

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



**Patogénese, diagnóstico e monitorização de infeções por HBV**

Bernardo Alexandre Pinto Gonçalves

Relatório de estágio orientado pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira e  
supervisionado pela Dra. Anabela Ribeiro Rodrigues Cunha

**Mestrado em Análises Clínicas**

**2024**

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



**Patogénese, diagnóstico e monitorização de infeções por HBV**

Bernardo Alexandre Pinto Gonçalves

Relatório de estágio orientado pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira e  
supervisionado pela Dra. Anabela Ribeiro Rodrigues Cunha

**Mestrado em Análises Clínicas**

**2024**

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus amigos mais antigos e mais recentes, que me garantiram os risos, a alegria, o carinho e o suporte durante este desafio. O que permitiu tornar esta fase da minha vida muito mais acessível e agradável. Em especial à Margarida, por ser a melhor parceira de estágio que eu podia ter pedido.

Ao pessoal do laboratório de análises clínicas SYNLAB, que tornaram a nossa passagem pelo laboratório uma aventura sempre cheia de boa disposição e toda a atenção que nós necessitássemos. Ensinarão-me muito e por isso estou-vos eternamente grato. Um beijinho especial à Lurdes, Maria João e Fátima, pela paciência extra e orientação inestimável.

Ao meu orientador e supervisora de estágio. À Dra. Anabela Cunha, por me ter aceitado neste estágio maravilhoso, no qual pude aprender imenso. Pela orientação e por me ter permitido um momento especial de aprendizagem consigo, na área da fundação. Ao Professor Doutor José Pereira, pela orientação especial que me proporcionou durante o duro processo de escrever a minha monografia. Sempre prestável, atento e de bom-humor. Algo que agradeço do fundo do coração.

À minha parceira de vida, Raquel. Por estar sempre ao meu lado, pelos conselhos, pelo ombro que me proporcionaste nos momentos difíceis destes últimos anos. Pelo amor e carinho que me fazes sentir todos os dias e, acima de tudo, pela pessoa que és. Tenho muito orgulho em ti e em nós. Amo-te.

Aos meus pais, Laurinda e Paulo. Que desde o início, mesmo com todas as dificuldades que tiveram, sempre conseguiram proporcionar-me tudo o que necessitei para que eu me conseguisse tornar quem sou hoje e conquistar tudo o que conquistei. Por todo o amor incondicional que me deram ao longo da minha vida, a educação e valores que me passaram. Obrigado, os meus primeiros (e eternos) amores da minha vida.

Por fim, ao meu irmão Nelson. Que começou ao mesmo tempo que eu o maior desafio da sua vida e o qual superou com distinção. Que tanto me custou não ter na minha vida durante este ano, mas que valeu a pena por nos ter enchido de tanto orgulho com esta sua conquista. Continua a ser o pote cheio de alegria na nossa vida.

### **Declaração de Integridade**

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e Boas Práticas da universidade de Lisboa. Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referência das frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria.

Este trabalho foi elaborado de acordo com o disposto no Artigo 40.º do Regulamento Geral do Ciclo de Estudos conducente ao Grau de Mestre da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, n.º 999/2021, DR, 2.ª série – N.º 236, de 7 de dezembro de 2021.

## Resumo

Este documento apresenta-se dividido em duas partes: Relatório de estágio e monografia.

O relatório de estágio apresenta as atividades realizadas, durante o período de estágio, e os conhecimentos adquiridos nesse mesmo período. Sendo descrito as atividades desenvolvidas nas diversas valências laboratoriais: Fase Pré-Analítica, Bioquímica Clínica, Hematologia e Fase Pós-Analítica.

A monografia consiste na revisão literária baseada no tema: “Patogênese, diagnóstico e monitorização das infecções por HBV”. Este vírus é atualmente considerado um grave problema de saúde pública. Sendo estimado pela Organização Mundial de Saúde que em 2017 cerca de 270 milhões de pessoas estavam infetadas cronicamente e que 800 mil morrem anualmente por cirrose e carcinoma hepatocelular. Esta monografia tem como objetivo aprofundar e reunir conhecimentos que permitam melhor compreender os diversos mecanismos de ação do vírus da Hepatite B e a respetiva resposta do sistema imune do hospedeiro nas diferentes fases conhecidas das infecções e enumerar os diversos testes disponíveis para o diagnóstico e a monitorização da progressão das infecções.

**Palavras-chave:** HBV; Patogênese; HCC; Diagnóstico; Monitorização

## Abstract

This document is presented in two distinct parts: The internship report, and the monograph.

The internship report presents the activities that were carried out throughout the internship and the knowledge acquired in that same period. All the activities performed in the different laboratory phases (pre-analytical, clinical biochemistry, hematology and post-analytical) are described.

The monograph consists of a literature review about the theme: “Pathogenesis, diagnosis and monitorization of HBV infections”. Nowadays, Hepatitis B virus is considered a major public health issue. In 2017, the World Health Organization estimated that about 270 million people were chronically infected with HBV. 800 thousand deaths annually due to cirrhosis and hepatocellular carcinoma complications. This monograph aims to deepen and to gather knowledge, so that it is possible to better understand the diverse viral mechanisms and the corresponding immune responses, along the different infection stages, and to enumerate the various tests available to diagnose and monitor the progression of the infections.

**Keywords:** HBV; Pathogenesis; HCC; Diagnostic; Monitoring

# Índice

Lista de Abreviaturas .....	10
<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>14</b>
Descrição do estágio .....	15
Pré-analítica .....	16
<b>Bioquímica Clínica.....</b>	<b>18</b>
<i>Atellica™ CH 930</i> .....	19
<b>Ensaios <i>Atellica™ CH 930</i>.....</b>	<b>19</b>
Metabolismo Lipídico.....	19
Metabolismo Glucídico.....	23
Função Hepática.....	24
Função renal e equilíbrio ácido-base .....	30
Metabolismo do Ferro.....	35
Metabolismo ósseo.....	39
<i>Atellica™ IM 1600</i> .....	41
<b>Ensaios <i>Atellica™ IM 1600</i> .....</b>	<b>42</b>
Anemia.....	43
Função Tiroideia .....	45
Oncologia (marcadores tumorais) .....	48
Infeções Sexualmente Transmissíveis .....	51
<i>Atellica™ 1500 Automated Urinalysis System (UAS)*</i> .....	55
<b>Ensaios <i>Atellica™ 1500 Automated Urinalysis System*</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>Hematologia .....</b>	<b>57</b>
Circuito Principal.....	58
Unicel® DXH 800 <i>COULTER® Cellular Analysis System</i> .....	58
Hemograma .....	59
DxH Slidemaker Stainer <i>Cellular Analysis System</i> .....	67
Esfregação de sangue periférico .....	67
ALIFAX® Test 1™ .....	74
Velocidade de sedimentação globular (VS) .....	74
D-100 Hemoglobin Testing System.....	76
Determinação da Hemoglobina Glicada (HbA1c) .....	76
Sistema <i>BCS®-XP</i> .....	78
Coagulação .....	78
Citómetro <i>Navios EX</i> .....	84
Citometria de Fluxo .....	84
<b>Controlo de Qualidade.....</b>	<b>87</b>

---

Controlo de Qualidade Interno.....	88
Controlo de Qualidade Externo.....	90
<b>Conclusão .....</b>	<b>91</b>
<b>SEGUNDA PARTE.....</b>	<b>92</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>93</b>
Características gerais do HBV.....	95
Ciclo replicativo do Vírus da Hepatite B.....	97
<b>Patogénese das infeções por HBV.....</b>	<b>99</b>
Resposta imunitária em infeções agudas por HBV .....	100
Imunidade inata .....	100
Reconhecimento antigénico e resposta do sistema inato à infeção por HBV.....	101
Imunidade Adaptativa .....	108
Resposta da imunidade adaptativa à infeção por HBV.....	109
Infeção crónica por HBV .....	117
Evolução temporal da infeção crónica por HBV .....	117
Factores e mecanismos de persistência da infeção por HBV .....	121
Mecanismos de imunossupressão do sistema imune inato .....	122
Mecanismos de imunossupressão do sistema imune adaptativo .....	127
Factores de persistência da infeção por HBV.....	131
Hepatocarcinogénese relacionada com a infeção por HBV .....	135
Relação entre o DNA viral sérico e HCC.....	135
Relação entre o antígeno HBs e HCC .....	136
Relação entre a integração do DNA viral e HCC .....	137
<b>Diagnóstico e Monitorização de infeções por HBV.....</b>	<b>140</b>
Diagnóstico e monitorização utilizando marcadores virais.....	140
Avaliação e monitorização do dano e fibrose hepática.....	146
Marcadores serológicos hepáticos na avaliação e monitorização da doença hepática .....	146
Avaliação e monitorização da fibrose hepática por testes invasivos e não invasivos.....	147
<b>Conclusão e Perspetivas Futuras.....</b>	<b>149</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>151</b>

## Índice de imagens

<b>Figura 1</b> - Secção da Triagem.....	16
<b>Figura 2</b> - Amostras lipémicas.....	17
<b>Figura 3</b> - Amostras hemolisadas .....	17
<b>Figura 4</b> - Linhas de trabalho 2 e 1 na secção da Bioquímica clínica. ....	18
<b>Figura 5</b> - Imunoensaio "ELISA" direto .....	42
<b>Figura 6</b> - Imunoensaio "ELISA" indireto.....	42
<b>Figura 7</b> - Imunoensaio em “sandwich”.....	42
<b>Figura 8</b> - Imunoensaio competitivo .....	43
<b>Figura 9</b> - Equipamento Atellica™ 1500 AUS.....	55
<b>Figura 10</b> - CLINITEK Novus 10 Cassettes.....	56
<b>Figura 11</b> - Área da Hematologia .....	57
<b>Figura 12</b> - Esquema das linhagens hematopoiéticas simplificado.....	59
<b>Figura 13</b> - Princípio de Coulter .....	60
<b>Figura 14</b> - Exemplo de método de contagem (100 células). ....	69
<b>Figura 15</b> - Equipamento ALIFAX® Test1 .....	74
<b>Figura 16</b> - Teste de VS manual utilizando método de Westergren. ....	74
<b>Figura 17</b> - Equipamento D-100™ Hemoglobin Testing System.....	76
<b>Figura 18</b> - Equipamento BCS®-XP. <sup>118</sup> .....	78
<b>Figura 19</b> - Equipamento Navios EX.....	84
<b>Figura 20</b> - Diferentes fases de uma análise clínica. <sup>139</sup> .....	87
<b>Figura 21</b> - Estrutura do virião do HBV e as formas possíveis de apresentação do seu genoma. ....	95
<b>Figura 22</b> - Estrutura do genoma do HBV .....	96
<b>Figura 23</b> - Ciclo Replicativo do HBV. ....	98
<b>Figura 24</b> - Curso normal de uma infeção por HBV autolimitada.....	101
<b>Figura 25</b> - Processo de ativação dos Linfócitos T imaturos pelas DCs .....	105
<b>Figura 26</b> - Vias de ação das células NKs numa infeção por HBV. ....	107
<b>Figura 27</b> - Diferentes tipos de linfócitos Th e os estímulos que os provocam. ....	111
<b>Figura 28</b> - Ação antiviral adaptativa durante a resposta à infeção por HBV. ....	112
<b>Figura 29</b> - Activação e ação dos linfócitos T citotóxicos. ....	114
<b>Figura 30</b> - Imunovigilância do fígado por parte dos linfócitos Tc. ....	115

---

<b>Figura 31</b> - Esquema da primeira fase de uma infecção crónica por HBV.....	118
<b>Figura 32</b> - Esquema da segunda fase de uma infecção crónica por HBV. ....	119
<b>Figura 33</b> - Esquema da terceira fase de uma infecção crónica por HBV.....	119
<b>Figura 34</b> - Esquema da quarta fase de uma infecção crónica por HBV. ....	120
<b>Figura 35</b> - Alvos das ações imunorreguladoras dos diferentes antigénios do HBV.....	124
<b>Figura 36</b> - Mecanismos carcinogénicos despoletados pela integração do DNA viral .....	137
<b>Figura 37</b> - A - Evolução dos biomarcadores numa infecção por HBV aguda; B - Evolução dos biomarcadores numa infecção crónica por HBV.....	141
<b>Figura 38</b> - Exemplos de Procedimentos não-invasivos físicos para a avaliação da fibrose hepática. .....	147

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Intervalos de referência do Ionograma por analito e tipo de amostra.....	34
<b>Tabela 2</b> - Valores de referência para Eritrograma na população da zona metropolitana de Lisboa. <sup>97</sup>	61
<b>Tabela 3</b> - Valores de referência para Leucograma na população da zona metropolitana de Lisboa. <sup>97</sup>	64
<b>Tabela 4</b> - Alterações da série branca e possíveis causas. <sup>100-106</sup> .....	65
<b>Tabela 5</b> - Valores de referência para plaquetograma na população da zona metropolitana de Lisboa. <sup>97</sup> .....	66
<b>Tabela 6</b> - Tabela de contagem leucocitária. ....	69
<b>Tabela 7</b> - Exemplos de alterações na linhagem vermelha. <sup>113,114</sup> .....	69
<b>Tabela 8</b> - Exemplos de alterações da linhagem granulocítica. <sup>113</sup> .....	71
<b>Tabela 9</b> - Exemplos de alterações na linhagem linfocítica. <sup>113,115</sup> .....	72
<b>Tabela 10</b> - Marcadores imunofenotípicos comuns das linhagens celulares hematológicas. <sup>134-137</sup> .....	85
<b>Tabela 11</b> - Marcadores imunofenotípicos de certas patologias hematológicas. <sup>138</sup> .....	86
<b>Tabela 12</b> - Citocinas importantes na resposta à infeção por HBV.....	103
<b>Tabela 13</b> - Definições dos diferentes estados da infeção por HBV. <sup>239</sup> .....	121

## Lista de Abreviaturas

**Abs** - Absorvância

**ADAR1** - Adenosina Deaminase de enzimas editoras de RNA 1, do inglês “Adenosine Deaminase acting on RNA 1”

**AGJ** - Anomalia da Glucose em Jejum

**ALP** - Fosfatase Alcalina

**ALT** - Alanina Aminotransferase

**APCs** - Células apresentadoras de Antígeno, do inglês “Antigen Presenting Cells”

**aPTT** - Tempo de Tromboplastina Parcial

**AST** - Aspartato Aminotransferase

**AVC** - Acidente Vascular Cerebral

**BCR** - recetor das células B

**Breg** - Linfócitos B regulatórios

**BTLA** - Atenuador dos linfócitos B e T

**cccDNA** - DNA circular covalentemente fechado

**CD** - Agrupamento de Diferenciação, do inglês "Cluster of Differentiation"

**CDC** - Centro de Controlo de Doenças

**c.d.o** - Comprimento de onda

**CMSPs** - Células Mononucleares do Sangue Periférico

**CTLA-4** - Antígeno Associada ao Linfócito T citotóxico 4

**DCs** - Células Dendríticas

**DCV** - Doença Cardiovascular

**DIC** - Coagulação Intravascular Disseminada

**DM** - Diabetes Mellitus

**DNA** - Ácido Desoxirribonucleico

**dsIDNA** - DNA em dupla cadeia linear

**dsRNA** - Ácido ribonucleico de dupla cadeia

**ERK** - Cinases Reguladas por sinal extracelular

**GGT** - Gama-Glutamil Transferase

**HBcAg** - Antígeno da cápside do vírus da Hepatite B

**HBeAg** - Antígeno "e" do Vírus da Hepatite B

**HBsAg** - Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B

**HBV** - Vírus da hepatite B, do inglês "Hepatitis B Virus"

**HCC** - Carcinoma Hepatocelular, do inglês "Hepatocellular Carcinoma"

**HCV** - Vírus da Hepatite C, do inglês "Hepatitis C Virus"

**HDL** - Lipoproteína de elevada densidade, do inglês "High Density Lipoprotein"

**HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês "Human Immunodeficiency Virus"

**HLA** - Antígeno Leucocitário Humano

**IDL** - Lipoproteína de densidade intermédia, do inglês "Intermediate Density Lipoprotein"

**iDNA** - DNA do HBV integrado

**IFN** - Interferão

**IL** - Interleucina

**INR** - Relação Internacional Normalizada, do inglês "International Normalized Relation"

**IRF** - Factores de Regulação de Interferão, do inglês "Interferon Regulation Factors"

**ISG** - Genes Estimulados por Interferão, do inglês "Interferon-Stimulated Genes"

**ISTs** - Infecções Sexualmente Transmissíveis

**JAK** - recetor do tipo JANUS

**JNK** - cinases de N-terminal Jun

**KC** - célula de Kupffer

**LCR** - Líquido Cefalorraquidiano

**LDL** - Lipoproteína de baixa densidade, do inglês "Low Density Lipoprotein"

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**LSEC** - células endoteliais sinusoidais do fígado

**MAPK** - Proteínas Cinases ativadas por mitogénio

**MAVS** - Proteína mitocondrial de sinalização antiviral

**MDA-5** - Gene associado à diferenciação do melanoma

**MHC** - Complexo de Histocompatibilidade

**MPO** - Mieloperoxidase

**mRNA** - Ácido Ribonucleico mensageiro

**NF- $\kappa$ B** - Factor nuclear kappa B

**NK** - células Natural Killer

**NLR** - recetor do tipo NOD

**NTCP** - Polipeptido cotransportador de taurocolato de sódio

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**ORF** - Open Reading Frame

**PAMPS** - Padrões moleculares associados a patógenos

**PD-1** - Proteína de morte celular programada 1

**PD-L1** - Ligando de morte programada 1

**PEG** - Polietilenoglicol

**PFA**s - Proteínas de Fase Aguda

**pgRNA** - ácido ribonucleico pré-genómico

**PSA** - Antígeno Específico da Próstata

**PT** - Proteínas Totais

**PTH** - Hormona da Paratiroide

**PTOG** - Prova de Tolerância à Glucose Oral

**rcDNA** - DNA circular relaxado

**RE** - Retículo Endoplasmático

**RIG-I** - Gene induzido por ácido retinoico

**RLR** - recetor do tipo RIG-I

**RNA** - Ácido Ribonucleico

**ROS** - Espécies Reativas de Oxigénio

**SIDA** - Síndrome da Imunodeficiência adquirida

**ssRNA** - Ácido Ribonucleico de cadeia única

**STAT** - Transdutor de sinal e activador de proteínas de transcrição

**STING** - Estimulador de Genes de Interferão

**Tc** - Linfócito T citotóxico

**TCR** - recetor das células T

**TDG** - Tolerância Diminuída à Glucose

**Tfh** - Linfócitos T helper foliculares

**TGB** - Globulina de Ligação à Tiroxina

**TGF** - Factor de Transformação do Crescimento

**Th** - Linfócito T helper

**TIR** – Recetor tipo Portagem de Interleucina, do inglês “Toll-interleukin receptor”

**TLR** - Recetor tipo Portagem, do inglês "Toll-like receptors"

**TNF** - Factor de Necrose Tumoral

**TRAIL** - Ligando tipo Factor de necrose tumoral indutor de apoptose

**T-reg** - Linfócitos T regulatórios

**TRH** - Hormona Libertadora de Tireotrofina

**TSH** - Hormona Tiroestimulante

**TP** - Tempo de protrombina

**VCS** - Volume, Condutividade e Dispersão, do inglês "Volume, Conductivity and Scatter"

**VLDL** - Lipoproteína de muito baixa densidade, do inglês “Very Low Density Lipoprotein”

**VS** - Velocidade de Sedimentação

# **PRIMEIRA PARTE**

## **Descrição do estágio**

O presente estágio, e o seu respectivo relatório no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, realizou-se no laboratório central de Lisboa do grupo SynlabHealth II, sempre com supervisão da Dra. Anabela Cunha.

O objetivo do mesmo seria o seguimento e integração das equipas das diferentes áreas, onde o estágio decorreria, tentando realizar as tarefas diárias das mesmas, sempre com o intuito de poder aplicar e aprofundar os conhecimentos teóricos adquiridos durante o curso.

Iniciou-se o estágio em Fevereiro de 2023 e concluiu-se em Julho do mesmo ano, tendo tido uma duração de 785 horas na sua totalidade, repartidas respectivamente pelas valências da Pré-analítica, Bioquímica, Microbiologia e Hematologia.

Neste relatório são exploradas com maior detalhe as valências de Bioquímica, Hematologia e Pré-Analítica, focando-se na descrição dos diferentes aparelhos em funcionamento nas diferentes áreas do laboratório, fundamentos teóricos dos ensaios mais importantes e mais praticados nas mesmas, diferentes tipos de amostras, etc.

## Pré-analítica

A prática laboratorial na área das análises clínicas baseia-se em três fases, fase pré-analítica, analítica e pós-analítica. Estas estão intimamente interligadas e que, devido a esta interação tão interdependente umas com outras, necessitam igualmente de especial atenção a vários níveis, de forma a controlar e minimizar os possíveis erros em cada uma delas. Até recentemente, só as duas últimas fases eram valorizadas, com protocolos standardizados rígidos e recomendações de boas práticas, tendo sido atribuídos a maioria dos erros à fase analítica.<sup>1,2</sup>

No entanto, nos últimos anos vários estudos acabaram por reconhecer que a fase pré-analítica pode ser responsável por até cerca de 70% de todos os erros na área, sendo mesmo considerada a fase mais complicada de se regular e monitorizar, por ser a fase menos automatizada. Assim, os erros mais comuns são pedidos incorretos de análises, erros na identificação, recolha e transporte das amostras, tanto como na conservação.<sup>2</sup>

Para além disto, muitos outros factores como a idade, sexo, horas da colheita, estado fisiológico do paciente (gravidez, menstruação), etc, têm um papel importante nas possíveis alterações e erros que acabam por ser detetados mais tarde nas fases analítica e pós-analítica. Factores estes que podem e devem ser controlados com uma boa preparação do doente antes da colheita e fazendo um questionário de forma a poder-se recolher informações que possam ter interesse a nível das fases seguintes.<sup>3</sup>

No laboratório de análises clínicas SYNLAB, Praça de Espanha, todas as amostras iniciam o seu percurso pela secção da Triagem (Figura 1). Primeiramente as amostras chegam ao laboratório em caixas de transporte, são rececionadas, dando-se entrada no sistema pelo código que as identifica e medindo-se a sua temperatura interna (amostras refrigeradas devem apresentar-se com temperaturas entre 5-15 °C e amostras de microbiologia entre 20-30 °C).



**Figura 1** - Secção da Triagem

Seguidamente, procede-se à confirmação da conformidade das amostras perante os critérios de aceitação para cada

tipo de amostra e área de análise, processa-se as mesmas (centrifugação de citratos e soros) e distribuem-se pelas diferentes secções.

Quando surgiam amostras com algum tipo de erro ou não-conformidade, várias soluções eram postas em prática de forma a se poder evitar que o utente tenha de repetir a colheita (especialmente idosos, crianças ou outras colheitas difíceis). Por exemplo, em caso de não consenso entre a informação do pedido de análises e as etiquetas que vinham nos tubos ou o tipo de amostra ou até o meio de transporte da mesma, entrava-se em contacto com o posto ou com o médico para confirmar o que se pretendia daquela amostra e tentar conciliar o que nos chegou com a análise pretendida.

Era comum casos de pedidos de cultura microbiológica em exsudado vaginal que, por vezes, só eram enviadas zaragatoas em meio carvão (quando seria suposto serem enviadas em meio carvão, em meio seco e um esfregaço) e fazia-se toda a análise com apenas esta zaragatoa, muitas vezes em amostras com pouco volume tentava-se recorrer a técnicas manuais para evitar a repetição de colheita (por exemplo, velocidade de sedimentação em tubos pediátricos). No entanto, certos casos não há mesmo possibilidade de se avançar e era mesmo pedida a repetição, como amostras hemolisadas, com coágulos, volumes demasiado baixos, tipos de amostra erradas para a análise pedida, etc.



**Figura 3** - Amostras hemolisadas  
Adaptado de SBPC/ML, 2010



**Figura 2** - Amostras lipémicas

Adaptado de Cruz, Edilayne "Manual de Critérios de Aceitação e Rejeição das Amostras da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas e Anatomia Patológica".

## Bioquímica Clínica

Na passagem pela área da bioquímica clínica, em específico “core da química”, foi possível acompanhar o funcionamento de diversos equipamentos de análise e explorar o decorrer do dia-a-dia da equipa.

Os equipamentos com os quais tive mais contacto foram os analisadores de química clínica *Atellica™* CH 930, IM 1600 e os analisadores *Atellica™* 1500, pelo que, serão os que abordarei mais pormenorizadamente, juntamente com os ensaios que neles pratiquei.

Os analisadores *Atellica™* CH 930 e IM 1600, são dois módulos diferentes, em que vários equipamentos de cada módulo (até 7 analisadores IM e CH) podem ser



**Figura 4** - Linhas de trabalho 2 e 1 na secção da Bioquímica clínica.

conectados e em conjunto formam uma linha de trabalho direta de química clínica. Para melhor rentabilização de espaço e tempo de trabalho o laboratório possui 3 linhas de trabalho lineares com analisadores IM e CH (ver Figura 4), em que cada uma tinha incorporado um componente denominado “*Atellica™* Sample Handler”. Este componente possui uma capacidade de 440 tubos e produtividade de 500 tubos por hora distribuindo este volume de amostras para o circuito CH 930:IM 1600.

Ambos os analisadores são capazes de processar várias amostras de diferentes líquidos biológicos como soro, plasma, sangue total, urina, e até LCR. Tendo também a capacidade de auto-detectar problemas de viabilidade nas amostras como os índices de hemólise, lipémia e icterícia, coágulos, bolhas de ar e volumes de amostra insuficientes. No seu interior os analisadores possuem um compartimento de armazenamento de reagentes, que os mantém refrigerados e o próprio sistema tem a capacidade de gerir o número de testes que restam a cada reagente, a validade dos mesmos e a validade das retas de calibração. As calibrações são automáticas apenas necessitando da ordem dada pelo utilizador.<sup>4</sup>

## ***Atellica*<sup>TM</sup> CH 930**

Este equipamento da *Siemens Healthineers* trata-se de um analisador de bioquímica clínica com a capacidade de executar até 1800 testes por hora, utilizando duas tecnologias distintas de funcionamento: Fotometria e Tecnologia de multisensores integrados (IMT).

Pelo método de fotometria, tem a capacidade de realizar 1200 testes/hora, em que são aspirados e diluídos (1:5) 50µl de cada amostra com 200µl de diluente CH podendo depois com este volume produzir-se até 15 testes (o que permite fazer testes com volumes muito baixos de amostra).

Pelo método de IMT, tem a capacidade de realizar 600 testes/hora, em que neste caso é aspirado 25 µl de amostra com uma diluição de 1:10 e com este volume produz-se 3 resultados, sódio (Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) e cloro (Cl<sup>-</sup>).

De forma a evitar o fenómeno de *carry-over* há uma lavagem intensiva das cuvetes de diluição entre cada teste, após a reação, os valores de abs são obtidos pela leitura efetuada por um fotómetro com 11 c.d.o (340nm, 410nm, 451nm, 478nm, 505nm, 545nm, 571nm, 596nm, 654nm, 658nm, 805nm) e os resultados calculados por reação a ponto final, taxa reacional, reação a dois pontos e correção por branco, dependendo do ensaio realizado.<sup>4</sup>

## **Ensaio *Atellica*<sup>TM</sup> CH 930**

Este analisador tem uma gama muito flexível de ensaios, realizando testes específicos de diabetes, drogas de abuso, química geral, drogas imunossupressoras, proteínas específicas, etc. Sendo que apenas abordarei os ensaios mais influentes nos diferentes tipos de metabolismo e nas análises gerais.

### **Metabolismo Lipídico**

Os lípidos são fundamentais numa variedade de funções no corpo humano como as cadeias de sinalização celular, integridade celular e regulação do metabolismo energético, regulação hormonal entre outras. No entanto, é necessário mantê-los em quantidades equilibradas e controladas já que são os mesmos que mais importância têm no desenvolvimento de DCV's, por conta da formação de placas ateroscleróticas nos vasos sanguíneos.<sup>5</sup>

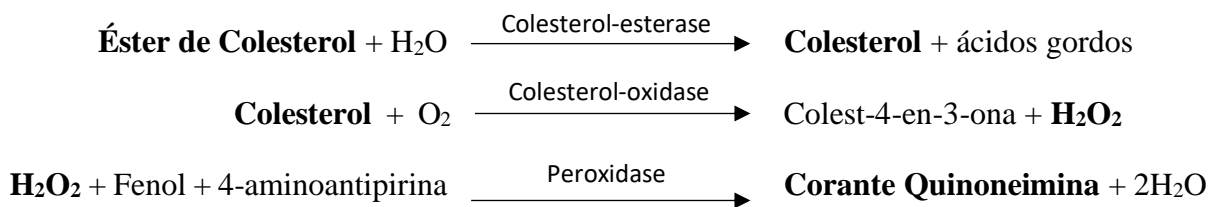
O que torna o controlo clínico destes níveis imprescindíveis para a manutenção da saúde cardíaca e também, muitas vezes, para o despiste de doenças genéticas por deteção de hiperlipidémias com padrões conhecidos.

### **- Colesterol total (Chol 2)**

O colesterol é um esteroide sintetizado no fígado (colesterol endógeno) e absorvido em certa parte na alimentação (colesterol exógeno). Trata-se de uma das moléculas mais importantes no ser humano, com imensas funções vitais em diversos metabolismos diferentes, sendo as principais a manutenção da integridade e fluidez das membranas celulares e servir de precursor de moléculas vitais como hormonas, vitaminas, ácidos biliares, etc. No entanto, dietas ricas em colesterol e gorduras saturadas levam a que haja um aumento sérico muito elevado desta molécula, sendo isto um factor de risco para DCV.<sup>6</sup>

Este ensaio vai-nos permitir quantificar os níveis de colesterol no soro ou plasma (heparina de lítio) por meio de um método enzimático que utiliza a reação de Trinder, após uma conversão dos ésteres de colesterol em peróxido de hidrogénio, por ação de uma enzima colesterol-esterase e uma enzima colesterol-oxidase, respectivamente. O peróxido vai servir para se formar um produto colorido pela ação de uma peroxidase e a abs do produto final será medida como uma reação de ponto a 505/694nm.<sup>7</sup>

#### **Equação de reação:**



#### **Valores referência:**

**Baixo risco** - < 200mg/dl  
**Risco moderado** - 200-239 mg/dl  
**Alto risco** - ≥ 240 mg/dl

#### **Interferências:**

**Hemoglobina**  
**Bilirrubina conjugada**  
**Bilirrubina não conjugada**  
**Lipémia**

### **- Triglicéridos (TRIG)**

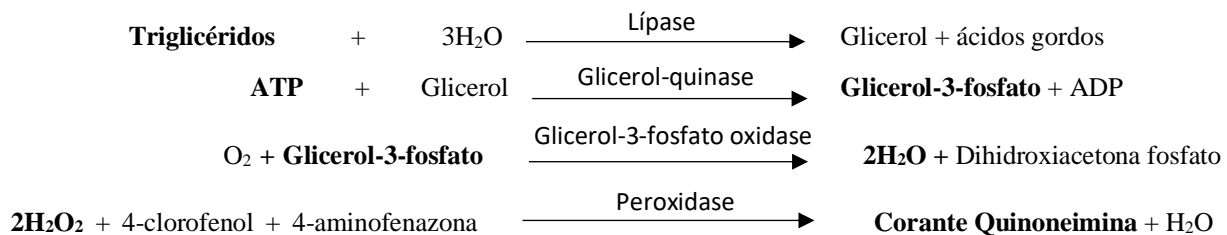
Os triglicéridos são moléculas estruturalmente constituídas por três moléculas de ácidos gordos esterificadas com um glicerol que funciona como suporte principal, sendo o principal constituinte das gorduras presentes na dieta e nos armazenamentos de gordura do corpo.

Estas moléculas são a principal forma de armazenamento de energia, sendo mobilizados em caso de necessidade energética pela corrente sanguínea, e têm também a função de regulação térmica do corpo, devido à sua pobre condução de calor.<sup>8</sup>

Uma vez que níveis elevados de triglicéridos é um risco de DCV é importante a sua quantificação, com este ensaio podemos fazer a sua determinação em amostras de soro e plasma (em EDTA de potássio e heparina de lítio), fornecendo resultados fidedignos num intervalo de 10-550 mg/dl.

O funcionamento baseia-se numa reação de enzimática trifásica de Fossati com um ponto final Trinder, por ação de uma enzima lípase nos triglicéridos formando-se glicerol que será fosforilado por uma glicerol-quinase e, por fim, oxidado por uma glicerol-3-fosfato oxidase formando peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio é utilizado por uma peroxidase para formar o composto colorido utilizado para se medir a abs.<sup>9</sup>

### **Equação de reação:**



### **Valores referência:**

**Normal** - < 150mg/dl

**Limite elevado** - 150-199 mg/dl

**Elevado** - 200-499 mg/dl

**Muito elevado** -  $\geq$  500 mg/dl

### **Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**

### **- Lipoproteínas:**

As lipoproteínas são grandes moléculas séricas formadas por complexos de lípidos e proteínas (apoproteínas) que são divididas em diferentes categorias dependendo da sua densidade, sendo que o que altera a sua densidade é a variação de conteúdo proteico e lipídico (normalmente, quanto maior a fração lipídica menor a densidade e maior o tamanho das partículas em si).

A função destas é o transporte de lípidos pelo sangue desde o intestino até ao fígado. Deste para outros órgãos-alvo, e vice-versa. Os lípidos necessitam deste transporte devido ao facto de serem hidrofóbicos. Nestes complexos, os lípidos (ésteres de colesterol, triglicéridos e ácidos gordos) encontram-se no interior do invólucro de apoproteínas (que têm o papel de interação entre o complexo e os recetores celulares, importante na troca de conteúdo), colesterol-livre e fosfolípidos que formam uma camada hidrofílica virada para o exterior e hidrofóbica para o interior. As grandes

categorias existentes são as quilomicras (lípidos exógenos), VLDL, IDL, DMLDL e HDL, por ordem crescente de densidade e decrescente de tamanho.<sup>10</sup>

### **- Colesterol HDL (HDLC)**

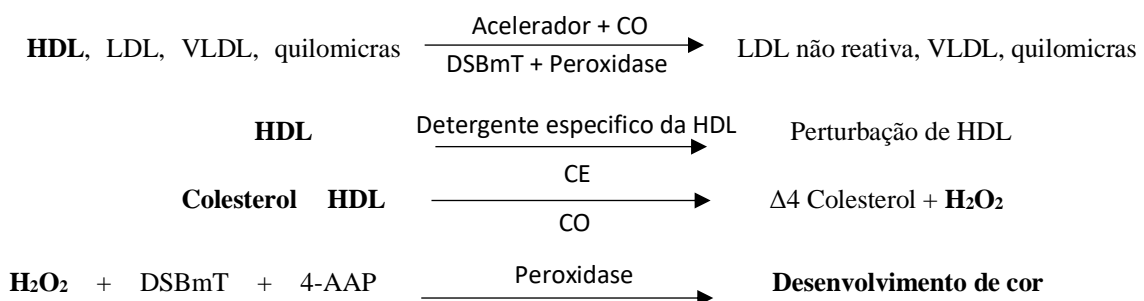
Este grupo de lipoproteínas é o de maior densidade, menor tamanho, e menor fração lipídica das diferentes categorias. A apoproteína A-I e A-II perfazem 90% da fração proteica desta lipoproteína que, em junção com outras apoproteínas, permitem a maior função deste complexo, o transporte reverso de colesterol, que significa a remoção do colesterol dos vasos periféricos para o fígado. Esta função indiretamente permite outras propriedades biológicas das HDL, como capacidade antioxidativa, anti-inflamatória endotelial e vasodilatadora, antitrombótica e citoprotetora. Tudo pelo simples facto de diminuir as placas ateroscleróticas, diminuindo assim a inflamação por elas causadas, sendo então um dos maiores factores protetores contra DCV.<sup>11</sup>

Os dois grupos mais importantes são as HDL e as LDL, o primeiro pelo mencionado acima e o segundo por ser o grupo mais predominante no sangue e que ao mesmo tempo tem a função complementar das HDL. Ou seja, transportam os lípidos do fígado para os órgão-alvo e acabam por formar a placa aterosclerótica, quando em excesso no sangue, sendo um factor de risco para DCV.

