, 11]

☞ A lesão hepática pode diagnosticar-se por uma ALT > 10 vezes o limite superior de referência e ALP < 3 vezes o limite superior de referência.

Salvo alguns casos de hepatites fulminantes, normalmente as hepatites agudas são autolimitadas evoluindo de forma benigna, contribuindo também para tal a elevada capacidade regenerativa do fígado. Contudo, se não diagnosticadas e tratadas corretamente, mesmo se associadas a etiologias menos agressivas, podem conduzir à morte. [1, 2, 11]

A lesão hepática crónica é um transtorno relativamente frequente, que aparentemente apresenta poucos sintomas mas aporta um risco significativo de morbidade e mortalidade a longo prazo, podendo culminar numa Cirrose ou em Carcinoma Hepático. Anatomopatologicamente define-se pelo estabelecimento de necrose hepática e inflamação, acompanhada de fibrose. As recomendações da NACB e AASLD para o diagnóstico de lesão hepática crónica são as seguintes: [1, 4, 5, 11]

☞ -Na ausência de biópsia hepática demonstrando hepatite crónica deve utilizar-se um dos seguintes achados laboratoriais para o diagnóstico de hepatite crónica:

- Persistência de níveis séricos elevados da ALT por mais de 6 meses após diagnóstico de hepatite aguda;
- ALT aumentada, sem outra explicação, em mais de uma ocasião num período de 6 meses. Em pacientes com fatores de risco para a hepatite crónica viral, causas genéticas de lesão hepática, patologia autoimune ou em presença de sinais e sintomas clínicos de doença hepática, o intervalo pode ser inferior a 6 meses.

3. O LABORATÓRIO CLÍNICO: PERFIL HEPÁTICO METABÓLICO, VIRAL E IMUNOLÓGICO

3.1 - Parâmetros Bioquímicos

3.1.1 – Transaminases – ALT e AST

As transaminases (ou aminotransferases) são indicadores sensíveis de dano hepático, particularmente perante uma lesão aguda. A AST também está presente em outros tecidos como o coração, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas e, portanto, é menos específica de lesão hepática do que a ALT que existe primariamente no fígado. Assim, perante uma lesão hepática, há refluxo de ambas as enzimas para o plasma com a elevação dos seus níveis, sendo que a ALT sobe ligeiramente mais do que a AST se a lesão for puramente hepática, exceptuando na Hepatite Alcoólica em que a elevação da AST é cerca de 2-3 vezes superior à elevação da ALT, dado que o álcool tem um efeito inibidor na síntese desta última enzima. A necrose em si não é condição necessária e há

baixa correlação entre o grau de lesão hepatocelular e o nível das transaminases. Deste modo, a elevação absoluta das transaminases possui grande significado diagnóstico, e não de prognóstico, nas hepatopatias agudas. Por vezes, mais importante do que as características individuais das transaminases é a relação entre o seu aumento (rácio AST/ALT), com valor diagnóstico. [2, 6, 7, 8, 9, 10, 12]

☞ AST

- Enzima que catalisa a transferência do grupo amina de um aminoácido para um ácido α -cetônico, segundo a reação:
Aspartato + Alfa-cetoglutarato --> Glutamato + Oxaloacetato
- Existem duas isoformas da AST: uma de localização celular citoplasmática e outra mitocondrial;
- Não existindo um método laboratorial que determine qual a origem da AST encontrada no sangue, o diagnóstico da causa do seu aumento deve considerar a possibilidade de lesão em qualquer um dos órgãos onde pode ser encontrada;
- Tempo de semi vida: 17 ± 5 horas.

☞ ALT

- Enzima que catalisa a transferência do grupo amina de um aminoácido para um ácido α -cetônico, segundo a reação:
Alanina + Alfa-cetoglutarato --> Glutamato + Piruvato
- De localização celular exclusivamente citoplasmática;
- O aumento sérico da ALT é o melhor indicador de lesão hepática aguda mas não reflete a gravidade da doença (para tal são necessárias análises complementares: bilirrubina e INR);
- Tempo de semi vida: 47 ± 10 horas.

A atividade enzimática das transaminases varia com a idade, existindo a necessidade de existirem limites superiores de referência ajustados de acordo com o método analítico, sobretudo para crianças e idosos. Nos adultos, esta atividade é

substancialmente mais elevada em homens comparativamente às mulheres. [4, 6, 7, 8, 9]

Analiticamente, a atividade das transaminases pode ser afetada por diversos fatores: pré analíticos (ex.: condições de armazenamento da amostra – congelação/descongelação diminui-a), exercício físico (aumenta), pelo índice de massa corporal (aumenta em pacientes obesos) e pelo grau de hemólise da amostra (aumenta). Perante a elevação inesperada destas enzimas, o ensaio deverá ser repetido. Se a amostra pertencer a um indivíduo que pratica exercício físico, este deve cessar por um determinado período de tempo a sua atividade antes de realizar a colheita. Normalmente, a quantificação da atividade catalítica das transaminases é efetuada pelo método de Espectrofotometria do UV, com a oxidação do NADH a NAD e requiere, para ambas, o reagente piridoxal-5'-fosfato como co-enzima. [6, 7, 8, 9]

3.1.2 – Fosfatase Alcalina (ALP)

A ALP é uma enzima glicoproteica de ligação à membrana implicada no transporte transmembranar. Na realidade, é uma família de enzimas composta por um grupo de pelo menos cinco isoenzimas, que catalisam a hidrólise de monoésteres de fosfato, em pH alcalino e se encontram distribuídas um pouco por todo o organismo, com maior expressão (por ordem decrescente) na placenta, mucosa do ílion, rim, osso e fígado. No fígado é encontrada principalmente nas microvilosidades dos canalículos biliares e na superfície sinusoidal dos hepatócitos. [2, 6, 7, 8, 9, 10, 12]

O aumento da ALP hepática é mais evidente na obstrução biliar, onde o acúmulo de sais biliares a solubilizam e a obstrução promove a sua regurgitação entre as células hepáticas até o sangue. A interpretação de alterações nos resultados da ALP deve ser efetuada utilizando valores de referência de acordo com o método analítico segundo a idade (adultos e crianças) e o sexo (apesar de nos adultos a ALP divergir pouco entre homens e mulheres, é importante quando a amostra pertence a gestantes). [4, 6, 7, 8, 9, 10, 12]

Analiticamente é possível a diferenciação entre as principais isoenzimas (hepática, óssea e intestinal) para localizar a fonte da alteração da ALP quando não se observam sinais clínicos ou laboratoriais de doença hepatobiliar. Os níveis sanguíneos da ALP podem ser influenciados por fatores pré analíticos (nomeadamente o jejum – aumenta com a ingestão de alimentos; condições de armazenamento – a refrigeração aumenta a sua atividade; intervalo de tempo que medeia entre a colheita e a análise - aumenta), hemólise (a hemoglobina inibe a atividade da enzima), gestação (os níveis de ALP aumentam no terceiro trimestre de gravidez), contraceptivos orais (diminuem os valores da enzima) e tabaco (nos fumadores a ALP tende a ser mais elevada). O método

amplamente implementado para a sua determinação é a Espectrofotometria do Visível cujo substrato, o p-nitrofenil-fosfato (incolor), em meio alcalino e na presença de magnésio é hidrolisado pela ALP a p-nitrofenol (amarelo) e fosfato inorgânico. [6, 7, 8, 12]

3.1.3 – Gama Glutamiltransferase (γ GT)

A γ GT é uma enzima presente nas membranas celulares que catalisa a transferência de resíduos γ -glutamil do glutatião para receptores peptídicos. Encontra-se sobretudo no rim, mas também no pâncreas, fígado, baço e pulmão. Embora o rim apresente o nível mais elevado de γ GT, a enzima presente no soro parece ter origem, sobretudo no sistema hepatobiliar, apresentando-se elevada em muitas formas de doença hepática. O aumento dos níveis de γ GT é identificado de modo precoce e mais acentuado relativamente a outras enzimas hepáticas em casos de obstrução hepatobiliar, considerando-se um indicador sensível para estas doenças. Contudo a sua inespecificidade, torna um resultado isolado desta enzima pouco relevante clinicamente. Assim, a γ GT integra normalmente um painel de análises e é a interpretação conjunta que auxilia ao diagnóstico. É particularmente útil para detetar casos de alcoolismo e determinar a origem de um aumento da ALP. [2, 6, 7, 8, 9, 10, 12]

Laboratorialmente, os níveis séricos da γ GT são afetados por diversas condições pré analíticas onde se incluem a gravidez (diminui nos primeiros meses), fármacos (aumenta), tabaco (aumenta), raça (aumenta na raça negra), ingestão de álcool (aumenta) e jejum (diminui com a ingestão de alimentos). Nos adultos, a atividade desta enzima é substancialmente mais elevada em homens comparativamente com as mulheres, pelo que as recomendações direcionam-se no sentido de se estabelecerem limites superiores de referência, ajustados de acordo com o método analítico, consoante o sexo. A maioria dos laboratórios pratica o método cinético colorimétrico padronizado pela *Internacional Federation of Clinical Chemistry* (IFCC), que utiliza como substrato a L-g-glutamil-3carboxi-4-nitranilida e como aceitador a glicilglicina, obtendo-se como produto da reação o 5-amino-2-nitrobenzoato, que é doseado por Espectrofotometria. [4, 5, 6, 7, 8, 9, 12]

3.1.4 – Bilirrubina Direta (BD) e Bilirrubina Total (BT)

Principal componente dos pigmentos biliares, a bilirrubina é o produto final do catabolismo do grupo heme da hemoglobina e outras hemoproteínas. É extraída e biotransformada no fígado e excretada na bilis e na urina. Circula no sangue em duas formas designadas como conjugada (ou direta) e não conjugada (ou indireta (BI)), refletindo respetivamente, se os grupos carboxil estão esterificados ou livres, e se a

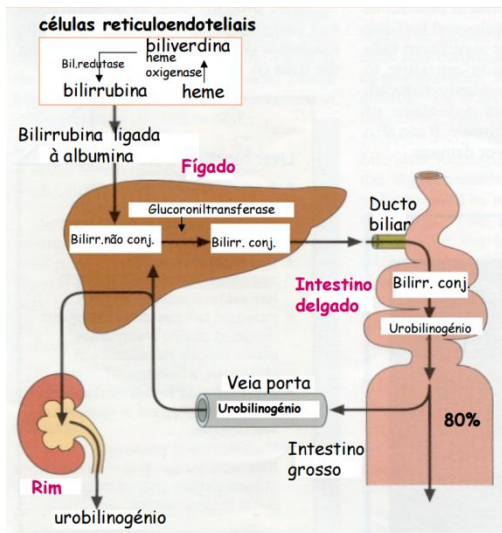


Figura 2 - Metabolismo da Bilirrubina. Retirado de [10]

reação com corantes diazo é direta ou se necessita de ativadores. O doseamento da BT compreende a quantificação simultânea destas duas formas. Uma vez produzida, a bilirrubina é transportada para o fígado ligada à albumina, por ser insolúvel em água (bilirrubina não conjugada). No fígado liga-se reversivelmente a proteínas solúveis (ligandinas), e é conjugada com o ácido glucorónico, para formar a BD, que é excretada através do sistema biliar para o intestino, onde parte é reabsorvida, e a restante é metabolizada pelas bactérias intestinais a Urobilinogénio. Deste, uma pequena percentagem é excretada na urina, outra é oxidada no tracto intestinal inferior sendo eliminada nas fezes sob a forma de estercobilinogénios, e o restante, é reabsorvido pelo intestino e retoma a circulação entero-hepática. A avaliação em separado das duas frações que compõem a BT é importante para determinar qual o processo hepático que está lesado. Se a bilirrubina se apresentar elevada no sangue, com predomínio da BD, significa que o fígado está a conjuga-la de um modo eficiente, mas a sua excreção está comprometida, provavelmente, devido a problemas no fluxo biliar. Um aumento da degradação do heme ou deficiência da conjugação no fígado traduz-se num predomínio da BI. O aumento de ambas as frações pode ser causado por lesão mais intensa dos hepatócitos (onde há deficiência na conjugação e também refluxo da bilirrubina conjugada para o sangue). Como apenas a BD aparece na urina a presença de bilirrubinúria é quase sempre indicativa de doença hepática (indivíduos são não devem possuir valores detetáveis de bilirrubina e urobilinogénio na urina). Assim, o doseamento da bilirrubina é uma análise que pode avaliar em simultâneo a presença de lesão hepatocelular, a integridade do fluxo biliar e a síntese hepática. [2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]

No laboratório, a bilirrubina sérica é normalmente doseada por duas técnicas, uma para a BT e outra para a BD, retirando-se por cálculo da diferença entre as duas a BI. Estes resultados podem ser afetados pela ingestão de alimentos (eleva-os consideravelmente), exposição à luz (a luz pode converter a BI num fotoisómero que reage diretamente – diminuição da BT e da BI), gravidez (a BT diminui no segundo trimestre), hemólise (a hemoglobina absorve luz no mesmo comprimento de onda da bilirrubina, incrementando-os) e anemia hemolítica (provoca o acúmulo de hemoglobina e consequentemente de BI, saturando o seu processo de conjugação no fígado). [6, 7, 8, 12]

Analiticamente, as entidades reguladoras recomendam que os intervalos de referência para a BT sejam diferentes para adultos e crianças, com diferenciação entre sexos. Relativamente à BD, a pouca reprodutibilidade entre laboratórios, como resultado de uma grande variedade de fatores, não permite obter dados suficientes sobre

as suas especificações. Contudo, devido à quase total ausência de BD num soro não patológico, os laboratórios devem assegurar-se de que as medições deste analito, na maioria dos indivíduos sãos, sejam inferiores a 0,1 mg/dl. As bilirrubinas são doseadas normalmente pelo método de espectrofotometria do visível envolvendo uma reação com corantes diazo. A BD reage diretamente. A BI reage em presença de substâncias ativadoras provenientes da precipitação de proteínas. [4, 5, 6, 7, 8, 9, 12]

3.1.5 – Albumina (ALB)

A ALB é a proteína mais abundante do plasma (40-60%) e a principal proteína de ligação e de transporte para um vasto leque de substâncias no sangue. É extremamente importante como tampão, na manutenção do pH sanguíneo em níveis fisiológicos, e na manutenção da viscosidade e da pressão oncótica do plasma. A ALB sérica é exclusivamente sintetizada pelos hepatócitos. Possui um tempo de semi vida de cerca de 15-19 dias, pelo que alterações à sua síntese traduzem-se em modificações lentas nos seus níveis séricos não sendo um bom indicador de severidade numa doença hepática aguda. A hipoalbuminémia é, no entanto, comum nas doenças hepáticas crónicas como a cirrose, sendo que a sua concentração é um marcador de descompensação e prognóstico desta patologia. Na ausência de doença hepática deve excluir-se síndromes de malnutrição ou outros em que há aumento das perdas de albumina pela urina (ex. síndrome nefrótico) ou pelo intestino (ex. enteropatia perdedora de proteínas). Incrementos séricos de ALB são secundários a hemoconcentração originada por desidratação, aplicação prolongada do garrote durante a colheita e por evaporação da amostra. [2, 6, 7, 8, 9, 11]

Os métodos para quantificar a ALB sérica baseiam-se na sua união específica (por forças electrostáticas) a determinados corantes aniónicos, particularmente verde e púrpura de bromocresol, sendo o primeiro o mais adequado em pacientes com patologia hepática. O complexo corado formado é detetado por Espectrofotometria do Visível. A sua concentração plasmática é baixa nos recém nascidos (2,8-4,4 g/dl) alcançando os valores de referência para adultos (3,7-5,0 g/dl) na primeira semana de vida, incrementando-se até 4,5-5,4 g/dl aos seis anos permanecendo nestes níveis, até que declinam até aos valores típicos da idade adulta. Não há diferença significativa entre homens e mulheres. [4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12]

3.1.6 – Tempo de Protrombina (TP)

O TP doseia o fibrinogénio e coletivamente os fatores do complexo protrombínico (fatores II, V, VII e X, todos dependentes da vitamina K). Assim, o TP mede o tempo de coagulação do plasma após a adição de tromboplastina ao plasma citratado do paciente, estando influenciado pela atividade dos fatores de coagulação que

se sintetizam no fígado. É determinado em segundos (seg.), sendo o tempo obtido comparado com o tempo de referência. [2, 6, 7, 8, 9]

Como já foi referenciado o fígado desempenha um papel central na homeostasia, sintetizando a maioria dos fatores e inibidores da coagulação e eliminando enzimas ativas dos sistemas de coagulação e fibrinólise. Assim, doenças hepáticas severas (sobretudo hepatites agudas e tóxicas) costumam cursar com alterações na coagulação. O TP incrementa no mínimo em 3seg. face à média da população na Hepatite Tóxica, mas raramente mais de 3seg. na Hepatite Viral ou Alcoólica. Pode ou não estar aumentado na icterícia obstrutiva. Contudo, a falta de fatores da coagulação pode também ocorrer por deficiência em vitamina K essencial à sua síntese, pelo que na ausência de achados clínicos que demonstrem comprometimento hepático, outras patologias que influenciem a absorção desta vitamina da dieta devem ser investigadas (a vitamina K não é sintetizada pelo organismo). [2, 6, 7, 8, 9]

A tromboplastina é um reagente de origem animal (bovina, de coelho), obtido por técnicas recombinantes, que aporta fator tissular, fosfolípidos e cálcio, mas que varia para a mesma amostra de acordo com os reagentes e a tecnologia utilizada. Para minimizar estas variações e normalizar os resultados adopta-se um modelo de calibração e standardização no qual, a partir do tempo de protrombina do paciente e do de referência, considerando o índice de padronização da tromboplastina, o *International Sensitivity Index* (ISI), obtém-se o INR (rácio internacional normalizado). Laboratorialmente, também podem interferir na determinação do TP (aumentando-o) uma concentração de citrato superior a 3,8% por enchimento incorreto do tubo de colheita (deficiente volume de amostra) ou por um hematócrito anormalmente elevado. [2, 6, 7, 8, 9]

3.1.7 – Amónia (NH₃)

A NH₃, produto do metabolismo dos aminoácidos e produzida por bactérias intestinais, é eliminada primariamente pelo fígado que promove a sua conversão em ureia, mediante uma cascata de reações enzimáticas (ciclo da ureia). Na patologia hepática, a deficiente metabolização da amónia em ureia culmina no aumento da mesma no sangue, um sinal típico de falência hepática, cuja extensão se reflete nos valores elevados deste metabolito. Laboratorialmente, o doseamento dos níveis de amónia plasmática, para o estudo de doença hepática, não é uma análise de rotina. Tem interesse clínico no seguimento da cirrose e para o diagnóstico de encefalopatia de origem incerta. Contudo, aumentos significativos deste composto são também observados no Síndrome de Reye e nas deficiências em enzimas do ciclo da ureia, pelo que um diagnóstico diferencial é importante. Também não deve ser descurado o fato de a amónia aumentar com a ingestão elevada de proteínas, na Leucemia Aguda, no

transplante de medula óssea e em crianças até aos três anos de idade. [1, 2, 6, 7, 8, 9, 11, 12]

O doseamento da NH_3 no laboratório é complicado devido à sua baixa concentração, instabilidade e contaminação dominante. Vários fatores podem afetar a sua concentração: idade (aumenta em crianças com menos de 3 anos de idade), exercício físico (aumenta), tabaco (aumenta), fármacos (sobretudo barbitúricos e diuréticos – aumenta) e hemólise (os eritrócitos possuem NH_3 em concentrações superiores ao plasma – aumenta), apesar de algumas metodologias permitirem que se aceite amostras até uma determinada concentração de hemoglobina livre. A amostra deve ser preferencialmente de origem arterial. Para amostras de sangue venoso, o plasma deve ser separado das células rapidamente (no máximo 15 min) para evitar o aumento artefactual da amónia. Os métodos mais utilizados para a determinação deste analito são enzimáticos (os principais) e de química seca. Os primeiros utilizam a enzima glutamato desidrogenase que convertem a amónia presente a glutamato com a oxidação do NADPH a NADP^+ detetando-se a diminuição da absorvância por Espectrofotometria do UV. Os métodos de química seca baseiam-se numa técnica colorimétrica de ponto final, que emprega reagentes em multicamada incorporados numa matriz de poliéster, que convertem o ião amónio em gás amoníaco que reage com o indicador Azul de Bromofenol para formar um composto corado detetável por Espectrofotometria do Visível. [6, 7, 8, 9, 11, 12]

3.1.8 – Globulinas

As globulinas séricas são um grupo de proteínas que circulam no plasma. Englobam as gama globulinas (imunoglobulinas), produzidas principalmente pelos linfócitos B, e as globulinas alfa e beta, produzidas essencialmente nos hepatócitos. Perante lesão hepática crónica, o fígado falha no processo de filtração de antígenos bacterianos da flora intestinal, que passam para a circulação sistémica estimulando os linfócitos a produzir imunoglobulinas, ao mesmo tempo que a produção de globulinas alfa e beta pelos hepatócitos está comprometida. Estes dois fenómenos (aumento da fração gama e diminuição da fração alfa e beta) produzem, na eletroforese das proteínas, um padrão electroforético característico de doença hepática crónica, onde não se consegue distinguir as diversas frações: fusão beta-gama ou ponte cirrótica. As globulinas podem ser doseadas por métodos de imunoturbidimetria. [2, 8, 9, 11]

3.1.9 – 5' nucleotidase (5'NTD)

A 5'NTD é uma fosfomonoesterase que hidrolisa especificamente a ligação éster fosfórico da ligação ribose-5'-fosfato dos nucleótidos. Localizada maioritariamente nas

membranas dos hepatócitos e nas paredes dos canalículos biliares, é um marcador sensível e específico das colestases. A 5'NTD não se eleva nas afecções ósseas ou durante o crescimento como a FA, nem é modificada por indutores enzimáticos (medicamentos ou bebidas alcoólicas) como a γ -GT. Assim, a 5' NTD é um teste específico para diagnóstico de colestase ou lesão ao sistema biliar intra ou extrahepático, e em alguns laboratórios, é doseada como um substituto para a γ GT com o intuito de aferir se um nível elevado de ALP é de origem biliar ou extra-biliar. [6, 7, 12]

Para o doseamento da 5'NTD estão implementados no laboratório métodos de Espectrofotometria do Visível e do UV cujos princípios analíticos envolvem respetivamente reações colorimétricas e enzimáticas. O primeiro assenta no doseamento do fósforo inorgânico gerado pela ação de dois substratos: a adenosina-5-monofosfato (AMP) e o glicerol fosfato. A AMP é hidrolisada pela 5'NTD e pelas fosfatases inespecíficas do soro, enquanto o glicerol fosfato apenas é hidrolizado pelas fosfatases referidas. Assim, a diferença entre a medida colorimétrica do fósforo liberado usando diferentes substratos reflete a atividade da 5'NTD. O método enzimático também utiliza como substrato a AMP mas foca-se em outro produto da reação – a adenosina. Esta sofre deaminação pela adenosina deaminase originando inosina e ião amónia. A amónia na presença da L-glutamato-desidrogenase, NADH e 2-oxoglutarato promove a oxidação do NADH a NAD, que permite avaliar diretamente a atividade enzimática da 5'NTD. [6, 7, 12]

3.1.10 – Lactato Desidrogenase (LDH)

A LDH é uma enzima chave do metabolismo dos glúcidos e que pode ser encontrada na maioria dos principais tecidos, como o coração, pulmão, fígado, rim e músculo-esquelético. Em aerobiose, transforma o lactato em piruvato que será em seguida utilizado na gliconeogénese. Em anaerobiose, intervém no final da degradação da glicose em lactato, libertando energia sob a forma de ATP. [2]

Existe em cinco isoformas, numeradas de LDH-1 a LDH-5 consoante os tecidos onde predomina. Uma vez que a concentração de LDH nos tecidos é cerca de 500 vezes superior à existente no plasma, a ocorrência de danos numa pequena porção de tecido pode conduzir a um aumento significativo da sua actividade no soro. Assim, o principal interesse no doseamento da LDH é a deteção de lesões tecidulares. O seu valor sérico reflete o grau de lesão, mas individualmente, não identifica a causa ou a localização da mesma. É uma análise complementar útil, quando a patologia hepática está claramente identificada, para monitorizar a sua evolução e o dano hepático. Pode ainda ajudar ao diagnóstico diferencial entre Hepatite Aguda Viral e lesão hepática tóxica. [2]

Laboratorialmente são utilizados métodos de Espectrofotometria para o doseamento da LDH. [6, 7, 12]

Tabela 1 - Provas bioquímicas para a valorização da função e da lesão hepática. *Adaptado de [12]*

Análises Laboratoriais Bioquímicas	Utilidade Clínica
ALT	Lesão hepatocelular
AST	Lesão hepatocelular
FA	Colestase, patologia infiltrativa, obstrução biliar
γ GT	Colestase ou obstrução biliar
Bilirrubina	Colestase, deficiência na conjugação da bilirrubina, obstrução biliar
Albumina	Função hepática
PT	Função hepática
Globulinas	Função hepática
Amónia	Coma hepático

3.2 - Marcadores Serológicos e Determinação de Carga Viral

3.2.1 – Hepatite A - Vírus da Hepatite A (HAV)

✚ DETECÃO INDIRETA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI-HAV DO TIPO IgM E IgG

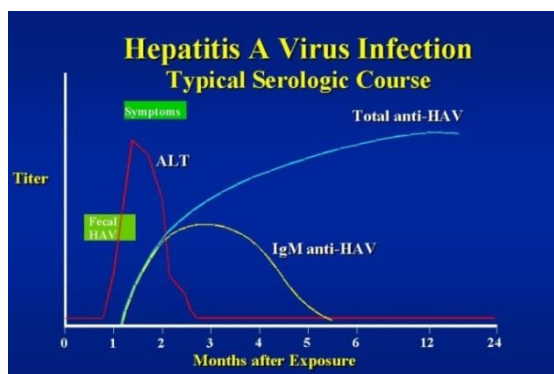


Figura 3 - Perfil serológico de uma infecção a HAV. *Retirado de [15]*

Durante a fase aguda da infecção os anticorpos Anti-HAV do tipo IgM aparecem no soro do paciente e são quase sempre detetáveis no início da sintomatologia. Na maioria dos casos a resposta à infecção por parte destes anticorpos, atinge o seu pico no primeiro mês da doença podendo persistir no soro até seis meses. A duração média da virémia é

de 18 dias. Os anticorpos Anti-HAV Totais (IgG+IgM) persistem durante largos períodos de tempo após a infeção, provavelmente por toda a vida. A vacinação induz anticorpos Anti-HAV detetáveis 2-4 semanas após a dose inicial. Assim, recorre-se ao doseamento dos anticorpos Anti-HAV do tipo IgM para o diagnóstico de infeção viral aguda e aos Anti-HAV Totais para avaliar o estado imune do paciente. [3, 13, 14, 15]

✚ DETEÇÃO DIRETA DE ÁCIDO NUCLEICO – DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL

A determinação direta do HVA não é uma análise de interesse no Laboratório Clínico, contudo é uma análise laboratorial exequível por vezes utilizada no campo da investigação. Assim as recomendações laboratoriais das entidades NACB E AASLD apontam no sentido de reservar a deteção do ácido nucleico viral (RNA), por metodologias de Biologia Molecular, nomeadamente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real, somente para fins de investigação. [4, 5, 14, 15]

3.2.2 – Hepatite B – Vírus da Hepatite B (HBV)

✚ DETEÇÃO DE ANTIGÉNIOS E DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS – SEROLOGIA

O HBV é um vírus com múltiplas proteínas que podem induzir resposta antigénica: [3, 13, 14, 15, 16, 17]

- **HBsAg (antigénio de superfície do HBV)** – É um antigénio de superfície, localizado no envelope, responsável pela ligação do vírus aos hepatócitos. É produzido em excesso junto às partículas virais durante as fases não replicativas da infeção. É utilizado como marcador geral de infeção (é o primeiro a ser detetado, persiste nas infeções crónicas e desaparece na convalescença).
- **Anti-HBs (anticorpos anti-antigénio de superfície do HBV)** – É o anticorpo contra o antigénio de superfície. É marcador de recuperação (ou cura se em conjunto desaparecer o HBsAg) e / ou de imunidade protetora (vacinação) à infeção pelo HBV.

- **Anti-HBc (anticorpos anti-antigénio do core do HBV IgM + IgG)** – Também designado por **core Total**. Indicador de infeção passada, período janela ou infeção crónica. Quando positivo, requer análise conjunta com outros marcadores serológicos do HBV.
- **Anti-HBc IgM (anticorpos IgM anti-antigénio do core do HBV)** – É o anticorpo contra o antigénio do core. É marcador de infeção aguda (é o primeiro anticorpo a ser detetado na fase inicial da infeção). Pode aumentar em fases de agudização da infeção crónica por HBV.
- **HBeAg (antigénio de replicação viral)** – É o antigénio solúvel da região pré-core que exerce funções de imunorregulação. Indica replicação do vírus e, portanto, infeciosidade. A sua persistência por mais de 6 meses indica tendência à cronicidade.
- **Anti-HBe (anticorpos anti-antigénio de replicação viral)** – Indica a interrupção da replicação viral, contudo, o doente ainda pode ser positivo para o HBsAg. Pode ser indicativo de bom prognóstico.