Normalmente o ensaio mais pedido é o HDL, pois é de maior relevância determinar o nível de colesterol total e de HDL para medir o nível de risco de DCV.

Este ensaio pode ser efetuado em amostras de soro, plasma com EDTA, heparina de lítio ou de sódio e baseia-se numa dissolução seletiva de HDL utilizando um detergente específico. Primariamente, um primeiro reagente, de forma simplificada, retira todo o colesterol não-HDL da equação e, posteriormente, há um segundo detergente que reage com especificamente com o HDL para formar um produto colorido que permite a determinação específica do HDL.<sup>12</sup>

### **Equação de reação:**



**Valores referência (adultos):****Baixo (alto risco) - < 40 mg/dl****Alto (efeito protetor) -  $\geq$  60 mg/dl****Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

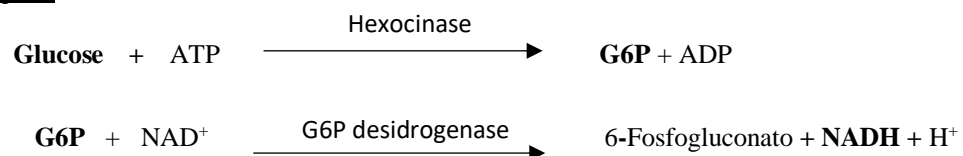
**Metabolismo Glucídico**

Este metabolismo é referente ao metabolismo da glucose. Sendo utilizada a determinação bioquímica da glucose para se fazer o controlo deste metabolismo. A glucose é o principal combustível energético do corpo humano e especialmente o SNC que dela depende fortemente. A sua homeostase é muito importante para se manter os níveis apertados, de forma a existir sempre disponível para a produção energética, mas também para não haver glicolisação dos tecidos por excesso de glucose sérica (muito comum na DM), pelo que estão muitos órgãos envolvidos como o fígado, os músculos e o pâncreas.<sup>13</sup>

**- Glucose Hexocinase (GluH 3)**

Como é descrito acima, o controlo da glicémia também permite o despiste muitas vezes de doenças subclínicas nestes órgãos, sendo o mais comum a DM, e situações pré-diabetes como TDG e AGJ hipoglicemia neonatal, hipoglicemia idiopática, e sobredosagem de insulina. Para isto utiliza-se as análises comuns em jejum ou então, em caso de suspeita, faz-se um teste PTOG que se baseia na ingestão de 75g (em crianças, 1,75g/Kg até 75g) de glucose desidratada após um jejum *overnight* e recolhem-se amostras antes da ingestão, uma hora e duas horas após a ingestão. Conforme os valores obtidos aos diferentes tempos pode-se fazer um diagnóstico.<sup>14</sup>

Neste ensaio pode ser efetuado em amostras de soro, LCR, plasma em heparina de lítio, EDTA com potássio, fluoreto de sódio/oxalato de potássio e urina. Este é um ensaio enzimático que se baseia no ensaio de Slein utilizando as enzimas Hexocinase e G6P desidrogenase para produzir NADH a partir da glucose presente na amostra e obtém-se a abs a partir de uma reação de ponto final a 340/410 nm.<sup>15</sup>

**Equação de reação:**

**Valores referência (adultos):****Adulto (soro/plasma)** – 74-106 mg/dl**RN (soro/plasma)** – 40-60 mg/dl**Criança (soro/plasma)** – 60-100 mg/dl**Adulto (urina)** - <0,5 g/dia**Adulto (LCR)** – 40-70 mg/dl**Criança (LCR)** – 60-80 mg/dl**PTOG (Normal):****Jejum** – 74-106 mg/dl**2 horas após** – 74-106 mg/dl**PTOG (ATG):****Jejum** –  $\geq 110$  e  $< 126$  mg/dl**Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

**PTOG (DM):****Jejum** –  $\geq 126$  mg/dl**2 horas após** -  $\geq 200$  mg/dl**PTOG (TDG):****Jejum** –  $< 126$  mg/dl**2 horas após** -  $\geq 140$  e  $\leq 199$  mg/dl**Função Hepática**

O fígado é um dos órgãos mais importantes do corpo humano, tendo um papel crucial na hemostase e funcionamento de diversos metabolismos, como o controlo dos níveis de glicémia, desintoxicação/excreção de metabolitos e outros xenobióticos tóxicos, síntese da maioria das proteínas plasmáticas, produção e secreção de ácidos biliares, controlo da homeostase do colesterol, etc. Para além disto, tem a capacidade de armazenar vitaminas lipossolúveis, ferro, cobre e ainda tem a capacidade de reservar fontes de energia como lípidos e glicogénio.

Tendo em conta toda a sua importância, é dos órgãos mais frequentemente controlados pelos clínicos e os ensaios bioquímicos mais comuns de serem pedidos são as transaminases (ALT e AST), bilirrubina, ALP, GGT, por serem excelentes marcadores de dano hepático (o único contra é o facto de não serem específicos do tecido hepático, mas em conjunto atinge-se essa especificidade). No entanto, de forma a medir a função hepática em si, deve-se testar a capacidade de produção proteica (por medição das PT) e de factores de coagulação.<sup>16,17</sup>

Aquando de uma deteção de níveis elevados dos testes de função hepática, pode haver um padrão hepatocelular (em que temos as transaminases estão muito superiores aos níveis de GGT e

ALP) e um padrão colestático (em que nos aparecem níveis de GGT, ALP e bilirrubinas predominantemente superiores que as transaminases).

### **- Padrão hepatocelular:**

Quando se fala em transaminases é comum referirmo-nos às AST e ALT que são marcadores de dano hepatocelular bem estabelecidos e que têm como importante função a participação na gluconeogénese e metabolismo proteico por catalisarem a redistribuição do nitrogénio entre os aminoácidos e os respectivos oxoácidos.

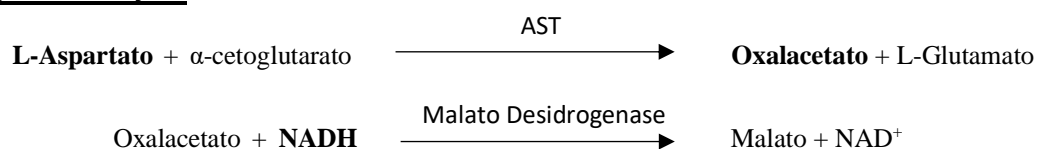
Em termos de localização no corpo, ambas apresentam atividade nos mesmos órgãos, mas esta distribuição possui uma diferença importante para nos permitir distinguir o a gravidade e cronicidade (normalmente uma lesão crónica acaba por libertar a isoenzima mitocondrial da AST o que leva a níveis muito mais elevados que a ALT) do dano hepatocelular. A AST apresenta duas isoenzimas em grandes concentrações (citossólica e mitocondrial) no fígado, miocárdio, musculo, rins, cérebro, pâncreas, respectivamente por ordem decrescente, o que a torna pouco específica, pois, a sua elevação pode significar dano em qualquer um destes tecidos. No entanto, a ALT apesar de se apresentar nos mesmos tecidos, ela possui o foco da sua função no fígado o que em conjunto com a AST vai nos dar muitas informações acerca do que se passa ao nível destes tecidos.

Assim, dentro do primeiro padrão poderemos obter uma predominância de AST que é normalmente associado a cirrose e esteatose relacionadas a consumo de álcool ou então causas não-hepáticas (hemólise, miopatia, doença tiroideia exercício) ou então uma predominância de ALT e é associado a Hepatite aguda/crónica viral, esteatohepatite, síndrome agudo de Budd-Chiari, hepatite isquémica ou autoimune, etc.<sup>18,19</sup>

### **- Aspartato Aminotransferase (AST)**

Este ensaio tem a como função a determinação quantitativa da atividade da enzima AST em amostras de soro e plasma (em heparina de lítio) e o seu funcionamento baseia-se na medição da concentração de NADH pela sua abs a 340/410 nm, que vai se reduzindo de forma proporcional à atividade da AST.<sup>20</sup>

### **Equação de reação:**

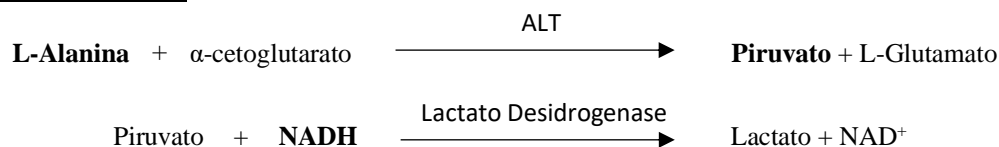


**Valores referência:****Adulto (<60anos) - <34 U/l****Interferências:**

- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

**- Alanina Aminotransferase (ALT)**

Este ensaio tem a como função a determinação quantitativa da atividade da enzima ALT em amostras de soro e plasma (em heparina de lítio), tendo o mesmo fundamento que o ensaio da AST, acima explicado.<sup>21</sup>

**Equação de reação:****Valores referência:****Adulto - 10-49 U/l****Interferências:**

- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

**- Padrão colestatíco:**

Neste padrão, ao contrário do padrão hepatocelular, o que acontece é uma desproporção entre a elevação dos níveis da ALP, GGT e bilirrubina em relação às transaminases, sendo que estas últimas muitas vezes apenas se apresentam discretamente elevadas ou mesmo normais.

Estes parâmetros, em semelhança aos do primeiro padrão, individualmente não apresentam boa especificidade para doença hepática, exatamente pelos mesmos motivos que as transaminases. A ALP e a GGT são ubíquas a vários tecidos e a bilirrubina pode estar elevada também devido a vários factores, sendo que é mais provável realmente haver doença hepática quando elevadas em conjunto do que individualmente.

Assim, as possíveis causas hepatobiliares para este padrão podem ser uma obstrução dos ductos biliares, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, indução medicamentosa, doenças infiltrantes do fígado (sarcoidose, linfoma, etc), fibrose cística, metástases no tracto hépato-biliar e colestase. No entanto, doenças ósseas, gravidez, doença renal crónica, certos linfomas,

cardiopatias congestivas, crescimento na infância, infecções ou inflamações podem também levar ao aumento destes parâmetros não existindo dano hepático.

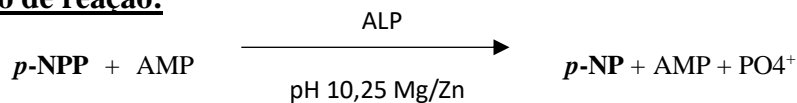
### **- Fosfatase alcalina (ALP\_2c)**

A ALP é uma enzima que catalisa a hidrólise de mono-ésteres de fosfato a pH alcalino em diversos tecidos e possui 4 isoenzimas expressadas na placenta, intestino, fígado/ossos/rins e por fim células germinais, sendo as prominentes as presentes nos ossos e fígado.

Isto faz com que haja pouca especificidade quando elevada se não tiver outro parâmetro para complementar a informação fornecida, podendo a sua elevação, como já dito anteriormente, significar outras doenças que não hepáticas, como tumores ósseos malignos ou até o normal crescimento ósseo de uma criança na infância ou gestação.<sup>19,22</sup>

Este ensaio, como a maioria, destina-se ser utilizado em amostras de soro e plasma (heparina de lítio) tendo capacidade de medir a ALP e todas as suas isoenzimas. O ensaio é muito semelhante ao das transaminases em que a ALP vai transfosforilar o *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) em *p*-nitrofenol (*p*-NP), ao mesmo tempo a abs vai estar a ser medida por velocidade bicromática a 410/478nm e vai variar com o aumento de *p*-NP, esta variação é diretamente proporcional à atividade de ALP.<sup>23</sup>

#### **Equação de reação:**



#### **Valores referência:**

**Adulto** - 46-116 U/l

#### **Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

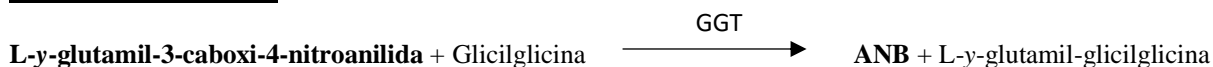
### **- Gama-glutamil transferase**

A GGT é uma enzima localizada nas membranas dos hepatócitos e células das vias biliares tendo como função primária o metabolismo da glutatona e de xenobióticos glutatonaados. Esta enzima encontra-se em maiores quantidades no fígado, mas também tem presença noutros tecidos como rins, pâncreas, intestino, próstata, testículos, etc. Isto faz com que seja um excelente biomarcador para inúmeras patologias como doenças cardíacas, diabetes, síndrome metabólico (MetS), entre outra e ,mais importante para este capítulo, é um biomarcador de disfunção hepática,

da condição dos ductos biliares e do consumo de álcool, elevando-se imenso em qualquer patologia que resulte em fibrose e/ou cirrose como na cirrose alcoólica (12 vezes em relação aos níveis normais).<sup>19,24</sup>

É possível utilizar este ensaio em amostras de soro e plasma (heparina de lítio) para a determinação deste parâmetro hepático e o seu funcionamento baseia-se na transferência de um resíduo  $\gamma$ -glutamil de um substrato sintético para um recetor, libertando-se um produto, o 5-amino-2-nitrobenzoato (ANB). O aumento deste produto vai ser medido a 410/478 nm.<sup>25</sup>

### **Equação de reação:**



### **Valores referência:**

**Adulto (Homem)** - <73 U/l

**Adulto (Mulher)** - <38 U/l

### **Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

### **Bilirrubina:**

A bilirrubina é um metabolito do hemo bastante importante e conhecido, utilizado como complexo de coordenação do ferro, de maneira a incorporá-lo em diversas proteínas. Aproximadamente 80% da bilirrubina no corpo advém do metabolismo dos grupos hemo libertados pela destruição dos hemoss em eritrócitos senescentes e imaturos no baço (sistema reticuloendotelial) e o resto é libertado pelo *turnover* de hemoproteínas como a mioglobina, citocromos, catalase, etc. Todos estes grupos hemo vão ser captados no baço e células de Kupffer (fígado) e vão sofrer ações das enzimas hemo oxigenase, libertando-se biliverdina, e pela biliverdina redutase, que reduz a biliverdina a bilirrubina.

A bilirrubina por si só é insolúvel em água a pH neutro necessitando de ser transportada pela albumina no soro, importantíssimo na proteção dos tecidos contra precipitados de bilirrubina e contra a infiltração glomerular, sendo que a sua excreção é possível devido à sua metabolização no fígado por conjugação com ácido glucurónico, tornando-se solúvel e passível de se juntar à bílis para posterior excreção no intestino ou pela urina em menor quantidade.

Portanto, fisiopatologicamente são conhecidas as hiperbilirrubinémias não-conjugadas e conjugadas, sendo que a diferença entre as duas é que na não-conjugada deve-se a um aumento da

bilirrubina não-conjugada por aumento da destruição dos eritrócitos e hemoproteínas (anemia hemolítica, hemoglobinopatias, malária etc) ou a não-capacidade de captação/conjugação pelo fígado (típico em diversas doenças genéticas).

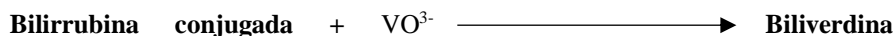
No caso das hiperbilirrubinémias conjugadas podem acontecer por condições que levem a um refluxo da bilirrubina conjugada para o sangue, como colestases, obstruções por pedras nos ductos ou massas tumorais ou síndromes como o de Dubin-Johnson e de Rotor.

Em qualquer um destes casos é comum haver icterícia, prurido e alterações na pigmentação da urina e fezes, dependendo do tipo de hiperbilirrubinémia.<sup>19,26,27</sup>

### **- Bilirrubina Direta (DBil\_2)**

Este ensaio pode ser aplicado em amostras de soro e plasma (em heparina de lítio) destinando-se à determinação da bilirrubina conjugada, baseando-se num método de oxidação química com o vanadato como agente oxidante. Portanto, a bilirrubina conjugada é a única que é diretamente oxidada pelo vanadato, o que vai reduzir a densidade ótica da cor amarela da bilirrubina e vai ser esta redução de cor que vai ser medida (451/545nm), sendo proporcional à concentração de bilirrubina conjugada (direta) na amostra.<sup>28</sup>

### **Equação de reação:**



### **Valores referência:**

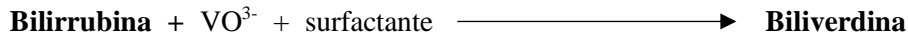
**Adulto** -  $\leq 0,3$  mg/dl

### **Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Lipémia (concentrado de triglicéridos)**

### **- Bilirrubina total (TBil\_2)**

Este ensaio tem como objetivo a determinação da bilirrubina total (bilirrubina conjugada e não-conjugada) presente no sangue, podendo ser utilizado em amostras de soro e plasma (heparina de lítio). Este método é muito semelhante ao da bilirrubina direta, mas como a bilirrubina não-conjugada tem um tempo de reação com o vanadato muito mais longo, neste método utiliza-se um acelerador (surfactante) que permite ambas as bilirrubinas serem oxidadas e determinadas no mesmo espaço temporal.<sup>29</sup>

**Equação de reação:****Valores referência:****0-1 dia** - <8,0 mg/dl**1-2 dias** - <12 mg/dl**3-5 dias** - <16 mg/dl**5 dias até 60 anos** - 0,3-1,2 mg/dl**60 até 90 anos** - 0,2-1,1 mg/dl**>90 anos** - 0,2-0,9 mg/dl**Interferências:**

- **Hemoglobina A**
- **Hemoglobina F**
- **Lipémia (concentrado de triglicéridos)**

**Função renal e equilíbrio ácido-base**

O rim é geralmente associado apenas à excreção de metabolitos tóxicos ao corpo pela urina, no entanto é um órgão multifuncional, com imensas funções vitais importantíssimas para a nossa sobrevivência.

Para além da excreção de substâncias tóxicas ao corpo, o rim é responsável por controlar o nível de hidratação, eletrólitos (sais e minerais), equilíbrio ácido-base ( $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_2^-$ ), por meio de sucessivas fases de excreção e reabsorção da água, eletrólitos, protões e bicarbonato consoante o nível de hidratação, níveis dos sais e acidez venosa. Para além disto possui função endócrina como a produção de eritropoietina, aldosterona, renina (controlo da pressão arterial) e ainda tem a função de transformar a vitamina D na sua forma biologicamente ativa.

Sem estes equilíbrios e controlos efetuados pelos rins todos os nossos sistemas, nervoso, muscular, entre outros tecidos deixam de ter a capacidade de funcionar corretamente e de forma a avaliar o estado da função renal costuma-se determinar os níveis de Ureia, ácido úrico, creatinina, microalbuminúria e ionograma.<sup>30,31</sup>

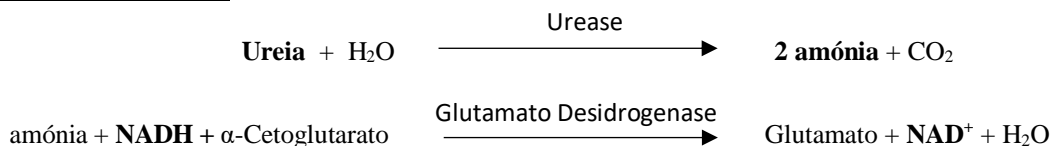
**- Azoto Ureico (UN\_c)**

A ureia é um composto orgânico produzido no fígado após a metabolização das proteínas, sendo extremamente importante para excretar a maioria das substâncias com nitrogénio na sua constituição, por ser altamente solúvel em água e conseguir albergar vários átomos de nitrogénio por cada molécula de ureia.

A ureia vai ser excretada maioritariamente na urina, juntamente com outras substâncias indesejadas ao corpo, onde 95% da urina é água e 5% são metabolitos, sendo que a ureia corresponde a metade destes. A urémia traduz-se no aumento da concentração de ureia no sangue e pode ser classificada em três categorias, pré-renal, renal e pós-renal. Sendo que causas pré-renais temos dietas hiperproteicas ou então pressão arterial baixa, desidratação, ambas podem levar a uma diminuição da capacidade dos rins de filtrarem a ureia do sangue. Causas renais é tudo o que vá diminuir a função renal em si e causas pós-renais temos condições que levem a uma obstrução e não-capacidade de expelir a urina da forma correta, como tumores da próstata ou bexiga.<sup>30-32</sup>

O ensaio da ureia está destinado a ser utilizado em amostras do tipo soro, plasma (em heparina de lítio) e urina e é um ensaio que se baseia na reação enzimática de Roch-Ramel. Neste ensaio a ureia sofre ação da enzima urease e da glutamato desidrogenase para formar amónia e depois oxidar NADH em NAD, respectivamente, sendo este consumo de NADH controlado e medido a 340/410 nm.<sup>33</sup>

### **Equação de reação:**



### **Valores referência:**

**Adulto (soro/plasma) - 9-23 mg/dl**

**Adultos (urina) - 12-20 g/dia**

### **Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

### **- Creatinina 2 (Crea\_2)**

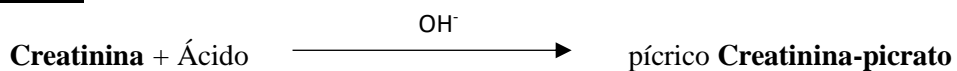
A creatinina é um produto azotado do metabolismo muscular da creatina, sendo o biomarcador de função renal mais utilizado a partir do cálculo da clearance da creatinina. Que devido ao facto de ser livremente filtrada nos glomérulos e ter só uma leve secreção nos túbulos proximais, é utilizada para estimar-se a taxa de filtração glomerular.

Isto quando nos referimos à creatinina na urina, no caso da creatinina sérica esta é influenciada por muitos factores externos aos rins, primeiramente por esta ser um reflexo do nível de massa muscular do individuo (indivíduos com maior massa, vão possuir maiores níveis plasmáticos de creatinina), depois temos factores como a dieta, etnia, idade, sexo, exercício físico e, por fim, certas doenças. No entanto, uma diminuição da função renal vai, de facto, aumentar os níveis séricos da

creatinina e da ureia, sendo facilmente diagnosticada e depois estimada pela clearance da creatinina (como referido anteriormente).<sup>34</sup>

Este ensaio foi desenvolvido para ser utilizado em amostras de soro, plasma (heparina de lítio) e urina, tendo como base o método de Jaffe e utilizando uma modificação de correção da taxa de branco e interceção (redução da interferência da bilirrubina e interações proteicas). Portanto, a creatina, por ação do ensaio e do meio alcalino, vai servir para formar o complexo creatina picrato (pigmento vermelho) e a sua velocidade de formação é diretamente proporcional à concentração de creatinina na amostra.<sup>35</sup>

### **Equação de reação:**



### **Valores referência:**

**Homens (soro/plasma)** - 0,70-1,3 mg/dl

**Mulheres (soro/plasma)** - 0,55-1,02 mg/dl

**Homens (urina)** - 950-2490 mg/dia

**Mulheres (urina)** - 600-1800 mg/dia

### **Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**
- **Certos Fármacos (aumento ou diminuição da clearance)**

### **- Ácido Úrico (UA)**

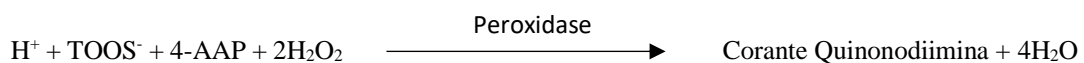
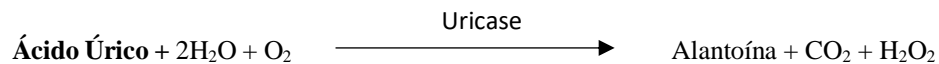
O ácido úrico é um produto metabólico do metabolismo das purinas que se dá maioritariamente no fígado, é maioritariamente excretado pelos rins e apesar das importantes propriedades fisiológicas, como a capacidade antioxidante (principal antioxidante no sangue), proteção anti helmintos (por estimulação das respostas imunes tipo 2) e é um excelente sequestrante de espécies ROS e espécies de peroxinitrito, o ácido úrico por ser um ácido fraco (PKa 5,8) tem o problema de facilmente formar sais e cristalizar (os uratos).

Isto leva a que em elevadas concentrações este risco aumente e haja deposição destes cristais pelos tecidos, levando a gota, síndromes cardiovasculares e, nos rins, urolitíase e nefropatia. Sendo o rim o seu principal local de excreção do corpo, normalmente um aumento dos níveis de ácido úrico pode indicar uma falha da função renal, especialmente com elevação também da creatinina e ureia, para além disto a determinação do ácido úrico é muito importante em pacientes com gota permitindo o seguimento da evolução da doença e controlo da terapêutica.<sup>36,37</sup>

Neste ensaio a determinação de ácido úrico destina-se a amostras de soro, plasma (heparina de lítio) e urina, utilizando a reação enzimática de Fossati em conjunto com um ponto final idêntico a Trinder.

O ácido úrico vai reagir com a uricase formando peróxido de hidrogénio, que será utilizado por uma peroxidase para formar um composto corado e o seu nível é diretamente proporcional à concentração de ácido úrico.<sup>38</sup>

### **Equação de reação:**



### **Valores referência:**

**Homens (soro/plasma)** – 3,7-9,2 mg/dl

**Mulheres (soro/plasma)** – 3,1-7,8 mg/dl

**Adultos (urina)** – 250-750 mg/dia

### **Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

### **- Ionograma (IMT Na K Cl)**

Os eletrólitos são moléculas carregadas, positivamente e negativamente, que possuem um papel importantíssimo no controlo do equilíbrio ácido-base, coagulação do sangue, manutenção do potencial elétrico membranar, equilíbrio hídrico e funcionamento dos estímulos nervoso e contrações musculares, sendo o sódio, potássio e cloro são os mais determinantes das propriedades eletrofisiológicas.

Elevação ou redução dos níveis fisiológicos dos eletrólitos no geral são condições de severa gravidade podendo levar à morte e as causas mais frequentes são a hiperglicemia, perda primária de sódio por sudorese, vômitos e diarreia, perda renal devido a diuréticos, nefropatia, hipotireoidismo, etc.<sup>39,40</sup>

O multissensor destina-se à determinação quantitativa de sódio, potássio e cloro nas amostras de soro, plasma (em heparina de lítio) e urina, na sua constituição existem quatro elétrodos, um para cada ião e um restante de referência.

O sensor funciona por forma de um equilíbrio dos iões com a superfície do eletrodo, gerando-se um potencial proporcional ao logaritmo da atividade destes na amostra e posteriormente este potencial é comparado a um potencial elétrico gerado por uma solução padrão e as respectivas concentrações dos iões calculada através da equação de Nernst.<sup>41</sup>

**Interferências (soro/plasma):**

- Hemoglobina (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>)
- Bilirrubina conjugada (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>)
- Bilirrubina não conjugada (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>)
- Lipémia (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>)
- Salicilato (Cl<sup>-</sup>)

**Interferências (urina):**

- Hemoglobina (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>)
- Bilirrubina Conjugada (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>)
- Bilirrubina não conjugada (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>)
- Lipémia (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>)

**Tabela 1** - Intervalos de referência do Ionograma por analito e tipo de amostra

Tipo de amostra	Analito	Intervalo de referência
Soro	Na <sup>+</sup>	136-145 mmol/l
	K <sup>+</sup>	3,5-5,1 mmol/l
	CL <sup>-</sup>	98-107 mmol/l
Plasma	Na <sup>+</sup>	136-145 mmol/l
	K <sup>+</sup>	3,4-4,5 mmol/l
	CL <sup>-</sup>	98-107 mmol/l
Urina	Na <sup>+</sup>	40-220 mmol/l
	K <sup>+</sup>	25-125 mmol/l
	CL <sup>-</sup>	110-250 mmol/l

**- Microalbumina (μAlb\_2)**

A microalbuminúria refere-se à presença de pequenas quantidades de albumina na urina, sendo medida em mg por dia. Este parâmetro é muito importante por ser um biomarcador independente para a doença renal progressiva e mortalidade por DCV, especialmente em pacientes com diabetes *mellitus*. Nestes casos, o aumento da microalbuminúria é sinal de progressão das condições acima referidas.<sup>42</sup>

Neste ensaio apenas podem ser utilizadas amostras de urina de forma a diagnosticar e seguir casos de microalbuminúria e tem como fundamento o trabalho de Fielding e Hellsing, em que é utilizado um método de imunoturbidimetria reforçada com PEG. A albumina presente na amostra reage com um antissoro específico, formando-se um precipitado capaz de ser medido por turbidimetria a 340/596 nm, de forma a calcular-se a concentração de albumina na amostra faz-se uma curva padrão a partir das abs de padrões.<sup>43</sup>

**Valores referência:**

**Adultos** - <30 mg/dia

**Interferências:**

- **Hemoglobina**

**Metabolismo do Ferro**

O metabolismo do ferro é de extrema importância no corpo humano, sendo um elemento essencial a imensos processos biológicos fundamentais, como o transporte do oxigénio pela hemoglobina e mioglobina, síntese de DNA, cadeia transportadora de eletrões, etc., no entanto, em níveis excessivos torna-se tóxico, por formar radicais livres, tornando crucial uma regulação da sua homeostasia no corpo.

O ferro é obtido pela dieta, chegando ao duodeno normalmente na forma insolúvel ( $\text{Fe}^{3+}$ ) devido ao pH fisiológico, nesta fase há uma redução dos átomos na forma insolúvel para a forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) por enzimas redutase, aumentando assim a solubilidade e absorção dos iões pelos enterócitos. Outra forma de absorção é pela metabolização dos grupos hemo presentes na dieta, libertando-se iões ferro na forma solúvel.

Após absorção pelos enterócitos os iões vão ser exportados das membranas destes para a via sanguínea pelas ferroportinas e, nesta passagem, serão reduzidos à sua forma inerte novamente ( $\text{Fe}^{3+}$ ) para serem sequestrados pela transferrina, que os transportará para os devidos tecidos, como a medula óssea para suportar a eritropoiese, para o fígado, baço e medula para armazenamento pela ferritina e para outros tecidos processos como formação de grupos hemo e agrupamentos ferro-enxofre.

Não existem mecanismos para a excreção do ferro, sendo totalmente reciclado sempre que possível pelos macrófagos que voltam a reintroduzi-lo na corrente sanguínea para sequestro da transferrina, perdendo-se apenas uma pequena porção do ferro pela descamação das células epiteliais.

Assim, o ferro tem uma grande importância no corpo e a sua deficiência pode levar a graves consequências, como a mais conhecida, a anemia ferropénica. Sendo as causas mais comuns da sua deficiência uma dieta pobre em ferro, aumento da necessidade de ferro pelo corpo devido a um rápido crescimento na infância, gravidez, menstruação, e excesso de perda de sangue por parasitas e problemas gastrointestinais.

Por fim, de forma a monitorizar este metabolismo é normal a determinação dos níveis de ferro totais no soro, os níveis de ferritina, transferrina e a capacidade total de fixação do ferro (TIBC).<sup>44</sup>

### **- Ferro (Iron\_2)**

Este ensaio está destinado a ser utilizado em amostras de soro e plasma (em heparina de lítio), de forma a determinar quantitativamente de ferro sérico.

O seu funcionamento baseia-se no trabalho de Artiss *et al.* e Siedell, em que o ferro é libertado da transferrina acabando por ser reduzido ao seu estado ferroso por ação do ácido ascórbico. Neste estado, o ferro tem a capacidade de se combinar com um cromogénio (ferrozina) para a sua medição por calorimetria a 571/658nm.<sup>45</sup>

#### **Equação de reação:**



#### **Valores referência:**

**Homens (soro/plasma)** – 65-175 µg/dl

**Mulheres (soro/plasma)** – 50-170 µg/dl

### **- Ferritina (Fer)**

Um dos componentes mais importantes na homeostase do ferro é o seu armazenamento, sendo este desempenhado na sua maioria pela ferritina (25% das reservas de ferro), uma proteína estruturada por 24 subunidades de cadeias leves e pesadas formando uma estrutura fechada que permite o enclausuramento de até 4500 átomos de ferro. A ferritina vai sequestrar os átomos intracelulares em excesso, armazenando-os num estado redox inerte (Fe<sup>3+</sup>) para posterior utilização.

#### **Interferências:**

- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

Os níveis sistêmicos e celulares da ferritina são indicadores cruciais dos níveis de reserva de ferro no corpo, são bons marcadores de inflamação e de perturbações imunológicas apresentando variações dependendo da condição, sendo o seu doseamento importante no diagnóstico de diversas patologias como anemia ferropénica, hemocromatose, etc.<sup>44,46</sup>

Este ensaio está destinado a ser utilizado no Atellica™ IM 1600, sendo um imunoensaio do tipo sanduiche recorrendo a tecnologia quimioluminométrica direta determinando quantitativamente os níveis de ferritina em amostras de soro e plasma(EDTA e heparina de lítio), utilizando quantidades constantes de dois anticorpos antiferritina em duas fases diferentes.

Como fase solida temos partículas paramagnéticas ligadas com anticorpos antiferritina de rato e fase líquida anticorpos antiferritina de cabra, que na presença de ferritina vão formar um complexo, tipo sanduiche, produzindo turvação. Esta é proporcional à quantidade de ferritina presente na amostra.<sup>47</sup>

#### **Valores referência:**

**Homens (soro/plasma) – 22-322 µg/l**

**Mulheres (soro/plasma) – 10-291 µg/l**

#### **Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**
- **Certos fármacos**

#### **- Transferrina (Trf)**

A transferrina é uma glicoproteína plasmática de fase aguda negativa que possui um papel importantíssimo no metabolismo do ferro no corpo humano, sendo responsável pela distribuição do mesmo para os diversos tecidos do corpo, chegando mesmo a fazer várias cargas e descargas de átomos de ferro entre a absorção de ferro no intestino, a reciclagem do mesmo efetuada pelos macrófagos reticuloendoteliais e o seu fornecimento à medula óssea e outros locais de armazenamento ou metabolismo do ferro.

Para além desta função, a transferrina é também bastante importante na prevenção da formação de ROS, tem um papel no sistema imune inato ao inibir o crescimento microbiano por diminuir o acesso destas ao ferro, é um marcador inflamatório sofrendo uma redução quando há inflamação, tornando-a um parâmetro de extrema importância de se diagnosticar. Apresentando-se em valores reduzidos nestes casos e elevados em deficiência de ferro.<sup>48</sup>

Neste ensaio é determinada a quantidade de transferrina em soro ou plasma (em heparina ou EDTA com potássio), com base no trabalho de Heidelberger e Kendall e modificado por Hellsing.

Este ensaio é um ensaio imunoturbidimétrico com reforço de PEG, em que as amostras são devidamente diluídas, de seguida reagem com um antissoro específico para se formar um precipitado medido por turbidimetria a 340/596nm. Assim, a partir de padrões com concentrações e abs conhecidas, constrói-se uma curva de calibração e, por extrapolação, determina-se a concentração de transferrina da amostra.<sup>49</sup>

#### **Valores referência:**

**Homens (soro/plasma)** – 215-365 mg/dl

**Mulheres (soro/plasma)** – 250-380 mg/dl

#### **Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

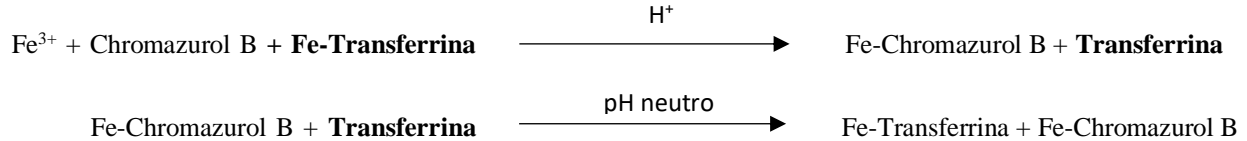
#### **- Capacidade Total de Ligação do Ferro (TIBC)**

A TIBC é um ensaio muito utilizado para o diagnóstico de anemia ferropénica e outras condições no metabolismo do ferro como a hemocromatose, entendendo-se pela medição da capacidade total de ligação de ferro pela transferrina presente na amostra, pois em situações normais esta apenas se encontra com um terço da sua capacidade a ser utilizada.

Assim, a TIBC também acaba por refletir os níveis e funcionalidade da transferrina, em que em situações de deficiência de ferro, também a TIBC acaba por aumentar com o aumento dos níveis de transferrina ou então, em casos de inflamação, doença hepática, entre outros. A TIBC acaba por estar diminuída por haver decréscimo dos níveis de transferrina.<sup>50</sup>

Este ensaio permite a medição da capacidade total de ligação do ferro seguindo um processo sequencial monitorizado espectrofotometricamente, é adicionada à amostra um reagente ácido (contendo átomos de ferro e um corante fixador de ferro) que vai libertar todo o ferro de toda a transferrina presente na amostra pelo pH baixo, todo o ferro libertado e o adicionado pelo reagente vai se ligar ao corante.