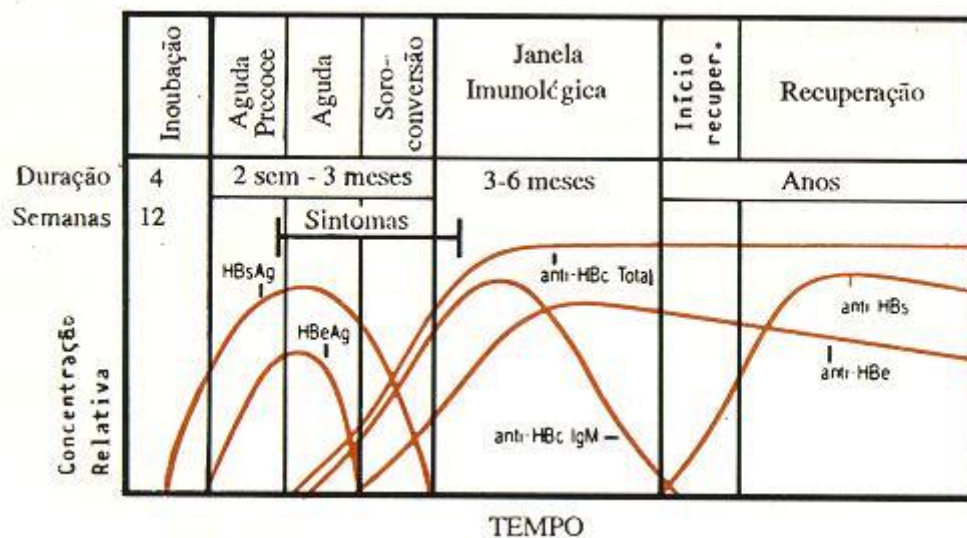


Figura 4 - Perfil serológico de uma infeção por HBV. Retirado de [17]

As recomendações das entidades competentes para o doseamento destes marcadores serológicos da Hepatite B, visam o seu doseamento faseado, ajustado às necessidades clínicas. De acordo com a informação pretendida assim deverá ser

solicitado ao laboratório a pesquisa de determinado marcador ou, mais frequentemente, grupos de marcadores. [4, 5, 13, 14, 15]

✚ DETEÇÃO DIRETA DE ÁCIDO NUCLEICO – DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL

A concentração de DNA do vírus determinada por metodologias de Biologia Molecular, nomeadamente por PCR, tem utilidade clínica comprovada na monitorização de doentes com Hepatite B crónica, com terapêutica antiviral instituída. Um DNA viral não detetável com a normalização dos níveis séricos das aminotransferases e melhoria histológica, implicam uma taxa de replicação do vírus baixa e uma melhoria clínica significativa. [13, 14, 15]

3.2.3 – Hepatite C – Vírus da Hepatite C (HCV)

✚ DETEÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS – SEROLOGIA

Os ensaios de *screening* da infeção aguda por HCV pesquisam anticorpos contra proteínas Anti-HCV: proteínas estruturais do core (C) e invólucro (E1 e E2) e para as proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4, NS5), mediante imunoensaios enzimáticos de segunda geração, que se tornam detetáveis numa média de 80 dias, podendo não o ser em doentes imunocomprometidos e hemodialisados. A presença de anticorpos contra o HCV pode indicar que o individuo esteve ou está infetado com HCV e/ou é capaz de transmitir a infeção. [3, 13, 14, 15, 18]

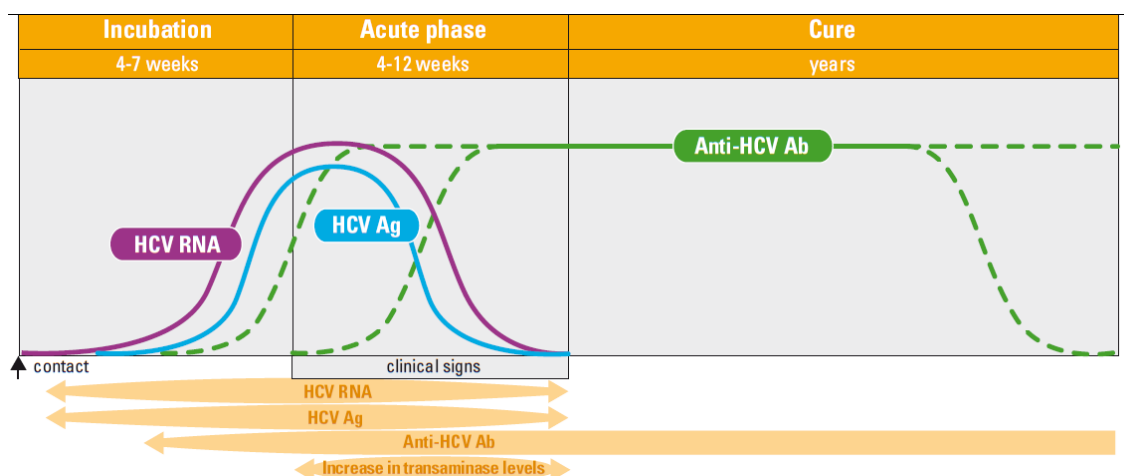


Figura 5 - Perfil serológico dos marcadores de infeção a HCV. Retirado de [18]

De acordo com as diretrizes da NACB e da AASLD, resultados de *screening* positivos deverão ser confirmados em ensaios adicionais de modo a despistar falsos positivos. São empregues técnicas de imunoensaios recombinantes, como o *Western blot*, com proteínas virais de natureza recombinante e péptidos sintéticos, fixadas em bandas individualizadas numa membrana, que permitem a caracterização de anticorpos direcionados para diferentes regiões do vírus e o acompanhamento da cinética da evolução dos anticorpos da classe IgG. [4, 5, 13, 14, 18]

DETEÇÃO DIRETA DE ÁCIDO NUCLEICO – DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL

O diagnóstico de uma infeção ativa a HCV depende da deteção do ácido nucleico viral (RNA). Este pode detetar-se no soro 1-2 semanas após a infeção aguda, assim como a elevação das transaminases. Os métodos de quantificação do genoma viral incluem metodologias de PCR de transcriptase reversa, cujos limites de deteção variam entre laboratórios de acordo com o método empregue. [13, 14, 15, 18]

3.2.4 – Hepatite D – Vírus da Hepatite D (HDV)

DETEÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS – SEROLOGIA

No laboratório clínico realiza-se a pesquisa serológica do antígeno delta e anticorpos Anti-delta - IgM para infeções agudas ou crónicas ativas e IgG para as infeções crónicas. [3, 13, 14]

DETEÇÃO DIRETA DE ÁCIDO NUCLEICO – DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL

Para determinar a actividade do vírus e monitorizar a resposta à terapêutica (se instituída), quantifica-se o genoma viral (RNA) por metodologias de PCR de transcriptase reversa. [13, 14, 15]

3.2.5 – Hepatite E – Vírus da Hepatite E (HEV)

✚ DETEÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS – SEROLOGIA

No laboratório clínico existem métodos de imunoensaio para a deteção de anticorpos Anti-HEV, que segundo as recomendações das entidades reguladoras, deverão detetar anticorpos IgM (infecção recente a HEV) e IgG (Exposição prévia ao HEV), contra antigénios contendo sequencias expressas pelas OFRs (*Open Reading Frames*) do vírus, para assegurar uma especificidade clínica adequada. [4, 13, 14, 15]

✚ DETEÇÃO DIRETA DE ÁCIDO NUCLEICO – DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL

A pesquisa de RNA viral é efetuada por técnicas de Biologia Molecular nas fezes. [14, 15]

3.2.6 – Hepatite F e Hepatite G – Vírus da Hepatite F (HFV) e Vírus da Hepatite G (HGV)

O HFV é um vírus a DNA, transmitido experimentalmente a macacos *Rhesus sp.* em laboratório, através de extratos de fezes de macacos infetados. Não há relatos de casos em humanos, pelo que no laboratório clínico não existem técnicas difundidas para a sua pesquisa. [13, 14, 15]

O HGV é um vírus a RNA, mutante do HVC, que pode ser detetado por técnicas de PCR. O seu diagnóstico por serologia ainda não é viável. O seu impacto epidemiológico é diminuto pelo que estas técnicas estão basicamente concentrada em centros de investigação. [13, 14, 15]

3.2.7 – Hepatite a Vírus Hepatotrópicos Inespecíficos – Citomegalovírus (CMV) e Vírus Epstein-Barr (EBV)

Os herpes vírus, particularmente o CMV e o EBV podem causar hepatite como principal manifestação clínica, apesar de geralmente esta ser assintomática. O laboratório clínico disponibiliza metodologias serológicas para a deteção de anticorpos

específicos e de Biologia Molecular (PCR) para a detecção direta do ácido nucleico viral. [3, 15, 19, 20]

DETEÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS – SEROLOGIA

➤ CMV

- Anticorpos **Anti-CMV** do tipo **IgM** e do tipo **IgG**.

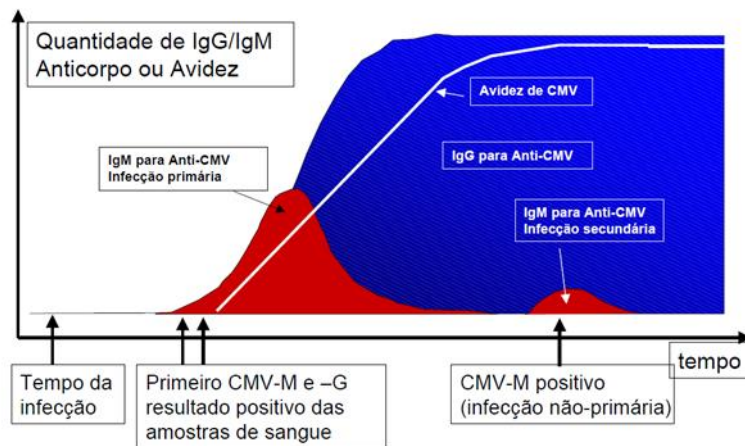


Figura 6 - Resumo esquemático da infecção pelo CMV. Retirado de [19]

➤ EBV

- Anticorpos **Anti-VCA** do tipo **IgG** e **IgM** – contra os antígenos da cápside viral.
- Anticorpos **Anti-EBNA1** do tipo **IgG** – contra os antígenos nucleares.
- Anticorpos **Anti-EA** do tipo **IgG** – contra os antígenos precoces localizados difusamente no citoplasma das células infetadas (**EA-D**).

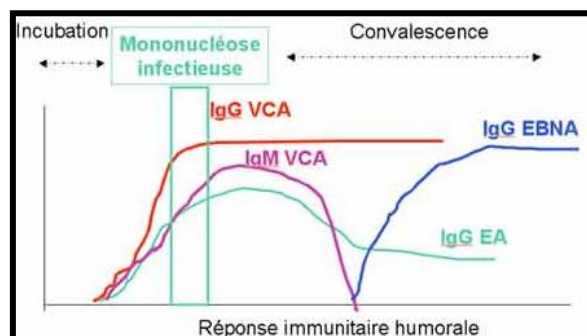


Figura 7 - Resposta imunológica típica à infecção por EBV. Retirado de [20]

3.3 - Autoimunidade

Na procura de um perfil imunológico que corrobore um diagnóstico de Hepatite Autoimune (HAI), são pesquisados e titulados os seguintes anticorpos (ditos convencionais ou de 1ª linha): [21, 22, 23, 24, 25]

- **Autoanticorpos Anti Nucleares (ANA)** - grupo heterogéneo de autoanticorpos, determinados por Imunofluorescência Indireta (IFI) em células Hep2, que reagem contra antígenos nucleares, nucleolares ou perinucleares, que integram os componentes celulares como ácidos nucleicos, histonas, cromatina e proteínas nucleares e ribonucleares. Laboratorialmente são os autoanticorpos mais prescritos na prática médica, sobretudo na ajuda a diagnósticos de patologias inflamatórias crônicas dos tecidos conectivos (os ANA são os verdadeiros marcadores das doenças conectivas) e da HAI;
- **Autoanticorpos Anti Músculo Liso (ASMA)** - têm diferentes antígenos alvo encontrados nos filamentos do músculo liso e estriado: actina, vimentina, tubulina, desmina, tropomiosina, troponina e citoqueratina. Os anti-actina são os autoanticorpos clinicamente mais relevantes para a patologia hepática autoimune.
- **Autoanticorpos Anti Mitocôndria (AMA)** - dos vários autoantígenos mitocondriais, os autoanticorpos anti-M2 são os detectados com maior frequência e são os de maior relevância clínica. Reagem com uma variedade de subunidades do complexo piruvato desidrogenase, localizado na membrana mitocondrial interna. PDC-E2 é a subunidade dominante e os autoanticorpos que a ela se ligam são bastante indicativos de patologia hepática autoimune;
- **Autoanticorpos Anti Microssomais Fígado/Rim (LKM)** - Os antígenos alvo dos autoanticorpos microssomais fígado/rim são citocromos P450 (CYP450), uma família grande e diversificada de enzimas caracterizadas pela presença de um pigmento heme. Anticorpos Anti-LKM1 e os Anti-LKM3 (raramente detetados) estão associados à clínica na HAI;
- **Autoanticorpos Anti Citoplasma dos Neutrófilos (ANCA)** – são autoanticorpos que possuem diferentes antígenos alvo nos grânulos azurófilos dos granulócitos (neutrófilos e monócitos) humanos, produzindo padrões de fluorescência distintos no citoplasma dos neutrófilos fixados em etanol, formol e metanol (tabela 2). Os x-ANCA são úteis para o diagnóstico da HAI seronegativa e para o diagnóstico diferencial de Hepatite Viral. A sua presença está correlacionada com evolução mais severa e maior tendência para recorrência da doença.

Tabela 2 – Antígenos alvo e padrão de fluorescência dos ANCA. Adaptado de [21, 22]

Fixador → Padrão (Antígeno Alvo) ↓	Etanol	Formol	Metanol
p-ANCA (Mieloperoxidase)	Fluorescência Periférica	Fluorescência Citoplasmática	Negativo
c-ANCA (Proteinase 3)	Fluorescência Citoplasmática	Fluorescência Citoplasmática	Fluorescência Citoplasmática
x-ANCA (Outros antígenos)	Fluorescência Periférica	Negativo	Fluorescência Periférica

Outros autoanticorpos, frente a componentes hepáticos, são pesquisados quando os convencionais não se encontram presentes e existe uma forte suspeita de HAI: [21, 22, 23, 24, 25]

- **Autoanticorpos Anti Antígeno Hepático Solúvel e Autoanticorpos Anti Fígado e Pâncreas (Anti-SLA/LP)** – são anticorpos dirigidos contra a molécula UGA-supressor-tRNA, uma proteína citoplasmática envolvida na regulação da biossíntese proteica. São altamente específicos da HAI uma vez que não estão presentes na Hepatite Viral. Os Anti-SLA/LP são detetados por técnicas de *Western-blot*.
- **Autoanticorpos Anti Citosol Hepático (Anti-LC1)** – O antígeno alvo destes autoanticorpos é uma enzima intracelular, a formiminotransferase ciclodesaminase, envolvida no metabolismo dos folatos, presente unicamente no citosol dos hepatócitos. Na maioria das ocorrências estão associados a anticorpos Anti-LKM1. Os Anti-LC1 são normalmente determinados por IFI sobre tecido de rato, apresentando fluorescência na zona citoplasmática dos hepatócitos periportais, mas também podem ser detetados por técnicas de *Western-blot*.
- **Autoanticorpos Anti Receptor Hepático da Asialoglicoproteína (Anti-ASGP-R), Autoanticorpos Anti Membrana Hepática (Anti-LMA) e Autoanticorpos Anti Proteína Hepática Específica (Anti-LSP)** – são anticorpos cujo alvo antígeno são componentes da membrana celular do hepatócito.
 - Os Anti-ASGP-R são dirigidos contra os recetores hepáticos de membrana dos hepatócitos periportais e são considerados marcadores de HAI. Correlacionam-se com a atividade histológica e com a resposta ao tratamento com imunossuppressores. Contudo são pouco específicos,

estando presentes também na HVB e na Hepatite Alcoólica. São habitualmente determinados por técnicas de ELISA.

- Os Anti-LMA dirigem-se frente ao CYP450 1A2. Conjuntamente com os Anti-LSP estão associados à HAI com níveis baixos da fração do complemento C4 e aos antígenos de histocompatibilidade HLA-B8 e DRW3. Também se encontram presentes numa elevada percentagem de indivíduos com Hepatite Alcoólica. São detetados por imunofluorescência sobre tecido hepático.
- Os Anti-LSP são determinados por técnicas de ELISA

4. O LABORATÓRIO CLÍNICO: MARCADORES DE LESÃO HEPÁTICA

4.1 – Screening da População Saudável

Em análises de rotina na população saudável, são requisitados pelo clínico ao laboratório, um conjunto de marcadores hepáticos que possam refletir qualquer dano hepático com origem nas diferentes etiologias, previamente descritas. Assim, um painel hepático típico de testes para a avaliação inicial inclui, normalmente, a determinação: da AST, ALT, γ GT, BT e BD. Alguns clínicos complementam a informação obtida incluindo o doseamento das Proteínas Totais, da Albumina e a medição do TP. [4, 5, 7, 26]

4.2 – Avaliação do Paciente com Suspeita de Lesão Hepática

Após anamnese e exame físico do paciente com queixas clínicas suspeitas de lesão hepática, ao laboratório pode chegar um pedido direcionado, cujo grupo de análises pode exprimir um padrão típico de doença hepática. [26, 27, 28]

4.2.1 - Avaliação da Lesão Hepatocelular

É efetuada recorrendo laboratorialmente ao doseamento da actividade das transaminases (ALT e AST), da γ GT e da FA. Geralmente uma lesão hepatocelular

traduz-se analiticamente por um aumento desproporcional das transaminases em relação à FA e γ GT, resultado da citólise dos hepatócitos. [6, 7, 8, 9, 10, 11, 26, 27, 28]

4.2.2 - Avaliação do Fluxo Biliar e Lesão das Vias Biliares

O doseamento da γ GT, da FA e da BT é essencial para identificar um padrão colestático. O incremento acentuado destes analitos face à normalidade ou ligeiro aumento das transaminases é sugestivo de uma obstrução intra ou extra hepática (de acordo com o valor sérico da BD), geralmente designada de colestase. As enzimas mencionadas, presentes nos canálculos biliares, tendem a refluir para o plasma quando o fluxo biliar está comprometido. [6, 7, 8, 9, 10, 11, 26, 27, 28]

4.2.3 - Avaliação da Função de Síntese do Fígado

Quando a suspeita recai sobre a capacidade funcional do fígado, o laboratório pode colmatá-la mediante os resultados da avaliação da coagulação (medição do TP) e da síntese proteica (doseamento das Proteínas Totais e Albumina). [6, 7, 8, 9, 10, 11, 26, 27, 28]

Tabela 3 - Resumo das provas hepáticas e suas alterações, exequíveis numa primeira abordagem a um paciente com suspeita de lesão hepática. Adaptada de [29].

Provas Hepáticas		Alterações das Provas Hepáticas
Marcadores de Lesão Hepática	ALT↑↑↑	Padrão Hepatocelular
	AST↑↑↑	
	γ GT↑	
	FA↑	
Marcadores de Obstrução Biliar	ALT N,↑	Padrão Colestático
	ASTN, ↑	
	γ GT↑↑	
	FA↑↑	
	Bilirrubina total↑↑↑	
Marcadores de Função Hepática	TP↑↑	Padrão de Alteração da Função de Síntese Hepática
	Albumina↓↓	
	Bilirrubina total↑↑↑	

5. O LABORATÓRIO CLÍNICO: LESÃO HEPÁTICA AGUDA vs LESÃO HEPÁTICA CRÓNICA

5.1 – Lesão Hepática Aguda

5.1.1 – Diagnóstico

A lesão hepática aguda pode reconhecer-se pela presença da icterícia acompanhada do incremento da actividade das transaminases AST e/ou ALT. As recomendações determinam que o valor sérico da aminotransferase de maior especificidade hepática (ALT) deve ser maior que dez vezes o seu Limite Superior de Referência (LSR) e o da ALP menor que três vezes o seu LSR, para que o diagnóstico de lesão hepática aguda seja credível. [4, 5, 6, 7, 8, 26, 27, 28]

5.2 – Lesão Hepática Crónica

5.2.1 – Diagnóstico

Anatomopatologicamente, a lesão hepática crónica define-se pelo estabelecimento de necrose hepática e inflamação, acompanhadas de fibrose, comprovadas pela biópsia hepática e laboratorialmente, pela persistência da atividade elevada da enzima ALT por períodos superiores a seis meses após um episódio de hepatite aguda ou por um aumento inexplicável da mesma, em mais do que uma ocasião, num espaço de tempo de seis meses (que pode ser mais curto se em causa estiverem pacientes com elevado potencial de risco para hepatite viral crónica, com predisposição genética para lesão hepática, com patologia autoimune ou com sinais e sintomas clínicos de dano hepático). A lesão hepática crónica é uma condição relativamente frequente, que aparentemente cursa com poucos sintomas mas possui um risco significativo de morbilidade e mortalidade a longo prazo, podendo progredir para cirrose e predispor para o carcinoma hepático. A sua maior causa são as infeções por vírus hepatotrópicos específicos, nomeadamente HBV e HCV (maioritariamente). [4, 5, 6, 7, 8, 9, 26]

5.2.2 – *Screening*

O *screening* de lesão hepática crónica é recomendado em pacientes assintomáticos conotados de risco elevado: história familiar de patologias hepáticas genéticas e predisposição para infeção viral crónica (consumidores de drogas

endovenosas, hemodialisados, transfundidos ou transplantados anteriores à implementação do rastreio para HCV(1992), nascidos de mães portadoras crônicas de HBV ou HCV, com múltiplos parceiros sexuais e profissionais de risco não vacinados para a Hepatite B). A determinação da atividade enzimática da ALT é a prova com melhor relação custo-eficácia, mas se existir história de abuso de álcool, a determinação concomitante da AST é essencial. Em indivíduos suspeitos de Hepatite Viral, serologia específica (Anti-HCV, HBsAg) e determinação da carga viral perante Anti-HCV positivo, devem também ser adicionadas. [4, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 26]

6. O LABORATÓRIO CLÍNICO: DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LESÃO HEPÁTICA

Na avaliação etiológica da patologia hepática e consequente diagnóstico diferencial, a história clínica e o exame físico são cruciais para a caracterização de um perfil inicial e identificação de possíveis factores de risco para doença hepática, como sejam o consumo abusivo de álcool, drogas ou determinados medicamentos (Hepatites Tóxicas), contactos sexuais de risco ou toxicodependência (Hepatites Virais), transfusões, viagens (Hepatites Virais), história familiar de doença hepática (doenças hepáticas hereditárias), diabetes, dislipidemia, obesidade e consumo exagerado de gorduras (Esteatohepatites Não Alcoólicas). [1, 2, 11]

Quando temos um padrão laboratorial inicial conducente com lesão hepatocelular devemos considerar as Hepatites Virais, Hepatites Tóxicas, Hepatites Autoimunes, Hepatite Alcoólica ou doença hepática crónica (em geral cirrose) de qualquer origem. Se a primeira abordagem laboratorial identifica um padrão colestativo, estamos perante uma lesão direta dos hepatócitos e dos colangiócitos que ficam impossibilitados de secretar bÍlis (colestase intra-hepática) ou perante uma obstrução a qualquer nível da árvore biliar que impossibilita que a bÍlis secretada atinja o intestino (colestase extra-hepática). Assim a etapa subsequente passa pela imagiologia e o laboratório clínico nada mais tem acrescentar que auxilie o diagnóstico final. [1, 2, 6, 7, 11, 27, 28]

6.1 - Hepatite Viral

As hepatites de etiologia viral são a principal causa de lesão hepática aguda. O quadro laboratorial das provas hepáticas gerais é na maioria dos casos o seguinte: [6, 7, 11, 13, 14, 29]

- **Aminotransferases** – na Hepatite Viral Aguda, os valores elevam-se habitualmente até cerca de 100 vezes acima do normal, embora alguns pacientes apresentem níveis bem mais baixos sobretudo na Hepatite C e nas Hepatites Virais Agudas a vírus hepatotrópicos não específicos. Nas formas crónicas na maioria das situações não ultrapassam 15 vezes os valores normais de referência;

- **Bilirrubinas** – elevam-se após o aumento das transaminases e, nas formas agudas, podem alcançar valores 20 a 25 vezes acima do normal, sobretudo na Hepatite B. O aumento acontece para as duas frações, conjugada e não conjugada, com predomínio da primeira. Na urina pode ser detetada precocemente mesmo antes do surgimento da icterícia;

- **Proteínas séricas** – normalmente não se alteram nas formas agudas, excepto quando o grau de severidade é elevado (hepatites agudas severas e fulminantes);

- **ALP** – pouco se altera nas Hepatites Virais, excepto nas formas colestáticas, quando se apresenta em níveis elevados. Devido à presença normalmente aumentada da fração osteoblástica desta enzima durante o período de crescimento, esse aspeto deve ser considerado no acompanhamento a crianças e adolescentes.

- **γ GT** – ocorre elevação discreta nas Hepatites Virais, excepto nas formas colestáticas.

- **PT** – nas formas agudas benignas sofre pouca ou nenhuma alteração, excepto nos quadros de hepatite severa ou fulminante;

- **α -fetoproteína** – proteína (globulina alfa) sintetizada no fígado que possui valor clínico apenas nas Hepatites Virais crónicas, sendo um indicador de mau prognóstico quando elevada;

- **Hemograma** – a leucopenia é habitual nas formas agudas, no entanto a maioria cursam sem alteração no leucograma. A presença de leucocitose sugere intensa necrose hepatocelular ou a associação com outras patologias. Não ocorrem

alterações significativas na série vermelha. A trombocitopenia pode ocorrer e normalmente é mais marcada na infecção crónica pelo HCV.

ALGORITMO PARA INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DA HEPATITE VIRAL AGUDA

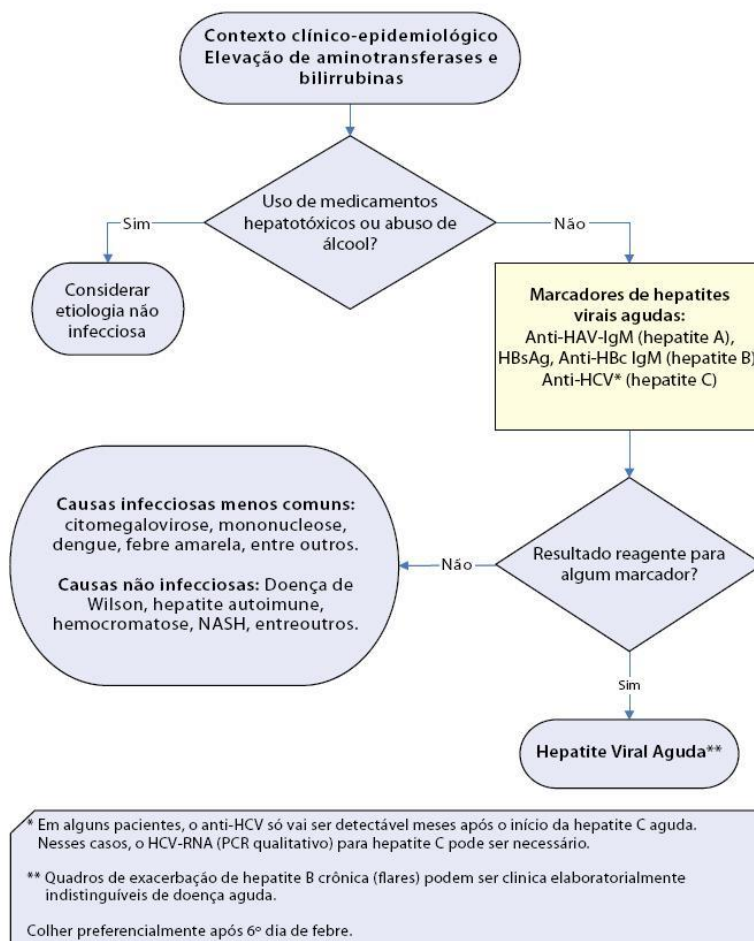



Figura 8 - Algoritmo para o diagnóstico diferencial da Hepatite Viral Aguda. Retirado de [30]

Para identificar o agente causal importa considerar o perfil clínico inicial, o perfil epidemiológico da região, viagens recentes a países endémicos e a sazonalidade. Estes, conjuntamente com a grandeza da elevação das aminotransferases orientam para a lista de enfermidades que devem ser consideradas no diagnóstico diferencial (vírus hepatotrópicos específicos *versus* não específicos). [11, 13, 14, 29]

OS VÍRUS E SUAS CARACTERÍSTICAS



	A	B	C	D	E
FAMÍLIA	Picornavírus	Hepadnavírus	Flavivírus	Não definida	Calicivírus
GENÉTICA	RNA	DNA	RNA	RNA	RNA
ISOLAMENTO	1973	1965	1988	1977	Não identificado
INCUBAÇÃO	20 a 40 dias	30 a 180 dias	15 a 150 dias	15 a 45 dias	30 a 180 dias
CRÔNICA	X	✓	✓	✓	X
CONTÁGIO	comida ou água contaminada	sangue e fluidos corporais	sangue e fluidos corporais	sangue e fluidos corporais	comida ou água contaminada
VACINA	✓	✓	X	✓	X

FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE / ENCICLOPÉDIA BRITÂNICA

Figura 9 - Características dos principais vírus hepatotrópicos específicos. Retirado de [31]

A serologia viral é o contributo do laboratório clínico para um diagnóstico final credível. [29, 31]

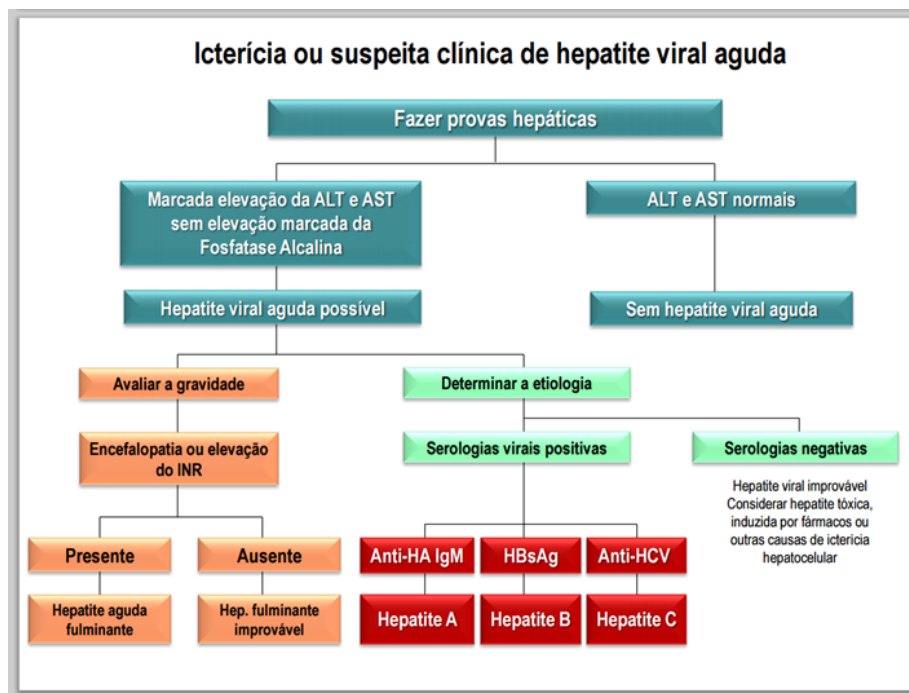


Figura 10 - Marcha de diagnóstico diferencial de hepatite viral aguda. Retirado de [29]

Para a caracterização completa da hepatopatia viral diagnosticada, sobretudo naquelas propensas à cronicidade, provas adicionais serológicas e de determinação da carga viral devem ser realizadas. Estas permitem ao clínico, na maioria dos casos, distinguir uma hepatite viral aguda de uma crónica, elaborar probabilidades da presença

de um episódio de agudização de uma infecção viral crónica e para os vírus defectivos, detetar co-infecções. [6, 7, 11, 13, 14, 31]

6.1.1 – Hepatite B

A Hepatite B evolui frequentemente para a cronicidade. O HBV causa inflamação crónica nos hepatócitos sendo a resposta imunitária do hospedeiro aos antígenos virais a principal razão das lesões hepáticas, aumentando o turn-over celular, levando a mutações no genoma e em última instancia a hepatocarcinoma. O HBV é um vírus DNA com várias proteínas que podem induzir resposta antigénica. O perfil serológico resultante da ação imunológica do hospedeiro contra os antígenos virais localizados no envelope, na nucleocápside e no core, permite identificar e caracterizar uma infecção por HBV (infecção aguda ou crónica). [11, 13, 14, 15, 31, 32]



Figura 11 - Perfil serológico numa infecção por HBV: à esquerda infecção aguda, à direita infecção crónica. Retirado de [15]

Laboratorialmente, numa primeira abordagem, devem ser pesquisados: o HBsAg, o Anti-HBs e o Anti-HBc. Os resultados obtidos para esta serologia de *screening* deverão ser interpretados de modo a incluir o paciente num dos diferentes perfis serológicos que a infecção pode apresentar. Informação clínica complementar é sempre uma mais valia, sendo, por exemplo, importante saber se o paciente está imunizado para o vírus, e conhecer perfis serológicos passados para o mesmo (a serologia não é suficiente para discriminar entre uma infecção aguda e uma reactivação em pacientes com infecção crónica). Se necessário, serologia complementar deverá ser realizada, nomeadamente Anti-HBc IgM se se suspeitar de uma infecção aguda a HBV e HBeAg e Anti-HBe para um estudo mais complexo da evolução da patologia

(seroconversão, cronicidade, convalescença) e monitorização da eficácia do tratamento antiviral quando em conjunto com doseamento quantitativo do DNA viral. O DNA viral circulante pode ser detetado por diversos métodos sensíveis de amplificação por PCR, com limites de deteção distintos, não existindo, como seria desejável, uma standardização entre laboratórios. [13, 14, 15, 31, 33]

Tabela 4 - Marcadores serológicos da Hepatite B (HBV) associados aos diferentes perfis de infeção. Adaptada de [33].