Posteriormente, é adicionado um segundo reagente de pH neutro que vai fazer com que toda a transferrina fique saturada pelo ferro presente no meio. Nesta fase haverá um decréscimo da abs que é diretamente proporcional à capacidade de ligação do ferro na amostra.<sup>51</sup>

**Equação de reação:****Valores referência:**

**Adultos** - 250-425 µg/dl

**Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

**Metabolismo ósseo**

Os ossos são tecidos muito ativos metabolicamente, providenciando suporte para o corpo, proteção dos órgãos vitais e é um armazenamento de cálcio, fosfato e outros minerais importantes no funcionamento das funções vitais com a capacidade de fácil libertação e armazenamento destes constituintes para/da corrente sanguínea. Este trata-se de um metabolismo muito dinâmico em que há, muitas vezes em simultâneo, processos de formação de osso e processos de reabsorção controlados por diversos factores.

O osso é uma reserva metabólica de sais minerais, em especial cálcio e fósforo, regulando as suas concentrações plasmáticas e a homeostase iónica no corpo, sendo que há imensos factores que podem alterar o normal funcionamento deste órgão como certas doenças hepáticas, condições que afetem o metabolismo da vitamina D, hiperbilirrubinémia, disfunções endócrinas, etc.

Assim sendo, a determinação quantitativa do cálcio, do fósforo inorgânico e da fosfatase alcalina são os mais comuns ensaios pedidos para diagnóstico de problemas envolvendo este metabolismo.<sup>52</sup>

**- Cálcio (CA\_2)**

O cálcio é quinto elemento mais comum no corpo humano, essencial em vários processos biológicos como no funcionamento cardíaco apropriado, na integridade estrutural óssea, no funcionamento muscular e sináptico e participa em imensas cadeias bioquímicas, sendo a sua homeostasia regulada de várias formas, e, em especial, pela PTH, calcitriol e calcitonina.

A absorção de cálcio dá-se pela dieta no intestino delgado, sendo depois distribuído por esqueleto (99% cálcio total), outros tecidos moles e plasma (1%), a sua homeostasia é depois

regulada por ação das hormonas referidas anteriormente, influenciando a absorção nos intestinos e reabsorção/excreção nos rins.

No entanto, quando há desregulações dos níveis de cálcio, pode-se dar hipercalcemias e hipocalcemias, afetando em longa extensão o indivíduo. Na primeira, pode-se dar desde cálculos renais de cálcio, fragilidade óssea, dor abdominal, bradicardia, etc. e, na segunda, sinais de irritabilidade neuromuscular, sinais de Chvostek e Trousseau, disfunções cardíacas, etc.

As causas destas desregulações vão desde má-absorção intestinal ou mesmo dieta fraca em cálcio, défice de vitamina D, hipoparatiroidismo, doença renal crónica, para a hipocalcemia. Medicamentos, hiperparatiroidismo, alguns tumores e desidratação, para a hipercalcemia.<sup>53</sup>

Neste ensaio é possível a determinação quantitativa de cálcio total em amostras de soro, plasma (em heparina de lítio) e urina, baseando-se no trabalho de Michaylova e Ikova em que se torna possível uma leitura estável e com alta seletividade dos níveis de cálcio.

Após formação de um composto entre os átomos de cálcio e o Arsenazo III, que tem coloração roxa, efetua-se a medição a 658/694 nm e a concentração de cálcio na amostra é diretamente proporcional à intensidade do composto formado.<sup>54</sup>

#### **Equação de reação:**



#### **Valores referência:**

**Adultos (soro/plasma)** - 8,7-10,4 mg/dl

**Adultos (urina)** - 100-300 mg/dia

#### **Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

#### **- Fósforo Inorgânico (IP)**

O fósforo inorgânico é uma das moléculas mais importantes, importantíssimo na formação de ATP, sinalização quinase/fosfatase, formação e função dos lípidos, hidratos de carbono e ácidos nucleico, participando também de forma crucial no normal funcionamento da mineralização do esqueleto e da dentina.

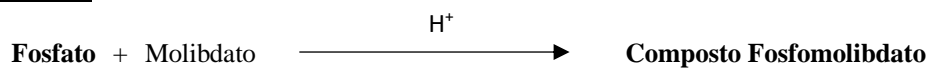
O fósforo é absorvido pelos intestinos com alta eficiência e pouco controlo, no entanto a sua homeostasia, apesar de não tanto restrita como o cálcio, é mesmo assim muito importante sendo os seus níveis mantidos em intervalos apertados numa colaboração elaborada de interações humorais envolvendo vários órgãos como os intestinos, rins, tireoide e ossos, com elevada regulação pela

PTH, calcitriol e calcitonina. O fósforo e o cálcio aparentam possuir equilíbrio inversamente proporcional, em que na subida de um, normalmente dá-se a descida do outro e vice-versa, sendo que os níveis de fósforo podem-se elevar em casos de falência renal, hipoparatiroidismo, hipocalcemia, etc., e podem sofrer um declínio em casos de hiperparatiroidismo, hipercalcemia, deficiência em vitamina C, hiperglicemia e hemólise.<sup>55,56</sup>

Para um bom diagnóstico de patologias ligadas aos cálcio e fósforo, deve-se fazer sempre ambas as determinações em conjunto.

Este ensaio destina-se a ser utilizado na quantificação de fósforo inorgânico em amostras de soro e plasma (em heparina de lítio) e urina, com base no procedimento de Daly e Ertinghausen, em que procede à formação de um composto entre o Fosfato e Molibdato e depois este composto é medido a 340/658 nm como uma reação de ponto final.<sup>57</sup>

#### **Equação de reação:**



#### **Valores referência:**

**Adultos (soro/plasma)** - 2,4-5,1 mg/dl

**Adultos (urina)** - 0,4-1,3g/dia

#### **Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

### ***Atellica™ IM 1600***

O *Atellica™ IM 1600* é o analisador de imunoensaio automático, da casa comercial *Siemens*, com detecção por quimioluminescência que utiliza a tecnologia avançada de éster de acridina. Sendo o 1600, é o de elevada capacidade em relação ao 1300, permitindo analisar até 440 amostras por hora numa variedade grande de amostras como soro, plasma, fluido amniótico, urina e sangue total(para ensaios específicos).

Este analisador também possui a capacidade de controlar a integridade das amostras, detetando volumes baixos de amostra(evitando entrada de ar para o sistema), detecção de coágulos, bolhas, hemólise, icterícia e lipemia, quando se encontra diretamente ligado ao *Atellica™ CH 930*.

Um outro problema comum neste tipo de sistemas de alta capacidade de amostras costuma ser o efeito do *carry-over* de ensaio para ensaio, neste analisador são utilizadas de pontas descartáveis de uso único em cada ensaio, o que vai permitir a eliminação desta questão.

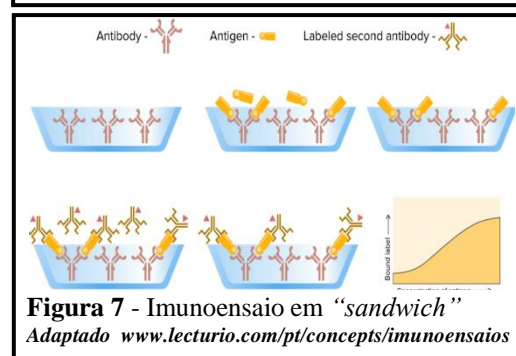
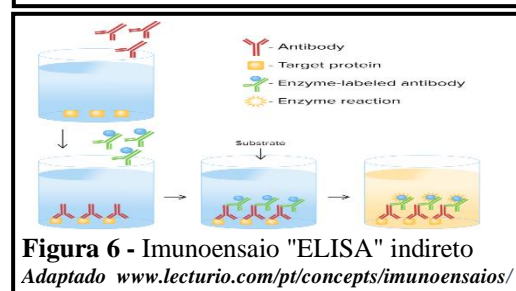
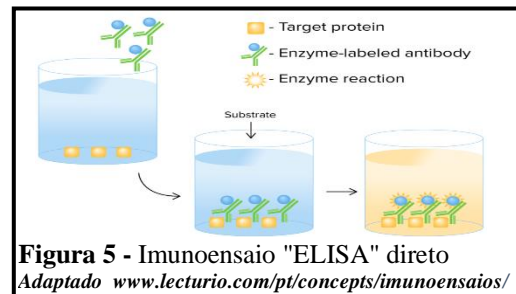
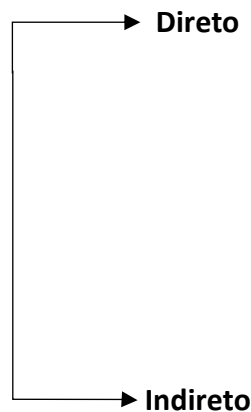
O volume de amostra utilizado varia entre os ensaios, desde 10 a 100 µl, que são volumes pequenos e assim uma mais-valia na necessidade de repetições de testes ou quando se recebe amostras de pouco volume, como tubos pediátricos e colheitas difíceis.<sup>4</sup>

## Ensaios *Atellica*<sup>TM</sup> IM 1600

O analisador *Atellica*<sup>TM</sup> IM 1600 permite uma grande variedade de testes em várias áreas como para o diagnóstico/monitorização de anemia, doenças autoimunes, metabolismo ósseo, marcadores cardíacos, diabetes, crescimento, deteção de hepatites, deteção de HIV, fármacos imunossupressores, certos marcadores inflamatórios, marcadores de fibrose hepática, hormonas ligadas ao metabolismo, marcadores de doenças neurológicas, marcadores oncológicos, monitorização da endocrinologia reprodutiva, sepsis, deteção específica de certos vírus, monitorização de fármacos terapêuticos e função tiroideia.<sup>4</sup>

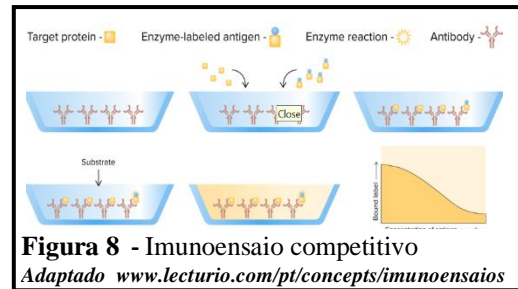
Esta gama de ensaios é conseguida pela utilização de três tipos de imunoensaio:

- Captura por anticorpo



- Em "Sandwich"

- **Competitivo**



## Anemia

### **- Folatos (Fol)**

Os folatos, são moléculas com a função de coenzimas em reações importantes para a síntese de ADN, em conjunto com a vitamina B<sub>12</sub>, muito importante para a formação dos eritrócitos. Estes são normalmente adquiridos pela dieta, em especial carnes vermelhas, sendo absorvidos pelo intestino delgado e armazenados no fígado.

Assim, quando em deficiência, a formação de ADN e conseqüentemente dos eritrócitos fica afetada, levando a uma anormal maturação dos precursores dos eritrócitos na medula óssea, que por sua vez se traduz na presença de megaloblastos nos esfregaços e pela diminuição da sobrevivência destes eritrócitos, resultando numa anemia macrocítica ou megaloblástica.

Existem várias causas que podem levar a esta redução dos níveis de folatos, começando pela ingestão insuficiente de folatos na dieta, uma má absorção por patologias gastrointestinais, gravidez, fármacos e também o alcoolismo crônico.<sup>58-61</sup>

Este ensaio é um imunoensaio competitivo que nos permite quantificar de forma a monitorizar os níveis de folatos no soro ou sangue total heparinizado, em que os folatos da amostra vão competir com folatos marcados com éster de acridina do reagente por uma proteína de ligação de folatos que se ligará à fase sólida e no fim há uma fase de lavagem que vai retirar o excesso de ambos os folatos. Nesta fase será medida a luz transmitida pelos folatos marcados e quanto maior a concentração de folatos na amostra, menor o número de proteínas de ligação ligadas a folatos marcados e assim uma menor luz relativa medida.<sup>62</sup>

#### **Valores referência:**

**Deficiência** - 0,35-3,37 ng/ml

**Indeterminado** - 3,38-5,38 ng/ml

**Normal** - >5,38 ng/ml

#### **Interferências:**

- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

### **- Ferritina (Fer)**

A ferritina, como já enunciado anteriormente na página 21 , é um dos componentes mais importantes na homeostase do ferro, pois é a sua principal fonte de armazenamento. Tornando-se um bom marcador de monitorização dos níveis de ferro que, por sua vez, quando baixos levam ao aparecimento de anemia ferropénica.

Este ensaio está destinado a ser utilizado no Atellica™ IM 1600, sendo um imunoensaio do tipo sanduiche recorrendo a tecnologia quimioluminométrica direta determinando quantitativamente os níveis de ferritina em amostras de soro e plasma(EDTA e heparina de lítio), utilizando quantidades constantes de dois anticorpos antiferritina em duas fases diferentes.

Como fase solida temos partículas paramagnéticas ligadas com anticorpos antiferritina de rato e fase líquida anticorpos antiferritina de cabra, que na presença de ferritina vão formar um complexo, tipo sanduiche, produzindo turvação. Esta é proporcional à quantidade de ferritina presente na amostra.<sup>47</sup>

#### **Valores referência:**

**Homens (soro/plasma) – 22-322 µg/l**

**Mulheres (soro/plasma) – 10-291 µg/l**

#### **Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**
- **Certos fármacos**

### **- Vitamina B12 (VB12)**

A vitamina B12, no corpo humano as suas formas fisiológicas são a desoxicobalamina e metilcobalamina, é um importante componente das dietas ricas em alimentos de origem animal, como carne, ovos e leite. Esta necessita de se ligar a um cofator, denominado factor intrínseco, que vai permitir tanto a manutenção estrutural da vitamina B12 no estômago, como a sua absorção posteriormente no íleo pelos recetores transcobalamina. Após absorção e armazenamento no fígado, medula e outros tecidos, a vitamina B12 tem um papel crucial na formação de ADN, na formação e manutenção da bainha de mielina dos neurónios e ainda na síntese de ácidos gordos. Sendo as suas funções tão importantes para o corpo, a sua excreção é muito reduzida e há reciclagem sempre que possível, tendo o armazenamento no corpo possibilidade de sustentar a necessidade de vitamina B12, em média até 3 anos, sem que haja fornecimento exógeno da mesma.

Em caso de deficiência em vitamina B12, para além da anemia macrocítica comum de se dar devido à falta de ADN sintetizado, também podem aparecer sintomas neurológicos por acumulação de ácido metilmalónico e homocisteína.

As causas comuns podem ser por causas autoimunes, como no caso da anemia perniciosa, por mal absorção devido a alterações da produção de factor intrínseco ou por danos na zona do íleo como acontece na doença de Crohn, doença celíaca e até infeções por helmintas. Por fim, insuficiências nutricionais como nas dietas vegetarianas com duração superior à capacidade de fornecimento do armazenamento no corpo.<sup>63</sup>

Com este imunoensaio competitivo é possível fazer a determinação quantitativa dos níveis de vitamina B12, amostras de soro e plasma (em EDTA ou heparina de lítio). O seu funcionamento baseia-se na competição por uma quantidade limitada de fator intrínseco da fase sólida, em que a vitamina B12 da amostra é libertada das proteínas de ligação pelo hidróxido de sódio e DTT. Quanto menor a intensidade relativa de luz, maior a quantidade de vitamina B12 na amostra.<sup>64</sup>

#### **Valores referência:**

**Normal** - 211-911 pg/ml

**Deficiência** - 32-246 pg/ml

#### **Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

## **Função Tiroideia**

A função tiroideia é um dos mais importantes mecanismos de regulação do corpo humano, tendo influência em todos os metabolismos e tecidos do corpo, incluindo o coração, SNC, sistema nervoso autónomo, ossos, tracto gastrointestinal e metabolismo energético.

Tudo isto é controlado pela ação das duas hormonas tiroideias, a T3 (triodotironina) e a T4(tiroxina), no entanto também a produção destas hormonas é controlada de forma a garantir a homeostase do organismo e dos metabolismos afetados. Este controlo é efetuado pelo eixo hipotálamo-hipófise-tiróide em que se dá um controlo por feedback negativo, ou seja, quando os níveis de T3 e T4 começam a ficar elevados, esta elevação vai ser um sinal inibitório para o hipotálamo, deixando de produzir TRH, inibindo assim a hipófise anterior, que por sua vez deixa de estimular a tiroide, cessando-se a produção de T3 e T4 e vice-versa quando se pretende aumentar a produção de T3 e T4.

Quando este controlo se encontra alterado, podem-se dar dois tipos de patologias, nomeadamente hipotiroidismo e hipertiroidismo. No hipotiroidismo há um decréscimo dos níveis séricos de T3 e T4 que leva a uma redução da taxa metabólica basal, resultando em sintomas como apatia, ganho de peso letargia, secura, alopecia, suores, bradicardia, obstipação, etc. Já no hipertiroidismo há uma acumulação excessiva de T3 e T4 no sangue e tecidos levando a sintomas de um estado hiperadrenérgico, como intolerância ao calor, perda de peso, maior apetite, taquicardia, palpitações, hipertensão, tremores, etc.

As causas de hipotiroidismo podem ser primárias, que a causa está diretamente na tiroide em si, ou secundárias quando o problema advém ou do hipotálamo ou da hipófise. Alguns exemplos são uma deficiência em iodo, tiroidite subaguda, pós-parto ou de Hashimoto, entre outros.

No hipertiroidismo podem também ser primárias ou secundárias e temos a doença de graves, excesso de iodo, adenomas pituitários, por indução de fármacos, etc.

Portanto, torna-se muito importante a monitorização desta função e para isto utiliza-se a determinação da T3 e T4 livres, pois a uma grande fração de ambas circula agregada à TGB e apenas a fração livre é biologicamente ativa nos tecidos, e da TSH, porque permite saber se a causa é primária ou secundária.<sup>65</sup>

#### **- T4 livre (FT4)**

Apesar de tanto a T3 como a T4 serem biologicamente ativas, a T3 possui uma atividade bastante superior à T4, funcionando mais como uma precursora de T3 nos tecidos. Assim, os níveis da sua fração livre no sangue estão relacionados com a sua secreção e metabolismo, acontecendo que em hipotiroidismo a sua fração livre é igual à T4 total, sendo este ensaio muito útil, não só para avaliar hipotiroidismo por escassez de T4, mas também detetar alterações nas proteínas de transporte, como a TBG, quando os níveis de T4 livres estão normais, mas a T4 total alterados.<sup>65,66</sup>

Este ensaio é um imunoensaio competitivo destinado a amostras de soro e plasma (em EDTA ou heparina de lítio), baseando na competição entre a T4 livre da amostra e uma sintética marcada com éster de acridina, por uma quantidade limitada de anticorpos anti-T4 policlonal.

Quanto menores as unidades de luz relativa medidas, libertadas pela T4 marcada, no final do ensaio maior será a quantidade de T4 livre na amostra.<sup>66</sup>

**Valores referência:**

**Normal** - 0,89-1,76 ng/dl

**Hipotiroideio** - <0,89 ng/dl

**Hipertiroideio** - >1,76 ng/dl

**Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**
- **Biotina**
- **Certos fármacos**

**- T3 livre (FT3)**

Tal como no ensaio da T4 livre, este ensaio permite obter informação não só do estado de produção e metabolismo da T3 livre, em conjunto com os níveis de T4 livre e TSH, permite monitorizar a função tiroideia e, em caso de alguma anomalia, permite descobrir se a causa está na tiroide em si ou se é secundária.

Este ensaio também é um imunoensaio competitivo com destino a amostras de soro e plasma (em EDTA e heparina de lítio), funcionando de maneira similar ao ensaio da T4 livre, com anticorpos anti-T3 de rato na fase sólida. Na medição o raciocínio vai ser o mesmo, ou seja, quantas menos unidades de luz relativas medidas, maior a concentração de T3 livre na amostra.<sup>67</sup>

**Valores referência:**

**Normal** - 2,3-4,2 pg/ml

**Hipotiroideio** - <2,3 pg/ml

**Hipertiroideio** - >4,2 pg/ml

**Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**
- **Certos fármacos**

**- Hormona Tiroestimulante (TSH3-UL)**

A TSH é uma hormona sintetizada e segregada pela hipófise anterior (pituitária), sempre em relação às concentrações de T3 e T4 livres e estimulada pela TRH, hormona sintetizada no hipotálamo.

Assim, a TSH é muito utilizada na diferenciação das patologias tiroideias entre primárias, secundárias e terciárias, quando efetuado um estudo em conjunto com os níveis de T3 e T4 livres. Por exemplo, no hipotiroidismo primário, as T3 e T4 vão estar baixas e a TSH elevadas, indicando

que o erro está na tiroide, pois a hipófise está a tentar estimular a tiroide a secretar T3 e T4. No secundário, as T3 e T4 e a TSH vão estar todas baixas, indicando que o problema provavelmente se deve ao não funcionamento da hipófise, devendo-se confirmar com a determinação dos níveis de TRH.<sup>68</sup>

Este imunoensaio destina-se a ser utilizado em amostras de soro e plasma (em EDTA e heparina de lítio), sendo um ensaio competitivo de terceira geração com maior capacidade de deteção dos níveis de TSH.<sup>68</sup>

**Valores referência:**

**Normal** - 0,55-4,78 µIU/ml

**Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

**Oncologia (marcadores tumorais)**

Os marcadores tumorais são indicadores bioquímicos produzidos pelo corpo na presença de tumor, estas moléculas são detetadas no plasma e em certos fluidos corporais e estão normalmente associadas a maliciedade.

Estes marcadores podem ser produzidos pelas próprias células tumorais ou pelo corpo em resposta ao tumor, acabando por ser libertados no sangue onde poderão ser detetados e quantificados. No entanto, estes por si só acabam por não servir de diagnóstico primário de cancro, servindo mais de suporte ao diagnóstico, prognóstico e seguimento dos tratamentos. Isto porque, devido à variabilidade biológica de cada individuo, podemos ter padrões dos biomarcadores completamente diferentes de pessoa para pessoa, desde concentrações com real significado serem diferentes, ou terem diferentes significados no estadio de cada cancro.

Assim, estas moléculas têm bastantes vantagens e desvantagens devendo-se ter em conta que devido à variabilidade biológica torna-se muito complicado deduzir os padrões de diagnostico que sejam verdadeiros para a população no geral, para cada cancro e cada fase destes.<sup>69</sup>

**- Antígeno Carcinoembrionário (CEA)**

O CEA foi detetado pela primeira vez em 1965 numa amostra de tecido de um cancro colorretal humano, tratando-se de uma glicoproteína oncofetal que normalmente não é sintetizada em grande número após o nascimento.

Apesar de ser tipicamente utilizado para o cancro colorretal, o CEA pode aparecer elevado em várias patologias como outros cancros no tracto gastrointestinal, cancro da mama, pulmão, ovário, etc., causando muitas vezes dilemas entre os clínicos.

Como dito anteriormente, não serve de diagnóstico prévio de cancro, mas fornece informações muito importantes no prognóstico da doença e eficácia dos tratamentos.<sup>70</sup>

Neste ensaio temos a possibilidade de detetar o CEA em amostras de soro e plasma (EDTA e heparina de lítio), tendo como princípio o tipo de imunoensaio em *sandwich*. Na fase sólida há um anticorpo anti-CEA que vai sequestrar o CEA presente na amostra, após uma fase de lavagem passa-se um reagente com um segundo anticorpo anti-CEA marcado com o éster de acridina que se vai ligar ao CEA, anteriormente sequestrado.

Numa terceira fase vai se medir a luz produzida pelo éster de acridina e a quantidade de CEA presente na amostra vai ter uma relação direta com a luz medida.<sup>71</sup>

**Valores referência:**<sup>72</sup>

**Indivíduos saudáveis não fumadores** -  $\leq 3 \mu\text{g/dl}$

**Indivíduos saudáveis fumadores** -  $\leq 5 \mu\text{g/dl}$

**Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**

**Cancro da próstata**

O marcador tumoral típico no diagnóstico do cancro da próstata é o PSA, uma protease de serina sintetizada no epitélio do tecido prostático com função de diminuir a viscosidade do fluido seminal, o que permite melhor mobilidade e uma migração facilitada dos espermatozoides.

O PSA acaba por entrar na corrente sanguínea pelos capilares, onde uma certa parte do PSA vai sofrer proteólise e tornando-se inativo passando-se a chamar PSA livre, este acontecimento é importante já que tanto o PSA como o PSA livre podem ser medidos e através da razão PSA livre/PSA total, o clínico obtém a informação bastante fidedigna do estado do utente.

O PSA apesar de ter alta sensibilidade, apresenta baixa especificidade devido ao facto de várias condições na próstata poderem elevar os níveis de PSA, como infeção, inflamação, trauma e tumores benignos, isto leva a que o PSA por si só não pode servir de teste de diagnóstico de cancro da próstata, mas apesar disto a informação fornecida é fulcral na maioria dos casos de cancro da próstata ainda em fases iniciais, que costumam ser assintomáticos.<sup>73</sup>

**- Antígeno específico da próstata**

Este ensaio é direcionado para a determinação de PSA em amostras de soro, baseando-se no tipo de imunoenensaio em *sandwich* em que a amostra é passada numa mistura de fase sólida e fase líquida ambas com anticorpos anti-PSA, levando à formação de uma estrutura do tipo *sandwich*, em que depois se é medida a luz produzida na reação de quimioluminescência produzida com o éster de acridina que se apresenta no anticorpo da fase líquida.

A concentração de PSA está diretamente relacionada com a luz relativa medida.<sup>74</sup>

**Valores referência:**

**Normal** - <4 ng/ml

**Suspeito** - >4 ng/ml

**Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**
- **Certos fármacos**

**- Antígeno livre específico da próstata (fPSA)**

Neste ensaio é possível determinar quantitativamente os níveis séricos de PSA livre e o tipo de imunoenensaio é semelhante ao ensaio da PSA, sendo que neste se utilizam anticorpos anti-PSA livre.

Assim, a luz relativa medida tem relação direta com a concentração de PSA livre na amostra.<sup>75</sup>

**Valores referência:**

**Razão fPSA/PSA** - <27% suspeita de cancro da próstata

**Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**
- **Certos fármacos**
- **biotina**

## Infeções Sexualmente Transmissíveis

### **- Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV Ag/Ab Combo)**

O HIV é um vírus inicialmente descoberto em 1981, nos EUA, responsável pela tão conhecida condição SIDA, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, e é uma das principais causas de mortes no mundo. Este vírus, tecnicamente trata-se de um retrovírus, pertencente à subfamília Lentivirinae e possui várias formas de contágio, como o contacto sexual, exposição a sangue por feridas, cortes transfusões, etc. e ainda a transmissão perinatal.

Atualmente, sabe-se que existem dois tipos de vírus HIV, o HIV-1 e HIV-2, sendo o primeiro o mais disseminado a nível mundial e o que apresenta piores sinais clínicos, pois como apresenta uma taxa de replicação muito maior, o que leva a uma maior virémia e por sua vez um declínio muito mais acentuado dos linfócitos T *helper* (CD4+).

Assim, existe uma grande necessidade de diagnosticar e identificar possíveis portadores, de forma a estagnar o avanço dos contágios e poder-se proporcionar uma boa qualidade de vida em segurança para os infetados e os ao seu redor.<sup>76-80</sup>

Neste ensaio são utilizados antigénios recombinantes correspondentes às proteínas virais do envelope, HIV-1 (gp41/120) e HIV-2 (gp36), é também utilizado um péptido sintético para a deteção de anticorpos ao HIV-1 do grupo O e ainda mais três anticorpos anti-p24, para a deteção do antigénio p24 do HIV-1, em amostras de soro e plasma em EDTA. A partir disto produziu-se um imunoensaio do tipo *sandwich*, em que na fase sólida temos um complexo formado pelos constituintes acima referidos, que vão capturar as respectivas moléculas-alvo e, posteriormente, é passado um reagente que possui os mesmos antigénios recombinantes, o péptido sintético do grupo O, e os três anticorpos anti-p24, mas com a diferença que estes se encontram marcados com o éster de acridina para ser-se possível a atividade de anticorpos do HIV e/ou do antigénio p24 na amostra.<sup>81</sup>

**Resultados:**

Os resultados são dados como reativos ou não reativos, sendo que quando há reatividade, a amostra deve ser centrifugada (10000g) por 10 minutos e repetido o teste em duplicado. Se ambos derem novamente reativos, deve-se proceder a testes complementares de confirmação.

**Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**
- **Hiper-IgG**
- **Biotina**
- **Hipo e hiperproteinémias**
- **Colesterol**

**Vírus da Hepatite B**

O HBV é um vírus pequeno que apenas infeta mamíferos e que após a infecção com o mesmo causa uma condição conhecida por Hepatite B, uma doença hepática necroinflamatória considerada grave e que se encontra distribuída a nível mundial.

É uma doença grave, pois cinco a dez por cento dos infetados acaba por não conseguir eliminar o vírus e desenvolvem uma infecção persistente que acaba por causar uma hepatite crónica, esta induz um estado inflamatório crónico e ciclos repetidos de dano e reparação hepática. Isto leva a que haja promoção da tumorigénese, aumentando o risco de cirrose e hepatocarcinoma celular, que se chega a desenvolver em dez a vinte e cinco por cento das infecções persistentes por HBV, causando 800,000 mortes por ano.

Este vírus é um vírus com uma elevada diversidade de vias de transmissão, transmitindo-se por sangue e outros fluidos corporais, sendo as mais problemáticas: a transmissão vertical e perinatal. Isto por serem as que mais infecções persistentes causam, devido ao sistema imune não estar tão desenvolvido como num adulto, e depois temos as transmissões por esterilização inadequada dos instrumentos médicos e de administração de drogas e por via de relações sexuais não protegidas.

Assim, é de elevada importância o diagnóstico e monitorização das infecções por este vírus, algo normalmente efetuado por deteção do antígeno de superfície (antígeno S) do HBV e por deteção dos anticorpos produzidos pelo corpo contra o antígeno S no sangue.<sup>82-87</sup>

**- Antígeno II de superfície da Hepatite B (HBsII)**

Este ensaio está destinado a ser utilizado em amostras de soro e plasma (em EDTA , heparina de lítio e de sódio) para a determinação qualitativa do antígeno S do HBV. Tratando-se de um imunoensaio do tipo *sandwich*, em que temos a captura do antígeno S de HBV possivelmente presentes na amostra pelos anticorpos anti-HBs da fase sólida e, posteriormente, os mesmos anticorpos anti-HBs marcados por éster de acridina vão complexar com o antígeno S capturado. Após esta fase, é medida a luz relativa produzida e o resultado dá-se pelo valor índice estabelecido pelos calibradores.

**Resultados:**

**Não-reativo** - índice  $< 1$

**Reativo** - índice  $1 \leq x \leq 50$ , repetir em duplicado

**Reativo** - índice  $\geq 50$ , confirmado sem necessidade  
de repetição

**Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**
- **Hiper-IgG**
- **Biotina**
- **Hipo e hiperproteïnémias**
- **Colesterol**

**- Anticorpos Anti-Hbs2 (aHBs2)**

Neste ensaio temos a possibilidade determinar qualitativamente e quantitativamente a presença de anticorpos anti-antigénio S do HBV, em amostras de soro e plasmas (em EDTA e heparina de lítio). Permitindo assim uma valorização da suscetibilidade do individuo a testar contra o HBV, seja antes ou depois de haver vacinação ou então caso não se saiba o estado de vacinação, permitindo também ter-se mais uma informação auxiliar no diagnóstico de uma infeção associada ao HBV no caso de uma hepatite com etiologia desconhecida.

Este ensaio trata-se também de um imunoensaio do tipo *sandwich*, em que numa fase sólida temos antígenos S de HBV sintéticos, que têm a função de capturar os anticorpos presentes na amostra e numa segunda fase é adicionado um reagente que possui novamente antígeno S, mas estes marcados por éster de acridina, que vão ser sequestrados pelos anticorpos da amostra que foram capturados pela fase sólida. Na fase final dá-se a medição da luz emitida pelos antígenos S marcados que foram capturados e a concentração de anticorpos da amostra terá uma relação direta com a luz relativa medida.<sup>88</sup>

**Resultados:**

**Não-reativo** - <8 mIU/ml

**Reativo** -  $8 \leq x \leq 12$  mIU/ml, repetir em duplicado

**Reativo** - >12 mIU/ml, confirmado sem necessidade de repetição

**Interferências:**

- **Hemoglobina**
- **Bilirrubina conjugada**
- **Bilirrubina não conjugada**
- **Lipémia**
- **Hiper-IgG**
- **Biotina**
- **Hipo e hiperproteïnémias**
- **Colesterol**

## ***Atellica™ 1500 Automated Urinalysis System (UAS)\****

O último equipamento que acompanhei foi o *Atellica™ 1500 Automated Urinalysis System\**, um equipamento da casa comercial *Siemens*, completamente autónomo na análise de urinas tipo II, que combina dois equipamentos.

Primeiro, um equipamento já conhecido da *Siemens*, o *CLINITEK Novus Automated Urine Chemistry Analyzer*, que permite fazer o exame químico das urinas de diversos parâmetros. Utilizando a tecnologia de tiras de teste em cassetes com uma câmara digital de última geração que permite a obtenção de imagens e resultados fidedignos dos testes químicos.

Em segundo lugar, uma novidade da casa *Siemens*, temos o *Atellica™ 800 UAS* que nos vai permitir automatizar todo o processo de análise microscópica dos sedimentos das urinas, também este utiliza tecnologia de imagem digital de alta-resolução, com imagem muito semelhante a microscopia eletrónica, reduzindo a necessidade de se fazer microscopia manual.



**Figura 9 - Equipamento *Atellica™ 1500 AUS***

Adaptado de <https://www.siemens-healthineers.com>

Este equipamento permite a análise de 106 a 240 amostras por hora com a capacidade de carregamento de até 100 amostras de cada vez, necessitando no mínimo apenas de 2,6 ml de amostra, e, posteriormente, tendo a capacidade de armazenar até 10,000 resultados e imagens de pacientes.

As informações fornecidas por estes testes importantes no diagnóstico e manutenção do estado do sistema renal, do tracto urinário, função hepática, etc.<sup>89</sup>

## ***Ensaio *Atellica™ 1500 Automated Urinalysis System\*****

O equipamento *Atellica™ 1500 UAS* permite dois menus de ensaios, o menu de exame químico/ótico da amostra e o menu de exame microscópico do sedimento das amostras, tudo na mesma passagem pelo equipamento.

Cada menu permite o teste das amostras de urina para:

### **- Exame químico/ótico (*CLINITEK Novus 10 Cassete*):<sup>89</sup>**

- Aspeto

- Bilirrubina
- Corpos cetónicos
- Cor
- Glucose
- Esterase Leucocitária
- Nitritos
- Hemoglobina
- pH
- Proteínas
- Densidade
- Urobilinogénio



**Figura 10** - CLINITEK Novus 10 Cassettes  
Adaptado de <https://www.siemens-healthineers.com>

**- Exame microscópico do sedimento:**<sup>89</sup>

- Bactérias
- Cristais (patológicos, hialinos e normais)
- Muco
- Células (de escamação e não escamação)
- Eritrócitos
- Espermatozoides
- Leucócitos
- Leveduras

As informações fornecidas por estes testes são cruciais no diagnóstico e manutenção do estado do sistema renal, do tracto urinário, função hepática, etc.<sup>89</sup>

## Hematologia

A última área pela qual se passou o estágio foi a área da Hematologia, nesta área do laboratório era dividida em secções, começando pela secção principal dos hemogramas, hemoglobina glicada, VS's e análise de esfregaços de sangue periférico, para a secção da coagulação, testes de Coombs e grupos sanguíneos, depois a secção da eletroforese de hemoglobinas e, por fim, a secção da Citometria de fluxo.



Figura 11 - Área da Hematologia

O tipo de amostras utilizado nesta área é, na sua grande maioria, tubos com anticoagulante EDTA para a generalidade dos testes praticados na área, seguidos pelos tubos com citrato de sódio para a coagulação e depois, para algumas análises específicas eram enviados outros tipos, como os tubos pediátricos com EDTA, citrato ou heparina, tubos com heparina, tubos para certos fluidos orgânicos, etc.