Interpretação	AgHBs	Anti-HBc Total	Anti-HBs	AgHBe	Anti-HBe	Anti-HBc IgM
• Fase Incubação Aguda Precoce	+	-	-	-	-	-
• Fase Aguda Precoce	+	-	-	+	-	-
• Fase Aguda	+	+	-	+	-	+
• Início da Seroconversão	+	+	-	-	+	+
• Portador Crónico com seroconversão Tardia	+	+	-	-	+	-
• Portador Crónico sem Seroconversão	+	+	-	+	-	-
• Fase da Convalescença	-	+	-	-	+	+
• Início da Recuperação (sem Anti-HBs)	-	+	-	-	+	-
• Possível: - Reação Cruzada - Período Janela - Persistência do Anti-HBc com desaparecimento do Anti-HBs em Infeção Anterior	-	+	-	-	-	-
• Negativo para HBV	-	-	-	-	-	-
• Infeção Passada a HBV	-	+/-	+	-	-	-
• Imunização / Vacinação	-	-	+	-	-	-

6.1.2 – Hepatite C

O HCV é um vírus no qual a sua fase aguda de infeção é normalmente assintomática e que possui uma elevada taxa de progressão para a cronicidade e para patologias hepáticas mais severas (cirrose e hepatocarcinoma). É um vírus largamente disseminado (não existe vacina e só a partir do ano de 1992 surgiram os testes de

screening para a presença de anticorpos em dádivas sanguíneas) e a maioria que está ou é identificada com esta infecção, foi ou é diagnosticada já numa fase de cronicidade. Uma pequena percentagem de doentes com Hepatite C aguda recupera espontaneamente, produzindo anticorpos Anti-HCV que embora não protejam futuras infeções, permanecem em circulação na maior parte dos casos para o resto da vida. Assim alguns indivíduos com anticorpos positivos (Anti-HCV) não são portadores do vírus. O vírus produz virémias intermitentes não existindo correlação estreita entre os

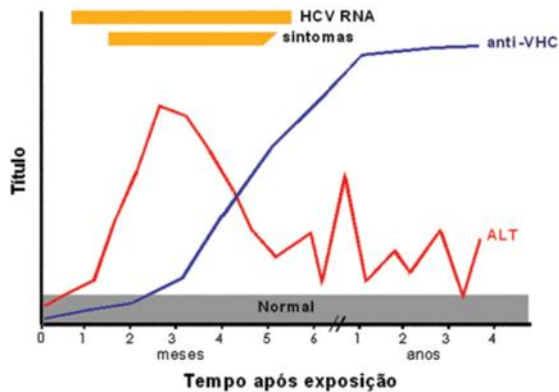


Figura 12 - Variação da transaminase alanina aminotransferase (ALT) em relação aos outros marcadores de infeção a HCV. Retirado de [34]

valores das análises do fígado (transaminases) e a doença hepática subjacente. Quando há elevação persistente das transaminases é preciso avaliar risco clínico de evolução da doença. Assim, atualmente não existe diagnóstico definitivo de Hepatite C aguda, uma vez que, os anticorpos Anti-HCV e o HCV-RNA podem estar presentes em ambos os tipos de infeção (aguda e crónica). Ainda relevante é o facto de os Anti-HCV só se detetarem em cerca de 57% dos casos de hepatite

aguda no período em que se observa o incremento da actividade enzimática das aminotransferases, e o RNA viral apenas em 15% dos mesmos e de um modo intermitente. Assim, falamos apenas de padrões laboratoriais que podem induzir a suspeita de uma infeção aguda a HCV: Anti-HCV negativo e RNA-HCV positivo ou Anti-HCV que evolui num curto espaço de tempo (1-3meses) de negativo a positivo e marcadores para HAV e HBV negativos. [13, 14, 15, 29, 31, 33, 34, 35]

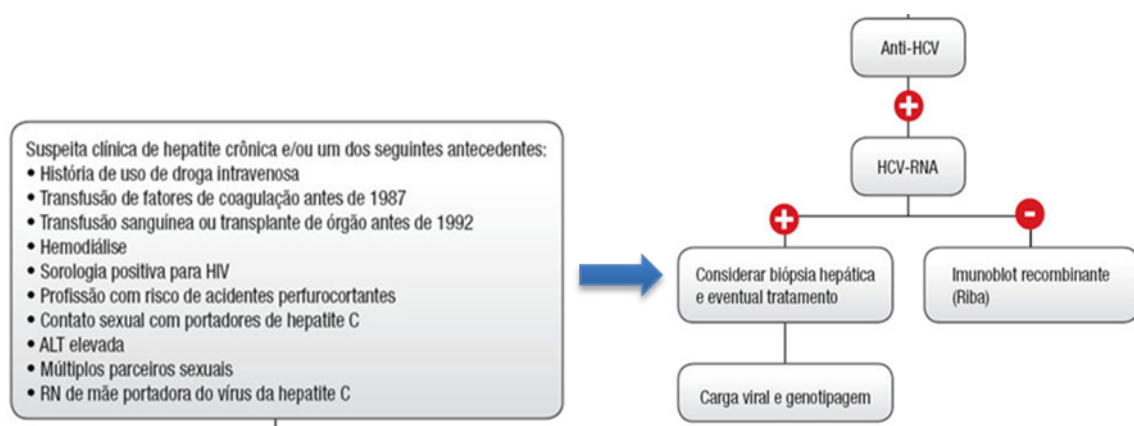


Figura 13 - Caracterização de uma infeção por HCV - Hepatite C. Adaptada de [35].

6.1.3 – Hepatite D

Sendo o HDV um vírus defetivo (incompleto) que não consegue, por si só, reproduzir o seu próprio antígeno de superfície e completar o ciclo replicativo, a pesquisa de anticorpos contra o vírus da Hepatite D para a deteção da infeção pelo vírus delta, é fundamentalmente limitada a pacientes com HBsAg positivo, particularmente se cursam com hepatite aguda severa, se portadores de factores de alto risco (toxicodependentes ou hemofílicos) ou se apresentam um padrão clínico atípico da doença. Se um paciente com Hepatite B crónica se sobreinfeta com Hepatite D, pode surgir um quadro clínico de lesão hepática aguda severa e falha hepática. Assim, existem duas possibilidades para a ocorrência da infeção pelo HDV: [13, 14, 15, 29, 32, 36]

- Superinfeção – infeção pelo vírus delta num portador crónico de HBV;
- Co-infeção – infeção simultânea pelo HBV e Delta em indivíduos susceptíveis.

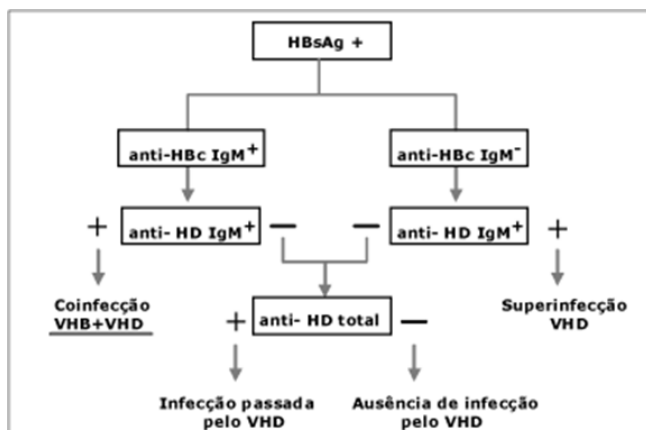


Figura 14 - Fluxograma de identificação de uma infeção aguda por HDV. (+) - Positivo; (-) - negativo. Retirado de [36]

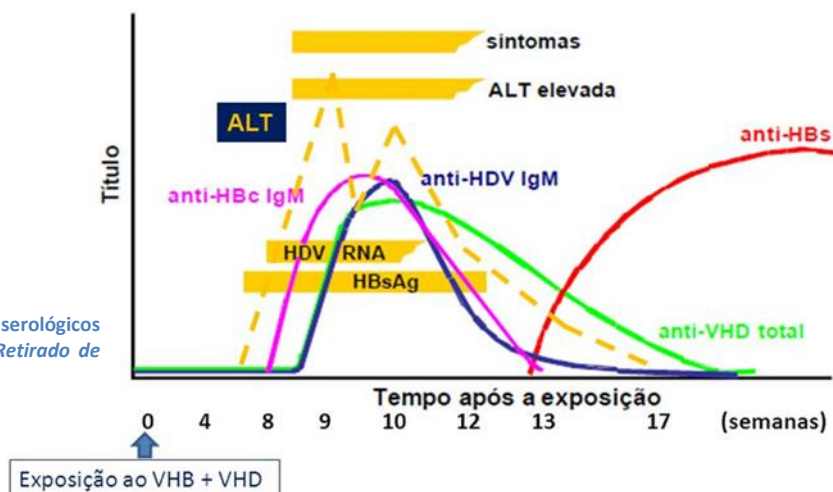


Figura 15 - Eventos clínicos e serológicos na Hepatite D (co-infeção). Retirado de [15]

O marcador serológico mais utilizado é o Anti-HDV Total (IgM+IgG). Os resultados laboratoriais devem ser interpretados em conjunto com os marcadores serológicos da Hepatite B do seguinte modo (tabela 5). [13, 14, 15, 29, 32, 36]

Tabela 5 - Interpretação serológica da Hepatite D. Adaptado de [14]

Formas	HBsAg	Anti-HBc	Anti-HBc IgM	Anti-HDV Total	Anti-Hbs
Co-infecção	(+)	(+)	(+)	(+)*	(-)
Superinfecção	(+)	(+)	(-)	(+)*	(-)
Cura	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)

Legenda: (+) – Positivo; (-) – Negativo; * - Anti-HDV (IgM+IgG) em altos títulos; ** - AntiHDV(IgG) em baixos títulos.

6.2 - Lesão Hepática Aguda de Etiologia Não Viral

6.2.1 - Esteatose Hepática não Alcoólica

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) ou *Non Alcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD) é uma entidade clínica patológica na qual ocorre acumulação excessiva de lípidos no fígado (sobretudo triglicéridos, fosfolípidos e ésteres de colesterol). A sua grande importância reside no forte potencial evolutivo para formas inflamatórias fibrosantes (Esteato-Hepatite Não Alcoólica – EHNA ou *Non Alcoholic Steato Hepatitis* (NASH) que incorrem em cirrose hepática e até mesmo em carcinoma hepatocelular. A DHGNA é considerada uma manifestação de doença metabólica de carácter benigno (quando isoladamente), cuja prevalência se eleva substancialmente com o aumento do índice de massa corporal (IMC) e a presença de *Diabetes Mellitus*. São ainda considerados fatores de risco a dislipidémia, produtos químicos, medicamentos e anabolizantes. [37, 38, 39, 40, 41, 42]

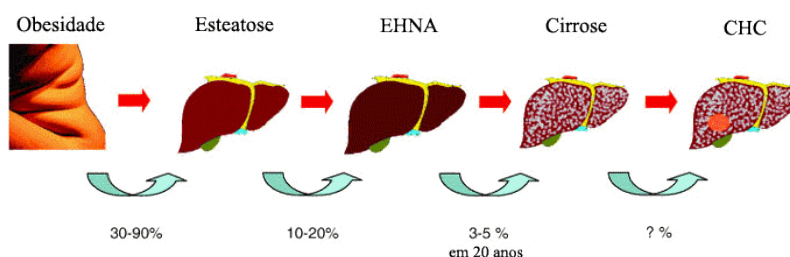


Figura 16 - História natural da DHGNA. Retirado de [42]

A DHGNA é uma doença poligénica e multifatorial, cuja fisiopatogénese é bastante complexa, envolvendo múltiplos fatores ambientais e genéticos. A maioria dos autores acredita na teoria dos múltiplos *hits*, destacando-se a resistência à insulina como condição inicial para a acumulação de ácidos gordos no hepatócito (primeiro *hit*), seguida de uma sequência de eventos como o aumento do *stress* oxidativo, do *stress* do retículo endoplasmático, disfunção mitocondrial e endotoxémia crónica (múltiplos *hits*). Este fígado esteatótico torna-se vulnerável aos múltiplos *hits*, instalando-se a lesão hepatocelular, despoletando a inflamação, fibrose e com maior severidade a cirrose. [37, 38, 39, 40, 41, 42]

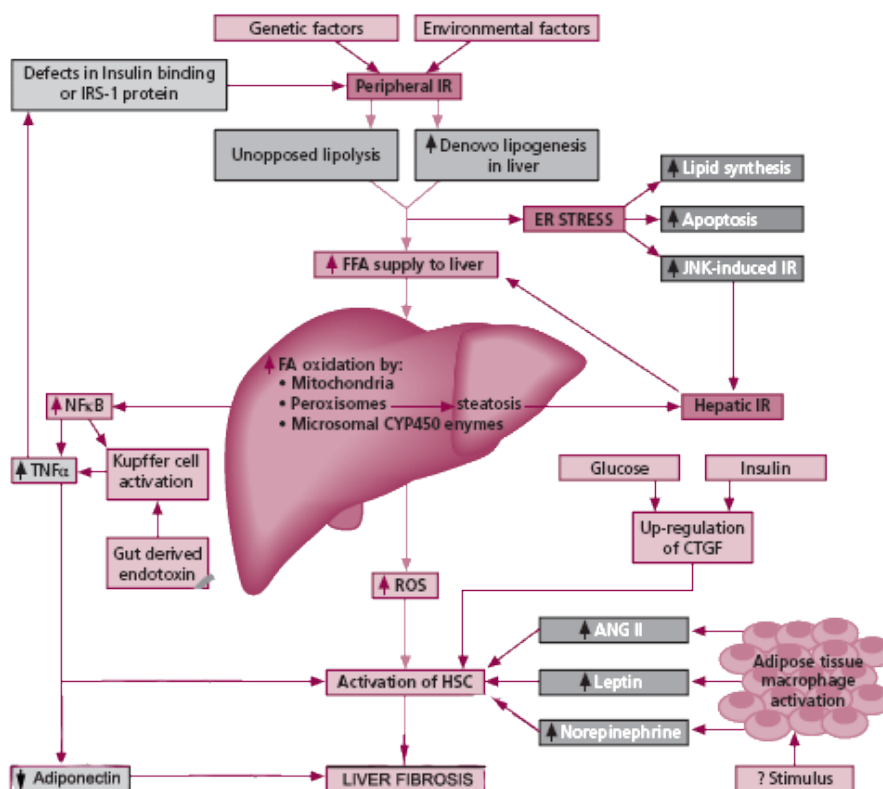


Figura 17 - Um dos modelos explicativos, que reúne maior consenso, da fisiopatologia da EHNA. Retirado de [42]

Na DHGNA a maioria dos pacientes não apresentam sintomas. Quando apresentam (formas mais severas e especialmente crianças), os sintomas mais comuns são dor no hipocôndrio direito, desconforto abdominal, fadiga e indisposição. A biópsia hepática é o *Gold Standard* na identificação das diferentes formas de apresentação da doença, contudo a elevada prevalência de DHGNA torna impraticável a realização de biópsias em todos os pacientes. Métodos não invasivos, nomeadamente de imagem e de diagnóstico laboratorial, podem auxiliar e identificar a esteatose bem como os indivíduos com maior risco de apresentar as formas degenerativas da doença. A identificação das formas evolutivas da DHGNA é melhor realizada através de testes

laboratoriais, que podem ser classificados como diretos (relacionados à síntese e degradação da matriz extracelular como colagênios, laminina, ácido hialurônico, metaloproteinases, citoqueratina CK-18) e indiretos (alterações bioquímicas como AST, ALT, γ GT, plaquetas, albumina, presença de diabetes) e os mistos, em que há combinação dos dois tipos. Na identificação da Esteato-Hepatite, a determinação sérica da CK-18 (que avalia o grau de apoptose hepática), isoladamente ou associada a outros parâmetros, tem sido o teste com melhor sensibilidade para esse diagnóstico. Determinações que avaliam o *stress* oxidativo, como a tioredoxina e o doseamento de ferritina, também podem auxiliar nessa diferenciação. Para a identificação da presença de fibrose significativa, doseamentos do ácido hialurônico, laminina e inibidores da matriz das metaloproteinases (TIMP), associadas a marcadores indiretos, têm mostrado melhor sensibilidade e especificidade. Contudo, a maioria destes testes não se encontram disponíveis na prática laboratorial diária. Nos exames laboratoriais de rotina os achados são normalmente os seguintes: [6,7, 12, 37, 38, 39, 40, 41, 42]

- Elevação discreta a moderada das transaminases - elevações de até 5 vezes o LSR da AST e ALT. A relação AST/ALT é frequentemente menor que 1. Quando surge maior do que 1, é sugestivo de progressão da doença com formação de fibrose e evolução para cirrose;
- Os níveis de FA e γ GT aumentados em 2 a 3 vezes os respectivos LSR.
- Prova de tolerância oral à glucose (PTGO) com doseamento concomitante da insulina sérica alteradas, demonstrando uma resistência à insulina;
- Com a progressão e aumento da severidade da doença, diminuição da concentração sérica da Albumina e alteração da coagulação.

É ainda importante considerar o fato de não existir nenhum exame que permita a distinção entre a esteatose decorrente do uso de álcool da DHGNA, assim, o diagnóstico da DHGNA está dependente do histórico de uso de álcool por parte do paciente: não ingestão ou quantidade ingerida insuficiente para causar a esteatose; os exames deverão ser todos confirmados após três meses de abstinência de álcool para um diagnóstico credível. [37, 38, 39, 40, 41, 42]

6.2.2 - Hepatite Alcoólica

As múltiplas disfunções hepáticas com etiologia no uso prolongado e abusivo do álcool são coletivamente referidas como Doença Hepática Alcoólica (DHA). A DHA apresenta um largo espectro clínico, desde a esteatose até formas mais severas de

insuficiência hepática, incluindo a Hepatite Alcoólica (HA), a cirrose e o Carcinoma Hepatocelular (CHC). A HA é uma síndrome caracterizada pela inflamação do fígado e lesão dos hepatócitos. Existem diversos fatores que contribuem para esta inflamação: [43, 44, 45, 46, 47, 48]

- **Hepatotoxicidade do álcool** - nos hepatócitos, o etanol é primariamente metabolizado em acetaldeído pela desidrogenase alcoólica no citosol, pelo citocromo P450 nos microssomas e pela catalase nos peroxissomas. Este metabolismo gera espécies reativas de oxigénio e causa peroxidação lipídica, depleção de glutathiona mitocondrial e depleção de S-adenosilmetionina. Todos estes produtos sensibilizam os hepatócitos.
- **Apoptose do hepatócito**- a apoptose do hepatócito é uma característica patológica importante da DHA. A apoptose resulta de múltiplos mecanismos, incluindo a hepatotoxicidade mediada pelo etanol, indução do *stress* oxidativo, inibição de genes de sobrevivência (c-Met) e indução de moléculas de sinalização pró-apoptóticas – o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e o ligando Fas.
- **Ativação da imunidade inata** - o consumo de álcool causa um aumento da permeabilidade intestinal e translocação de lipopolissacáridos bacterianos (LPS) do intestino para o fígado.
- **Ativação da imunidade adaptativa** - os doentes com HA apresentam um aumento dos níveis circulantes de anticorpos contra adutos da peroxidação lipídica e das células T no fígado, indicando ativação do sistema imune adaptativo, que estará envolvido na patogénese da DHA, incluindo a HA.
- **Infiltração por neutrófilos** - a infiltração do parênquima hepático por neutrófilos é uma característica proeminente da HA. No fígado, a supra-regulação da IL-8, CXCL1 e IL-17 contribui para esta infiltração e sua intensidade.

A apresentação clínica desta entidade é variável. A HA ligeira cursa com sintomas inespecíficos (febre, anorexia, dor, distensão abdominal, náuseas, vômitos), discreta elevação das transaminases séricas e sem qualquer compromisso da função hepática. A HA severa é clinicamente caracterizada pelo início recente de icterícia e sinais clínicos e bioquímicos de disfunção hepática. Nestes casos, a HA pode conduzir a descompensação hepática como ascite, hemorragia varicosa, Síndrome Hepato-Renal (SHR), Encefalopatia Hepática e sépsis com consequente falência multiorgânica. Os resultados das provas laboratoriais amplamente solicitadas ao laboratório clínico, visando o diagnóstico diferencial da HA, são frequentemente os seguintes: [6, 7, 12, 43, 44, 45, 46, 47, 48]

- O ratio AST/ALT é aproximadamente 2:1. O aumento da AST sobre a ALT relaciona-se com uma deficiência de piridoxina (vitamina B6) e dano mitocondrial induzidos pelo álcool, mas pode também apenas refletir a presença de cirrose. Nos casos severos, a AST sérica está tipicamente elevada (2 a 6 vezes o LSR). Contudo, níveis de ALT acima de 200 IU/L ou de AST acima de 500 IU/L são pouco comuns na HA e sugerem uma etiologia diferente.
- A hiperbilirrubinemia é um aspeto central da HA comparativamente a outras causas de descompensação de DHA e está correlacionada com o grau de envolvimento hepático, sendo incluída nos *scores* para estratificação da severidade da doença. Contudo, a hiperbilirrubinemia pode ser de difícil interpretação pois está muitas vezes associada a sépsis e à síndrome de resposta inflamatória sistémica.
- Grau de coagulopatia variável com um aumento do INR e um TP prolongado, indiciando disfunção hepática e/ou baixa contagem de plaquetas devido a esplenomegalia provocada pela hipertensão portal.
- Aumento de leucócitos causado pela hepatite que geralmente acompanha uma infiltração neutrofílica do tecido hepático.
- Quadro típico de malnutrição severa que se reflete na atrofia muscular, nos níveis de albumina sérica baixos, nos corpos cetónicos urinários (tradutores de um balanço nitrogenado negativo) e nos défices de vitamina B, C, E, retinóides e zinco.

O diagnóstico de HA, para além de exigir um alto nível de suspeição, é estabelecido a partir da história clínica, exame físico, imagiologia, testes laboratoriais e por vezes biópsia hepática. Mesmo assim, o diagnóstico clínico falha em cerca de 10 a 15% destes doentes. Dado que não existe nenhum teste específico que confirme o diagnóstico de HA, a sua presença deve ser considerada em todos os doentes que se apresentem com icterícia de instalação rápida, no contexto de consumo pesado de álcool e no qual não se identifique outra etiologia de icterícia. [11, 43, 44, 45, 46, 47, 48]

6.2.3 - Lesão Hepática Isquémica e Tóxica

Considera-se Hepatite Tóxica a lesão hepática causada por agentes farmacológicos (ex.: antibióticos, antifúngicos, psicotrópicos, quimioterápicos, paracetamol em doses elevadas) ou químicos (ex.: tetra cloreto de carbono, organofosforados) através da sua inalação, ingestão ou administração parentérica. A toxicidade induzida por determinada droga reveste-se de padrões característicos que se

refletem a nível das alterações analíticas, da latência dos sintomas, da presença ou não de hipersensibilidade imune e da evolução após suspensão da substância. Pode manifestar-se através de reações diretas ou idiossincrásicas. A primeira é, geralmente, dose dependente, reprodutível e de evolução previsível. As reações idiossincrásicas manifestam-se após um atraso ou período de latência que varia entre 5 a 90 dias depois da ingestão da droga. O período de tempo entre o consumo de determinada droga e a toxicidade hepática que induz é, geralmente, consistente de pessoa para pessoa. O mesmo sucede com a dose necessária para provocar a lesão. A toxicidade hepática pode permanecer irreconhecível até que se estabeleça icterícia. [2, 11, 49, 50, 51]

O diagnóstico de toxicidade hepática induzida por drogas constitui um desafio. Pressupõe um elevado índice de suspeição e a exclusão de outros diagnósticos diferenciais. Laboratorialmente caracteriza-se: [6, 7, 9, 11, 12, 49, 50, 51]

- Aminotransferases - elevação rápida e marcada das aminotransferases séricas, com pico nas primeiras 12-24h seguida de normalização igualmente rápida, geralmente nos 10 dias seguintes. Frequentemente elevam-se bem acima do LSR (mais de 100 vezes). Considerando a título de exemplo a lesão hepática induzida pelo paracetamol, é frequente (cerca de 90% dos casos) obter um pico da actividade enzimática da AST superior a 3000U/L;
- BT – raramente sobe acima dos 2mg/dL;
- TP – na grande maioria dos casos o TP é superior a 4 segundos face à margem de referência;

6.3 - Lesão Hepática Hereditária

6.3.1 – Hemocromatose

A Hemocromatose é uma doença caracterizada pelo depósito de ferro nos tecidos em virtude do seu suprimento suplantarem as necessidades fisiológicas do organismo. Os principais órgãos acometidos são o fígado, o pâncreas e o coração. A sobrecarga de ferro lesiona progressivamente as células prejudicando o seu funcionamento. A Hemocromatose pode ser primária ou hereditária (causa mais comum), quando a sua etiologia é de cariz genético, ou adquirida, secundária a outra doença ou fatores ambientais (ex: doenças hepáticas crónicas, algumas formas de anemia, transfusões de sangue repetidas e, raramente, excesso de ingestão de ferro), tomando a designação de Hemossiderose. [1,11, 52, 53, 54]

A Hemocromatose hereditária é maioritariamente causada pela mutação C282y do gene HFE. Algumas vezes, estão implicadas outras mutações do gene HFE, como H63D ou S65C ou combinações entre as três. O laboratório de genética é crucial ao diagnóstico final contudo, devido à variabilidade genética mutacional, pode não ser decisivo. O laboratório clínico fornece provas essenciais à precisão desse diagnóstico: [2, 6, 7, 9, 52, 53, 54]

- **Saturação da transferrina** - mede a quantidade de ferro ligado à proteína transportadora transferrina. Os resultados estão elevados na hemocromatose, mas não são específicos;
- **Ferritina** - mede as reservas de ferro do organismo. Os resultados estão elevados na hemocromatose, mas não são específicos. Resultados normais em homocigotos para hemocromatose indicam risco baixo de desenvolver a doença;
- **Perfil hepático** - encontra-se normalmente alterado, sendo que o grau de disfunção correlaciona-se com a severidade da mutação presente.

6.3.2 – Doença de Wilson

A Doença de Wilson ou degeneração hepatolenticular é um distúrbio primário hereditário do metabolismo do cobre, originado pela mutação autossómica recessiva do gene ATP7B, responsável pelo transporte deste metal, levando ao seu acúmulo, inicialmente no hepatócito e posteriormente em diversos órgãos e tecidos (particularmente no cérebro, córnea e rins), gerando sintomas neuropsiquiátricos e de doença hepática. É uma afeção hepática que culmina normalmente em cirrose e raramente em hepatite fulminante. [1, 11, 55, 56]

O diagnóstico da Doença de Wilson integra uma componente clínica, bioquímica e genética. O doseamento da Ceruloplasmina sérica, do cobre sérico total e do cobre urinário são o contributo fulcral do laboratório clínico para o diagnóstico diferencial desta patologia. Os dois primeiros encontram-se diminuídos e o último elevado. Acompanham estes achados laboratoriais a alteração da coagulação, do perfil electroforético das proteínas e o aumento dos níveis de amónia na corrente sanguínea. [6, 7, 9, 55, 56]

6.3.3 – Deficiência em Alfa-1-Antitripsina (α 1-AT)

A deficiência de α 1-AT é uma doença genética autossômica recessiva, de gravidade variável e relativamente rara. A α 1-AT é uma enzima de fase ativa positiva produzida no fígado, codificada por um gene localizado no braço longo do cromossoma 14. Tem como função inibir a elastase neutrofílica que, quando ativa, tem a capacidade de destruir o parênquima pulmonar através da hidrólise das fibras de elastina. No fígado, a lesão ocorre quando a mutação genética (principalmente Z) permite alguma produção de α 1-AT mas condiciona a sua libertação do hepatócito para a corrente sanguínea. Esta acumulação e polimerização dentro das células do fígado origina lesões, que se agravam no tempo, podendo culminar em cirrose. [11, 57]

O diagnóstico diferencial envolve a deteção laboratorial de níveis séricos reduzidos de α 1-AT (normalmente por nefelometria) e a confirmação fenotípica. Na maioria dos casos as suspeitas clínicas desta patologia, que conduzem depois ao seu diagnóstico, surgem através das manifestações resultantes das alterações pulmonares e não de alterações hepáticas. Contudo, uma Electroforese de Proteínas de rotina pode, por vezes, ser o primeiro sinal de alerta. [6, 7, 9, 11, 57]

6.4 - Lesão Hepática Autoimune

As HAI caracterizam-se pela lesão imunológica das diferentes estruturas hepáticas, como consequência de um descontrolo do sistema imunológico do indivíduo, por falha na tolerância ao *self* (falha no reconhecimento de órgãos e tecidos próprios). O sistema imunológico atua contra os hepatócitos, as células epiteliais dos ductos biliares interlobulares e os ductos biliares intra e extra hepáticos, conduzindo aos diferentes tipos de lesão hepática autoimune. [1, 21, 24]