A utilização destes é muito importante para esta área devido ao facto de os anticoagulantes prevenirem a formação de coágulos e ao mesmo tempo conseguirem manter o estado fisiológico dos componentes sanguíneos como, por exemplo, a morfologia das células, que assim nos permite ter uma noção correta do estado fisiológico das amostras na altura da análise e, para além disto, tornam possível que a amostra não necessite de ser analisada logo nos momentos após ter sido colhida, podendo estar armazenada no laboratório por umas horas (dependendo do tipo de anticoagulante utilizado) sem afetar a qualidade dos resultados na hora da análise.<sup>90</sup>

Na minha passagem por esta área, foi-me possível acompanhar o funcionamento da secção dos hemogramas, hemoglobina glicada e VS's, a secção da análise dos esfregaços de sangue periférico, a secção da coagulação e a secção da Citometria de fluxo, respectivamente. Pelo que serão as que abordarei nesta parte do relatório, juntamente com os equipamentos utilizados e novamente os parâmetros mais influentes e mais importantes nas análises gerais.

O percurso de todas as amostras, que tivessem como destino a área da Hematologia, iniciava-se na entrada e triagem efetuada pelo equipamento *AutoMate 1250*, da casa comercial *Beckman*

*Coulter*, onde as amostras são identificadas, são verificadas se estão conformes e são distribuídas para as respectivas secções--destino dentro da área da Hematologia.

## **Circuito Principal**

O circuito principal é um circuito linear de sentido único (exceto na necessidade de repetir algum parâmetro) composto pela secção dos hemogramas e esfregaços de sangue periférico, seguida da secção das VS's e hemoglobina glicada, pela ordem descrita.

Praticamente todas as amostras que têm como destino o circuito principal são amostras de plasma em EDTA, sendo este o anticoagulante de eleição devido à sua melhor capacidade de manutenção da qualidade e estado das amostras e por não haver necessidade de se fazer o estudo da coagulação nestes tubos, devido ao facto do EDTA sequestrar irreversivelmente o cálcio necessário para o funcionamento da cascata de coagulação.

Assim, dependendo do leque de análises pedido pelo clínico, as amostras podiam ter várias opções de circulação, sendo estas distinguidas por *racks* de diferentes cores:

**Verde** - Apenas Hemograma

**Azul** - Hemograma e VS

**Vermelho** - Hemograma e Hemoglobina glicada

**Amarelo** - Hemograma, VS e hemoglobina glicada

**Preto** - Apenas esfregaço de sangue periférico

Algumas raras exceções como amostras urgentes, certas repetições de algum parâmetro em falta, etc., poderiam não utilizar este método de organização.

Após serem analisadas, as amostras regressam ao *AutoMate* 1250 para serem arquivadas e armazenadas ou então serem encaminhadas para outra secção na qual a amostra possua alguma análise pendente.

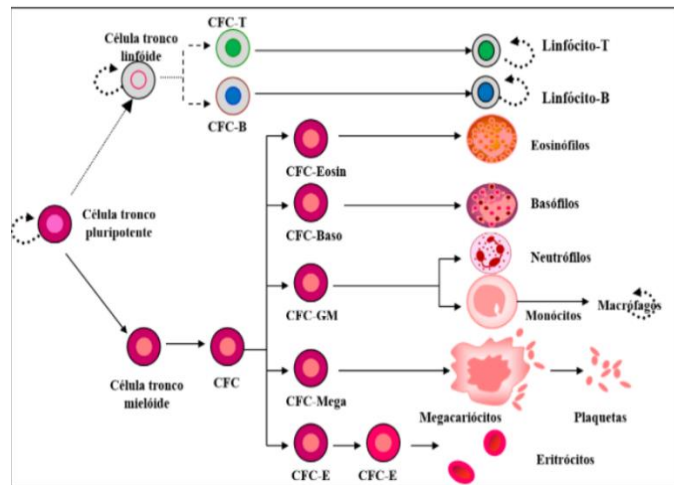
## **Unicel<sup>®</sup> DXH 800 COULTER<sup>®</sup> Cellular Analysis System**

Na área da Hematologia do laboratório a gama de equipamentos a uso para a execução dos hemogramas no circuito principal é o Unicel<sup>®</sup> DXH 800, da casa comercial *Beckman Coulter, Inc.*, um equipamento com a capacidade de executar até 100 testes por hora no máximo, necessitando apenas de 165 µl de volume de amostra para determinar 29 parâmetros como eritrócitos, leucócitos,

hemoglobina, plaquetas, reticulócitos, eritrócitos nucleados (NRBC) e ainda tendo a capacidade de realizar a contagem diferencial absoluta e relativa dos leucócitos e reticulócitos.<sup>91</sup>

## Hemograma

O sangue é composto por três grandes linhagens de células, os leucócitos, eritrócitos e plaquetas, que são produzidas e amadurecidas na medula óssea, um processo fisiológico que facilmente se perturba por diversas causas como dieta pobre em vitamina B12, ferro, folatos, etc., câncers hematológicos, infecções, estados hemorrágicos agudos, alergias e imunodeficiências.



**Figura 12** - Esquema das linhagens hematopoiéticas simplificado. Adaptado <https://ingoh.com.br>

A realização de um hemograma é uma das análises mais comuns e pedidas no mundo que se baseia numa contagem celular total no sangue que inclui a determinação da hemoglobina, número de leucócitos e a sua contagem diferencial, plaquetas, eritrócitos e os seus diversos índices e, por fim, pode ser pedida a contagem de reticulócitos e de NRBC's em casos específicos.

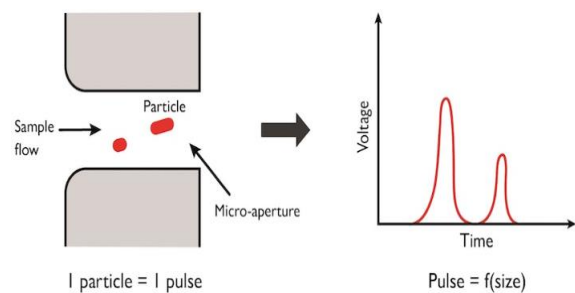
As informações fornecidas por esta análise vão capacitar o clínico de avaliar o estado fisiológico de um indivíduo, detetar algum dos problemas anteriormente referidos que se possa estar a manifestar por forma de uma anemia, uma citopénia ou uma policitémia, por exemplo. Posteriormente, após início de um tratamento é também possível fazer a monitorização do sucesso do mesmo a partir do hemograma.<sup>92</sup>

Todos os parâmetros do hemograma são efetuados no equipamento DXH 800 CAS e em todos é utilizado o mesmo método de análise, o princípio de *Coulter* (ou método da impedância elétrica), à exceção da determinação da hemoglobina que é feita por espectrofotometria, da contagem diferencial de leucócitos e da contagem de reticulócitos e de NRBC's, em que se utiliza a tecnologia VCS, baseada na utilização dos métodos da condutividade por rádio frequências, o princípio de

*Coulter* e por dispersão e absorção de luz, todos em simultâneo permitindo uma identificação muito mais pormenorizada e fidedigna das células.<sup>93</sup>

### **- Princípio de Coulter (método da impedância elétrica)**

O princípio de Coulter é um método de quantificação do número e tamanho de células, desenvolvido no final da década de 1940. Um método desenvolvido principalmente para o propósito de se contar células hematológicas com eficácia e rapidez, mas atualmente é utilizado em praticamente todos os analisadores automáticos



**Figura 13 - Princípio de Coulter**

Adaptado <https://www.comsol.com>

tanto de células do sangue como de milhares de diferentes materiais biológicos e industriais.<sup>93</sup>

O fundamento por trás deste método, baseia-se na deteção e medição das alterações efetuadas numa corrente elétrica estável, devido à passagem dos componentes celulares do sangue, num líquido condutor, por uma passagem estreita situada entre dois eletrodos.

As células são partículas pouco condutoras, em relação à suspensão onde se encontram diluídas, por isso ao passarem pela passagem entre os eletrodos acabam por distorcer a corrente elétrica efetuada pelo líquido condutor e essa resistência à corrente elétrica é medida, por forma de pulsos elétricos de várias amplitudes. Assim, o número de pulsos exibe o número de passagens, ou seja, o número de células e a amplitude dos mesmos vai nos fornecer o tamanho das células, pois quanto maior a partícula maior a resistência causada.

### **- Método espectrofotométrico**

A medição da hemoglobina neste equipamento dá-se pela conversão da hemoglobina em hematina alcalina pela ação de um detergente não-iónico. Após este pré-tratamento da amostra vai-se adicionar o reagente “*Total Hemoglobin*” à amostra e a reação de ambos vai formar uma coloração verde à amostra, que será medida a 600 nm por espectrofotometria.<sup>93</sup>

### **- Eritrograma**

O Eritrograma é composto pela análise dos parâmetros hematológicos dos eritrócitos, começando pelo doseamento da hemoglobina, a contagem de eritrócitos, o volume globular médio (VGM) e o índice de distribuição eritrocitária (RDW) e depois faz-se o cálculo do hematócrito, da hemoglobina globular média (HGM), da concentração da hemoglobina globular média (CHGM), a partir das seguintes fórmulas:

- **Hematócrito:**

$$Ht \left( \frac{L}{L} \right) = \frac{RBC * VGM}{10}$$

- **HGM:**

$$HGM (pg) = \frac{Hb}{RBC} * 100$$

- **CHGM:**

$$CHGM \left( \frac{g}{dl} \right) = \frac{Hb}{Ht} * 1000$$

**Tabela 2** - Valores de referência para Eritrograma na população da zona metropolitana de Lisboa.<sup>94</sup>

Parâmetro	Intervalo de valores		Unidades
	Homens	Mulheres	
Eritrócitos	4,41 - 5,77	3,85 - 5,27	10 <sup>12</sup> / L
Hemoglobina	13,7 - 17,0	11,8 - 15,8	g/dL
Hematócrito	40,6 - 50,4	34,8 - 46,9	%
VGM	81,8 - 99,1	82,1 - 97	fL
HGM	27,3 - 33,7	27,4 - 33,6	pg
CHGM	32,9 - 35,4	32,7 - 35,5	g/dL
RDW	12,0 - 14,6	12,0 - 16,8	%

Vários factores podem influenciar a série vermelha de um hemograma, como a dieta, infeções, hemorragias, doenças genéticas, doenças autoimunes, transfusões, fármacos, alcoolismo, doença hepática, hipotiroidismo e cancro.

A ação destes factores costuma resultar numa condição bastante conhecida e das mais comuns da série vermelha no mundo, a anemia, que afeta até um terço da população mundial, com muitos casos a serem assintomáticos ou com sintomas leves, mas em situações graves é uma condição que

pode levar à morte. Os sintomas podem ir desde fraqueza, palidez, cansaço ao mínimo esforço e hipotensão, etc.

Fisiologicamente a anemia é caracterizada por hemoglobina abaixo dos valores de referência, o normalmente acaba por influenciar a quantidade de hemoglobina por eritrócito e o número de eritrócitos, assim podemos classificar o tipo de anemia pelo VGM e pelo CHGM, o que nos permite obter informações acerca do que poderá estar a causar a anemia.

As anemias podem ser microcíticas, no caso do VGM se apresentar diminuído, normocíticas, no caso de o VGM estar normal, ou então macrocítica, no caso do VGM se apresentar aumentado. Posteriormente, tendo em conta o CHGM as anemias podem ser ainda hipocrômicas, normocrômicas ou “hipercrômicas”, no caso do CHGM se encontrar diminuído, normal ou “aumentado”, respectivamente.

Um exemplo de anemia microcítica e hipocrômica é a anemia ferropénica, a anemia mais comum, que se traduz na deficiência de ferro no organismo levando à deficiente produção do grupo hemo para a hemoglobina, sendo comum uma apresentação de um hemograma com VGM baixo, CHGM baixo e um RDW elevado por termos uma grande variedade de tamanhos de eritrócitos.

Um outro sinal clínico indicador de anemia é um possível aumento do nível de reticulócitos, no caso de uma anemia regenerativa, um sinal positivo para o prognóstico pois indica uma tentativa da medula de recuperar a homeostase, no entanto podemos ter anemias não-regenerativas em que os reticulócitos se encontram reduzidos, algo muito comum em casos de uma incapacidade da medula de produzir células da linhagem vermelha, como anemias aplásticas, falência renal, mieloma múltiplo, etc. Algo que normalmente é um mau prognóstico para o utente.<sup>95</sup>

### **- Leucograma**

O Leucograma é composto pela análise completa dos parâmetros leucocitários, incluindo a contagem total de leucócitos e a sua contagem diferencial, em absoluto e percentagem.

A contagem diferencial é a contagem individual de cada tipo de leucócito, ou seja, os neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, esta contagem é utilizada pelos clínicos para monitorizar a estado fisiológico dos utentes, pois fornece informações precisas acerca do estado imunológico e do estado do tecido medular e do seu funcionamento, permitindo o diagnóstico de diversas patologias que afetam esta linhagem e ainda, no caso de tratamentos em

curso, também nos vai fornecer informações da progressão ou regressão da doença, refletindo a eficácia do tratamento e assim o clínico já consegue sugerir um prognóstico.

### **- Tecnologia Coulter 3-D VCS**

O equipamento UniceL<sup>®</sup> DXH 800 *COULTER*<sup>®</sup> CAS, para além do princípio de *Coulter* que é utilizado na contagem total dos leucócitos, utiliza a tecnologia VCS para conseguir fazer a contagem diferencial dos leucócitos. A tecnologia VCS trata-se de uma ferramenta avançada e preciosa nas análises hematológicas, com base no volume, condutividade e pelos padrões de dispersão e absorção de luz pelas células, é possível ao equipamento distinguir as diferentes células da linhagem branca e ainda proceder à sua contagem.

O volume é determinado pela utilização do princípio de *Coulter* da impedância, uma forma capaz de medir o volume independentemente da posição das células na amostra.

A medição da condutividade das células é efetuada pela utilização de corrente alternada de radio frequências, que vai permitir ao equipamento receber informações importantes acerca da estrutura interna da célula como a sua composição química e o volume nuclear. Por fim, a partir da tecnologia de dispersão de luz num intervalo de ângulos de deteção de 10 a 70 graus, o equipamento recebe informações acerca das granulações celulares, lóbulos nucleares e estrutura da superfície celular.

Assim, com estas tecnologias a serem utilizadas em simultâneo num único canal de medição o equipamento vai ter a capacidade de rapidamente conseguir medir estas características celulares das células presentes nas amostras e, posteriormente, cada célula é ordenada numa espécie de histograma tridimensional em que as células com características similares vão ser apresentadas em “clusters”, cada “cluster” será um tipo diferente de células.

**Tabela 3** - Valores de referência para Leucograma na população da zona metropolitana de Lisboa.<sup>94</sup>

Parâmetro	Intervalo de valores		Unidades
	Homens	Mulheres	
Leucócitos	4,4 - 12,4	4,3 - 11,6	10 <sup>9</sup> / L
Neutrófilos	2,1 - 9,1 (43,4 - 76,0)	2,2 - 7,6 (46,1 - 75,1)	10 <sup>9</sup> / L (%)
Linfócitos	1,3 - 3,1 (16,9 - 46,1)	1,3 - 3,4 (16,5 - 43,4)	10 <sup>9</sup> / L (%)
Eosinófilos	0,0 - 0,5 (0,4 - 6,9)	0,0 - 0,5 (0,2 - 6,5)	10 <sup>9</sup> / L (%)
Monócitos	0,3 - 1,0 (4,3 - 11,9)	0,2 - 0,8 (3,3 - 10,9)	10 <sup>9</sup> / L (%)
Basófilos	0,0 - 0,1 (0,2 - 1,1)	0,0 - 0,1 (0,2 - 1,2)	10 <sup>9</sup> / L (%)

Tal como no Eritrograma, certos factores e condições fisiológicas podem influenciar os valores hematológicos da linhagem leucocitária e causar alterações dos valores do leucograma.

Em casos de leucocitose, ou seja, um aumento do número de leucócitos no sangue, pode ter como causa alergias, queimaduras, doenças inflamatórias como artrite reumatoide, infeções e cancro. Por outro lado, também pode ocorrer leucopénia, que pode ser devido a doenças autoimunes como a lúpus, infeção por HIV, dano no tecido medular por quimioterapia, radioterapia, entre outras. No entanto, apenas com o valor total de leucócitos, não é possível determinar a causa da variação detetada no leucograma, sendo nesta fase que a contagem diferencial dos leucócitos se sobressai e exhibe a sua importância.<sup>96</sup>

**Tabela 4** - Alterações da série branca e possíveis causas. <sup>97-103</sup>

<b>Linhagem</b>	<b>Condição</b>	<b>Possíveis causas</b>
<b>Neutrófilos</b>	<b>Neutrofilia</b>	<b>Distúrbios mieloproliferativos, infecções bacterianas (desvio à esquerda), doenças inflamatórias, hipoesplenismo, causas genéticas, dano nos tecidos (trauma, queimaduras).</b>
	<b>Neutropenia</b>	<b>Leucemia, linfomas, mieloma, agranulocitose, mielodisplasia, causa autoimune (Lúpus), sepsis, hiperesplenismo, medicação, quimioterapia, radioterapia, deficiência em vitamina B12 e folatos.</b>
<b>Linfócitos</b>	<b>Linfocitose</b>	<b>Infeções virais e por <i>Toxoplasma Gondii</i>, distúrbios linfoproliferativos (leucemia, linfoma), medicação, stress e hipoesplenismo.</b>
	<b>Linfopenia</b>	<b>Causas genéticas hereditárias, certas infecções virais (HIV, SARS COV-2, etc.), distúrbios autoimunes, linfoma, leucemia, síndromes mielodisplásicas, anemia aplástica, medicação, tratamentos oncológicos, álcool e malnutrição.</b>
<b>Eosinófilos</b>	<b>Eosinofilia</b>	<b>Reações alérgicas, infecções parasitárias, doenças autoimunes, síndromes mielodisplásicas e mieloproliferativos, leucemia, linfoma, certas neoplasias sólidas</b>
	<b>Eosinopenia</b>	<b>Sépsis, stress, infecção aguda, medicação.</b>
<b>Monócitos</b>	<b>Monocitose</b>	<b>Recuperação da medula óssea, exercício, infecções, esplenotomia, medicação, stress, leucemia, neoplasias, síndromes mieloproliferativos.</b>
	<b>Monocitopenia</b>	<b>Anemia aplástica, hemodiálise, queimaduras, SIDA, Tricoleucémia.</b>
<b>Basófilos</b>	<b>Basofilia</b>	<b>Hipotiroidismo, colite ulcerosa, mastocitose, leucemia eosinofílica, leucemia mieloide crônica.</b>
	<b>Basopenia</b>	<b>Reações de hipersensibilidade, hipertireoidismo, stress, síndrome de Cushing, gravidez.</b>

## **- Plaquetograma**

O plaquetograma é composto pela análise dos parâmetros plaquetares, baseando-se na contagem total do número de plaquetas circulantes, o volume plaquetar médio (VPM), o plaquetócrito (PCT) e o índice de distribuição plaquetária (PDW). O equipamento mede o número de plaquetas, VPM e PDW e depois faz o cálculo do PCT.

- $$PCT = \frac{n^{\circ} Plt * VPM}{10000}$$

**Tabela 5** - Valores de referência para plaquetograma na população da zona metropolitana de Lisboa.<sup>94</sup>

Parâmetro	Intervalo de valores		Unidades
	Homens	Mulheres	
Plaquetas	157 - 362	176 - 425	10 <sup>9</sup> / L
VPM	7,3 - 11,1	7,3 - 11,1	fL
PDW	15,2-17,7	15,1 - 17,5	%
PCT	0,152 - 0,299	0,157 - 0,351	%

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados multifuncionais originados a partir da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, sendo a sua função mais conhecida a tradicional, a função de regulação da hemostase e trombose assim como na manutenção dos tecidos dos vasos sanguíneos, mas recentemente chegou-se à conclusão de que também têm uma papel na resposta imune inata e regulação do crescimento tumoral. Após 5-7 dias existência nos vasos, caso ainda não tenham sido utilizadas nas suas funções, as plaquetas acabam por ser eliminadas ou por neutrófilos e macrófagos ou então são removidas pelo baço.<sup>104</sup>

As alterações mais comuns nas plaquetas são a trombocitose (aumento do número de plaquetas) que pode originar complicações graves como tromboembolismo venoso, AVC e ataques isquémicos. A trombocitopenia (diminuição do número de plaquetas) que pode originar complicações como hemorragias graves, hemorragias cerebrais e ataque cardíaco, podendo tanto a trombocitose como a trombocitopenia ocorrer por causas genéticas ou então serem adquiridas secundariamente a outra condição.

Na trombocitose genética temos a trombocitose familiar/hereditária e também, em alguns casos, a policitémia vera, que são causadas por mutações nos genes JAK2, CALR e MPL que acabam por causar um aumento na produção de plaquetas pela medula óssea.

Já quando há este aumento por causas secundárias ou reativas, a trombocitose pode ser secundária a uma infecção, inflamação, hemorragia, a uma asplenia funcional ou cirúrgica, doenças inflamatórias e a cancro ou doença mieloproliferativa crónica.<sup>105,106</sup>

No caso da trombocitopenia, várias condições podem levar a esta diminuição drástica dos níveis de plaquetas no sangue, como anemia aplástica, certas doenças autoimunes como a lúpus e a trombocitopenia imune, por cancro como no caso de leucemia ou linfoma e os tratamentos destas condições, infeções também podem levar a trombocitopenia e também podemos ter uma excessiva retenção de plaquetas pelo baço.<sup>107</sup>

### ***DxH Slidemaker Stainer Cellular Analysis System***

No circuito principal da hematologia, após a execução dos hemogramas das amostras, os esfregaços de sangue periférico são realizados pelo equipamento Unicel® DxH SMS, da casa comercial *Beckman Coulter*. Caso exista um pedido de avaliação do esfregaço sanguíneo pelo clínico ou caso os valores hematológicos do hemograma de uma amostra estejam alterados e seja necessária uma avaliação pelos especialistas no microscópio, a amostra é referenciada pelo sistema e segue para este equipamento.

O Unicel® DxH SMS tem a capacidade de realizar até 140 esfregaços por hora com opções variáveis de apenas o esfregaço, realização de esfregaço e coloração do mesmo ou então caso seja de interesse apenas realizar a coloração, necessitando apenas do tubo bem identificado e com o código de barras em bom estado e a identificação da lâmina do esfregaço é automática.<sup>108</sup>

### **Esfregaço de sangue periférico**

O esfregaço sanguíneo é um teste laboratorial que tem como objetivo a avaliação citológica das células sanguíneas fixadas numa lâmina, sendo um teste considerado simples e básico de se realizar, mas que, apesar da simplicidade da sua natureza, continua a ser um dos testes laboratoriais mais importantes no diagnóstico de doenças hematológicas. Isto, porque vai permitir ao hematologista uma análise morfológica do estado de todas as linhagens hematológicas por visualização direta destas pelo microscópio, onde será possível observar e identificar alterações nas mesmas, tanto quantitativamente como morfológicamente.

Assim, após a análise é possível realizar o diagnóstico e encaminhar a análise para testes confirmatórios como a imunofenotipagem, fazer uma monitorização do avanço da doença ou então da eficácia do tratamento em curso.

As características que se procuram obter quando se realiza a técnica do esfregaço são um esfregaço liso, regular e homogéneo, com a espessura decrescente da cabeça para a cauda e os bordos e franja bem definidos.

Já com o esfregaço realizado e em boas condições, segue-se a avaliação ao microscópio do esfregaço, inicia-se com uma passagem pela esfregaço todo com a objetiva 10x (x100ampliação) de forma a ter-se uma ideia do aspeto geral do esfregaço e conforme as descobertas encontradas, passa-se para as objetivas de maior ampliação para melhor observação e confirmação das mesmas, faz-se a contagem diferencial dos leucócitos, eritroblastos e plaquetas e avalia-se com atenção a morfologia das células.<sup>109</sup>

A estrutura normal de um esfregaço tem como constituição:

- **Cabeça do esfregaço:** Esta é a zona próxima da zona de deposição da gota de sangue e é zona mais espessa do esfregaço, sendo característico desta zona as células aparecerem muito sobrepostas com maior número de linfócitos e, portanto, não costuma ser uma zona de utilidade de contagem.
- **Corpo do esfregaço:** Zona intermédia do esfregaço entre a cabeça e a cauda, em que há presença mais homogénea de células, sendo a zona de eleição para a contagem diferencial e análise morfológica.
- **Cauda do esfregaço:** Esta é a zona final do esfregaço com menor espessura em que é mais utilizada para observar agregados plaquetares e certos tipos de parasitas com menores ampliações, é de evitar a observação com maiores ampliações pelo facto de as células se apresentarem distorcidas e assim fornecerem falsas informações do estado real das mesmas no sangue.

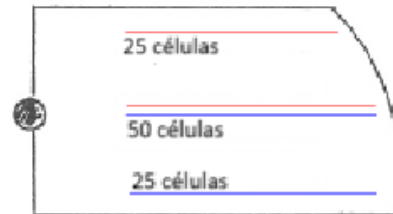
Como já foi referido anteriormente, a contagem diferencial dos leucócitos e a observação dos eritrócitos e das plaquetas estão inseridas na rotina de qualquer laboratório aquando da análise de um esfregaço. Para se realizar uma contagem diferencial de leucócitos de forma uniforme e que seja representativa do real número das diferentes linhagens no sangue, tem de haver uma standardização da metodologia de observação das laminas.

Primeiramente, decidir qual o número de leucócitos a contar na totalidade, isto vai depender do valor de leucócitos contador pelo contador automático (observar tabela 6), de seguida, deve-se

contar metade do número que se pretende contar em ambos os bordos do esfregaço e a restante metade no centro do esfregaço, tentando sempre que haja um varrimento geral do esfregaço.

**Tabela 6** - Tabela de contagem leucocitária.

Contagem total de leucócitos ( x 10 <sup>9</sup> /L)	Total de leucócitos contados na lâmina
< 4,0	50
4,0 - 11,0	100
11,0 - 20,0	200
20,0 - 30,0	300
>30,0	400



**Figura 14** - Exemplo de método de contagem (100 células).

Quando se observa um esfregaço sanguíneo podemos nos deparar com várias alterações nas células sanguíneas podendo indicar várias patologias dependendo de qual se observar.

Nos eritrócitos podemos ter alterações no tamanho, forma, cor, distribuição e inclusões intracitoplasmáticas.

**Tabela 7** - Exemplos de alterações na linhagem vermelha.<sup>110,111</sup>

Alteração	Características	Possíveis causas associadas
<b>Tamanho e Distribuição</b>		
<b>Microcitose</b>	VGM inferior aos valores de referência, eritrócitos mais pequenos do que o normal	Anemia ferropénica, talassemias, anemia sideroblástica, intoxicação por chumbo
<b>Macrocitose</b>	VGM superior aos valores de referência e com forma arredonda/ovalada	Alcoolismo crónico, doença hepática, anemia megaloblástica, síndromes mielodisplásicas
<b>Anisocitose</b>	Comum ter-se um VGM normal com o RDW elevado, notando-se uma variedade de tamanhos no esfregaço	Comum de existir quando há presença de distúrbio hematológico
<b>Rouleaux</b>	Eritrócitos aparecem empilhados, Aumento da VS	Gravidez, inflamações, infeções, mielomas
<b>Aglutinação</b>	Aglomerados de eritrócitos devido à ação de anticorpos	Anemias hemolíticas autoimunes, doença das aglutinas frias

**Tabela 7A** - Exemplos de alterações na linhagem vermelha.<sup>110,111</sup>

<b>Alteração</b>	<b>Características</b>	<b>Possíveis causas associadas</b>
<b>Cor</b>		
<b>Hipocromia</b>	Diminuição da coloração dos eritrócitos, aumento do tamanho do halo central	Deficiência em ferro, talassemias, anemia das doenças crônicas
<b>“Hiperchromia”</b>	Aumento da coloração, muitas vezes há perda do halo central	Esferocitose hereditária, muitas vezes não passa de um falso aumento da concentração de hemoglobina na amostra.
<b>Anisocromia</b>	Uma variedade de tonalidades dos eritrócitos, uns mais pálidos e outros normais	Resposta ao tratamento de anemia ferropénica, anemia sideroblástica
<b>Forma</b>		
<b>Esferócitos</b>	Eritrócitos esféricos (sem halo central) e microcíticos	Esferocitose hereditária, doença hemolítica do recém-nascido, anemia hemolítica autoimune
<b>Eliptócitos</b>	Eritrócitos em forma de charuto, alongados	Eliptose hereditária, anemia megaloblástica, anemia ferropénica, talassemias
<b>Dianócitos</b>	“target cells”, halo em forma de alvo	Hemoglobinopatias (drepanocitose, talassemias), doenças hepáticas, anemia ferropénica
<b>Drepanócitos</b>	Eritrócitos em forma de foice	Drepanocitose, anemia falciforme, outras hemoglobinopatias
<b>Dacriócitos</b>	Eritrócitos em forma de lágrima, gota ou pêra	Talasseмии, anemia ferropénica, mielofibrose, esplenotomia, doença renal
<b>Inclusões Eritrocitárias</b>		
<b>Pontuado basófilo</b>	Grânulos arredondados finos de tonalidade azulada que distribuídos por todo o eritrócito	Perturbações na eritropoiese, talassemias, anemias sideroblástica e megaloblástica, doenças hepáticas
<b>Corpos de Howell-Jolly</b>	Inclusões redondas maiores que o pontuado basófilo, geralmente 1/2 por célula de cor azul-escuro	Esplenectomia, anemia megaloblástica, anemia hemolítica severa

**Tabela 7B** - Exemplos de alterações na linhagem vermelha.<sup>110,111</sup>

<b>Inclusões Eritrocitárias</b>		
<b>Parasitas</b>	Dependendo do tipo de parasita e do seu estadio de vida, podemos ter inclusões em forma de anel, manchas de cor azulada/roxa, pontilhados, etc	<i>Plasmodium spp.</i>
<b>Alterações devido ao aumento da eritropoiese</b>		
<b>Eritroblastos</b>	Células levemente maiores que os eritrócitos normais que apresentam núcleo basófilo do tipo ovo estrelado	Talassemias, anemia falciforme, recuperação de uma hemorragia, anemias hemolíticas, anemias regenerativas
<b>Policromatofilia</b>	Aumento do número de reticulócitos, células sem halo central com uma tonalidade mais acinzentada	Anemias regenerativas, anemias hemolíticas, tratamento de anemias ferropénica ou megaloblásticas

No caso dos leucócitos também podemos observar vários tipos de morfologias dependendo do tipo de patologia que afete o indivíduo em questão, podendo tais alterações aparecer as várias linhagens de leucócitos.

Nos neutrófilos podemos ter vários tipos de alterações como:

**Tabela 8** - Exemplos de alterações da linhagem granulocítica.<sup>110</sup>

Alteração	Característica	Possíveis causas associadas
<b>Desvio à esquerda</b>	Neutrófilos com núcleo em banda	Infeções bacterianas, gravidez
<b>Desvio à direita</b>	Células macrocítica com núcleos com mais de 4 lóbulos	Anemia megaloblástica, citotóxicos que interferem na síntese de DNA
<b>Vacuolização tóxica</b>	As células apresentam vacúolos no citoplasma	Infeções bacterianas (vacúolos resultam da fagocitose das bactérias)
<b>Corpos de Döhle</b>	Grânulos citoplasmáticos lilases na periferia do citoplasma dos neutrófilos	Infeções graves como escarlatina, queimaduras, uso de citotóxicos, inflamações, às vezes na gravidez
<b>Drumsticks</b>	Projeção de cromatina em forma de extremidade de uma baqueta de tambor ou gota	Situação normal nas mulheres (existência de cromossoma X adormecido), no entanto quando em números elevados pode-se desconfiar de síndrome mielodisplásicos ou mieloproliferativo

Tabela 8A - Exemplos de alterações da linhagem granulocítica.<sup>110</sup>

<b>Alteração</b>	<b>Característica</b>	<b>Possíveis causas associadas</b>
<b>Granulações tóxicas</b>	<b>Grânulos de tonalidade azulada-escuro presentes nos neutrófilos</b>	<b>Resposta medular acelerada em resposta a infecções, queimaduras, tratamento com corticoides, gravidez</b>
<b>Células imaturas</b>	<b>Presença no esfregaço de células imaturas basófilas de maiores dimensões que as normais com elevada razão núcleo/citoplasma e granulação imatura</b>	<b>Uso de corticoides, gravidez, tumores sólidos na medula óssea, reações leucemoides</b>

Na linhagem linfocítica podem ser observadas alterações como:

Tabela 9 - Exemplos de alterações na linhagem linfocítica.<sup>110,112</sup>

<b>Alteração</b>	<b>Característica</b>	<b>Possíveis causas associadas</b>
<b>Linfócitos atípicos</b>	<b>Linfócitos de maiores dimensões que o normal, com razão núcleo/ citoplasma reduzidos e com a característica de os seus citoplasmas se rodearem as células vizinhas</b>	<b>Mononucleose infecciosa, outras infecções virais, vacinação</b>
<b>Tricoleucócitos</b>	<b>Linfócitos apresentam projeções citoplasmáticas em forma de cabelo</b>	<b>Leucemia a tricoleucócitos</b>
<b>Linfoblastos</b>	<b>Células precursoras dos linfócitos com maiores tamanho, cromatina imatura e menos condensada, razões núcleo/citoplasma reduzidas</b>	<b>Leucemias linfoblásticas, linfomas, neoplasias linfoides</b>
<b>Elevados plasmócitos</b>	<b>Número anormalmente elevado de plasmócitos no sangue</b>	<b>Linfoma angioblástico de células T, Hepatite A, Infecção por rubéola, Mieloma Múltiplo</b>
<b>Vacuolização citoplasmática</b>	<b>Presença de linfócitos com vacúolos citoplasmáticos</b>	<b>Leucemia linfocítica aguda L3, Linfoma de Burkitt</b>
<b>Sombras de Gumprecht</b>	<b>Artefacto produzido no momento da produção do esfregaço por fragilidade celular dos linfócitos, caracterizados por restos celulares basófilos em forma de sombra</b>	<b>Leucemia linfocítica crónica</b>

**Tabela 9A** - Exemplos de alterações na linhagem linfocítica.<sup>110,112</sup>

<b>Alteração</b>	<b>Característica</b>	<b>Possíveis causas associadas</b>
<b>Linfócitos grandes granulares</b>	<b>Linfócitos de grandes dimensões que apresentam pequenos grânulos azurófilos no citoplasma e razão núcleo/citoplasma reduzida</b>	<b>Leucemia linfocítica a grandes células T granulares (LGL-T)</b>

## ALIFAX® Test 1™

No circuito principal da área da Hematologia, a seguir a serem efetuados os hemogramas e lâminas nos equipamentos DXH 800, as amostras que estão nas racks azuis e amarelas tem de ser direcionadas para a análise da velocidade de sedimentação globular.

Este teste é efetuado pelo equipamento ALIFAX® Test 1™, da casa comercial ALIFAX®, utilizando um método de agregação dos eritrócitos e fornecendo os resultados em 5 minutos após o começo da análise. Este método tem elevada correlação com o método de Westgren, sem a necessidade de utilizar reagentes, tubos diferentes e apenas necessitando de 800µL no tubo do quais utiliza apenas 175 µL.

Permitindo o carregamento do mesmo com até 60 amostras e tendo uma capacidade de analisar até 180 amostras por hora.<sup>113</sup>



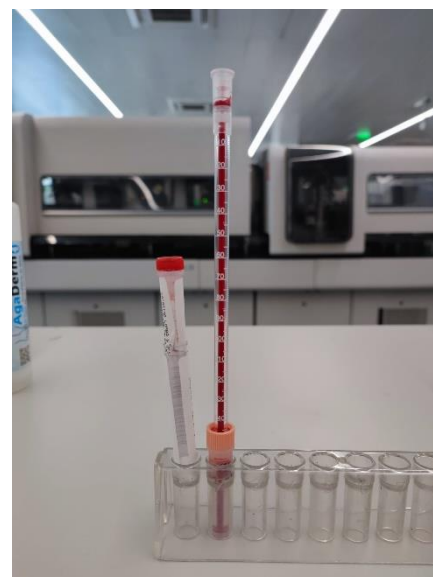
**Figura 15** - Equipamento ALIFAX® Test1 Adaptado de <https://www.alifax.com/products/esr-line/>

## Velocidade de sedimentação globular (VS)

A VS globular é um teste muito utilizado para se fazer uma monitorização do estado inflamatório no corpo. Apesar de fornecer informações importantes, é um teste que por si só não deve ser utilizado como teste de diagnóstico, sendo melhor utilizado em conjunto com outros testes.