O diagnóstico diferencial destas patologias é complexo, já que se associam características de doença específica de órgão e de doença sistémica, junto com a presença de hipergamaglobulinémia e de autoanticorpos; e na maioria dos casos existe, por sua vez, uma doença autoimune extrahepática associada, como Tireoidite, Síndrome de Sjögren, entre outras. Assim, o diagnóstico estabelece-se mediante elementos positivos (autoanticorpos em títulos clinicamente relevantes – de acordo com a técnica adultos $>1/40$ ou $>1/80$ e crianças $>1/20$ ou $>1/40$; e histologia) e elementos negativos, como a ausência de outras causas de hepatite (Hepatites Virais, Induzidas por Álcool e Drogas, Deficiência em α 1-AT, Doença de Wilson e Hemocromatose) que partilham

resultados laboratoriais semelhantes. Um quadro laboratorial típico caracteriza-se: pelo aumento das aminotransferases (podem atingir valores acima de 50 vezes o LSR) e da BT – níveis que descem rapidamente como resposta ao tratamento com esteróides; diminuição da ALB sérica; hipergamaglobulinémia característica (isotipo: elevados níveis de IgG policlonal, IgA normal e ligeiro aumento da IgM); e pela presença de autoanticorpos específicos (ex.: autoanticorpos mitocondriais) ou não (ex.: autoanticorpos antinucleares). [1, 21, 22, 58]

Os autoanticorpos na HAI não são patogénicos nem patognomónicos. Os achados laboratoriais devem considerar-se sempre face aos critérios clínicos e a presença de um determinado autoanticorpo é, por vezes, mais importante que o seu título. Estes podem flutuar não sendo úteis para valorizar a atividade da doença ou a resposta ao tratamento. [21]

6.4.1 - Hepatite Autoimune (HAI) do Tipo1 e do Tipo2

A HAI é uma hepatopatia inflamatória crónica e progressiva cujo alvo do sistema imunológico são os hepatócitos. Provoca inflamação, necrose celular, fibrose e evolução a cirrose e colapso hepático quando não tratada. É uma patologia pouco frequente com maior incidência em mulheres adolescentes ou perto da menopausa. A sua etiologia é desconhecida e postula-se que na sua patogenia podem intervir diversos elementos que interagem de um modo complexo: predisposição genética, formação de antigénios por fatores desencadeantes e mimetismo molecular. [11, 21, 22, 58]

Laboratorialmente contribuem para o diagnóstico diferencial de HAI os seguintes achados: [21, 22, 23, 58, 59, 60, 61]

- Hipergamaglobulinémia sem presença de autoanticorpos circulantes:
 - Alterações histológicas, perfil genético (caracterização do HLA), resposta à terapêutica com imunossuppressores e sistema de pontuação.
- Hipergamaglobulinémia com presença de autoanticorpos circulantes:
 - ANA e ASMA (especificamente os anti-actina) e, mais raramente, ANCA, Anti-SLA/LP (possuem um valor preditivo positivo elevado, próximo dos 100%) e Anti-ASGP-R – **HAI do Tipo I**;
 - Anti-LC1 e LKM (especificamente LKM-1 e LKM-3) e, mais raramente, Anti-ASGP-R – **HAI do Tipo II**;

6.4.2 - Cirrose Biliar Primária (CBP) e Colangite Esclerosante Primária (CEP)

A CBP afecta predominantemente mulheres com idade superior a 40 anos. Resulta da interação de fatores genéticos e ambientais que induzem fenómenos de colangite crónica dos ductos biliares intra hepáticos de pequeno e médio calibre com destruição imunomediada dos mesmos. Analiticamente encontram-se quadros de colestase com elevação da FA e γ GT, associando elevação mínima ou moderada das transaminases. Os autoanticorpos AMA (sobretudo os anti-M2), considerados marcadores clássicos do diagnóstico, detetam-se em mais de 90% dos doentes. No entanto, perfis serológicos distintos podem surgir em cerca de 30% dos casos, caracterizados por diferentes variantes de anticorpos ANA que, ao contrário dos AMA, se relacionam com a gravidade e progressão da doença. Podem ainda ser detetados anticorpos anti-centrómero em cerca de 10% dos doentes, que se associam frequentemente à síndrome de sobreposição CBP-Esclerodermia CREST. [11,23, 62]

A CEP é preferencialmente diagnosticada em homens entre os 30 e os 50 anos de idade. É uma doença colestática crónica caracterizada por inflamação, esclerose e obliteração progressiva das vias biliares extra hepáticas e/ou intra hepáticas. É, na sua maioria, acompanhada de doença inflamatória intestinal. O processo inflamatório estenosante e a colestase crónica predispoem a episódios de colangite aguda, uma complicação bem estabelecida desta doença. O exame de primeira linha para o diagnóstico da CEP é a colangiografia. O aumento persistente dos níveis séricos dos marcadores de colestase (FA e γ GT) é a principal alteração bioquímica acompanhada pela elevação moderada das transaminases. A bilirrubinemia é intermitentemente elevada, e na ocasião do diagnóstico alguns pacientes apresentam hipoalbuminemia e prolongamento do TP. Títulos razoáveis de autoanticorpos do tipo ANA, AMA e ASMA completam o quadro laboratorial. [11, 23, 63]

O fluxograma seguinte (fig.18) ilustra uma marcha laboratorial que direciona para um diagnóstico diferencial, das diferentes patologias hepáticas, a partir de analitos bioquímicos que enquadram um típico perfil de ensaios, perante uma suspeita inicial de doença hepática. [35]

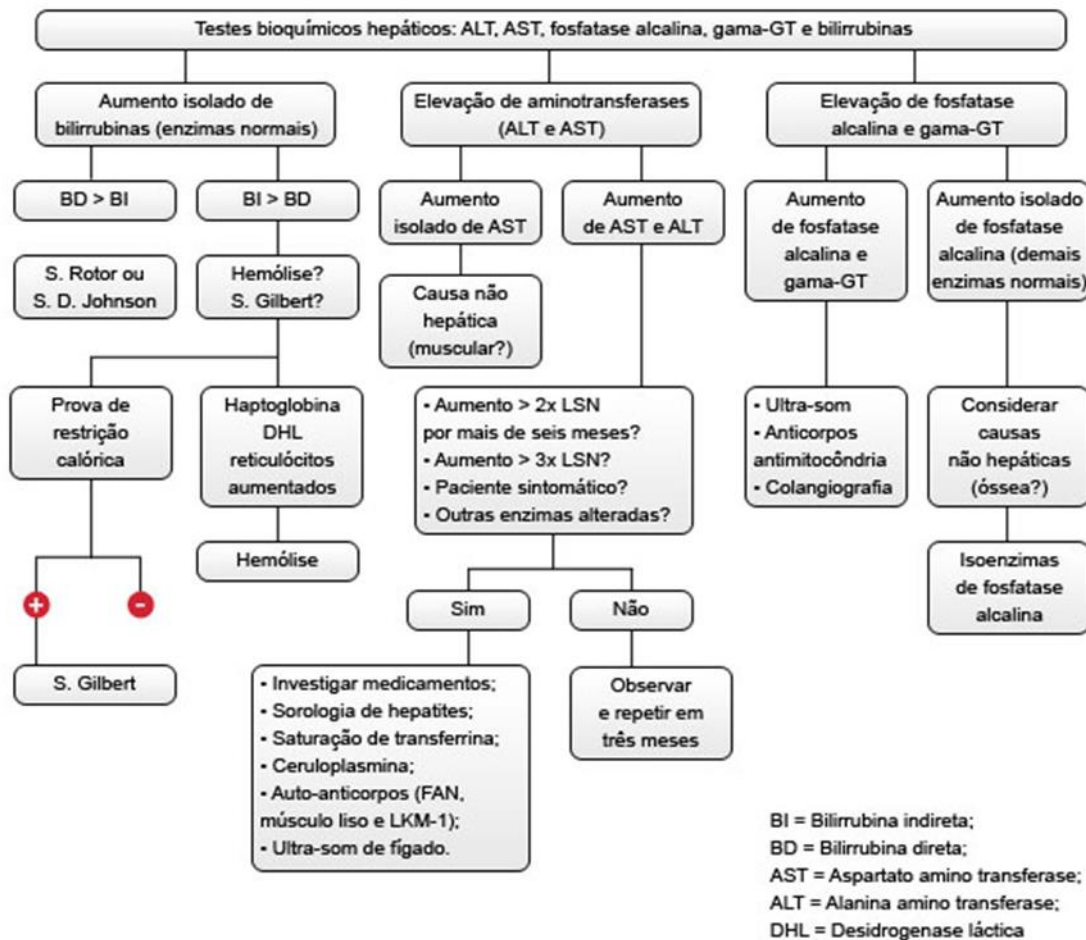


Figura 18 - Exemplo de um fluxograma que orienta para o diagnóstico diferencial, a partir do resultado laboratorial dos parâmetros bioquímicos hepáticos de rotina. Retirado de [35]

7. O LABORATÓRIO CLÍNICO: MARCADORES DE SEVERIDADE E MONITORIZAÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA

7.1 – Marcadores de Severidade

As lesões hepáticas agudas são normalmente autolimitadas e a maioria dos pacientes recuperam completamente. Contudo, algumas podem evoluir para a cronicidade e numa minoria, pode-se instalar um quadro de lesão hepática fulminante. [1, 2, 11]

As actividades máximas das aminotransferases não se relacionam com o prognóstico, podendo até mesmo diminuir apesar do agravamento clínico do paciente. A prova laboratorial que melhor caracteriza os pacientes com elevado risco de falha hepática grave é o TP. Um TP alargado indica a deterioração da função hepática e em associação com outros fatores clínicos e laboratoriais (encefalopatia, ascite, BT e ALB) compõem a classificação de Child (um importante e prático meio de avaliar o grau de deterioração hepática, por meio de um *score*, que de um modo grosseiro estadia o paciente cirrótico, funcionando como um marcador de prognóstico). O TP, sob a forma de INR, figura ainda em outros modelos matemáticos mais precisos como o Modelo para Doença Hepática Terminal *Model for End-Stage Liver Disease* (MELD); e o *Pediatric End-Stage Liver Disease* (PELD). O MELD avalia a gravidade da doença hepática, em pacientes adultos, por meio de uma escala numérica, num algoritmo matemático que toma como variáveis a BT, o INR e a creatinina. O PELD é uma escala semelhante, desenvolvida para crianças, baseada em cinco variáveis: BT, INR, ALB, distúrbio do crescimento (presente ou ausente) e idade da criança (inferior ou não a um ano de idade). [6, 7, 9, 11, 12, 26, 27, 64]

Assim, um TP alargado em 4 segundos face ao controlo, um TP superior a 20 segundos ou um INR superior a 6,5 identifica os doentes com risco elevado de morte. Esta sensibilidade aumenta quando outros achados laboratoriais como a concentração da BT (aumentada) e da ALB (diminuída) corroboram este quadro clínico. Por exemplo, na Hepatite Alcoólica um TP superior em 5 segundos ao controlo, Bilirrubina total superior a 25 mg/dL ou ALB menor 2,5 g/dL, e idade do paciente superior a 55 anos, prediz uma probabilidade de morte de 90%. [6, 7, 9, 11, 12, 26, 27, 64]

A tabela seguinte (tabela 6) mostra as recomendações para a avaliação da severidade em algumas patologias hepáticas agudas. [4, 5]

Tabela 6 - Recomendações das entidades reguladoras para avaliação da severidade da lesão hepática aguda. Adaptado de [4, 5]

- BT > 15mg/dL ou TP > 3 seg sobre o LSR, num paciente com Hepatite Viral, na ausência de outros fatores que possam influenciar estes resultados (hemólise, icterícia obstrutiva), indica lesão hepática severa;
- Na Hepatite Tóxica a paracetamol, um incremento persistente do TP superior a 4 dias indica lesão hepática severa.

7.2 – Monitorização

Todos os pacientes com doença hepática necessitam de acompanhamento cuidadoso, em especial aqueles que são acometidos por doença hepática crónica. A monitorização regular é essencial para que se possam detetar, de um modo precoce, qualquer progressão da doença para determinar e instituir um perfil terapêutico e avaliar a eficácia do mesmo. [1, 11]

Para além dos marcadores hepáticos já mencionados, num quadro clínico evidente de hepatite crónica, o doseamento das plaquetas e da alfa-fetoproteína, são um auxílio à monitorização da progressão e do estadió da doença. A trombocitopenia (diminuição do número de plaquetas) é um achado laboratorial comum, em consequência do aumento do sequestro e destruição de plaquetas pelo baço aumentado, pela diminuição da sua síntese na medula óssea, pelo défice de ácido fólico, pela destruição envolvendo mecanismos imunológicos e por coagulação intravascular disseminada. A sua monitorização em doentes hepáticos crónicos é essencial para prevenir riscos de hemorragia grave e de um modo indireto permite avaliar o grau de fibrose hepática (a quantidade de plaquetas reflete e é de um modo geral proporcional ao grau de hipertensão portal) e predizer o risco de surgimento de varizes gastroesofágicas. [11, 26, 27, 64]

A Alfa-fetoproteína é uma proteína de síntese hepática à qual se recorre para monitorizar: pacientes em risco de desenvolver tumor hepático (hepatites crónicas virais e cirrose), tratamento e sucesso de cirurgia e determinar recorrência. É um bom indicador de prognóstico de carcinoma hepatocelular, particularmente em doentes crónicos HBV, HCV e com Hemocromatose. As recomendações apontam no sentido do seu doseamento a cada seis meses. [4, 5, 11, 26, 27, 64]

8. O LABORATÓRIO CLÍNICO: ESPECIFICAÇÕES DE QUALIDADE PARA AS PROVAS HEPÁTICAS – Recomendações AASLD e NACB

As especificações de qualidade para a fase analítica podem estabelecer-se por diferentes métodos, incluindo: estudos de resultados médicos, dados de variação biológica, opiniões de clínicos ou colégios da especialidade, dados de provas de aptidão e diretivas governamentais. Devem especificar: [6, 65, 66, 67]

- A Imprecisão Aceitável: grau de reprodutibilidade da medida, que pode expressar-se como Desvio Padrão ou Coeficiente de Variação (CV%);
- O Erro Sistemático ou *Bias*: diferença entre o resultado medido e o valor verdadeiro;
- O Erro Total ou Inexatidão: discrepância entre o resultado de uma medição e o valor verdadeiro da magnitude biológica medida (Exatidão + 1,65 x Imprecisão (CV%)).