Este é um teste que tem sido muito utilizado ao longo das últimas décadas com base no método de Westergren, que é o método de referência pelo Comitê Internacional para a Estandarização em Hematologia, e funciona por medição da distância, em milímetros, que uma amostra de sangue total com anticoagulante (EDTA) sedimenta num tubo estandardizado na vertical, por ação da gravidade, o tubo de Westergren.

O processo de sedimentação dos glóbulos vermelhos dá-se pelo amontoamento dos eritrócitos de forma natural por efeito da gravidade e acaba por ser afetado pela presença de elementos



**Figura 16** - Teste de VS manual utilizando método de Westergren.

produzidos durante o estado inflamatório, como as proteínas de fase aguda, induzido por uma infecção, tumor, doença autoimune.

Isto acontece porque os eritrócitos têm as suas membranas carregadas negativamente fazendo com que o seu amontoamento seja mais lento, mas durante um estado inflamatório a concentração de proteínas carregadas positivamente aumenta no sangue. Nesta fase, as proteínas vão neutralizar as cargas membranares dos eritrócitos e estes acabam por se amontoar em rouleaux (como um monte de moedas) muito mais rapidamente, aumentando a VS.

No entanto, também há condições que levam a uma diminuição da VS, como a policitémia, algumas hemoglobinopatias, esferocitose, alcoolismo regular, exercício físico regular, etc., por aumento da viscosidade do sangue ou por dificultar o empacotamento dos eritrócitos.<sup>114</sup>

**Possíveis causas de um aumento da VSG:**

- Anemia
- Infecções
- Doença renal
- Albumina sérica baixa
- Mieloma múltiplo
- Linfomas
- Artrite reumatoide
- Gravidez
- Diabetes Mellitus

## D-100 Hemoglobin Testing System

A última análise realizada no circuito principal da área da Hematologia é a determinação da hemoglobina glicada (HbA1c) tendo como alvo as amostras das racks de cor vermelho e amarelo.

Esta análise é realizada pelo equipamento D-100™ HbA1c Analyzer, da casa comercial BIO-RAD, que vai permitir determinar quantitativamente a HbA1c, detetando em simultâneo outras variantes de Hemoglobina, tudo com a capacidade de realizar 80 testes por hora.<sup>115</sup>



**Figura 17** - Equipamento D-100™ Hemoglobin Testing System.

## Determinação da Hemoglobina Glicada (HbA1c)

A hemoglobina é uma proteína encontrada exclusivamente nos eritrócitos e, como todas as proteínas, também ela é glicada na presença de glucose e de condições favoráveis para a reação. No caso da hemoglobina trata-se de uma glicação, ou seja, a glucose é adicionada à estrutura da hemoglobina numa reação não-enzimática, formando-se uma base de Schiff e, posteriormente, dá-se um rearranjo de Amadori convertendo-se a base de Schiff na HbA1c, processo irreversível.

Este processo ocorre continuamente *in vivo*, sendo normal a existência do mesmo no ciclo funcional da hemoglobina, acabando mesmo por existir uma pequena percentagem de HbA1c no sangue, em pessoas saudáveis. No entanto, nos casos de diabetes Mellitus, os níveis de glucose sérica acabam por se encontrar elevados repetidamente, o que favorece muito a formação da HbA1c e, juntamente com o tempo de vida média de 3 meses dos eritrócitos, torna este produto um excelente marcador dos níveis médios de glucose nos períodos anteriores à análise. Assim, esta análise é muito utilizada a nível mundial como controlo apertado dos níveis de glucose e da diabetes Mellitus.<sup>116,117</sup>

O método de funcionamento do teste HbA1c, no equipamento D-100, utiliza como princípio a cromatografia líquida de elevada resolução por troca iónica. Em que as amostras são injetadas na coluna, ficando agregadas à fase sólida, posteriormente, é adicionada a fase líquida e de forma a

eluir as diferentes hemoglobinas de forma seletiva, o equipamento faz um gradiente crescente de força iônica.

Conforme as hemoglobinas vão sendo eluídas, estas vão passando pela célula de fluxo e pelas alterações da absorvância a 415nm, o equipamento tem a capacidade de calcular os valores de HbA1c utilizando um algoritmo de Gauss exponencialmente modificado.<sup>115</sup>

**Valores de referência:**

- Normal - 4,0-5,7 %
- Pré-diabetes - 5,8-6,4%
- Diabetes -  $\geq 6,5\%$

**Factores que podem influenciar os valores de HbA1c:**

- Anemia falciforme
- Anemia
- Talassemias
- Falha renal
- Doença hepática
- Transfusões de sangue recentes
- Gravidez

## Sistema *BCS®-XP*

Na secção da coagulação os testes da hemostase eram realizados pelos dois equipamentos *BCS®-XP*, da casa comercial *Siemens*, com a capacidade de realizar aproximadamente 380 testes por horas e fornecendo um vasto leque de testes de análise.<sup>118</sup>

O seu funcionamento baseia-se na conversão da intensidade de luz, detetada no fotodetector durante toda a medição, num sinal elétrico que vai servir para construir uma curva cinética. A partir desta curva, dependendo do tipo de teste, este equipamento utiliza quatro tipos de método de medição para calcular os resultados finais, como:



**Figura 18** - Equipamento *BCS®-XP*.<sup>118</sup>

- **Método coagulométrico** - dá-se a medição do tempo de formação de um coágulo de fibrina ou o tempo que se demora a atingir outro ponto limite, isto leva à redução de intensidade de luz que chega ao detetor devido ao aumento da turvação da amostra.
- **Métodos cinéticos** - é medida a velocidade à qual a reação ocorre.
- **Método cromogénico** - medição enzimática com auxílio de substratos cromogénicos, em que há alteração da absorção da luz devido à formação de pigmentos.
- **Métodos imunoquímicos** - utilizados para medir a concentração das proteínas, pela utilização de partículas de látex com anticorpos ligados. Formam-se agregados e assim aumenta a turvação.

## Coagulação

A segunda secção que me foi possível acompanhar na área da Hematologia, foi a secção da coagulação, onde pude acompanhar dois coagulómetros automáticos que têm a capacidade de processar vários testes de coagulação como o Tempo de protrombina, a PTT, o Fibrinogénio, Antitrombina III funcional, D-Dímeros, Proteína S livre, Proteína C funcional, Fator V, VII e VIII, Anticoagulante lúpico, Resistência à proteína C activada, Fator de Von Willebrand e tempo de trombina.

Nesta secção, as amostras que são recebidas são do tipo sangue total sobre citrato de Sódio e os equipamentos que fazem o processamento destas são dois BCS<sup>®</sup>-XP, ambos totalmente automáticos e destinados à realização de testes para a avaliação da hemostase.

Para este tipo de testes é de extrema importância que haja a realização de um processamento específico das amostras antes e depois do processamento das mesmas. Iniciando-se na verificação da integridade das etiquetas e códigos de barras e na observação da existência de coágulos por inversão suave dos tubos, de seguida verifica-se se os tubos necessitam de nova centrifugação (normalmente neste laboratório faz-se sempre uma centrifugação antes de analisar as amostras recém chegadas, mesmo que já venham centrifugadas), processa-se o respectivos controlos dos testes que vamos efetuar e após a realização dos testes deve-se colocar as amostras em suportes próprios à temperatura ambiente, para caso seja necessária nova utilização. Caso não haja possibilidade de processar a amostra no mesmo dia, refrigera-se a mesma a -20°C.

A hemostase é o mecanismo fisiológico que tem como função primária a interrupção de hemorragias nos vasos sanguíneos, a partir do envolvimento de várias procedimentos interligados em cascata, levando à formação de uma espécie de rolhão na zona do tecido onde seu o dano.

De forma a este mecanismo ser possível vários componentes entram em ação, como as células do endotélio do vaso sanguíneo, que vão produzir certos factores de coagulação, os sinalizadores para a vaso constricção e recetores de ancoramento das plaquetas. As plaquetas que por ação dos marcadores inflamatórios e citocinas do endotélio mais factores de ativação libertados dos seus grânulos citoplasmáticos vão formar o rolhão plaquetário e o fígado que vai produzir nos hepatócitos a maioria das vitaminas e factores de coagulação necessários para o funcionamento de todos os processos da hemostase, incluindo os anticoagulantes para a dissolução do rolhão final de trombina.

Assim, o controlo do funcionamento deste mecanismo fisiológico por testes analíticos é muito importante em inúmeros casos, como em avaliações perioperativas, em casos de pacientes com condições que afetem este mecanismo e tenham de ter um controlo apertado e ainda em pacientes que tenham tido problemas cardíacos e necessitem de monitorizar a atividade de agentes anticoagulantes.<sup>119</sup>

As condições que afetam a hemostase podem levar a problemas de hipercoagulação como é o exemplo do síndrome anticorpo anti-fosfolipídico, da mutação no factor V de Leiden, deficiência em proteína C e S, etc. Por outro lado, também há condições que levam a problemas de

hipocoagulação como a doença de Von Willebrand, hemofilia, coagulação intravascular disseminada, etc.<sup>119</sup>

### **- Tempo de protrombina (Thromborel S)**

O TP é um dos testes rotineiros de avaliação do estado da hemostase, rastreio de perturbações na mesma, monitorização de terapêuticas de anticoagulação, avaliação perioperatória, etc., mais utilizado a nível clínico, sendo utilizado especificamente para a avaliação das vias intrínseca e extrínseca da coagulação. Permitindo assim a deteção de deficiências em diversos factores de coagulação presentes nestas vias, como o factor II, V, VII e X juntamente com as concentrações de fibrinogénio.

Várias condições podem levar a uma aumento do valor do PT, como doença hepática, por diminuição da síntese de factores e vitaminas importantes na hemostase, malnutrição, uso prolongado de antibióticos e má absorção de gorduras levam a uma deficiência em vitamina K. Certas doenças genéticas levam também à deficiência de factores de coagulação, a DIC leva a uma menor disponibilidade dos mesmos, terapias com antagonistas de vitamina K (VKA) e anticorpos antifosfolípidos que levam à redução dos níveis de protrombina no sangue.

O princípio do método de funcionamento do teste é muito simples, sendo apenas desencadeado o processo de coagulação após incubação da amostra com o reagente do teste, que é uma mistura de tromboplastina placentárias humana liofilizada e cloreto de cálcio, mede-se o tempo que se demora a formar um coágulo de fibrina na amostra.<sup>120</sup>

No entanto, como este teste é muito dependente das concentrações dos constituintes do reagente de tromboplastina de cada laboratório, o mais correto a fazer-se é dar-se os resultados obtidos nas medidas internacionais utilizando o INR, que se obtém fazendo a razão entre o PT obtido na análise e a média dos PT's de controlos normais do laboratório, tudo à potência do índice de sensibilidade internacional (entre 1,0 e 1,4) estandardizado pela OMS.<sup>121</sup>

$$INR = \left( \frac{PT \text{ amostra}}{Média \text{ dos } PT's \text{ dos controlos normais}} \right)^{ISI}$$

**Valores de referência:****Normal** - INR  $\leq 1,1$ **Normal (VKA)** -  $2 \geq \text{INR} \leq 3$ **Interferências:**

- **Policitemia (Ht  $\geq 55\%$ )**
- **Tubos com pouco volume de amostras**
- **Terapêuticas com anticoagulantes**
- **Mau armazenamento das amostras**
- **Lipemia**

**- Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (Pathromtin SL)**

O aPTT é um teste de rastreio da coagulação que nos permite averiguar o estado do mecanismo hemostático pela estimativa da atividade da via intrínseca e da via comum da cascata de coagulação, avaliando os níveis dos factores como o factor II, o factor V e o fibrinogénio.

Para além disto, é muito utilizado no rastreio de certas patologias como deficiência em factores de coagulação, na monitorização de terapias de heparina não-fracionada e também para detetar a presença de anticorpos lúpicos, avaliação perioperatória, .

Como princípio metodológico temos a incubação da amostra com um reagente que vai proceder à ativação da cascata de coagulação, por ação de uma quantidade ótima de fosfolípidos e um ativador de superfície, medindo-se o tempo até à formação do coágulo de fibrina.

Tal como no tempo de protrombina, o aPTT apresenta uma grande variabilidade entre laboratórios devido à grande oferta em diferentes reagentes e de analisadores automáticos, cada um apresentando resultados diferentes e, portanto, os resultados são dados em forma de razão entre o tempo do paciente e o tempo considerado normal pelo laboratório.<sup>122,123</sup>

**Valores de referência:****Normal** - INR  $\leq 1,1$ **Normal (VKA)** -  $2 \geq \text{INR} \leq 3$ **Interferências:**

- Certos antibióticos
- Terapêuticas com anticoagulantes
- Toma de anticoncecionais

**- Fibrinogénio (Multifibren U)**

O fibrinogénio, também conhecido por factor I, é uma glicoproteína plasmática de 340 kDa muito reconhecida pela importância das suas funções vitais ao funcionamento da hemostase no corpo, estando presente em elevadas concentrações, nos indivíduos saudáveis.

A sua síntese é realizada pelo fígado, libertando-se no sangue a partir dos hepatócitos, sendo largamente regulada a vários níveis transcricionais e translacionais, já que o fibrinogénio tem a

particularidade de se tratar de uma proteína de fase aguda, ou seja, em caso de inflamação os seus valores elevam-se para valores superiores aos basais, no entanto a sua regulação ainda não é completamente compreendida.

Como já foi dito anteriormente, o fibrinogénio apresenta importantes funções no funcionamento da hemostase e relações com outros intervenientes na cascata de coagulação como as plaquetas, os restantes factores de coagulação, leucócitos, células endoteliais e recetores celulares plaquetares, que vão permitir uma cinética muito dinâmica na formação do coágulo de fibrina e, posteriormente, a sua degradação.

O fibrinogénio, como precursor da fibrina, tem de ser convertido nesta por um complexo processo de clivagem proteolítica mediado pela trombina, que por sua vez é também produzida pela ação de uma cascata de ativações a partir da protrombina. Todo este processo vai formar filamentos de protofibrina que vão se associar num coágulo primário de fibrina muito instável e, pela continuidade da cascata de coagulação nas suas vias intrínseca e extrínseca, acabam por se formar fibras maduras de fibrina que vão fortalecer e estabilizar o coágulo primário.

Este ensaio vai permitir o diagnóstico e rastreio de diversas patologias e condições congénitas ou adquiridas que possam levar a uma deficiência da função ou redução da concentração do fibrinogénio, levando a um mau funcionamento deste mecanismo e que conseqüentemente afeta a capacidade do corpo de responder a situações como trombose, gravidez, inflamação, infeção, cancro e outras patologias. O ensaio permite ainda a manutenção de alguma terapêutica de substituição do fibrinogénio em curso.<sup>124-126</sup>

O princípio do procedimento deste ensaio baseia-se numa modificação do método de Clauss, em que é medido o tempo que demora a formação do coágulo após a adição de uma quantidade elevada de trombina à amostra, assim permitindo a determinação quantitativa do fibrinogénio, já que este processo depende praticamente do teor do mesmo na amostra.<sup>124</sup>

#### **Valores de referência:**

**Normal** - 1,8 - 3,5 g/L

#### **- D-Dímeros**

Os D-dímeros são produtos de degradação dos coágulos, estas moléculas formam-se pela ligação covalente dos domínios D localizados nos monómeros de fibrina e nas plaquetas ativadas.

#### **Interferências:**

- Produtos de degradação da fibrina
- Terapêuticas com anticoagulantes
- Inibidores de trombina

Quando se dá o processo de coagulação, o factor de coagulação XIIIa vai funcionar ligando covalentemente as plaquetas e monómeros de fibrina pelos domínios D, fortalecendo o coágulo.

Após o coágulo estar formado, a plasmina vai iniciar o processo de degradação do coágulo de fibrina por clivagem nos domínios D dos monómeros de fibrina interligados, levando à produção e libertação dos D-dímeros, na corrente sanguínea, onde vão ser eliminados, após aproximadamente 8 horas, pelos rins e sistema reticuloendotelial.

Este analito pode ser encontrado em níveis baixos, nos indivíduos saudáveis, mas várias condições podem elevar os seus níveis para níveis considerados patológicos, bastando haver uma formação aumentada de fibrina otimizada e fibrinólise, como no caso de tromboembolismo venoso, DIC, cancro, cirurgia, gravidez e doenças inflamatórias.

Assim, este ensaio analítico tem como principal aplicação a exclusão de vários eventos tromboembólicos, em conjunto com outros ensaios analíticos, sendo muito eficazes na deteção e exclusão de tromboembolismo vascular em diversas situações de risco, como operações, cancro, aneurisma aórtico, cirrose hepática, DIC, etc.

O princípio do procedimento deste teste é a utilização de partículas de poliestireno revestidas com anticorpos monoclonais que se vão ligar aos D-dímeros presentes nas amostras, fazendo com que estas se agreguem e façam aumentar a turvação, sendo depois esta medida por turbidimetria.<sup>127,128</sup>

#### **Valores de referência:**

**Normal** - <0.50 µg/L

#### **Possíveis interferências:**

- Gravidez
- Tabagismo
- Cancro
- Trauma
- Infeções

## Citómetro *Navios EX*

Na secção da Citometria de fluxo da área da hematologia, o equipamento de eleição pelo laboratório para a realização das análises de Citometria de fluxo é o *Navios EX*, da casa comercial Beckman Coulter.

Tratando-se de um equipamento que permite a avaliação das características físicas e químicas das células, por marcação prévia das mesmas com anticorpos monoclonais específicos que se encontram conjugados com fluorocromos.

O *Navios EX* tem uma capacidade de carregamento de 32 amostras e apresenta uma performance de até 82 amostras por hora ou 89 amostras por hora em amostras concentradas, possuindo três lasers diodo de cores azul, vermelho e violeta a 488nm, 639 nm e 405 nm, respectivamente, e para a deteção dos sinais possui 3 detetores diferentes como o detetor de fotodiodo de dispersão frontal, lateral e os detetores de fluorescência, que vão transformar os sinais luminosos produzidos pela dispersão da luz emitida pelos lasers nas células e transformar esses sinais luminosos em sinais elétricos com a informação detalhada das células.<sup>129</sup>

### Citometria de Fluxo

A Citometria de fluxo é uma tecnologia de análise celular que permite analisar, individualmente, múltiplos parâmetros celulares ou de partículas numa solução tampão salina isotónica, pela dispersão de luz emitida nelas por lasers e pela deteção de padrões de fluorescência.

Nos citómetros, os diferentes parâmetros possíveis de se analisar por esta tecnologia vão desde o tamanho celular, que nos é dado pela medição dos padrões de dispersão detetados pelos detetores frontais e a complexidade interna, que é medida por outros padrões de dispersão detetados pelos detetores laterais e juntos nos vão permitir diferenciar as várias linhagens celulares.

Depois, a partir dos padrões de fluorescência, é nos possível detetar, analisar e monitorizar certos componentes celulares de interesse, pela marcação prévia dos mesmos componentes celulares com vários tipos de reagentes diferentes, dependendo daquilo que se quer analisar, podendo ir desde DNA, RNA, componentes membranares, etc.



**Figura 19** - Equipamento Navios EX.

Estes diferentes reagentes incluem diversos métodos de marcação celular, como anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, corantes que se ligam a estruturas específicas como, DNA, RNA e iões e, por fim, proteínas fluorescentes.

No final de todo o processo e após a deteção dos diferentes padrões pelos detetores, as informações são processadas e analisadas a partir do programa *Infinicyt* no computador ligado ao equipamento, sendo apresentadas na forma de histogramas e gráficos de pontos com duas características ou marcadores correlacionados, o que vai permitir uma elevada flexibilidade da apresentação dos diversos imunofenótipos e características físicas que se possam ter sido pesquisados e assim auxiliando a análise.

Graças a esta elevada variabilidade de aplicações a nível celular, a citometria de fluxo tornou-se uma ferramenta muito útil em diversas áreas da biologia celular e sistema imune, como na imunologia, biologia molecular, bacteriologia, virologia, biologia do cancro e monitorização de doenças infecciosas.<sup>130</sup>

No laboratório central de Lisboa da SYNLAB, esta área é apenas utilizada para a monitorização da evolução do estado da doença dos pacientes HIV positivos e no rastreio, identificação e confirmação de leucemias e linfomas por imunofenotipagem, utilizando os tais diversos padrões de marcação fluorescente referidos anteriormente.

Portanto, no caso da imunofenotipagem, certas amostras são redirecionadas do circuito principal para esta área por deteção de parâmetros ou características suspeitas no hemograma e esfregaço de sangue. Nesta fase, vai-se proceder à pesquisa e confirmação de antigénios típicos das condições malignas que se possam suspeitar, por uma preparação específica das amostras com marcadores específicos de cada linhagem ou tipo de células malignas.

Nos casos das diferentes linhagens se encontrarem saudáveis e sem nenhuma expressão aberrante, os seguintes marcadores são considerados normais de ser expressos:

**Tabela 10** - Marcadores imunofenotípicos comuns das linhagens celulares hematológicas.<sup>131-134</sup>

Linhagem celular	Marcadores imunofenotípicos
Linfócitos T	Expressão de CD7, CD45, CD2, CD5, CD3, CD4 ou CD8 dependendo se <i>helper</i> ou citotóxico
Linfócitos B	Expressão de CD19, CD79a, CD20, CD23, CD45, CD10 e as cadeias pesadas e leves das imunoglobulinas
Neutrófilos	Expressão de CD13, CD11b, CD15, CD16, CD35, MPO, CD10

**Tabela 10A** - Marcadores imunofenotípicos comuns das linhagens celulares hematológicas.<sup>131-134</sup>

<b>Linhagem celular</b>	<b>Marcadores imunofenotípicos</b>
Eosinófilos	Expressão de CD45, Cd11b e c, CD13, Cd15, Cd33
Basófilos	Expressão de CD9, CD13, CD22, CD25 (fraco), CD33, CD36, CD38(forte), CD45(fraco), CD123(forte)
Monócitos	Expressão de CD4, CD13, CD15, CD33, CD36, HLA-DR, CD11b e c, CD14, CD64
Megacariócitos	Expressão de CD38, CD41, CD42, CD61

Estes são os marcadores comuns benignos nestas linhagens, simbolizando uma produção e maturação normal das mesmas.

No entanto, quando há suspeita de alguma patologia ou condição conhecida, faz-se uma pesquisa dos respectivos marcadores malignos comuns nas respectivas condições patológicas, como por exemplo:

**Tabela 11** - Marcadores imunofenotípicos de certas patologias hematológicas.<sup>135</sup>

<b>Patologia</b>	<b>Marcadores imunofenotípicos</b>
Células precursoras	Expressão de HLA-DR, TdT, CD34, CD117
Leucemia linfocítica crónica	Expressão de CD20, CD22, CD23 e FMC-7 negativo
Leucemia prolinfocítica	Expressão de CD20, sIg, FMC-7, CD5
Leucemia de Tricoleucócitos	Expressão de Cd20, CD22, CD11c, CD25, CD103, sIG
Linfoma/leucemia das células T do adulto	Expressão de CD7, CD25, HTLV-1
Leucemia das grandes células T granulares	CD5, CD7, CD16, granenzima-B, perforina, CD56
Linfoma das células do manto	Expressão de CD20, CD5 +/-
Linfoma folicular	Expressão de BCL-2, CD43
Linfoma de Burkitt	Expressão de BCL-2, CD10, CD43
Linfoma das grandes células B difuso	Expressão de BCL-2, CD43

## Controlo de Qualidade

Uma das coisas mais importantes de qualquer laboratório de análises clínicas é o controlo de qualidade do mesmo, com a definição de qualidade laboratorial sendo a precisão, fiabilidade e a rapidez dos resultados dos ensaios reportados.

Os resultados laboratoriais têm de ser sempre o mais precisos possível em relação ao valor real, com as características e estratégias analíticas do laboratório sempre o mais seguras, fidedignas e confiáveis e sempre tentando que estes resultados sejam reportados no menor período de tempo possível, garantindo assim que estes resultados beneficiem a saúde pública, apresentando a maior utilidade possível.

No entanto, há momentos de ineficácia do controlo de qualidade, ocorrendo erros do laboratório e despoletando várias consequências que se tornam situações muito indesejadas, tanto para o laboratório como para os utentes. Por exemplo, quando um laboratório reporta um resultado impreciso, pode estar a causar a aplicação de terapêuticas desnecessárias e/ou inadequadas num utente, um atraso no correto diagnóstico e um desperdício de tempo e dinheiro em testes adicionais de rastreio, confirmação, etc., tudo consequências muito graves que podem significar um risco na saúde do utente e, em certos casos específicos, até de terceiros pertencentes ao círculo pessoal do mesmo.

Assim, é de extrema importância a formação de um sistema eficaz e eficiente de gestão da qualidade nos laboratórios de análises, que consiga controlar, gerir e organizar todo os processos, procedimentos e pessoal do laboratório para a manutenção da performance em todos os aspetos e em todas as fases do ciclo ao qual uma análise faz parte, desde a fase pré-analítica, até à fase pós-analítica.

O conceito de controlo de qualidade já é algo presente na sociedade desde o início do século vinte, na altura terá sido proposto para áreas da indústria fabril, sendo apenas começado a ser aplicado em laboratórios de análises a partir de 1940. Atualmente, os conceitos da gestão e controlo de qualidade evoluíram e formou-se organizações próprias para a criação de standardizações internacionais para as diferentes áreas, incluindo os laboratórios de diagnóstico médico, e para a



**Figura 20** - Diferentes fases de uma análise clínica.<sup>136</sup>

criação de diretrizes de auxílio aos laboratórios no desenvolvimento dos seus respectivos sistemas de gestão e controlo de qualidade. Como é o caso da ISO, *International Organization for Standardization*, e o CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*.<sup>136</sup>

O laboratório central de Lisboa da SYNLAB atualmente encontra-se certificado pela Empresa Internacional de Certificação e sustenta a sua atividade no contexto das normas NP EN ISO 9001:2015, NP EN ISO 15189 e Manual de Boas Práticas Laboratoriais (MBPL).

O laboratório apresenta um sistema de gestão de qualidade desenhado de forma a permitir um aperfeiçoamento proativo e contínuo do mesmo, por forma de utilização de indicadores de qualidade passíveis de serem mensuráveis nas demais fases de atuação do laboratório, demonstradas na **Figura 20**.

Pela utilização dos indicadores e por uma estandardização dos processos e as atividades do laboratório, é possível fazer-se um controlo mais apertado dos diferentes processos a ocorrer no laboratório e uma maior prevenção dos erros. Por exemplo, pela afixação das instruções de trabalho, das manutenções diárias, mensais e anuais de cada equipamento, procedimentos de aplicação das diferentes calibrações e utilização dos controlos internos e os respectivos intervalos temporais em que se devem realizar os mesmos. São ainda efetuadas frequentemente auditorias internas e externas e aplicação de controlos externos de qualidade por entidades reguladas que visam a avaliação do sistema de gestão da qualidade e se o mesmo está a ser respeitado pelo pessoal do laboratório.

Quando se é detetado algum erro, tomam-se ações corretivas nos respectivos procedimentos, equipamentos e ensaios, de forma a que o mesmo seja erradicado e a probabilidade de se voltar a repetir seja muito reduzida.<sup>136</sup>

### **Controlo de Qualidade Interno**

Uma das formas de controlar a qualidade de todo o processo analítico e de manter a mesma em níveis desejados é o controlo apertado dos valores dos ensaios, que é possível pela utilização de controlos para todos os ensaios praticados no laboratório, tanto quantitativos como qualitativos e semiquantitativos.

A utilização destes controlos permite detetar vários tipos de problemas que possam afetar a performance de um ensaio e os respetivos resultados por ele obtidos, sejam problemas mecânicos dos equipamentos, problemas com os reagentes e até mesmo mau desempenho do pessoal. Estes

problemas são depois avaliados e correções são aplicadas conforme seja necessário, tornando todo o processo seguro e confiável. Dependendo do tipo de ensaio em questão os controlos vão apresentar diferentes procedimentos de aplicação e diferentes formas de se avaliar a informação que nos dizem.<sup>136</sup>

### **- Ensaio quantitativo**

No caso dos ensaios quantitativos, temos um tipo de atuação mais simples e direta, pois os controlos deste tipo de ensaio têm como função determinar se o equipamento está a fornecer resultados fidedignos, precisos e exatos. Isto é possível pois os controlos são espécies que mimetizam amostras biológicas já com valores do analito conhecidos e, após serem analisados nas mesmas condições que as amostras dos utentes, o equipamento dá uma determinação do valor de analito no controlo.

Depois, com os vários valores obtidos para cada tipo de analito, são efetuados estudos estatísticos que vão permitir ao laboratório perceber se o equipamento/processo está conforme o desejado ou não, sendo o mais comum para estes estudos a realização de cartas de controlo com os resultados obtidos ao longo de mais ou menos 30 dias.

Após este período é seguro calcular-se uma média e desvio-padrão fidedignos para cada ensaio e fazer-se uma representação gráfica do comportamento do controlo diariamente, onde se vai aplicar as regras de Westgard, que nos permitem controlar de forma apertada e agir rapidamente em caso de algum critério de rejeição seja detetado.<sup>136</sup>

No laboratório central SYNLAB é efetuado um estudo estatístico para cada controlo, realizando-se uma obtenção de 20 a 30 pontos antes de se começar a utilizar o controlo, depois é calculada uma média móvel e 3 níveis positivos e negativos de desvio padrão e representa-se estas informações calculadas, mais os pontos diários, num gráfico de Levey-Jennings, aplicando-se regras de Westgard modificadas internamente.

Após a formulação destes gráficos cada ensaio é controlado várias vezes por dia, sendo o mais comum cerca de 3 vezes ao dia, em 3 níveis diferentes de concentração (nível baixo, normal e patológico) e todos esses pontos vão sendo adicionados aos gráficos para avaliação e observação da variabilidade da média móvel. Quando um ponto ultrapassa o segundo nível de desvio-padrão, negativamente ou positivamente, ou quando se começa a notar uma tendência no comportamento,

o processo é interrompido e são efetuadas medidas de correção, como mudar o regente e calibrar o ensaio e repete-se o controlo até o mesmo voltar para valores aceitáveis.

### **- Ensaio Qualitativo e semiquantitativo**

Neste tipo de ensaios o controlo de qualidade funciona de uma forma diferente da dos ensaios quantitativos, pois nestes não há uma determinação exata da concentração de um analito, mas sim apenas a sua deteção ou então a avaliação de alguma característica celular, etc.

Assim, estes tipos de ensaios possuem uma grande variedade de diferentes tipos de controlo, desde controlos internamente integrados no próprio teste, como é o caso dos testes rápidos, a controlos tradicionais e culturas padrão na área da microbiologia.

No entanto, tal como nos ensaios quantitativos, estes controlos são aplicados em várias alturas do dia para um maior controlo e gestão da qualidade dos resultados obtidos pelos ensaios e, em caso de algum critério de rejeição ser cumprido, faz-se também um estudo para se descobrir a fonte do erro e corrige-se o mesmo.

### **Controlo de Qualidade Externo**

O controlo de qualidade externo será outro tipo de controlo de qualidade que qualquer laboratório deve estar sujeito para conseguir manter a qualidade e confiança dos seus resultados.

A norma NP EN ISO 15189 indica que os laboratórios de análises clínicas devem participar em grupos interlaboratoriais de avaliação externa de qualidade, necessitando o laboratório de se inscrever num programa de avaliação externa de qualidade em que são enviadas periodicamente amostras com valores desconhecidos de certos analitos a analisar.

Os laboratórios em teste têm o papel de analisar as amostras do programa, enviar os seus resultados de volta para o programa, os resultados do grupo interlaboratorial são avaliados, é feita uma comparação estatística entre todos os laboratórios e entre os resultados individuais em relação ao valor real da amostra.

A importância de todos este processo é que vai nos permitir ter uma determinação rápida e eficaz dos certos erros sistemáticos difíceis de detetar internamente, devido ao facto destas amostras mistério serem tratadas e analisadas como se fossem amostras comuns de utentes, levando a uma melhor representação da realidade dos processos analíticos do laboratório, ainda por ser um

controlo sistemático periódico, permite ao mesmo tempo um processo de melhoria e monitorização continua dos mesmos e assim os laboratórios em avaliação podem avaliar e validar os seus métodos e desempenho do pessoal.<sup>136</sup>

O laboratório central SYNLAB, apresenta-se inscrito em alguns programas de avaliação externa da qualidade, como o INSA, RIQAS, NEQAS e SEQC, efetuando todo este processo anteriormente falado nas diversas áreas do laboratório.

## **Conclusão**

A realização do estágio curricular no laboratório central de Lisboa do grupo SynlabHealth II, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, permitiu-me o acompanhamento e participação na rotina laboratorial das áreas da Triagem, Bioquímica, Hematologia e Microbiologia. Nas quais consegui aprofundar e colocar em prática conhecimentos obtidos no mestrado, referente às valências das fases pré-analítica, analítica e pós-analítica.

Foi-me possível trabalhar com equipamentos de alta performance com vários tipos de ensaios clínicos nas várias áreas do laboratório, assistir à colheita e tratamento de amostras, preparação de reagentes, manutenção dos equipamentos, proceder à coloração de amostras e acompanhar o processo de análise de amostras com suspeitas de micobactérias.

No geral, foi de extrema importância perceber os métodos de funcionamento, organização e gestão de um grande laboratório, fornecendo-me competências e conhecimentos fulcrais para o futuro nesta área da ciência.

## **SEGUNDA PARTE**

## Introdução

A Hepatite B é uma doença hepática necroinflamatória causada pela infeção pelo HBV e é um problema mundial de saúde considerado grave devido ao facto de, em 5-10% dos casos, o hospedeiro acabar por não conseguir eliminar o vírus acabando por provocar, após uma infeção inicial, uma infeção persistente que leva a uma hepatite crónica. Esta está associada a uma inflamação crónica, com um ciclo repetido de dano e regeneração do tecido hepático, promovendo a tumorigénese deste e aumentando o risco de se desenvolver cirrose e hepatocarcinoma celular. Este último apresenta uma incidência de 10-25% nas infeções crónicas e a incidência de HCC associado a HBV em fígados cirróticos é de 70-90% dos casos.<sup>83,84</sup>

De forma a elucidar a distribuição deste vírus, é utilizado o marcador serológico HBsAg. Em 2016, estimava-se que existiam 292 milhões de casos (3,9% da população mundial), dos quais apenas 10 milhões tinham o diagnóstico de infeção por HBV e destes, apenas 4.8 milhões tinham recebido tratamento.<sup>137</sup>

Actualmente, o número elevado de infeções crónicas resulta em cerca de 800,000 de mortes a cada ano devido a cirrose e HCC, que é a quarta maior causa de morte por cancro por ano, sendo 10-100x maior o risco de desenvolver HCC em pessoas cronicamente infetadas com HBV em comparação com pessoas não-infetadas. Outro facto interessante, é que mesmo com tratamento e após ser dada como curada a infeção por HBV este risco é reduzido, mas não eliminado.<sup>84-86</sup>

Um outro grave problema desta infeção é a diversidade de vias de transmissão, sendo transmitido por exposição a sangue, saliva e sémen. A principal forma de transmissão é a vertical, que acaba por ser a mais problemática devido ao facto de quanto mais cedo na vida se é infetado, maior a probabilidade da infeção se tornar crónica. Além desta temos a transmissão por esterilização inadequada dos instrumentos médicos e administração de produtos sanguíneos ou drogas e, por fim, a transmissão por via de relações sexuais não protegidas.