Os objetivos de qualidade que se expõem em seguida são referenciados pela NACB e AASLD e estão definidos baseando-se no limite superior de referência, exceptuando para a Albumina (limite inferior). Não existe relevância clínica para baixos níveis séricos de enzimas, bilirrubina ou amónia. [4, 5, 6]

Transaminases

Baseando-se na variação biológica, os ensaios para medir a atividade da ALT devem ter no limite superior de referência um Erro Total $\leq 10\%$ e para a AST um Erro Total entre 15-20% é aceitável. Todos os valores inesperadamente elevados devem ser avaliados em nova amostra. [4, 5, 6]

ALP

Os ensaios para medir a atividade da ALP devem ter no limite superior de referência um Erro Total $\leq 10-15\%$. [4, 5, 6]

γ GT

As especificações da Qualidade para a γ GT estão fundamentadas essencialmente na variação biológica, com o limite de tolerância para o Erro Total a rondar os 20%, que se adequam devido à limitada utilização clínica desta enzima. [4, 5, 6,]

Bilirrubina

Analicamente, as especificações do Erro Total para as medições de bilirrubina variam de 20-30% sobre o limite superior de referência, levando em conta sobretudo a variação biológica. [4, 5, 6]

● Albumina

Em termos de qualidade de resultados, os objetivos para a albumina baseados na variação biológica são aproximadamente de 4%, contudo, um Erro Total até 10% na margem inferior do limite de referência é aceitável para a utilização clínica. [4, 5, 6]

● TP

Em termos de qualidade, é aceitável um coeficiente de variação médio de até 10%. Os valores de referência para o tempo de protrombina enquadram-se entre 11,1 a 13,2 e os de INR entre 0,9 e 1,1, de acordo com a metodologia utilizada. O coeficiente de variação interlaboratorial do TP, utilizando o mesmo equipamento e os mesmos reagentes cifra-se entre 3-8% quando o INR está alargado, e esta variação é maior pra o INR do que para o TP. [4, 5, 6]

● Amónia

A reprodutibilidade dos métodos entre laboratórios não deve variar mais do que 10%. [4, 5, 6]

Tabela 7 - Dados publicados sobre especificações de qualidade e imprecisão para provas hepáticas. Adaptado de [4, 5, 6, 66, 67, 68, 69]

Fonte	Tipo	ALT	AST	ALP	γ GT	Albumina	Bilirrubina
Especificações de Qualidade (%)							
CLIA	Obrigatório	ET=20	ET=20	ET=30	N.E.	ET=10	ET=20 ou 0,4 mg/dL
Europeias (Westgard)	Variação Biológica	I=13,6 ES=13,6 ET=36	I=7,2 ES=6,2 ET=18	I=3,4 ES=6,4 ET=12	N.E.	I=1,4 ES=1,1 ET=3,4	I=11,3 ES=9,8 ET=28
Ricos <i>et al</i>	Variação Biológica	I=12,2 ES=12,2 ET=32	I=6,0 ES=5,4 ET=15	I=3,2 ES=6,4 ET=12	I=6,9 ES=10,8 ET=22	I=1,6 ES=1,3 ET=3,9	I=12,8 ES=10 ET=31
Skendzel <i>et al</i>	Opinião Clínica	N.E.	ET=26	N.E.	N.E.	N.E.	ET=23
Imprecisão Intralaboratorial							
Lott <i>et al</i>	Ensaio de Aptidão	8	9	5	6	N.E.	N.E.
Ross <i>et al</i>	Ensaio de Aptidão	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	4,4	8,9

ET: Erro Total; I: Imprecisão ou grau de reprodutibilidade; ES: Erro Sistemático ou diferença respeitante ao resultado correto; N.E.: Não Especificado;

9. CONCLUSÃO

O fígado é um órgão central na fisiologia do corpo humano, realizando numerosas funções vitais, muitas das quais ainda não totalmente compreendidas. Está sujeito a uma grande variedade de agentes agressores e, portanto, perante uma lesão hepática é necessário, da parte do médico, um profundo conhecimento da fisiologia hepática e por parte do Laboratório Clínico rigor, precisão e qualidade de resultados, para melhor orientar o estudo do paciente.

O fígado possui uma alta capacidade regenerativa permitindo ao doente sobreviver a uma lesão hepática aguda grave e recuperar totalmente, a longo prazo, a função hepática. No entanto, quando sujeito a uma lesão crónica geralmente responde com um processo evolutivo de fibrose culminando em cirrose hepática, um processo quase sempre irreversível, que conduz a uma insuficiência hepática incompatível com a vida. Assim, é por mais evidente que um diagnóstico e tratamento precoces da patologia hepática são essenciais.

Incrementos séricos da bilirrubina conjugada são altamente específicos de patologia hepática ou dos canais biliares. Se o estudo analítico mostra apenas elevação das bilirrubinas, provavelmente, não estamos perante uma doença hepática orgânica mas sim genética, efeito de fármacos ou hemólise. Se as diversas provas da função hepática estão alteradas, permite-nos avaliar a lesão hepática em distintos padrões clínicos que orientam para abordagens laboratoriais divergentes. Apesar da lesão hepática normalmente apresentar um padrão clínico característico nem sempre isso se verifica e, por vezes, para se alcançar um diagnóstico é necessário um vasto conjunto de análises clínicas e exames de imagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. S. J. MacPhee, W.F. Ganong - **Fisiopatologia da Doença** - Lange Medical Books/McGrawHill – 5 th Ed. -2007;
2. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood – **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics** – 5 th Ed;
3. <http://www.worldgastroenterology.org/>; [sitado 2015 Fev]
4. William M. Lee, Anne M. Larson, R. Todd Stravitz - **AASLD Position Paper: The Management of Acute Liver Failure: Update 2011**;
5. <https://www.aacc.org/community/national-academy-of-clinical-biochemistry/>; [sitado 2015 Fev]
6. Dufour R, Lott JA, Nolte FS, Gretch D, Koff RS, SEEF LB. **Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance characteristics of Laboratory tests.** Clin Chem 2000; 46:2027-2049;
7. Dufour R, Lott JA, Nolte FS, Gretch D, Koff RS, SEEF LB. **Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis and monitoring.** Clin Chem 2000; 46:2050-2068;
8. David E. Johnston - **Special Considerations in Interpreting Liver Function Tests.** Am Fam Physician. 1999 Apr 15;59(8):2223-2230;
9. Knight JA - **Liver function tests: their role in the diagnosis of hepatobiliary diseases.** J Infus Nurs. 2005 Mar-Apr;28(2):108-17;
10. M.Cristina Marques – **Doença Hepática e Biliar.** Departamento Fisiologia e Fisiopatologia, FFUL 2008;
11. Pedro Pimentel Nunes, Adelino Leite Moreira – **Fisiologia Hepática.** Serviço de Fisiologia, FMUP 2007;
12. José Angel Aguilar Doreste – **Parámetros Bioquímicos Para La Valoración Hepática.** Programa de Formación Continuada a Distancia 2010;
13. Ticiania Fernandes Macedo, Nayandra Souza e Silva, Vanessa Yuri da Silva, Tatiliana Geralda Kashiwabara – **Hepatites Virais – Uma revisão de Literatura.** Vol.5,n.1.,pp.55-58 Fev 2014 Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. **Hepatites virais:o Brasil está atento.** Brasília, 2005.
15. <http://virology-online.com/>; [sitado 2015 Abr]
16. Taís Gardenia Santos Lemos Lopes, Maria Isabel Schinoni - **Aspectos Gerais da Hepatite B.** R. Ci. med. biol., Salvador, v.10, n.3, p.337-344, set./dez. 2011;
17. <http://www.labhpardini.com.br/lab/imunologia/hepatite.htm>; [sitado 2015 Abr]
18. Figueiredo M., Cunha M. - **HCV e Linfoma Não Hodgkin B.** Laboratório de Virologia do IPOLFG, 2014;
19. Marc Van Ranst – **Citomegalovírus: um vírus de múltiplos talentos.** Universidade de Leuven, Bélgica 2007;
20. <http://www.microbes-edu.org/etudiant/herpes.html>; [sitado 2015 Abr]

21. Immaculada Alarcón Torres – **Manejo Clínico de Los Autoanticuerpos en Las Enfermedades Hepáticas Autoinmunes**. Programa de Formación Continuada a Distancia 2009;
22. Elisa de Carvalho. - **Hepatite Autoimune: A autoimunidade na gênese das doenças hepáticas**. Unidade de Pediatria HBDF;
23. Maria Fernanda Silva Rocha – **Determinação de Autoanticorpos em Doentes com Suspeita de Hepatite Autoimune e Cirrose Biliar Primária**. Unidade Local de Saúde de Matosinhos, EPE – Hospital Pedro Hispano Dezembro de 2012;
24. Castro Christine, Gourley Mark, **Diagnostic Testing and Interpretation of Tests for Autoimmunity** National Institutes of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases (NIAMS), National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, U.S.A
25. Bradwell AR, Hughes RG. **Atlas of hep-2 patterns**. 3ª ed. Birmingham: The Binding Site; 2007. 9780704425958.
26. Scheig R. - **Evaluation of tests used to screen patients with liver disorders**. Prim Care. 1996 Sep;23(3):551-60;
27. Edoardo G. Giannini, Roberto Testa, Vincenzo Savarino - **Liver Enzyme Alteration: A Guide for Clinicians**. CMAJ. 2005 Feb 1; 172(3): 367–379.
28. Renner EL, Dällenbach A. - **Increased liver enzymes: what should be done?** Ther Umsch. 1992 May;49(5):281-6;
29. **Santo J., Martins L., Gomes M. - Algoritmo de Investigação das Alterações das Provas Hepáticas**. Update em Medicina 2011;
30. https://www.laboratorioclin.com.br/docs/hepatite_viral_aguda.pdf; [sitado 2015 Mar]
31. <http://revistapesquisa.fapesp.br/2011/09/03/o-mapa-das-hepatites/>; [sitado 2015 Mar]
32. Giersch K, Dandri M. - **Hepatitis B and Delta Virus: Advances on Studies about Interactions between the Two Viruses and the Infected Hepatocyte**. J Clin Transl Hepatol. 2015 Sep 28;3(3):220-9;
33. Banha L., Cochicho D., Cunha M., Ornelas C., Rebelo, L.; **Instruções de Trabalho do Laboratório de Virologia** do Instituto Português de Lisboa, Francisco Gentil, E.P.E.
34. **Guia Estadual de Orientações Técnicas das Hepatites Virais**. Minas Gerais 2007;
35. <http://www.biovel.com.br/diagnosticos>; [sitado 2015 Mar]
36. José Carlos Ferraz da Fonseca – **Hepatite D**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.35 no.2 Uberaba Mar./Apr. 2002;
37. Sociedade brasileira de hepatologia -**Doença hepática gordurosa não Alcoólica**;
38. Kumar, KS *et al.* **Nonalcoholic steatohepatitis**. Mayo Clinic Proc 2000; 75(7):733-739;
39. Nuno Devesa, Paulo Carrola, José Manuel Silva, Mário Borges Alexandrino, José Júlio Alves Moura - **Esteato-hepatite não alcoólica – a propósito de um caso clínico**. Serviço de Medicina II dos Hospitais da Universidade de Coimbra 2002;

40. Etsuko Hashimoto, Makiko Taniai and Katsutoshi Tokushige - **Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH.** J Gastroenterol Hepatol. 2013 Dec;28 Suppl 4:64-70;
41. Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH - **Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease.** Clin Sci (Lond). 2009 Apr;116(7):539-64;
42. <http://www.hepcentro.com.br/>; [sitado 2015 Fev]
43. Suraweera DB, Weeratunga AN, Hu RW, Pandol SJ, Hu R. - **Alcoholic hepatitis: The pivotal role of Kupffer cells.** World J Gastrointest Pathophysiol. 2015 Nov 15;6(4):90-8;
44. Dhanda AD1, Collins PL1. - **Immune dysfunction in acute alcoholic hepatitis.** World J Gastroenterol. 2015 Nov 14;21(42):11904-13;
45. Liang R1, Liu A1, Perumpail RB1, Wong RJ1, Ahmed A1. - **Advances in alcoholic liver disease: An update on alcoholic hepatitis.** World J Gastroenterol. 2015 Nov 14;21(42):11893-903;
46. Spengler EK, Dunkelberg J, Schey R. - **Alcoholic hepatitis: current management.** Dig Dis Sci. 2014 Oct;59(10):2357-66;
47. McCullough AJ, O'Shea RS, Dasarthy S. - **Diagnosis and management of alcoholic liver disease.** J Dig Dis. 2011 Aug;12(4):257-62.
48. Tiago Carvalheira Corte Real Oliveira - **Hepatite Alcoólica.** Universidade do Porto 2014;
49. Stirnimann G, Kessebohm K, Lauterburg B. - **Liver injury caused by drugs: an update.** Swiss Med Wkly. 2010 Sep 24;140;
50. Mohankumar N, Ranjan P, Kumari A. - **Drug-induced liver injury: Diagnosing (and treating) it early.** Fam Pract. 2015 Oct;64(10):634-44;
51. Kim SH, Naisbitt DJ. - **Update on Advances in Research on Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury.** Allergy Asthma Immunol Res. 2016 Jan;8(1):3-11. Epub 2015 Jul 3;
52. Geller SA, de Campos FP. - **Hereditary hemochromatosis.** Autops Case Rep. 2015 Mar 30;5(1):7-10;
53. DeHart MA. - **Hereditary hemochromatosis: diagnosis and treatment in primary care.** Tenn Med. 1999 Nov;92(11):415-7;
54. Crownover BK, Covey CJ. - **Hereditary hemochromatosis.** Am Fam Physician. 2013 Feb 1;87(3):183-90;
55. Gow PJ, Smallwood RA, Angus PW, Smith AL, Wall AJ, Sewell RB. - **Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades.** Gut. 2000 Mar;46(3):415-9;
56. Brewer GJ. - **Practical recommendations and new therapies for Wilson's disease.** Drugs. 1995 Aug;50(2):240-9;
57. Aquiles A Camelier; Daniel Hugo Winter; José Roberto Jardim; Carlos Eduardo Galvão Barboza; Alberto Cukier; Marc Miravittles - **Deficiência de alfa-1 antitripsina: diagnóstico e tratamento.** J. bras. pneumol. vol.34 no.7 July 2008;

58. Umemura T, Ota M. - **Genetic factors affect the etiology, clinical characteristics and outcome of autoimmune hepatitis.** Clin J Gastroenterol. 2015 Out;
59. Muratori L, Deleonardi G, Lalanne C, Barbato E, Tovoli A, Libra A, Lenzi M, Cassani F, Muratori P. - **Autoantibodies in Autoimmune Hepatitis.** Dig Dis. 2015;33 Suppl 2:65-9;
60. Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D. - **Clinical significance of autoantibodies in autoimmune hepatitis.** J Autoimmun. 2013 Oct;46:17-24;
61. Bogdanos DP, Mieli-Vergani G, Vergani D. - **Autoantibodies and their antigens in autoimmune hepatitis.** Semin Liver Dis. 2009 Aug;29(3):241-53;
62. Pinho, P. Ventura, A. Cardoso, J. Pereira. - **Cirrose Biliar Primária AMA Negativa: Caso Clínico.** Revista de Saúde Amato Lusitano 2012; 30:28-31;
63. M. Bispo, P. R. Pina, S. Sousa, I. Seves, M. L. C. Moura, J. P. Graça. - **Colangite Esclerosante Primária: Uma Forma de Apresentação Potencialmente Fatal.** J Port Gastreterol 2007; 14: 236-240;
64. Yoav Lurie, Muriel Webb, Ruth Cytter-Kuint, Shimon Shteingart, and Gerardo Z Lederkremer. - **Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis.** World J Gastroenterol. 2015 Nov 7; 21(41): 11567–11583;
65. Ross JW, Lawson NS. - **Analytic goals, concentration relationships and state of the art for clinical laboratory precision.** Arch Pathol Lab Med 1995; 119:495-513;
66. Skendzel LP, Barnett RN, Platt R. - **Medically usefull criteria for analytical performance of laboratory test.** Am J Clin Pathol 1985; 83:200-5;
67. Lott JA, Tholen DW, Massion CG. **Proficiency testing of enzymes. Charting the way toward standardization.** Arch Pathol Lab Med 1988; 112:392-8;
68. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia Lario JV, Hernández A, Jimenez CV, et al. **Current databases on biological variation; pros, cons and progress.** Scand J Clin Lab Invest 1999; 59:491-500;
69. Westgard JO, Seehafer JJ, Barry PL. - **European specifications for imprecision and inaccuracy compared with operating specifications that assure the quality required by US CLIA proficiency testing criteria.**