Apesar da infeção crónica por HBV em si, a longo prazo, estar associada a doença crónica do fígado esta não se deve diretamente a danos provocados pelo vírus, nem pelo seu ciclo de replicação na célula. Vários estudos sugeriram que o HBV não é citopático e que, por exemplo na fase aguda da infeção em chimpanzés, antes da entrada dos linfócitos T no fígado, não foi detetado qualquer

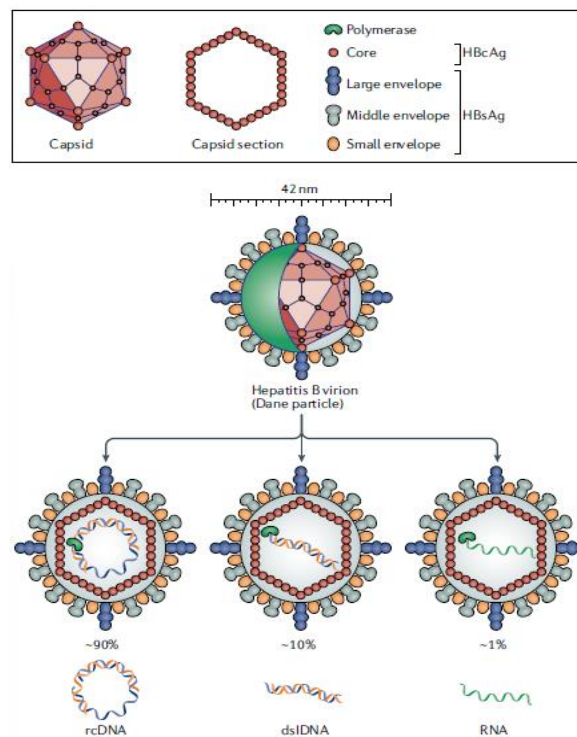
dano nos fígados de todos os chimpanzés infetados e que em indivíduos com as respostas celulares imunes deficientes ou suprimidas, o HBV acaba mesmo por se replicar a níveis elevadíssimos sem causar nenhum dano ou alteração citológica.<sup>87</sup>

Vários factores estão intimamente interligados com a persistência e a cronicidade da infeção por HBV, sendo que isto leva a um estado inflamatório no tecido hepático que acaba por promover a fibrose, com a consequente cirrose e HCC, tornando importantíssimo o diagnóstico precoce e uma monitorização eficaz para que se consiga da melhor forma arranjar abordagens terapêuticas inovadoras e eficazes que permitam o controlo da doença. Por isto, o diagnóstico e a monitorização efetuam-se de várias formas e utilizando diversas técnicas e marcadores, como os testes serológicos, moleculares, genómicos e bioquímicos, por histologia e outros biomarcadores da infeção. Actualmente, várias situações clínicas e virológicas são observadas diariamente em pessoas infetadas com o HBV, sendo possível fazer-se uma interligação entre estas fases de evolução da infeção e os diversos marcadores, sejam quantitativos ou qualitativos. Por exemplo, a quantificação dos antigénios, o título de DNA viral, e a presença de determinados anticorpos são úteis na previsão do desenvolvimento de doença ou manutenção/melhoria do estado atual ou até mesmo a eficácia do tratamento.<sup>86,137</sup>

## Características gerais do HBV

O HBV é um vírus pequeno, com um genoma de aproximadamente 3,2 kb, da família *Hepadnaviridae*, género *Orthohepadnavirus*, pertencendo ao grupo VII da classificação de Baltimore (pararetrovírus). O HBV apenas possui a capacidade de infectar mamíferos, dos quais mais especificamente primatas superiores como o humano e chimpanzés, e apresenta tropismo exclusivamente para os hepatócitos.<sup>138,139</sup>

Como se é possível observar na **Figura 1**, o virião tem uma estrutura esférica com simetria icosaédrica apresentando normalmente no seu interior o genoma. Este é constituído por uma molécula de DNA parcialmente de dupla cadeia, sempre acompanhado por uma retrotranscriptase de origem viral, que se encontram dentro de uma cápside composta por várias subunidades proteicas do *core*, normalmente conhecidas por HBcAg do HBV. Cerca de 90% das partículas virais possuem o seu genoma na forma rcDNA. Enquanto que as restantes partículas se apresentam com a forma dsDNA e uma fração residual na forma de RNA.<sup>82,140,141</sup>

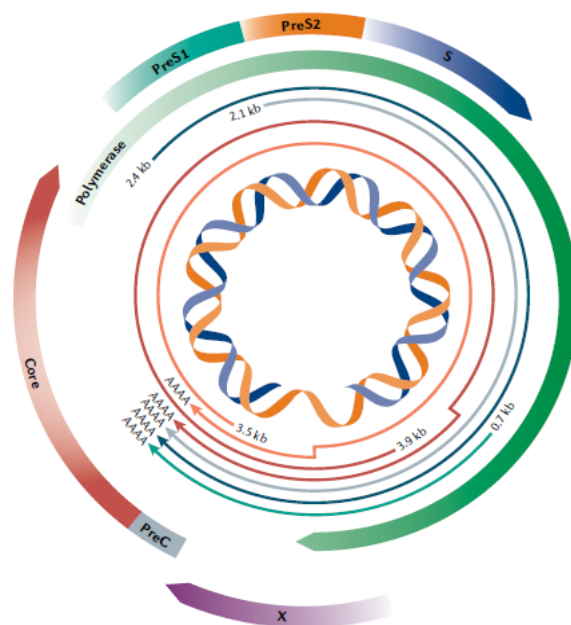


**Figura 21** - Estrutura do virião do HBV e as formas possíveis de apresentação do seu genoma.

Adaptado de <sup>141</sup>.

O virião apresenta ainda um invólucro constituído por uma bicamada lipídica, proveniente das membranas celulares das células do hospedeiro, e o HBsAg.

A partir da observação da **Figura 2**, é possível de notar que o HBV se trata de um vírus com alguma diversidade sequencial apresentando na sequência nucleotídica do seu genoma 10 genótipos diferentes (A a J), resultantes de mutações provenientes da falta de *proofreading* da sua retrotranscriptase. No seu genoma existem apenas 4 genes: um que codifica para a polimerase, outro para as proteínas de superfície (S, pré-S1 e pré-S2), um para as proteínas do *core* (C) e um para a proteína X. Para a sua tradução o genoma também possui apenas quatro *ORF*s sobrepostas e são traduzidas sete proteínas a partir destas *ORF*'s: três isoformas do HBsAg (*Large*, *Middle* e *Small*) pela *ORF S*; os HBcAg e HBeAG pela *ORF C*; a retrotranscriptase pela *ORF P*; e, por fim, a *ORF X* que vai codificar a proteína X. <sup>140,142-144</sup>



**Figura 22** - Estrutura do genoma do HBV  
Adaptado de <sup>141</sup>.

## Ciclo replicativo do Vírus da Hepatite B

O ciclo replicativo do HBV, que se encontra esquematizado na **Figura 3**, vai-se iniciar com a entrada das partículas virais nos hepatócitos, que se dá, inicialmente, pela ancoragem do virião através da ligação entre o HBsAg e os proteoglicanos de sulfato de heparina, que se encontram nas vilosidades dos hepatócitos que se estendem para lá do espaço de Disse, junto das LSECs, por interações de fraca especificidade. Posteriormente, dá-se a entrada do virião por endocitose a partir da ligação entre a região pré-S<sub>1</sub> do HBsAg e um recetor celular, o NTCP.<sup>142-145</sup>

Após este processo, ocorre o transporte das cápsides virais pelo citoplasma até ao núcleo dos hepatócitos, libertando no seu interior o rcDNA. Este vai sofrer um processo de reparação pelas enzimas de reparação de DNA do hospedeiro, acabando por se converter em cccDNA. Esta forma do material genético do HBV é bastante relevante, porque é o cccDNA que vai ser usado como *template* para a transcrição da grande maioria dos mRNAs, sub-genómicos e pgRNA virais.<sup>142-144</sup>

É nesta fase que se começam a formar as cápsides virais, constituídas pelas proteínas do *core* e no seu interior o pgRNA juntamente com a retrotranscriptase, que vai se encontrar ligada à região *épsilon* do pgRNA. Este tem o papel de funcionar como *template* para a replicação viral por transcrição reversa pela retrotranscriptase e de codificar tanto a própria retrotranscriptase como as proteínas do *core*.<sup>146,147</sup>

A este ponto inicia-se a replicação viral por transcrição reversa, formando-se a cadeia (-) de DNA, e, posteriormente, há síntese da cadeia (+) de DNA, originando-se o rcDNA, que vai seguir dois destinos: seguir para a continuação da formação da partícula viral no retículo endoplasmático e ser libertado na corrente sanguínea; ou então o virião retornará para o núcleo e reforçará o *pool* de cccDNA e recomeçar o ciclo.<sup>144,148</sup>

No entanto, no passo da replicação, pode-se dar a formação de outro produto genómico, o dsIDNA, devido a uma translocação de um *primer* para uma posição incorreta, na fase da síntese da cadeia (+) de DNA. As novas partículas virais constituídas por este tipo de material genómico vão também: ou sofrer o processo de formação do invólucro e libertação na corrente sanguínea ou voltarão para o núcleo. As moléculas de dsIDNA que forem transportadas para o núcleo servirão para o reforço do *pool* de cccDNA ou serão integradas no genoma da célula hospedeira, de forma aleatória, em regiões que a dupla cadeia da célula hospedeira se encontre com cortes, devido ao funcionamento do sistema de reparação de DNA.<sup>149-151</sup>



## Patogénese das infeções por HBV

A patogénese da infeção pelo HBV, como já foi referido anteriormente neste trabalho, é exclusivamente mediada pelo sistema imunitário do hospedeiro, ou seja, o vírus e o seu respectivo ciclo replicativo não provocam diretamente dano nos hepatócitos. Tratando-se de um processo extremamente complexo, este e as diferentes fases da infeção, conhecidas até agora, encontram-se ainda em estudo.

As infeções por HBV podem ser agudas (infeções recentes até 6 meses) ou crónicas (persistentes, ou seja, que ultrapassam os 6 meses e podem durar toda a vida do hospedeiro), sendo que dentro das infeções crónicas são conhecidas várias subfases de infeção com diferentes características, como, por exemplo, os valores dos marcadores bioquímicos e a histologia do tecido hepático. A evolução da infeção depende de vários factores como a idade em que se deu a infeção (normalmente, quanto mais prematura a infeção maior a probabilidade de evoluir para infeção crónica), o estado imunitário do hospedeiro, a carga viral, coinfeções com outros vírus, o genótipo de HBV com que se foi infetado, entre outros.<sup>137</sup>

Estimativas da OMS apontam para que quase um terço da população humana já tenha estado em contacto com o vírus em algum ponto da sua vida e, dado que a grande maioria destes teve este contacto apenas na idade adulta, praticamente todos os imunocompetentes terão apenas desenvolvido hepatite B aguda que acabou por se resolver autonomamente.<sup>156-158</sup>

No entanto, como também já referido anteriormente, vários factores podem influenciar o desfecho da infeção, levando a que este se torne persistente no hospedeiro.<sup>10</sup>

## Resposta imunitária em infecções agudas por HBV

Uma resposta rápida e eficaz do sistema imunitário é de extrema importância para o controlo da infeção por HBV, sendo esta resposta resultado da ação e cooperação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa.

Vários estudos consideram esta cooperação entre as duas respostas fulcral para determinar o desfecho que a infeção pode tomar. No caso das infeções por HBV, apesar da resposta adaptativa ser indiscutivelmente a que mais contribui para a eliminação do vírus e das células infetadas, quando não se dá um *priming* eficiente dos linfócitos pelos mecanismos de resposta inata, na fase inicial da infeção, a probabilidade de se desenvolver uma infeção crónica aumenta.<sup>87,141,159</sup>

Uma infeção por HBV pode ser definida como aguda quando, no decurso da mesma, se dá a eliminação completa dos níveis de HBsAg juntamente com o regresso ao normal dos níveis de ALT em menos de 6 meses. Este período é algo incomum nas infeções virais, devendo-se este facto ao longo período de incubação do HBV no indivíduo infetado.<sup>159</sup>

## Imunidade inata

A imunidade inata deteta certos tipos de estruturas e moléculas de natureza vírica bem como moléculas originadas durante os processos de morte celular. Nestas incluem-se as proteínas virais, ácidos nucleicos virais e proteínas de dano tecidual, sendo o primeiro tipo de imunidade a ter funções antivirais quando detetada uma infeção.<sup>159</sup>

A resposta inata baseia-se em dois tipos de ação:

- A ação celular, como as células dendríticas que funcionam por apresentação de antígenos às células pertencentes à imunidade adaptativa, as KCs e os monócitos inflamatórios, que vão ajudar no processo inflamatório nos hepatócitos, e as células *NK*.

- A ação não-celular, em que participa a família tipo I dos IFNs e das restantes citocinas inflamatórias e quimiocinas, que vão induzir o estado antiviral dos hepatócitos, direcionar a ação celular, e promover a maturação e recrutamento da imunidade adaptativa.<sup>160</sup>

Como foi referido no capítulo anterior, o bom funcionamento deste tipo de resposta imune é muito importante para o desfecho da infeção por HBV, pois são os seus tipos de ação que vão permitir um abrandamento inicial da replicação viral e também têm a função de fazer o *priming* dos linfócitos T para uma ação efetora mais agressiva e eficiente dos mesmos.

Em indivíduos imunocompetentes, a resposta inata é moderada devido à capacidade do vírus de suprimir a indução de produção de citocinas pró-inflamatórias, havendo apenas a ativação moderada de algumas citocinas, como o *IFN- $\alpha$*  e *IFN- $\beta$* , *TNF- $\alpha$*  e a *IL-15*, através da detecção de componentes virais pelos *TLRs*.<sup>160,161</sup>

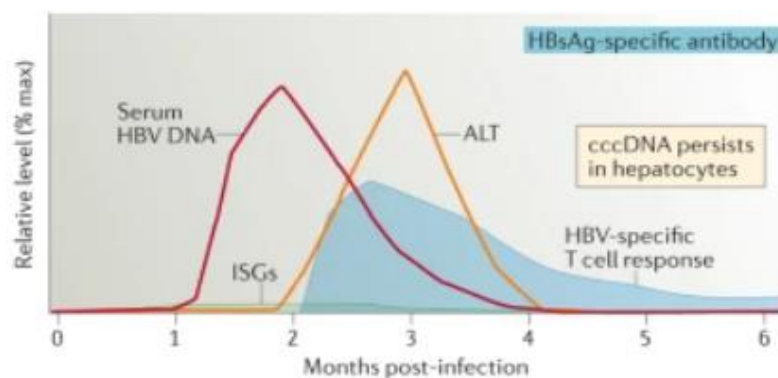
## Reconhecimento antigénico e resposta do sistema inato à infecção por HBV

No momento de uma infecção viral, os componentes virais vão ser detetados pelos recetores de reconhecimento de padrões estranhos ao organismo, os *PRRs*. Estes, ao serem ativados vão induzir sinalização intracelular que conduz a diversas respostas inflamatórias e antivirais, como as citocinas pró-inflamatórias e os *ISGs*. Isto vai permitir às células infetadas controlarem a infecção até o sistema adaptativo entrar em ação e se resolver a infecção.<sup>162</sup>

Dentro dos *PRRs* existem vários tipos de recetores que conseguem detetar diferentes antigénios virais e que acabam por ativar os *ISGs*, como por exemplo os *TLRs* que vão detetar diversos *PAMPS*, como o *LPS*, *dsRNA*, *ssRNA* e no caso do HBV, a proteína X. Temos depois o exemplo dos recetores *NLR*, os *RLR*, os *JAK/STAT* e os *NF- $\kappa$ B*, que vão ter a sua função específica na mediação da resposta imune e ativação dos *ISGs*.<sup>161</sup>

No entanto, como é se pode observar na **Figura 4**, o HBV tem a capacidade de não induzir em grande escala a ativação dos *ISGs*, mesmo sendo os *PRRs* ativados por alguns dos componentes virais, o que explica a resposta ineficaz detetada nas fases iniciais das infeções por HBV.

Mesmo após a fase inicial, quando se dá a fase exponencial de replicação viral e o vírus passa a estar detetável, a resposta imune inata continua a desempenhar vários papéis importantes.<sup>160</sup>



**Figura 24** - Curso normal de uma infecção por HBV autolimitada  
Adaptado de<sup>379</sup>.

### **- Papel dos interferões na resposta à infecção por HBV**

Os IFNs são um grupo de proteínas sinalizadoras muito importantes na detecção e restrição da propagação das infecções virais. São libertados por vários tipos de células após a detecção de certos PAMPs pelos PRRs referidos anteriormente. Estes actuam de forma autócrina e parácrina na indução de um estado antiviral em células infetadas e nas células vizinhas a estas, que possuam recetores de IFN, isto é muito importante na.

Existem três tipos de IFNs, os IFN-I, II e III, diferenciados pela homologia e tipos de recetores com os quais eles se associam, sendo os do tipo I, (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\tau$ ) os mais importantes na resposta a infecções virais.<sup>163</sup>

Os IFNs intervêm na através da ativação dos ISGs, promovendo a produção de citocinas inflamatórias, a função efetora da ação celular e apresentação de antigénio.

Mais especificamente, no caso do HBV, o IFN- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  possuem a capacidade de interferir com a síntese da cadeia (-) de DNA do HBV pela indução da inibição do funcionamento da polimerase viral.<sup>164</sup> Adicionalmente, o IFN- $\alpha$  consegue ainda reduzir a produção de DNA viral e dos antigénios HBsAg e HBeAg pela inibição da transcrição do cccDNA, consegue também inibir a replicação do HBV por degradação do cccDNA e ainda tem a capacidade de inibir a libertação das partículas virais dos hepatócitos pela indução da produção da proteína Teterina.<sup>165-167</sup>

### **- Papel das citocinas na resposta à infecção por HBV**

Uma das formas mais importantes na resolução de uma infecção por HBV são os mecanismos antivirais não-citopáticos efetuados pelas citocinas, mediadores inflamatórios que possuem vários tipos de funções e ações antivirais e que acabam por limitar a replicação viral.<sup>168</sup>

São várias as citocinas produzidas no momento de uma infecção por HBV. Apresentando diversas propriedades pro-inflamatórias e acabando por contribuir para a eliminação do HBV. Alguns exemplos destas propriedades são: a purga dos componentes virais estruturais nos citoplasmas; a purga dos cccDNAs nos núcleos dos hepatócitos infetados; a inibição da entrada viral nos hepatócitos saudáveis; o controlo epigenético da transcrição dos cccDNAs; a prevenção da tradução das proteínas virais e o bloqueio da secreção viral dos hepatócitos infetados.<sup>169-172</sup>

Na **Tabela 12**, são apresentadas as citocinas importantes nesta resposta e as respectivas funções, primárias e na resposta ao HBV.

**Tabela 12** - Citocinas importantes na resposta à infecção por HBV.

Citocina	Função Primária	Função na resposta ao HBV
IL-1	Função proinflamatórias.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Funciona em sinergia com o TNF-<math>\alpha</math> promovendo a inflamação</li> <li>• Estimulação da síntese de fatores de adesão nas células endoteliais</li> <li>• Diapedese dos leucócitos e ativação dos macrófagos.<sup>173</sup></li> </ul>
IL-2	Função de proliferação de linfócitos T, atividade citolítica das células NK, promoção do desenvolvimento e atividade supressora dos linfócitos Treg.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Útil na avaliação da função dos linfócitos T</li> <li>• Promoção da atividade do sistema imune do hospedeiro<sup>174,175</sup></li> </ul>
IL-4	Promoção da diferenciação e imunidade humoral dos linfócitos Th2.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidade de suprimir a expressão viral em diferentes tipos de linhagens celulares de HCC.<sup>176</sup></li> </ul>
IL-6	Estimulação da produção de PFAs pelo fígado, estimulação da proliferação de linfócitos B e produção de neutrófilos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulação dos níveis dos NTCPs que leva a uma diminuição da entrada do HBV nos hepatócitos</li> <li>• Capacidade de inibir a transcrição do cccDNA por controlo epigenético do cccDNA.<sup>177-179</sup></li> </ul>
IL-12	Modulador da resposta inata nas fases iniciais de uma infecção, funcionando como um mediador da imunidade adaptativa, formando uma ligação entre a imunidade inata e adaptativa. <sup>173</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimula a síntese do IFN-<math>\gamma</math> pelas células NK e linfócitos T</li> <li>• Aumenta a citotoxicidade, proliferação e sobrevivência dos linfócitos T específicos do HBV e células NK</li> <li>• Estimula a maturação de linfócitos <i>naïve</i> em Th1.</li> <li>• Em fases mais avançadas têm a capacidade de resgatar a funcionalidade de Linfócitos Tc que estejam “exaustos” da sobrestimulação antigénica.<sup>180-182</sup></li> </ul>
IL-21	Diferenciação dos linfócitos B e importante na produção de anticorpos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promoção da capacidade proliferativa e citotóxica dos linfócitos Tc</li> <li>• Promoção das vias citolítica e não-citolítica dos linfócitos Tc, aumentando a contenção e eliminação viral.</li> <li>• Supressão da replicação viral por inibição da secreção de IL-10.<sup>183</sup></li> </ul>
IL-23	Estimulação do funcionamento das células dendríticas, da sua produção e manutenção dos linfócitos Th17.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amplifica a resposta das Th17 e a inflamação hepática</li> <li>• Acaba por favorecer um ambiente pro-cancro em infeções crónicas com produção persistente de IL-23<sup>184,185</sup></li> </ul>

**Tabela 12A** - Citocinas importantes na resposta à infecção por HBV.

Citocina	Função Primária	Função na resposta ao HBV
TNF- $\alpha$	<p>Principal mediadora da inflamação aguda, importante no recrutamento de leucócitos por estimulação da produção de quimiocinas e proteínas de membrana importantes para a diapedese.</p> <p>Ativação dos neutrófilos e da cascata de coagulação no local do ataque, favorecendo a contenção de agentes patogénicos e estimula a cicatrização dos tecidos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mediador importante na imunidade anti-HBV</li> <li>• Capacidade de interferir com a integridade e estabilidade do cccDNA nos hepatócitos</li> <li>• Inibição da expressão genética e replicação do HBV, por eliminação da cápside viral.</li> <li>• Induz inflamação hepática, levando à fibrose do mesmo, por inflamação persistente.<sup>186-188</sup></li> </ul>

### **- Papel das quimiocinas na resposta à infecção por HBV**

As quimiocinas, também conhecidas por citocinas quimiotáticas, são um subgrupo dentro do grupo das citocinas que actuam na sinalização e mobilidade dos leucócitos desde o sangue até aos locais de atuação nos tecidos.

Estas moléculas podem ser divididas em quatro famílias, dependendo da sequência na vizinhança do resíduo de cisteína no seu terminal-N, sendo estas a família C, a CC, a CXC e CX3C.<sup>189</sup>

A sua ação é muito importante na resposta à infecção por HBV, intervindo em diversos fases dos mecanismos de defesa contra o vírus. Por exemplo intervêm na diapedese, aumentando a afinidade das integrinas, presentes nas membranas das células endoteliais, para com os leucócitos; regulam a polimerização e despolimerização da actina nos leucócitos permitindo a sua mobilidade e migração entre tecidos; e ainda funcionam como sinalizadores para os linfócitos.<sup>173</sup>

Para além do papel na mobilidade, as quimiocinas também possuem a capacidade de induzir alguns leucócitos a destruir células por secreção de agentes citopáticos e de induzir outros a digerir restos celulares de tecido danificado.<sup>173</sup>

As quimiocinas têm importância na criação de condições ideais para a activação, diferenciação e proliferação de células imaturas e na orquestração de outros processos de respostas celulares contra o HBV. Concretamente, a quimiocina CCR5, já demonstrou ser essencial no controlo da activação das células imunes e na sua migração durante a infecção por HBV. Um outro exemplo é a CXCL10, em que já foi demonstrado que a proteína HBx leva ao seu aumento e isto provoca a sobre expressão do NF- $\kappa$ B, o que vai levar à amplificação da migração de leucócitos periféricos para o fígado e obtendo-se assim uma capacidade efetora maior e mais eficaz à infecção.<sup>160,190</sup>

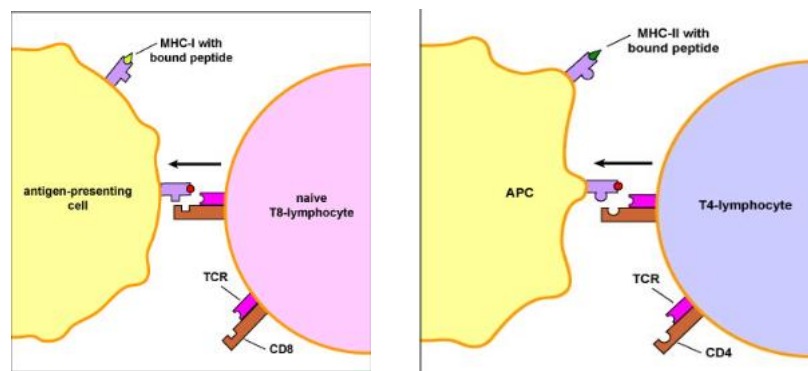
### **- Papel das células dendríticas na resposta à infecção por HBV**

As DCs são essenciais na interligação da imunidade inata com a adaptativa pela sua função de células apresentadoras de antígenos, existindo no epitélio cutâneo, nas mucosa do tracto respiratório e gastrointestinal, nos órgãos linfoides e no parênquima de vários órgãos, entre os quais o fígado.

Em situações de ausência de infecção, estas células encontram-se na sua forma imatura. Isto até ao momento em que elas capturem antígenos e sejam sinalizadas por citocinas inflamatórias, produzidas pelas células em resposta à infecção. Neste caso ficam ativadas, iniciando o processo de migração até aos nódulos linfáticos mais próximos da região onde ocorreu a infecção.<sup>191</sup>

Nesta fase, esquematizada pela **Figura 5**, as DCs amadureceram e vão apresentar os antígenos capturados às populações de linfócitos T imaturos presentes nos nódulos, ativando-os e assim iniciando-se o seu *priming* para a resposta efetora por eles desempenhada.<sup>191,192</sup>

Nas infeções por HBV, qualquer tipo de perturbação na função ou processo de maturação das DCs, impede uma boa resposta imunitária e a probabilidade de evolução para infeção crónica por HBV aumenta drasticamente. Isto, porque as DCs são as principais ativadoras dos linfócitos T específicos para o HBV, pela deteção de partículas virais pelos recetores *MHC-I* e *MHC-II* e pela deteção de *PAMPS* pelos *TLRs*. As DCs vão ativar os linfócitos Tc e os Th, e vão produzir citocinas inflamatórias, como o *TNF- $\alpha$* , *IL-1*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-12* e os *IFNs*, que serão depois cruciais para uma resposta imune eficiente e capaz de eliminar o vírus.<sup>191,193,194</sup>



**Figura 25** - Processo de ativação dos Linfócitos T imaturos pelas DCs  
Adaptado de <sup>191</sup>.

### **- Papel das células de Kupffer na resposta à infecção por HBV**

As KCs são macrófagos teciduais específicos do fígado, que se encontram alojados nos sinusoides hepáticos, sendo a maior população de células do sistema imune inato presente no fígado, onde desempenham funções de limpeza e fagocitose, importantes na remoção de restos celulares, complexos proteicos e restos de células sanguíneas, sendo uma das primeiras barreiras contra agentes patogénicos no fígado.<sup>195</sup>

Como nas DCs e outros macrófagos, as KCs também possuem recetores PRR com a função de detetar PAMPS que possam significar a presença de uma infeção. Quando há ativação das KCs por PAMPS, estas vão produzir e libertar diversas respostas como a produção de ROS, citocinas inflamatórias, quimiocinas, que, como já foi referido anteriormente, vão ser importantes no recrutamento e ativação dos restantes constituintes da defesa imune inata e na própria eliminação dos hepatócitos infetados.<sup>196,197</sup>

Além das funções anteriormente referidas, na resposta contra a infeção por HBV, as KCs possuem a capacidade de fazer o priming dos linfócitos T imaturos como as DCs, apesar de numa menor extensão e eficiência, Esta função é fundamental na resposta contra o HBV, pois aumenta o recrutamento e activação dos leucócitos pelas citocinas e quimiocinas e ainda permitem a apresentação de antigénios.<sup>198,199</sup>

No entanto, está também reportado que as KCs, por fazerem a lise dos hepatócitos de uma forma inespecífica, em relação do seu estado de infeção por HBV, acabam por contribuir para o dano hepático, fibrose, cirrose e contribuição para a progressão para HCC em casos crónicos de infeção por HBV.<sup>199</sup>

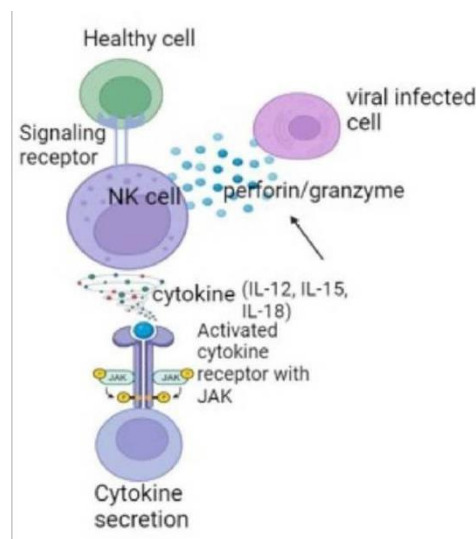
### **- Papel das Células NK na resposta à infecção por HBV**

As células NKs são um tipo específico de linfócito e os principais efetores citotóxico da imunidade inata, em especial no fígado onde representam 30% dos linfócitos intra-hepáticos.<sup>200</sup>

Em termos funcionais, como está descrito na **Figura 6**, as NKs promovem a eliminação direta de células infetadas ou tumorais pela libertação dos seus constituintes granulares, como a perforina e granzima, em células com sub-expressão dos recetores membranares *MHC-I* (comum em células infetadas e tumorais) e também possuem a capacidade de libertar citocinas inflamatórias como o *IFN- $\gamma$* , *TNF- $\alpha$* , algumas interleucinas importantes na inflamação e quimiocinas, acabando por

possuir um papel de regulação na resposta imune e de interligação entre as respostas imunes, inata e adaptativa.<sup>201</sup>

Na resposta à infecção por HBV, as *NKs* parecem exercer preferencialmente a resposta não-citolítica. Tal foi reportado em estudos nos quais foi possível observar uma redução no DNA viral antes do pico de recrutamento de linfócitos T, normalmente observado em infecções autolimitadas (ver **Figura 4**), na ausência de elevação de ALT ou sintomas de lesão hepática. Foi ainda possível detetar níveis aumentados de *IFN- $\gamma$*  e *TNF- $\alpha$*  nesta fase, o que vai de acordo com a hipótese anterior.<sup>202,203</sup>



**Figura 26** - Vias de ação das células NKs numa infecção por HBV.

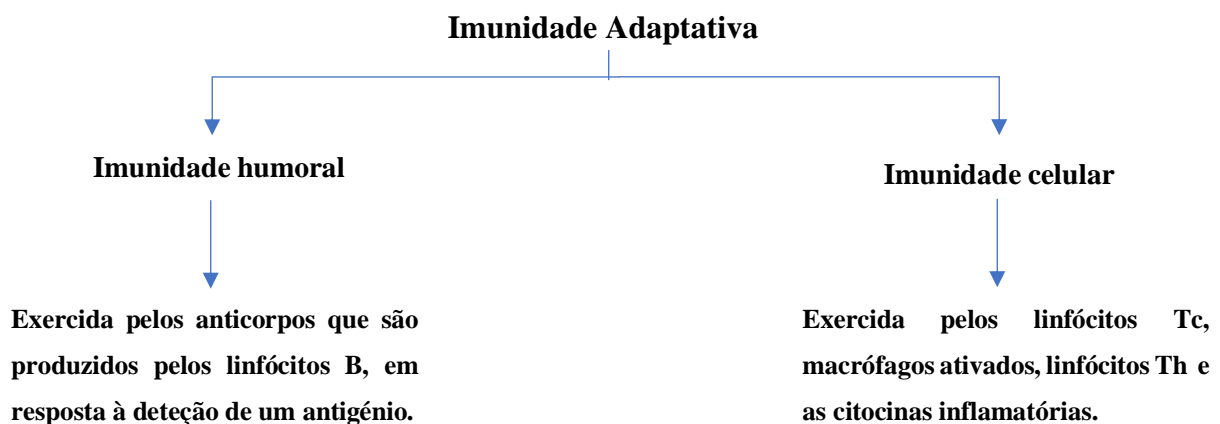
Adaptado de <sup>160</sup>.

## Imunidade Adaptativa

A imunidade adaptativa, ou imunidade adquirida, é o segundo tipo de imunidade para além da imunidade inata. Em relação à imunidade inata, a imunidade adaptativa apresenta diferentes tipos de mecanismos de ação, diferentes agentes efectores e necessita de diferentes tipos de estimulação, tanto para ser ativada, como para se desenvolver e acabar por ser mais eficiente na resposta ao agente patogénico.

Esta imunidade é dependente de um antígeno para se ativar. Após dias de desenvolvimento e diversos mecanismos de ativação, proliferação e maturação, desencadeia uma resposta protetora visando a eliminação do respectivo antígeno e do respectivo agente patogénico.

Tal como na imunidade inata, a imunidade adaptativa também possui duas formas distintas de ação:



No entanto, a imunidade adaptativa vai depender da ação apresentadora de antígenos da imunidade inata para que se possa iniciar o processo de ativação, maturação e proliferação dos linfócitos imaturos, presentes nos órgãos linfoides. Daí a importância da ponte de ligação entre as duas imunidades, as células apresentadoras de antígeno, que, como já foi referido anteriormente, vão captar o novo antígeno e transportá-lo até aos linfócitos imaturos para ativá-los e com eles toda a imunidade adaptativa.

A partir deste ponto, os linfócitos que foram ativados e se proliferaram vão passar a possuir nas suas membranas os recetores próprios para os epítomos do antígeno, deixando de necessitar de intermediários para a deteção daquele antígeno específico, formando-se depois células de

memória. Desta forma, numa reinfeção, a resposta adaptativa será mais rápida e eficaz contra aquele agente patogénico.<sup>204</sup>

## **Resposta da imunidade adaptativa à infeção por HBV**

Nas infeções por HBV, é a resposta adaptativa celular que vai acabar por efetuar a maior parte do controlo e eliminação da infeção. Nas fases mais avançadas, depois da infeção ter sido controlada, é a imunidade humoral que vai ter mais impacto, pois apenas nesta fase são produzidos anticorpos neutralizantes contra os antigénios do HBV e que vão fornecer proteção contra reinfeções futuras.<sup>87,141</sup>

Outra questão importante, já referida, é a questão do *priming* dos linfócitos T nas fases iniciais da infeção e a sua importância no desenrolar da infeção, que quando se fala em infeções por HBV ganha ainda mais importância na capacidade da resposta imunitária em eliminar o vírus. Isto deve-se ao facto de que tanto é necessária uma maturação e proliferação eficiente dos linfócitos Tc, como é para os Th, pois já está estabelecido que a interação entre as duas linhagens e a imunidade inata é fulcral para que se dê a eliminação do vírus, e se resolva a infeção.

### **- Papel dos linfócitos B e dos seus anticorpos produzidos na resposta à infeção por HBV**

Os linfócitos B são as células responsáveis pelo funcionamento da imunidade humoral, sendo também um constituinte crucial na regulação do sistema imune, funcionando como produtores de anticorpos, apresentadores de antigénios, suporte a outras células imunes para além de serem produtores de citocinas importantes na resposta inflamatória, como a IL-6 e TNF- $\alpha$ .<sup>205</sup>

A sua ativação pode ocorrer por duas vias diferentes, uma dependente dos linfócitos Th e outra independente destes, sendo que os linfócitos B costumam encontrar-se na forma imatura nos órgãos linfoides secundários até serem ativados por alguma das duas vias. O tipo de antigénio detetado vai determinar qual das duas vias possíveis de ativação dos linfócitos B vai ocorrer.

Antigénios de natureza proteica vão ativar a via dependente de linfócitos Th pela sua deteção a partir dos recetores BCR, sendo depois internalizados e voltando para a superfície membranar da célula associados a recetores MHC-II.

Nesta fase, se o antigénio for realmente de uma ameaça externa, vão existir linfócitos Th específicos para esse antigénio que vão entrar em contacto com o linfócito B sendo os antigénios

apresentados em associação a recetores MHC-II. Após este contacto os linfócitos T vão libertar citocinas que vão estimular a ativação, proliferação e maturação desse linfócito B.<sup>205</sup>

Por outro lado, antigénios de natureza não-proteica como os polissacarídeos e o LPS, vão ativar os linfócitos B pelos recetores BCR e pelos TLR presentes na membrana dos linfócitos B. Por esta via, os linfócitos B vão ser ativados diretamente, promovendo a sua proliferação e diferenciação contra esse antigénio específico, sem que haja a necessidade de haver a apresentação e confirmação pelos linfócitos Th.<sup>205</sup>

No caso da infeção por HBV, os antigénios detetados são de natureza proteica, o que implica que a via mais prevalente e mais importante será a mediada pelos linfócitos Th. Este facto evidencia a importância de um bom *priming* dos linfócitos T para a uma boa resposta à infeção, pois se os linfócitos Th não tiverem a capacidade de ativar eficientemente os linfócitos B, estes acabam por estar em número insuficiente e disfuncionais.<sup>206</sup>

Nas infeções agudas em que há cura funcional da infeção, o papel dos linfócitos B é bastante importante na luta contra o vírus. Estes, após serem ativados, vão dividir-se por mitose em clones e esses clones vão-se diferenciar em plasmócitos produtores de anticorpos. A deteção dos diferentes anticorpos permite a elucidação das diferentes fases da infeção em que se situa o utente e se houve ou não resolução da infeção.<sup>207</sup>

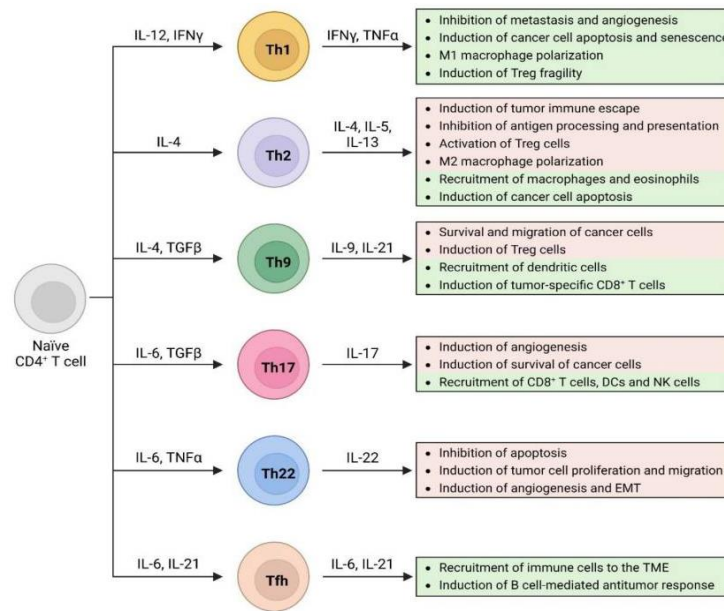
Os anticorpos anti-HBs e anti-HBc são produzidos em diferentes momentos. Os anticorpos anti-HBs significam cura funcional, sendo detetados apenas após a redução para níveis indetetáveis dos níveis plasmáticos do DNA viral e HBsAg; os anticorpos anti-HBc são detetados precocemente, após a fase exponencial da replicação viral, e ficam elevados durante todas as fases da infeção. Já a seroconversão dos anticorpos anti-HBe costuma significar uma recuperação de uma infeção aguda ou um estado inativo da replicação viral numa infeção crónica, no entanto esta pode continuar ativa em certos casos. Podendo estes aparecer em qualquer uma destas duas situações.

A função dos anticorpos na resposta ao vírus tem sido amplamente elucidada e já se sabe que são muito importantes no controlo da infeção, através do controlo da entrada viral nos hepatócitos e pela eliminação das partículas virais por opsonização das mesmas.<sup>87,207</sup>

## Papel dos Linfócitos T helper na resposta à infecção por HBV

Os linfócitos Th são células do sistema imune adaptativo que têm um dos papéis mais importantes nas respostas imunológicas a agressões externas e internas, sendo mesmo consideradas as mais importantes por alguns autores, pois a sua ação é necessária em praticamente todas as respostas do sistema imune adaptativo. A sua função é de extrema importância, pois facilita e melhora a resposta de muitas outras células efetoras do sistema imune, como as DCs, macrófagos, linfócitos B, linfócitos Tc e células NK.<sup>208,209</sup>

Inicialmente, os linfócitos Th são designados como linfócitos TCD4+ imaturos, podendo-se diferenciar em diversos tipos de Th, ver **Figura 7**, como os Th1, Th2, Th7/17, Th9, Th22 e Th foliculares, dependendo do tipo de estímulo a que foram expostos, . Os diferentes estímulos que podem receber são as citocinas libertadas por outros linfócitos Th e pelas respostas do sistema imune inato, para além de certos fatores de transcrição, moléculas de adesão, entre outros.<sup>210</sup>



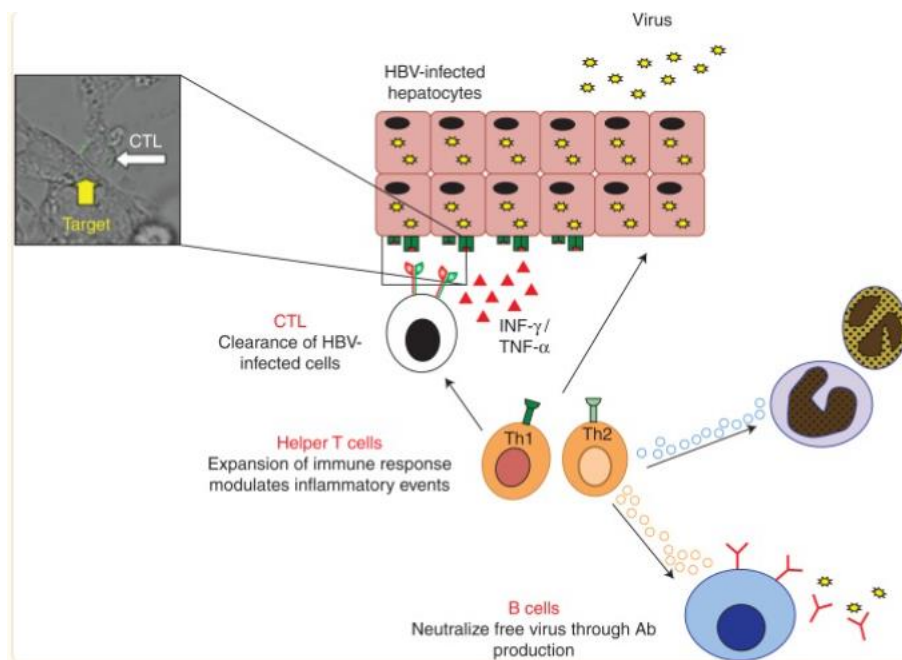
**Figura 27** - Diferentes tipos de linfócitos Th e os estímulos que os provocam.

Adaptado de <sup>210</sup>.

Cada um dos subtipos destas células possui diferentes funções na resposta imune, no entanto, quando em resposta ao HBV, os subtipos mais importantes são os linfócitos Th1, Th2 e Th foliculares. Ao contrário, os Th17 e Th22, por possuírem uma ação anti-inflamatória e imunomoduladora, acabam por interferir com a ação antiviral dos anteriores.<sup>211,212</sup>

Na **Figura 8**, é possível observar-se como os linfócitos T específicos para HBV são normalmente orientados para uma resposta imunitária do tipo I. A sua função principal é a mediação da resposta imune e da inflamação contra bactérias, fungos e vírus intracelulares. Esta mediação dá-se pela regulação das funções efetoras das células com capacidade citolítica, a partir da produção de elevadas quantidades de IFN- $\gamma$ , que vai ativar e aumentar a atividade citolítica dos macrófagos e linfócitos Tc que identificam e destroem as células infetadas. Secundariamente, ao produzirem quantidades elevadas de IFN- $\gamma$ , acabam por também contribuir para a destruição e redução dos níveis de DNA viral através da função não-citolítica desta tipo de interferão.<sup>209,213</sup>

Por outro lado, os linfócitos Th2, apesar de estarem em menores proporções, também apresentam bastante importância. A sua função está mais orientada para o controlo dos níveis de partículas virais extracelulares, a partir da ativação e regulação da maturação dos linfócitos B, para a produção dos anticorpos específicos contra o HBV para além das restantes funções mencionadas no capítulo anterior.<sup>213,214</sup>



**Figura 28** - Ação antiviral adaptativa durante a resposta à infeção por HBV.  
Adaptado de <sup>213</sup>.

Estas funções são muito importantes no controlo e resolução da infeção, sendo comum em infeções autolimitadas detetar-se um decréscimo dos níveis de componentes virais dentro de duas a três semanas, após o pico replicativo do vírus. Para além destes factos, existe também uma correlação forte entre o esgotamento, não-funcionalidade ou a fraca resposta destes grupos de

células e a evolução para infecção crônica o que fortalece a importância dos linfócitos Th para o bom prognóstico das infecções por este vírus.<sup>160,213</sup>

### **- Papel dos linfócitos citotóxicos na resposta à infecção por HBV**

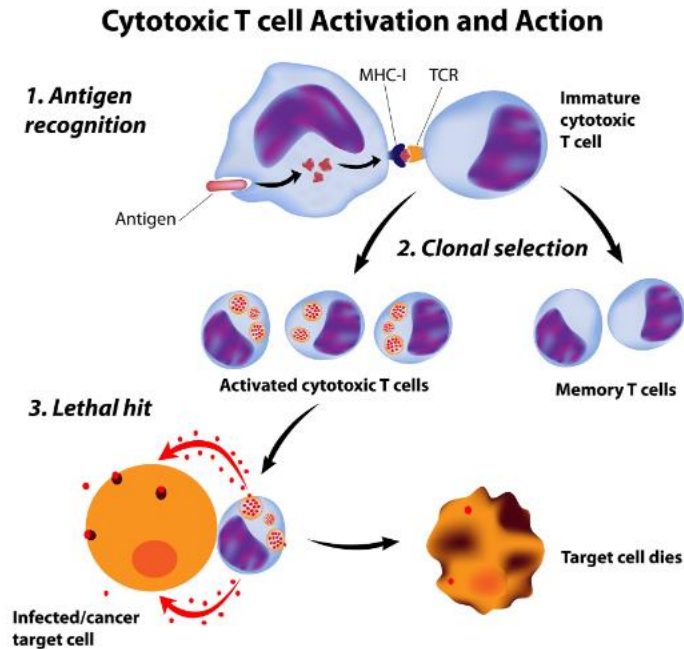
Os linfócitos Tc são linfócitos T CD8+ ativados que possuem a função de eliminar células que estejam danificadas, infetadas, ou que sejam cancerígenas. São particularmente importantes no combate a patógenos intracelulares, como é o caso dos vírus e bactérias intracelulares, que se encontram fora do alcance dos anticorpos específicos para os mesmos. São vários os mecanismos que lhes permitem efetuar as suas funções, tanto de forma citolítica como de forma não-citolítica.<sup>215</sup>

Inicialmente, os linfócitos Tc encontram-se na sua forma imatura e a sua ativação vai necessitar de dois sinais para que se realize completamente. No primeiro sinal, tem de haver a interação entre o recetor TCR do linfócito T CD8+ e um antigénio que esteja agregado a um recetor MHC-I na célula apresentadora de antigénio, sendo esta interação estabilizada pela coligação do CD8 com o MHC-I. O segundo sinal vai funcionar como um sinal de co-estimulação para confirmar a necessidade da célula T CD8+ de se ativar, proliferar e maturar em célula Tc. Esta confirmação dá-se, normalmente, pela ligação do recetor CD28 no linfócito com os recetores CD80 e CD86 na célula apresentadora de antigénio. No entanto, este mecanismo pode ser auxiliado ou mesmo substituído pela estimulação do linfócito CD8+ com citocinas libertadas pela células apresentadoras de antigénio. Após esta fase, a célula T CD8+ estará ativada e iniciará o processo de proliferação e diferenciação em linfócitos Tc efetoras e células T de memória.<sup>215</sup>

Uma vez ativados, os linfócitos Tc podem efetuar a sua função por várias formas diferentes, começando pela libertação de grânulos citotóxicos, que contêm perforina e granzima, em direção à célula-alvo, através da sinapse imunológica, de forma a evitar dano nas células circundantes. Esta função culmina com a destruição da célula infetada, nomeadamente por indução da apoptose da mesma.

Outra forma de ação é a indução de apoptose da célula-alvo pela ligação do recetor CD178 (ligando Fas), na membrana do linfócito Tc, ao recetor CD95 (Fas) na célula-alvo, que vai ativar as caspases e induzir a apoptose desta última.

Por fim, temos a libertação de citocinas como o IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que, pelas vias já referidas anteriormente, vão permitir um combate à infecção das células infetadas por uma forma não-citolítica.<sup>215,216</sup>



**Figura 29** - Ativação e ação dos linfócitos T citotóxicos.

Adaptado de <sup>215</sup>

A importância dos linfócitos Tc nas infecções por HBV está bastante documentada, estando já estabelecido que durante as infecções por HBV o controlo da replicação viral e patogénese da hepatite se devem em grande parte às funções dos linfócitos Tc.

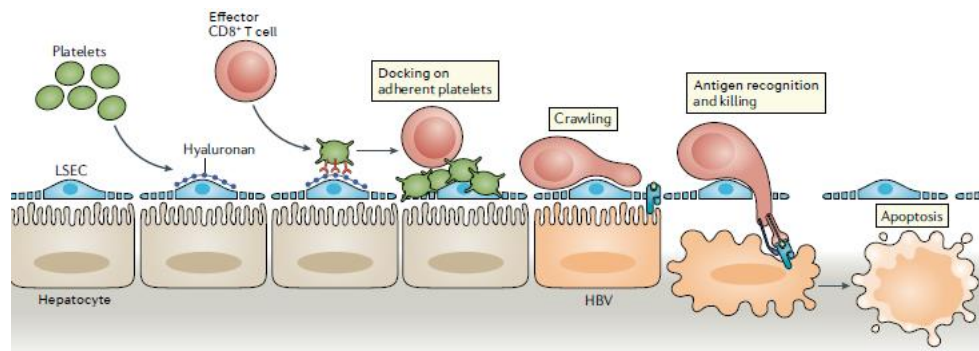
Os linfócitos Tc desempenham um papel crucial na luta do sistema imune contra o HBV, existindo uma correlação entre os níveis e funcionalidade elevados destas células e a eliminação viral/resolução da infeção.<sup>217</sup>

Como se pode observar pela **Figura 9**, a sua forma de ação contra o HBV engloba a atividade citolítica e a atividade não-citolítica destas células, possuindo a capacidade de controlar a infeção por indução de um estado apoptótico nos hepatócitos infetados, causando dano hepático. Paralelamente, controlam a replicação do DNA viral e a produção dos componentes virais, de forma não-citopática, a partir da ação do IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , por eles libertados.

Até recentemente, considerava-se que a forma citopática seria a forma mais utilizada e importante com que os linfócitos Tc controlavam a infeção, mas em estudos recentes utilizando

diferentes modelos de estudo de infecções por HBV, foi possível observar que, muito provavelmente, este controlo se deve à função das citocinas, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .<sup>218-220</sup>

Na **Figura 10** está esquematizado o processo de imunovigilância hepática efetuado pelos linfócitos Tc. Inicialmente, estes são mobilizados para o fígado, acumulando-se nos sinusoides, onde, nas suas paredes, se vão encontrar aglomerados de plaquetas ativadas, agregados às células endoteliais pela ligação entre o ácido hialurónico destas e o recetor CD44 das plaquetas. Estas são cruciais, pois os linfócitos Tc vão se ancorar às mesmas, iniciar a sua mobilização ao longo das paredes vasculares e vão reconhecendo antigénios hepatocelulares. Nesta fase, iniciam-se os processos efetores de libertação das citocinas e da morte dos hepatócitos. No entanto, o processo de morte dos hepatócitos demonstra-se ineficaz como método de controlo, pois o número de hepatócitos infetados, na altura em que os linfócitos são mobilizados, é significativamente superior ao número de linfócitos Tc e tendo em consideração que o efeito citolítico obriga a um contacto direto com os hepatócitos, é muito improvável que este seja conseguido no pouco tempo até à diminuição rápida dos níveis de DNA viral no fígado.<sup>221,222</sup>



**Figura 30** - Imunovigilância do fígado por parte dos linfócitos Tc.

Adaptado de <sup>141</sup>.

Assim, o processo não-citopático desempenhado pelas citocinas produzidas parece ser o mais provável de levar ao controlo da infeção, apoiado pela diminuição de DNA e partículas virais antes da elevação das transaminases. Além disso, seria de esperar danos muito superiores no tecido hepático, caso fosse o método citolítico o principal utilizado, em contradição com o que se verifica nos indivíduos que conseguem autoresolver a infeção.<sup>221,222</sup>

Ainda assim, ambos os processos são cruciais e detetáveis, o que permite concluir que o sistema imune utiliza ambos em equilíbrio de forma a maximizar a eliminação do cccDNA e os seus intermediários da maioria dos hepatócitos, apesar da sobrevivência de um pequeno número de hepatócitos com cccDNA funcional. Estes acabam por ser controlados pelos linfócitos Tc de

memória produzidos após a resolução da infecção e pelos anticorpos, prevenindo a reativação da doença.<sup>223,224</sup>

## Infeção crónica por HBV

Uma infeção crónica por HBV é definida pela continuação da deteção do HBsAg no soro de um indivíduo infetado por HBV, passados seis meses desde o momento de infeção. Em indivíduos imunocompetentes é um acontecimento raro, acontecendo em apenas aproximadamente cinco por cento dos casos. No entanto, nas infeções perinatais ou em idades jovens, os números sobem, sendo que até 90 % das infeções acabam por evoluir para a cronicidade.<sup>225</sup>

Este estado avançado da doença, pode ser caracterizado pela incapacidade de o sistema imune adaptativo produzir uma resposta vigorosa, coordenada e eficaz contra o vírus. O que resulta derradeiramente na persistência da infeção.<sup>226</sup>

## Evolução temporal da infeção crónica por HBV

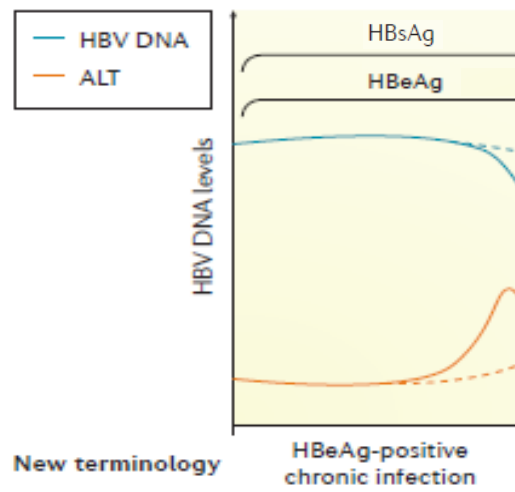
O curso natural da evolução da doença acaba por envolver uma interação complexa e dinâmica entre os mecanismos virais e as respostas do sistema imune do hospedeiro. Como consequência verifica-se um grande leque de situações clínicas, existindo uma grande porção dos infetados a desenvolver cirrose, acompanhada das suas complicações, e HCC. Enquanto que, por outro lado, estão reportados casos de infeções quiescentes de longa duração que acabam por não necessitar de tratamentos antivirais.<sup>86,227,228</sup>

O reflexo desta interação pode ser observado nas quatro fases distintas em que uma infeção crónica por HBV se encontra dividida. Nos indivíduos infetados cronicamente, estas fases estão já descritas, apesar de estarem em constante revisão com base nas diferenças entre os seus perfis bioquímicos, serológicos, virais e histológicos.<sup>229</sup>

### **- Primeira fase: Infeção crónica com HBeAg positivo**

Na **Figura 11** é possível observar o decorrer da primeira fase, outrora conhecida por fase da imunotolerância. Esta é uma fase mais comum em indivíduos infetados na infância e tende a dar-se entre os 10 e 20 anos de idade, sendo caracterizada pelos níveis elevados de DNA viral no soro (normalmente níveis superiores a  $10^7$  U/mL). No entanto, é apresentado um perfil histológico do fígado praticamente normal com alterações necroinflamatórias mínimas e os níveis das aminotransferases normais. Outra característica interessante é a positividade do HBeAg, uma

proteína truncada derivada do gene do HBcAg, que pensa-se ter capacidade imunomoduladora na resposta dos linfócitos T específicos para o HBV.<sup>86,226,230</sup>



**Figura 31** - Esquema da primeira fase de uma infecção crônica por HBV.

Adaptado de <sup>226</sup>

### **- Segunda fase: Hepatite crônica com HBeAg positivo**

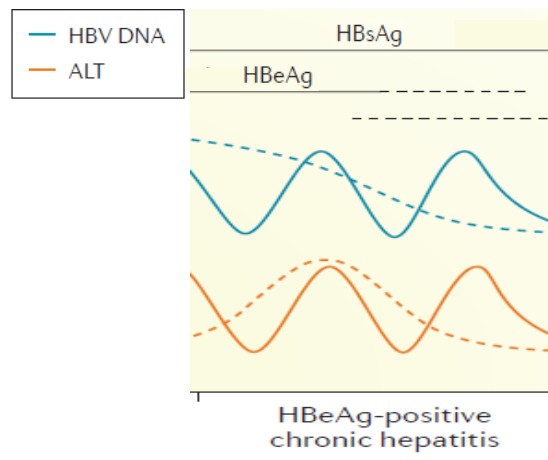
A segunda fase da infecção normalmente ocorre durante a terceira ou quarta década de vida dos indivíduos infetados em idades jovens.<sup>226</sup>

Como se pode observar pela **Figura 12**, esta fase inicia-se com o aumento da expressão do HBcAg nos hepatócitos. Simultaneamente, é detetado um aumento da atividade das células apresentadoras de antígeno, que levam ao recrutamento e ativação dos linfócitos T específicos para o HBV. Por via dos linfócitos Tc, o fígado entra num estado necroinflamatório imuno-mediado com dano hepático, elevação das transaminases e redução dos níveis de DNA viral circulante.<sup>225,226</sup>

No entanto, esta resposta imune não é suficiente para eliminar o vírus, acabando por haver períodos com flutuações de atuação e dos níveis das transaminases e DNA viral. O que contribui para o dano contínuo do tecido ao longo da evolução desta fase, levando a que por vezes os indivíduos desenvolvam fibrose e cirrose no fígado.<sup>86,226</sup>

Em consequência da resposta imune, é comum observar-se supressão da replicação viral, com redução do número de hepatócitos infetados, juntamente com o decréscimo dos níveis de DNA viral. Sendo comum dar-se nesta altura a seroconversão do HBeAg e começar-se a detetar anticorpos anti-HBe no soro.<sup>225,226,231</sup>

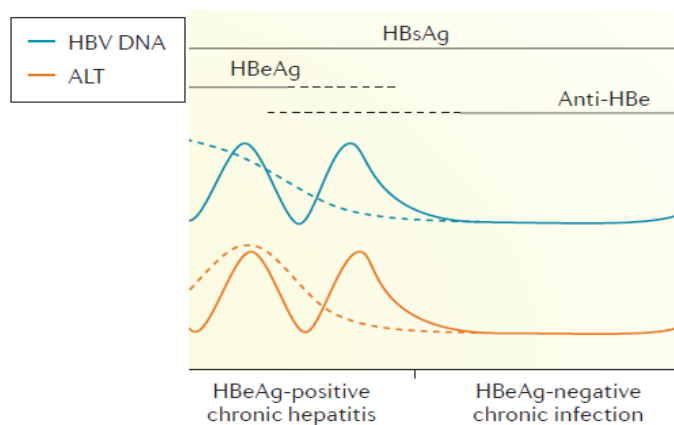
A idade a que se dá esta seroconversão pode servir de prognóstico da evolução da doença. Existindo evidências que os indivíduos infectados que apresentam a seroconversão do HBeAg depois dos quarenta anos de idade, apresentam um maior risco de desenvolverem HCC no futuro quando comparado com aqueles que têm a seroconversão antes dessa idade.<sup>232</sup>



**Figura 32** - Esquema da segunda fase de uma infecção crônica por HBV.  
Adaptado de <sup>226</sup>.

### **-Terceira fase: Infecção crônica com HBeAg negativo**

A seroconversão indica o início da terceira fase, como se encontra esquematizado na **Figura 13**. Esta fase, até recentemente, era conhecida pela fase do portador inativo, distinguindo-se pelos níveis baixos de DNA viral no soro (<2000 UI/mL) e níveis normais das transaminases, com o HBeAg indetetável.<sup>226</sup>

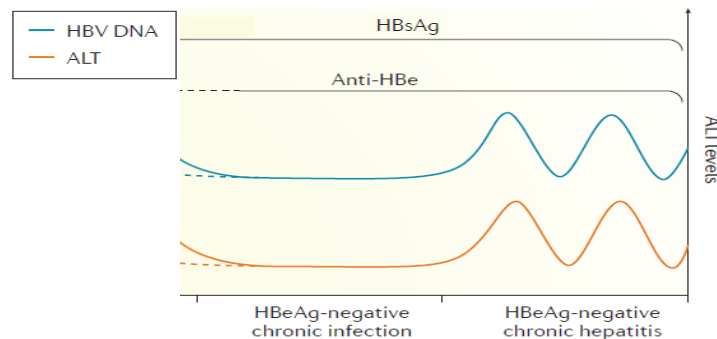


**Figura 33** - Esquema da terceira fase de uma infecção crônica por HBV.  
Adaptado de <sup>226</sup>.

Normalmente, é uma fase longa em que os indivíduos infetados costumam possuir ainda níveis intermédios a elevados de replicação, o que leva a uma maior velocidade de evolução da doença para cirrose. Ainda assim, uma fração reduzida dos indivíduos infetados (0,2-2,0%) parece conseguir eliminar o HBsAg do soro, apresentando anticorpos anti-HBs. Este acontecimento é indiscutivelmente de bom prognóstico, por significar uma cura funcional da doença. De realçar que o DNA do vírus ainda persiste intrahepaticamente sob a forma de cccDNA e eventualmente DNA integrado no DNA do hospedeiro, apresentando níveis reduzidos de replicação e transcrição.<sup>226,233</sup>

#### **-Quarta fase: Hepatite crónica com HBeAg negativo**

Por fim, uma porção dos indivíduos entra nesta fase em que, como se pode observar na **Figura 14**, é possível detetar-se uma espécie de reativação da doença. Existindo flutuações dos níveis das transaminases e do DNA viral, com certos casos a sofrerem uma reversão para positividade de HBeAg no soro.<sup>229,231</sup>



**Figura 34** - Esquema da quarta fase de uma infeção crónica por HBV.

Adaptado de <sup>226</sup>.

## Factores e mecanismos de persistência da infeção por HBV

Uma cura funcional, ou recuperação clínica, não significa diretamente uma resolução completa da infeção por HBV, já que existe a possibilidade da persistência do genoma viral sob a forma de cccDNA e de DNA integrado, nos núcleos de alguns hepatócitos.<sup>234-236</sup>

Nestes casos, a persistência do vírus pode ser considerada como a variação entre um estado ativo e um estado oculto da infeção ao longo do tempo, sendo possível distingui-los pelos marcadores de atividade do vírus como, por exemplo, o DNA viral, HBsAg e o HBeAg.

**Tabela 13** - Definições dos diferentes estados da infeção por HBV.<sup>237</sup>

Estado da infeção	Definição
Cura funcional	O HBsAg e DNA viral tornam-se indetetáveis de forma contínua no soro. Podendo existir, ou não, a seroconversão para anticorpos anti-HBs após a resolução de uma infeção aguda ou a recuperação de uma infeção crónica de forma espontânea ou por ação de tratamento antiviral.
Cura completa	Eliminação completa de todo o DNA integrado e todo cccDNA com total capacidade de replicação dos viriões presentes nos hepatócitos.
Infeção ativa ou <i>ouvert</i>	HBsAg detetável no soro.
Infeção crónica	Deteção contínua de HBsAg no soro, durante 6 meses no mínimo.
Infeção oculta	Presença de DNA viral com total capacidade replicativa (cccDNA) nos hepatócitos quando os níveis de HBsAg são indetetáveis.

Como é apresentado na **Tabela 13**, a presença de cccDNA com total capacidade replicativa acaba por ser essencial no estabelecimento de uma infeção crónica oculta, sendo que para se obter a cura completa é necessária a eliminação dos hepatócitos contendo este material genético, abolindo a capacidade replicativa do vírus.

Atualmente, sabe-se que o HBV utiliza diversos mecanismos que permitem a instauração de infeções crónicas. Estes mecanismos têm a função de suprimir e manipular ambas as respostas,

inata e adaptativa, o que acaba por possibilitar a persistência da infecção aguda e evolução para infecção crônica.<sup>238</sup>

### **Mecanismos de imunossupressão do sistema imunitário inato**

Como foi referido anteriormente, há bastantes evidência que o HBV ter-se-á adaptado ao nosso sistema imune inato, de forma a conseguir evitar as suas respostas e facilitar a sua replicação nos hepatócitos.

A sua adaptação pode ser observada nos momentos iniciais da infecção, começando pelo seu ciclo replicativo. O vírus utiliza o núcleo da célula infetada como refúgio do seu material genético, que como possui uma estrutura semelhante à estrutura do material genético da célula hospedeira consegue escapar aos sensores de DNA viral. É no núcleo que serão produzidos os seus produtos transcricionais (mRNAs), que também apresentam estrutura semelhante aos da célula infetada, pois apresentam *capping* e poliadenilização, permitindo-lhes não serem detetados pelos mecanismos de defesa da célula. Posteriormente, são traduzidos em proteínas virais que vão integrar o virião e servir de proteção para o seu genoma replicativo.<sup>87,239</sup>

Após a produção dos viriões, estes estão prontos para entrar na circulação hepática e infetar mais hepatócitos. Sendo que nesta fase entram em ação outros tipos de factores e mecanismos de supressão e modulação do sistema imune inato.

#### **- Imunossupressão dos PRRs e da cascata de sinalização da família dos interferões**

Os PRRs e a consequente cascata de sinalização da família dos IFNs são vias de sinalização muito importantes na resposta antiviral inata contra a infecção por HBV. A deteção de PAMPs leva à ativação das cascatas de sinalização e por consequente a produção de citocinas inflamatórias e interleucinas como o IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, entre outras. Os mecanismos replicativos e genoma virais são bastantes sensíveis à ação efetuada por estas moléculas, como já foi referido anteriormente.

Sempre se pensou que o HBV age como um vírus com capacidade de evadir o sistema imune inato, por induzir respostas muito fracas ou até mesmo indetetáveis da família dos interferões e dos ISGs. No entanto, vários estudos realizados em chimpanzés, ratos transgênicos e culturas celulares modificadas para oferecerem um ambiente semelhante ao dos hepatócitos (células HepG2),

indicam que o mais provável é que o vírus para além de conseguir evadir as defesas do hospedeiro, consegue ainda inibir as mesmas defesas. Na **Figura 15** é possível observar as ações imunorreguladoras que os antígenos do HBV exercem sobre o sistema imune, quando os seus níveis plasmáticos se elevam exponencialmente.<sup>238,240</sup>

Os antígenos HBs e HBe são proteínas virais com importantes funções no estabelecimento de uma infeção crónica. Estes antígenos são dos mais importantes na supressão da cascata de sinalização dos interferões, pois a sua ação assenta na inibição direta dos TLRs nas membranas dos hepatócitos, como das células efetoras do sistema imune inato.<sup>161</sup>

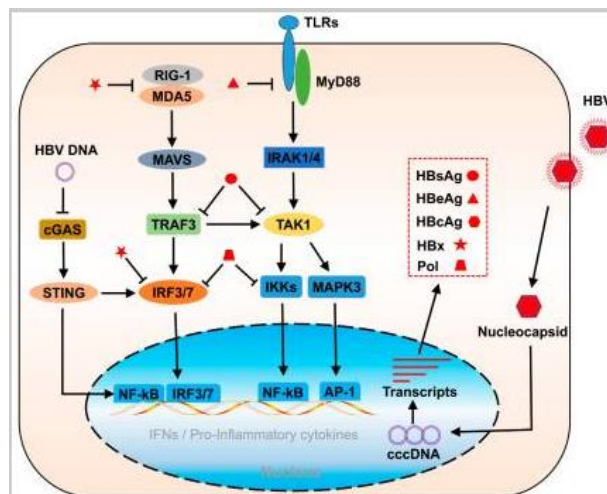
Um dos relatos é que estes recetores aparecem em sub-expressão nas CMSPs e nos hepatócitos de indivíduos com infeção crónica com HBeAg positivo, quando comparados com indivíduos infetados cronicamente com HBeAg negativo. Outros estudos também apontam o HBeAg como inibidor primário de outros recetores da família dos TLRs, como é o caso do TIR, que são importantes na cascata de ativação dos ISGs e de promotores de atividade dos interferões. Tal como o HBeAg, os níveis elevados de HBsAg também estão relacionados com os níveis reduzidos de expressão dos mesmos tipos de recetores membranares, nas mesmas células que o HBeAg afeta. Adicionalmente, o HBsAg também está relacionado com a disfuncionalidade das células dendríticas, inibindo a capacidade de produção dos interferões e outras citocinas inflamatórias importantes nas mesmas.<sup>241–245</sup>

Assim, as respostas imunes mediadas pelos recetores do tipo dos TLRs são quase completamente inibidas pelos níveis elevados de HBeAg e HBsAg, promovendo a elevada replicação do HBV e a persistência da sua infeção. O que está de acordo com o facto de estes serem os antígenos que se mantêm em níveis elevados durante a maior parte das infeções crónicas, devido às partículas subvirais (partículas não-infecciosas, por serem cápsides sem material genético viral no seu interior, compostas unicamente por antígenos HBc e HBs) que são produzidas em níveis muito mais elevados que os viriões em si.<sup>246,247</sup>

O antígeno HBc também é conhecido por ter um papel na regulação do sistema imune inato e na inflamação, por possuir a capacidade de levar à sobre-expressão do recetor TLR2 nas KCs e, depois, ativar este mesmo recetor. Ao ativar-se o TLR2 nestas células estimula-se a sua produção de IL-10, induzindo-se a supressão dos linfócitos Tc. O HBcAg tem ainda capacidade de inibir a proteína MxA, que se trata de uma proteína intracitoplasmática com ação antiviral crucial no combate aos RNAs do HBV.<sup>248,249</sup>

Outro antígeno importante nesta questão é a proteína viral HBx, sendo relatado que esta possui a capacidade de regular e modular as vias de sinalização dos PRRs. Sendo vários os mecanismos utilizados, como a promoção da degradação e inibição do MAVS, a inibição da ativação dos genes RIG-I e MDA-5, a partir da indução da sobre-expressão da enzima ADAR1 que vai impedir a transcrição dos RIG-I e MDA-5 e ainda consegue suprimir a capacidade dos hepatócitos reconhecerem o RNA.<sup>250-253</sup>

Por fim, a polimerase viral está também referenciada por conseguir inibir os mecanismos relacionados com a produção de IFN. A sua sobre-expressão acaba por inibir a ativação de vários indutores da produção de IFN- $\beta$  em diversas linhagens celulares, como o IRF, NF- $\kappa$ B e o STING. Isto leva a uma melhor capacidade de evasão das defesas inatas e também confere uma resistência a tratamentos com IFN.<sup>254-256</sup>



**Figura 35** - Alvos das ações imunorreguladoras dos diferentes antígenos do HBV. Adaptado de <sup>161</sup>.

### **- Imunorregulação da atividade das células dendríticas pelo HBV**

As DCs, devido à sua função de apresentação de antígenos, são consideradas a ponte de ligação entre a resposta imune inata e a ativação da resposta imune adaptativa. Tendo sido reportado por vários autores que a sua disfuncionalidade acaba por ser um dos factores importantes na cronicidade das infeções por HBV e progressão de doença hepática. Adicionalmente, é comum ser detetado um menor número de DCs no sangue periférico em pessoas com infeção crónica, quando comparado com esse número em pessoas saudáveis. Tal facto provoca provavelmente uma indução

ineficaz da resposta adaptativa e, como consequência, a disfuncionalidade dos linfócitos T específicos para o HBV.<sup>257</sup>

Esta disfuncionalidade das DCs advém de um conjunto de alterações mediadas pelo vírus. Verifica-se um decréscimo da capacidade de apresentação de antígenos e de migração, devido a uma redução da expressão de um transdutor de sinal da IL-6, o gp130. Adicionalmente, é comum observar-se uma supressão na transdução dos sinais de coestimulação dos linfócitos T, por sub-expressão dos CD80, CD83, CD86 e CD40 nas membranas das DCs.<sup>257</sup>

Alguns dos antígenos virais também parecem exercer uma ação moduladora da estrutura das DCs. Começando pelo HBsAg, que tem a capacidade de reduzir a produção de IL-12 pelo comprometimento da via de sinalização *JNK-MAPK*, o que leva a um fenótipo celular bastante tolerogénico. O HBeAg também tem a capacidade de induzir a conversão das DCs derivadas da medula óssea num tipo específico de DCs regulatórias, que demonstram uma capacidade estimulatória dos linfócitos T e de produção de IL-12, extremamente reduzida. Por fim, os antígenos virais com especial foco no HBsAg conseguem diminuir a expressão dos recetores TLR importantes na maturação das DCs, o que resulta numa redução na secreção das citocinas importantes como a IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN ( $-\alpha$ ,  $-\gamma 1$  e  $-\gamma 2$ ).<sup>258-261</sup>

### **- Imunorregulação dos macrófagos pelo HBV**

Os macrófagos hepáticos, denominados por KCs, são células efetoras do sistema imune inato importantes no combate ao HBV. Isto pela sua capacidade de apresentação de antígenos, por também conseguirem produzir citocinas importantes no recrutamento e maturação da resposta imune adaptativa e por corresponderem à maior população de células do sistema imune inato presente no fígado.<sup>262</sup>

A infeção por HBV induz a produção de citocinas imunomoduladoras como a IL-10 e o TGF- $\beta$ , juntamente com a expressão de PD-1 e PD-2, que acabam por ter uma ação supressora da resposta adaptativa anti-HBV.<sup>263</sup>

As respostas das KCs aos diferentes antígenos virais acabam por promover a persistência do vírus. À exceção da interação com o HBsAg, em que as KCs são induzidas a produzir citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e TNF- $\alpha$ . No entanto, no caso do HBeAg, este vai ativar os recetores TLR2 e promover um ambiente de imunotolerância no fígado, pela produção de IL-10. Sendo esta

interação comprovada em estudos onde a remoção ou do TLR2 ou das KCs levou a um aumento da eliminação viral e das funções dos linfócitos Tc contra o vírus.<sup>264,265</sup>

O HBeAg também acaba por alterar a função destas células por supressão de cascatas de sinalização importantes na maturação e produção de certas citocinas proinflamatórias e na produção de espécies reativas de oxigénio.<sup>266</sup>

Os macrófagos derivados de monócitos provenientes do sangue periférico, também sofrem alterações na sua atividade pela ação do HBV e dos seus antigénios, tendo sido já referido que os macrófagos, após fagocitose de HBcAg, acabam por apresentar maior atividade anti-inflamatória. A interação com o HBsAg também acaba por inibir a produção das citocinas proinflamatórias, anteriormente referidas. Por fim, os monócitos, ao entrarem em contacto com o HBV, acabam por se maturar em macrófagos do tipo M2. Estes promovem a atividade imunossupressora dos linfócitos Treg que, em conjunto com os mecanismos falados nos parágrafos anteriores, vão promover a manutenção e persistência da infeção e a aceleração dos processos de fibrose no tecido hepático.<sup>267-269</sup>

### **- Imunorregulação das células NK pelo HBV**

As células NK são consideradas as principais células efetoras do sistema imune inato. Este grupo de células constitui até metade dos linfócitos intra-hepáticos, nos seres humanos, e são a primeira linha de defesa contra organismos patogénicos. A sua ativação e funções estão associadas com uma contenção eficiente da infeção por HBV. Em particular, a sua ativação mediada por anticorpos, desempenha um papel vital na resolução das infeções agudas autolimitadas.<sup>270,271</sup>

Actualmente, sabe-se que a disfuncionalidade e a expressão anormal dos recetores de membrana das células NK hepáticas contribuem para a persistência das infeções por HBV. Para além disto, estes factores acabam também por contribuir na progressão da infeção crónica para HCC, sendo comum estarem relacionadas com mau prognóstico da doença e sobrevivência dos indivíduos. Esta disfunção, detetada em infeções crónicas por HBV, parece estar associada com os níveis reduzidos de recetores de ativação das NK e de citocinas proinflamatórias, juntamente com o aumento de recetores e citocinas com função inibitória das NK.<sup>272-274</sup>

Por outro lado, os papeis dos antigénios virais na imunorregulação destas células ainda não se encontra totalmente compreendido. Recentemente, foi possível observar-se que os antigénios HBs

e HBe funcionam como mediadores inibitórios das células NK por interação direta, pois estes acabam por interferir com a capacidade de se ativar os recetores STAT1, NF- $\kappa$ B e p38-MAPK.<sup>275</sup>

Quando a ativação destes recetores é afetada, é comum observar-se uma perda de capacidade citotóxica e de produção de citocinas pró-inflamatórias. Adicionalmente, os monócitos que tenham sido ativados pelo HBsAg, acabam por se tornar monócitos imunossupressores, com a capacidade de promoverem uma conversão das células NK em células NK regulatórias, por ação do PD-L1 e MHC-I. Este tipo de NKs são produtoras de IL-10, o que acaba por contribuir também para a persistência da infeção crónica.<sup>268,275</sup>

## **Mecanismos de imunossupressão do sistema imunitário adaptativo**

Como já foi referido no capítulo anterior, a imunidade adaptativa possui um papel crítico na defesa do organismo contra uma infeção por HBV. Pela ação das APCs dá-se a ativação, proliferação e maturação dos linfócitos Th e Tc específicos para o HBV e estes dois grupos de células vão orquestrar e induzir a resposta contra o HBV de forma vigorosa. No entanto, no caso das infeções crónicas por HBV, esta imunidade encontra-se fraca quantitativamente e funcionalmente. As causas destes acontecimentos podem ser devidas ao facto da capacidade de apresentar antígenos pela imunidade inata se encontrar inibida, como foi falado anteriormente, em conjunto com a ação imunomoduladora dos antígenos virais sobre a imunidade adaptativa, levando à persistência da infeção.

### **- Imunossupressão dos linfócitos citotóxicos pelo HBV**

A alteração da capacidade da imunidade inata ativar a imunidade adaptativa é o principal mecanismo indireto de imunossupressão dos linfócitos Tc. A partir dos mecanismos falados nos capítulos anteriores, a sub-expressão das moléculas e recetores co-estimulatórios das APCs e a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e cascatas de sinalização, tornam a ativação dos linfócitos Tc ineficaz. Como consequência, as suas funções acabam por ser afetadas negativamente e a sua capacidade de resposta ao HBV diminui, o que promove a persistência da infeção.

Os mecanismos diretos reportados, são mecanismos que alteram efetivamente a estrutura e funcionalidade dos linfócitos Tc, estabelecendo-se um estado de fadiga funcional dos mesmos. A infeção por HBV leva à sobre-expressão de diversas moléculas membranares com ações pro-

apoptóticas como a proteína 11 *Bcl-2-like* e também de certos recetores inibitórios como o PD-1, CTLA-4, CD244, entre outros. Estes acabam por levar a um estado de exaustão dos linfócitos Tc que resulta na incapacidade de estes produzirem citocinas importantes como a IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , juntamente com a perda das suas capacidades citotóxicas e proliferativas<sup>276-279</sup>. Por fim, o mecanismo de supressão mais reportado é a estimulação excessiva dos linfócitos Tc com os antigénios virais, HBs e HBe, de uma forma contínua. Durante a infeção por HBV, dá-se a produção contínua de HBsAg sob a forma de partículas subvirais numa proporção de até mil vezes maior que a quantidade de viriões infecciosos. Esta quantidade excessiva de partículas subvirais acaba por funcionar como um método de evasão e defesa das partículas virais contra as defesas do sistema imune adaptativo humoral e celular. As partículas subvirais acabam por funcionarem como um engodo para o sistema imune, promovendo um estado de anergia dos linfócitos T específicos para o HBV devido ao facto de estarem constantemente a ativarem as cascatas de sinalização dos linfócitos levando à sua exaustão. Em conjunto com a ação do HBsAg, o HBeAg também consegue promover um estado de tolerância viral por levar à sub-expressão do CD28 nos linfócitos Tc, que funciona como uma molécula co-estimulatória importante na ativação dos mesmos.<sup>280-282</sup>

Concluindo, estes mecanismos em conjunto acabam por conseguir levar a um estado de exaustão e disfunção dos linfócitos Tc específicos para o HBV, o que acaba por ser crucial para a persistência da infeção na maioria das infeções crónicas.

### **- Imunossupressão dos linfócitos T helper pelo HBV**

Os linfócitos Th são muito importantes na regulação da ação antiviral dos linfócito Tc durante as infeções por HBV. Dada a sua importância, a sua disfuncionalidade é considerada o factor mais importante envolvido na incapacidade de resposta e falha da ação dos linfócitos Tc contra a infeção.

Assim, tem sido dada cada vez mais importância e atenção às consequências da exaustão dos linfócitos Th, estando já identificada a importância dos antigénios virais, HBs e HBe, nesta exaustão. Por exemplo, o HBeAg tem a capacidade de aumentar a expressão de certas moléculas inibitórias, como o PD-1, na superfície membranar dos linfócitos Th, resultando na disrupção das funções e dos níveis dos mesmos. Por outro lado, os níveis elevados de HBsAg resultam na sobre-expressão de inibidores que vão afetar a capacidade de iniciar as cascatas de ativação dos linfócitos Th, nomeadamente as cascatas ERK e p38 MAPK. Foi também já demonstrado que as infeções

por HBV levam à expressão aumentada de recetores TRAIL, que acabam por se tornar alvos de linfócitos NK TRAIL<sup>+</sup>, contribuindo ainda mais a redução dos níveis deste grupo de células.<sup>283–286</sup>

Dentro do grupo dos linfócitos Th temos os linfócitos Tfh, que são importantes na formação e maturação de plasmócitos, nos centros germinativos do tecido linfoide, e na sua função secretora de anticorpos. Esta ação demonstra a sua importância na regulação e orquestração da resposta humoral e, em específico, na seroconversão em anticorpos anti-HBs, que por sua vez auxilia na eliminação e controlo das infeções. No entanto, a sua deficiência acaba por levar à inibição da formação de centros germinativos no baço e, por conseguinte, a uma menor eficiência da ação da resposta humoral. Adicionalmente, as infeções por HBV promovem significativamente a formação de linfócitos Tfh regulatórios. Estes expressam níveis elevados de recetores inibitórios, como o PD-1 e CTLA-4, e secretam níveis elevados de citocinas anti-inflamatórias, resultando na supressão dos centros germinativos e da ação dos linfócitos B e Tc.<sup>287–290</sup>

Em suma, o HBV tem a capacidade de alterar fortemente a ação dos linfócitos Th e ainda de reduzir os seus níveis, o que leva a uma exaustão funcional dos mesmos. A disfuncionalidade dos linfócitos Th resulta numa menor capacidade de resposta à infeção por HBV, devida à menor capacidade de ativação, proliferação e maturação dos linfócitos Tc e ainda, ao atrofiar a capacidade de produção de citocinas anti-inflamatórias dos linfócitos Th, o que promove uma exaustão precoce dos Tc.

### **- Imunossupressão dos linfócitos B pelo HBV**

Os linfócitos B apresentam funções essenciais no combate e controlo da infeção por HBV e, como tal, o vírus apresenta mecanismos de supressão dessas funções.

Como já foi referido anteriormente, são os linfócitos B que produzem os anticorpos específicos para os antígenos do HBV. A função destes anticorpos vai desde a prevenção da entrada das partículas virais nos hepatócitos, à opsonização das partículas virais no meio extracelular. Funções estas que, em conjunto com os restantes mecanismos de defesa, promovem nos casos normais o controlo e eliminação da infeção. No entanto, apesar de se saber que o número total de linfócitos B está aumentado nos casos de infeção crónica por HBV, o número de linfócitos B específicos para o HBV encontra-se reduzido e as suas funções encontram-se comprometidas. Como por exemplo, a capacidade de produzir anticorpos anti-HBs e de proliferação, especialmente nos linfócitos B hiperativados e a expressar CD69 e CD71.<sup>213,291–293</sup>

Um estudo efetuado por Burton *et al.* permitiu identificar um fenótipo atípico dos linfócitos B de memória (CD21<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) em indivíduos infectados cronicamente por HBV. Para além do fenótipo atípico, foi possível detetar-se recetores de membrana inibitórios como o PD-1, BTLA e CD22, que no seu conjunto levam ao comprometimento das capacidades de sobrevivência, proliferação e produção de anticorpos e citocinas pró-inflamatórias. Para além destas funções, a capacidade dos linfócitos B se diferenciarem em plasmócitos produtores de anticorpos também se encontrava afetada, o que leva a uma incapacidade de estabelecer uma resposta humoral eficaz e vigorosa nos indivíduos infectados cronicamente.<sup>294</sup>

Outro mecanismo reportado, é a ação imunossupressora que o HBcAg tem sobre os linfócitos B. Este antigénio ao ligar-se a estes linfócitos tanto consegue induzir uma sobre-expressão de certos recetores inibitórios, como consegue induzir fenótipos disfuncionais. Além disso, suprime a proliferação e ativação dos mesmos pela inibição da cascata de sinalização mediada pelos TLRs. Adicionalmente, o HBcAg parece levar a uma diferenciação dos linfócitos B normais em linfócitos B regulatórios, produtores de IL-10. Estes linfócitos B regulatórios acabam por suprimir a ação dos linfócitos Tc e conseguem ainda promover a conversão de linfócitos Th efetores em Th regulatórios, aprofundando ainda mais a ação de supressão dos linfócitos Tc e a manutenção de um ambiente de imunotolerância no fígado.<sup>292,295</sup>

Por fim, os linfócitos B também são conhecidos pela sua capacidade de apresentar antigénios. No entanto, esta ação nos indivíduos com infeção crónica por HBV apresenta-se bastante comprometida devido à redução da expressão de recetores co-estimulatórios, como o CD80 e CD40, nos próprios linfócitos B. Isto vai afetar as interações entre estes e os linfócitos Th efetores, contribuindo para o já referido estado de exaustão dos linfócitos T.<sup>296</sup>

## **Fatores de persistência da infecção por HBV**

No momento de uma infecção por HBV há certos factores, virais e do hospedeiro, que vão influenciar o desenrolar da infecção. Como exemplos temos as mutações ocasionais e polimorfismos que podem acontecer nos epítomos virais, a idade do hospedeiro quando é infetado, o estadio da infecção da mãe no momento da gravidez e o nível da carga viral no momento da infecção.

Todos estes factores têm a sua influência e são muitas vezes fulcrais no evolução da infecção: autolimitada com cura e convalescença, ou persistente e crónica.

### **- Mutações e polimorfismos nos epítomos virais**

Os sistemas HLA-I e -II presentes nos linfócitos T e nas APCs, possuem um papel crucial no momento da ativação da imunidade adaptativa, ditando a capacidade das APCs apresentarem os péptidos (antigénios) aos linfócitos T *naïve*.

O sistema HLA-II apresenta diferentes alelos, como o HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR, que codificam os MHC-II. Estes complexos são as estruturas que vão permitir a troca de antigénios entre as APCs e os linfócitos Th, ativando a resposta imune ao HBV.

Os diferentes alelos apresentam uma variabilidade genética, sendo detetados vários polimorfismos entre cada indivíduo, permitindo assim uma vasta gama de estruturas MCH-II que acaba por determinar uma grande variabilidade de antigénios que podem ser apresentados. Está descrito em diferentes regiões do mundo que, durante uma infecção por HBV, certos tipos de polimorfismos genéticos podem levar a uma maior imunotolerância devido à alteração das propriedades de ligação dos antigénios virais. Este acontecimento pode afetar a resposta imunológica ao vírus e consequentemente resultar na persistência da infecção.<sup>297-300</sup>

Para além disto, como já foi referido anteriormente, o HBV tem a capacidade de reduzir a expressão deste tipo de moléculas nas membranas das células envolvidas na apresentação de antigénios, o que por sua vez também acaba por influenciar a qualidade da resposta imunológica ao vírus.

### **- Influência da carga viral na evolução da infecção por HBV**

Asabe *et al.* relata a importância da carga viral presente no inóculo no desenrolar da infecção por HBV. As diferentes quantidades de genoma viral nesse inóculo podem ditar a persistência ou resolução da infecção aguda, tendo-se concluído que um inóculo considerado reduzido, como  $10^0$  a  $10^1$  moléculas de DNA viral, leva a uma propagação lenta, mas total, do vírus no fígado. Progredindo, na maioria dos casos, para infecção crônica. Por outro lado, inóculos intermédios ( $10^4$  a  $10^7$ ) e elevados ( $>10^7$ ) estão associados a bons prognósticos e à resolução das infecções, existindo apenas uma diferença na amplitude da infecção. Enquanto as infecções de inóculo intermédio acabam por ter uma propagação limitada no fígado ( $<0,1\%$  dos hepatócitos infetados) seguida de uma abrupta resolução da infecção, as infecções de elevado inóculo demonstraram uma propagação do vírus a todo o tecido hepático, tal como se verifica nas infecções de baixo inóculo. Ambas acabam por evoluir favoravelmente com a resolução da infecção, apesar desta ser mais demorada nas infecções de inóculo elevado devido à maior propagação da infecção.<sup>301</sup>

A conclusão a que se chegou foi que a carga viral influencia a qualidade do *priming* dos linfócitos Th, sendo este muito mais eficaz nas quantidades dos dois últimos cenários, o que conduzia a uma ação mais vigorosa e sincronizada dos linfócitos Tc, permitindo a resolução da infecção.

No caso das infecções de baixo inóculo para além do facto do *priming* dos linfócitos Th não ser tão eficaz, pensa-se também que o diferente destino das infecções com este inóculo pode advir de uma resposta por IFNs do tipo I. Os IFNs têm a capacidade de inibir a replicação viral a vários níveis, particularmente quando as cargas virais são elevadas. No entanto, quando as cargas virais do inóculo são reduzidas, verifica-se uma resposta diminuída dos IFNs, que por sua vez parece ter a capacidade de estimular a expressão dos genes virais. Esta estimulação dá-se pela ativação do factor nuclear  $3\gamma$  dos hepatócitos (HNF $3\gamma$ ) que estimula o promotor I do genoma viral e este, por sua vez, promove o aumento da expressão dos genes virais e o aumento da replicação viral nas fases iniciais da infecção, contribuindo assim para a persistência das infecções.<sup>302,303</sup>

### **- Influência da idade do hospedeiro na resposta imunitária ao HBV**

Como é evidente, a idade tem influência no desenvolvimento das infecções por HBV. A maioria das infecções na idade adulta resulta na resolução das mesmas, enquanto que as infecções em idades jovens terminam, na sua maioria, em infecções crônicas. Assim, é seguro de se hipotetizar que esta diferença de desfechos se deva à diferença do estado de maturação da imunidade de um adulto e de uma criança.

Dois estudos confirmam esta hipótese a partir do estudo da evolução de infecções em modelos animais (marmotas e ratos transgênicos) em diferentes fases de desenvolvimento.<sup>304-306</sup> Foi possível observar que, após a infecção de um grupo jovem e um grupo adulto, todos os animais adultos conseguiram resolver a infecção, enquanto que o mesmo não se observou em nenhum dos animais jovens, tendo-se verificado em todos a persistência da infecção.<sup>304,305</sup> Uma possível explicação encontrada num dos estudos foi que nos ratos adultos detetou-se uma maior produção de IL-21 em relação aos rato jovens. Esta produção advém, em maior grau, dos linfócitos Th foliculares e demonstrou-se ser crucial para o correto desenvolvimento das respostas por parte dos linfócitos Tc e B. Outro estudo realizado em indivíduos infetados confirma os estudos anteriores, ao constatarem que os indivíduos infetados que resolveram a infecção por HBV apresentavam níveis mais elevados de IL-21 em comparação com os indivíduos infetados cronicamente. Neste estudo foi também sugerido que a expressão nas KCs de um recetor dependente da idade, o CXCL13, desempenha um papel crucial na resposta ao HBV: é importante para o recrutamento de linfócitos B, bem como na arquitetura e desenvolvimento linfoide. Como tal, ao encontrar-se reduzido em idades mais jovens, acaba por ser outro factor a promover a persistência da infecção nessa faixa etária.<sup>304-306</sup>

### **- O efeito do estado infeccioso materno e a persistência da infecção por HBV**

Um outro factor crucial na persistência das infecções por HBV em idades jovens é o estado infeccioso da progenitora durante a gestação. Isto foi relatado por estudos recentes, em que se foi possível observar que os ratos transgênicos HBV negativos, nascidos de mães HBV-positivas, quando eram infetados em adultos eram mais suscetíveis à infecção, demorando mais tempo a resolverem a mesma ou chegando mesmo a cronificar. Por outro lado, os ratos adultos nascidos de mães HBV-negativas demonstravam-se muito mais capazes do que os anteriores, conseguindo resolver as infecções numa questão de poucas semanas. A explicação para este acontecimento é a

debilitação da resposta dos linfócitos Tc específicos do HBV, causada pelo aumento da expressão do recetor PD-1 nas membranas destes linfócitos e o respectivo ligando (PD-L1) nas KCs, tendo isto também sido detetado em indivíduos com infeções crónicas por HBV. Como já foi referido anteriormente, este recetor é um regulador da atividade dos linfócitos Tc e a interação entre o recetor e o seu ligando leva a uma supressão da atividade e função dos linfócitos. A confirmação da importância do PD-1 foi demonstrada quando se inibiu esta interação, o que levou à recuperação da funcionalidade dos linfócitos Tc e, posteriormente, à resolução da infeção.<sup>307-309</sup>

Vários estudos relatam outro factor com bastante influência no desenvolvimento da infeção por HBV: A positividade de HBeAg da progenitora durante a gestação. É relatado que o HBeAg materno tem a capacidade de passar a placenta e de preconditionar as KCs da criança a tornarem-se macrófagos anti-inflamatórios do tipo M2, depois de serem estimulados novamente pelo HBeAg após o parto. Isto leva à formação de um ambiente hepático tolerogénico e imunossupressivo e está associado à persistência da infeção, uma vez que levam à exaustão dos linfócitos Tc específicos do HBV, sendo que estes macrófagos por terem tempos de sobrevivência longos, permitem uma supressão dos linfócitos durante longos períodos de tempo.<sup>307,310</sup>

## Hepatocarcinogénese relacionada com a infeção por HBV

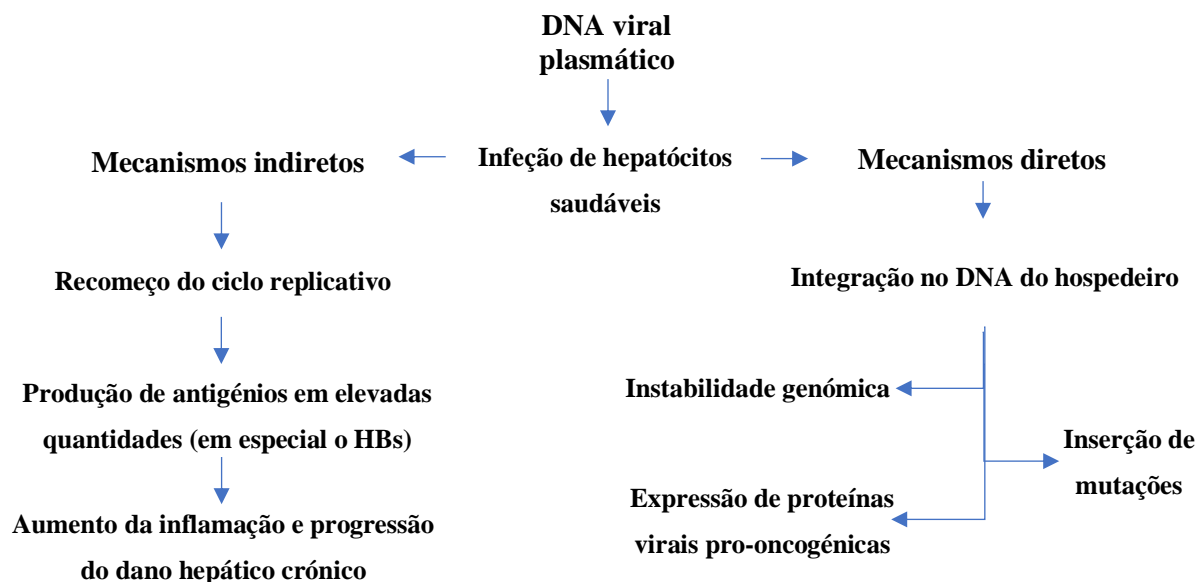
O HCC é o quarto cancro mais mortal nível mundial e o seu factor de risco mais comum é a infeção crónica por HBV. Nestas infeções, a probabilidade de se desenvolver HCC é dez a mil vezes maior do que nas pessoas saudáveis e, para além desta aumentar com o passar dos anos de infeção, existem vários factores, virais e do hospedeiro, que promovem a evolução para HCC.<sup>311,312</sup>

Como já foi referido anteriormente, a patogénese é exclusivamente mediada pelo sistema imune do hospedeiro. Após a deteção da infeção, é despoletada uma resposta imune contra o HBV e, nas infeções crónicas, inicia-se um ciclo crónico de inflamação e dano hepático, seguido da regeneração do tecido ao longo de décadas. Isto leva a uma progressão do dano hepático, pela forma de fibrose do tecido, que acaba por promover o desenvolvimento de cirrose e tumorogénese.

Apesar de não provocar dano direto no fígado, o HBV possui a capacidade de promover a tumorogénese na fase avançada da infeção, a partir de alguns mecanismos mediados por certos componentes virais.

### Relação entre o DNA viral sérico e HCC

O DNA viral é o material genético do HBV e a sua quantificação no plasma reflete os níveis da replicação viral. No entanto, a concentração de DNA viral no plasma também aparenta estar relacionada com a progressão da doença, sabendo-se que este se encontra associado a certos mecanismos diretos e indiretos de tumorogénese.



## Relação entre o antígeno HBs e HCC

O HBsAg pode ser traduzido a partir do cccDNA e do DNA integrado. O HBV possui dois mRNAs que codificam as três variantes do HBsAg. Estas formas do HBsAg têm a capacidade de formar os viriões normais que serão libertados da célula para infectar outras células, mas também conseguem formar partículas virais não-infecciosas no retículo endoplasmático. As partículas subvirais costumam possuir formas esféricas ou filamentosas, podendo chegar a quantidades 1000 a 10000 vezes superior que aos viriões no soro.<sup>313</sup>

Como já foi referido nos capítulos anteriores, estas partículas não-infecciosas podem servir como mecanismo de imunomodulação, a partir do sequestro dos anticorpos anti-HBs e por poderem servir de isco às células do sistema imune. Tal estratégia permite aos viriões continuarem o ciclo de infeção sem serem detetado e promover a persistência da infeção.

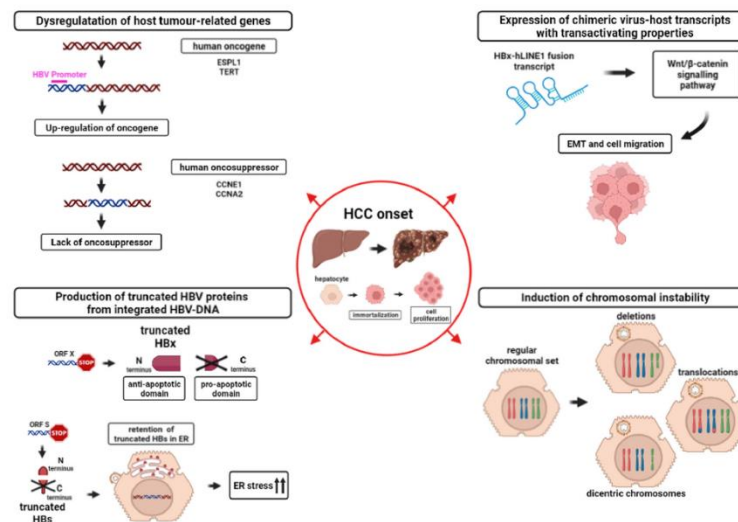
A relação deste antígeno com o HCC está já bastante documentada, sendo relatado que níveis séricos elevados de HBsAg estão associados a um maior risco de progressão para HCC. Proporcionalmente, a seroconversão do anti-HBs está associada a um bom prognóstico e um menor risco de desenvolver HCC.<sup>314-316</sup>

A inflamação crónica promovida pelas respostas do hospedeiro contra o HBsAg parecem promover a oncogénese. Num estudo utilizando ratos transgénicos, foram transplantados hepatócitos produtores de HBsAg nos ratos. Os resultados foram um despoletar das defesas mediadas pelos linfócitos Tc, com apoptose dos hepatócitos e inflamação crónica que acabou por progredir para HCC. Para além da inflamação crónica, também já foi reportado em modelos *in vitro* que o HBsAg consegue promover a capacidade invasiva do HCC a partir da cascata de sinalização TLR2/MyD88/NF-κB.<sup>317,318</sup>

Outro mecanismo relatado é o que refere que antígenos HBs com mutações nas regiões Pre-S1 e Pre-S2, ou formas truncadas, podem exercer ação oncogénica direta, pela sua capacidade de alterar o metabolismo lipídico da célula hospedeira. Isto leva a um stress no retículo endoplasmático, induzindo dano oxidativo no DNA da célula e instabilidade genómica, aumentando o risco de desenvolvimento de HCC. Adicionalmente, foi já demonstrado que estas formas truncadas conseguem inibir a reparação das quebras de dupla-cadeia no DNA do hospedeiro e contribuir para a instabilidade genómica e para a transformação neoplásica dos hepatócitos.<sup>319-</sup>

## Relação entre a integração do DNA viral e HCC

Como já foi referido anteriormente, o DNA viral integrado não vai possuir a capacidade de replicação viral devido à falta de promotores das ORFs correspondentes ao pgRNA, ao HBcAg e à retrotranscriptase. Apresentando apenas os promotores referentes às ORF S e ORF X e assim possuindo a capacidade de produzir apenas o HBsAg e a proteína X, que são ambos conhecidos por estarem relacionados com o desenvolvimento de HCC.



**Figura 36** - Mecanismos carcinogênicos despoletados pela integração do DNA viral  
Adaptado de 1.

A integração do DNA viral é conhecida por desregular os genes circundantes à sua zona de integração. Como se pode observar na **Figura 16**, esta desregulação pode ativar mecanismos que podem despoletar uma seleção de clones dos hepatócitos que possuam propriedades anormais de sobrevivência e proliferação, causando a sua transformação neoplásica.<sup>323-325</sup>

### - Desregulação de genes oncogénicos

Este mecanismo resulta da integração do DNA viral numa zona em que estão presentes genes que regulam funções celulares cruciais, como genes de regulação do ciclo celular, da imortalização celular, de regulação da interação intercelular e sinalização celular. A integração nestas zonas pode induzir alterações nesses genes e levar a uma aquisição de propriedades pro-oncogénicas pelo hepatócito infetado.<sup>326,327</sup>

Vários estudos relatam que, apesar de a integração do DNA viral parecer dar-se aleatoriamente no genoma dos tecidos infetados não-tumorais, quando se analisa biópsias de tumores hepáticos é

possível observar-se que a integração nestes tecidos é recorrente em certas zonas específicas do genoma que estão envolvidas em mecanismos carcinogénicos. Os genes mais frequentemente detetados são TERT, MAPK1, MLL2 e MLL4, CCNE1 e CCNE2, TP53, CTNNB1, FAR2, ITPR1 e IRAK2. Entre estes os TERT, CCNE1 e CCNE2 são os que apresentam maior frequência de integração e revelou-se que mais de 90% das biópsias de tumor apresentam integração nestes genes enquanto que apenas menos de 10% das biópsias não tumorais apresentam integração nos mesmos. Este facto reforça a hipótese de estes possuírem um papel nos mecanismos de carcinogénese relacionada com HBV.<sup>328</sup>

Recentemente descobriu-se que a integração específica do promotor I do HBV a montante do gene TERT aumenta a expressão deste mesmo gene. Isto leva a uma maior capacidade de manter a integridade dos telómeros e aumenta a estabilidade dos hepatócitos danificados, o que é crucial para estes hepatócitos superarem o mecanismo de senescência celular e iniciarem uma transformação neoplásica.<sup>329-331</sup>

#### **- Expressão de transcritos quiméricos vírus-hospedeiro com propriedades transativadoras**

Como no caso do aumento da expressão do gene TERT, já mencionado, é possível que se dê a produção de transcritos com origem na fusão de genes do vírus e do hospedeiro. Um dos exemplos deste mecanismo é o transcrito resultante da fusão entre os genes que codificam a proteína X do HBV e os genes LINE1 do hospedeiro. Este transcrito pode atuar como um ativador da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, que regula várias funções celulares importantes como a proliferação, diferenciação, migração, entre outras. A desregulação desta via de sinalização pode trazer várias consequências tal como a promoção do desenvolvimento de HCC.<sup>332-334</sup>

#### **- Produção de proteínas virais truncadas**

O DNA viral integrado é uma das fontes principais das proteínas virais HBx e HBs e/ou das suas formas alteradas. O que por sua vez contribui para a persistência da infeção e com isto o dano hepático contínuo e progressão para HCC.

No caso da HBx, esta acaba por ser produzida em elevadas quantidades com uma deleção na sua extremidade C-terminal. Esta forma da HBx consegue inibir a apoptose do hepatócito e induzir

o ganho de propriedades típicas de célula estaminal e assim acaba também por promover a transformação neoplásica dos hepatócitos.<sup>335</sup>

No caso do antigénio HBs, como já foi referido no capítulo anterior, este promove a manutenção da inflamação e protege os viriões da resposta imune do hospedeiro. No entanto, em certos casos, dá-se a produção de antigénios S truncados, que como foi referido anteriormente, acabam por promover o stress oxidativo, dano no DNA do hospedeiro e inibição da reparação do DNA genómico celular.

### **- Indução de instabilidade cromossómica**

Por fim, a integração do DNA viral pode levar a um estado geral de instabilidade genómica, aumentando o risco de se acumularem rearranjos que promovem ainda mais a transformação neoplásica dos hepatócitos.<sup>336-338</sup>

Num estudo recente efetuado por análise dos perfis de integração do DNA viral em biópsias de tecido tumoral, observou-se que as integrações no genoma celular podem causar modificações catastróficas, como fusões de cromossomas não-homólogos, cromossomas dicêntricos e longas deleções dos telómeros. Estes eventos são críticos, pois podem conduzir à perda de certos genes oncosupressores como o TP53, ARID1A, RB1, RPS6KA3 e o IRF2. Adicionalmente, este estudo estimou que estes eventos podem ter ocorrido décadas antes da manifestação do tumor, reforçando assim o seu papel promotor da hepatocarcinogénese.<sup>339</sup>

## Diagnóstico e Monitorização de infeções por HBV

Em 2011, a OMS decidiu reconhecer as hepatites virais como um problema de saúde mundial. Em 2015 publicou o primeiro plano de ação para o controlo da infeções por HBV, sendo o objetivo deste plano reduzir até 2030 a morbilidade e a mortalidade observadas nos indivíduos com hepatites crónicas.

Em consequência do aumento da adesão à vacinação neonatal e tratamento *prepartum*, pensa-se ser possível erradicar a hepatite B. No entanto, como já foi referido, ainda existem centenas de milhões de indivíduos com hepatite B crónica espalhados pelo mundo com apenas 10 milhões destes diagnosticados. Isto é um problema grave e um obstáculo tanto ao tratamento e cuidado dos indivíduos infetados cronicamente, como à prevenção da transmissão. Assim, para que se consiga um rastreio e diagnóstico eficiente, é necessária uma abordagem multifatorial de forma a conseguir-se uma avaliação clínica completa do estado dos indivíduos infetados, permitir um prognóstico e planear a abordagem clínica a ter-se com cada caso.

### Diagnóstico e monitorização utilizando marcadores virais

As recomendações publicadas pela CDC, em 2023, recomenda: (i) o rastreio da infeção por HBV, pelo painel triplo de testes (HBsAg, Anti-HBs e Anti-HBc), para todos os adultos acima dos 18 anos pelo menos uma vez na vida; (ii) o rastreio de todas as mulheres grávidas pela deteção do HBsAg, independentemente do estado de vacinação das mesmas e do seu histórico de testes; e (iii) efetuar-se o rastreio periódico recorrendo ao painel triplo de testes a qualquer pessoa que seja considerada suscetível.<sup>340</sup>

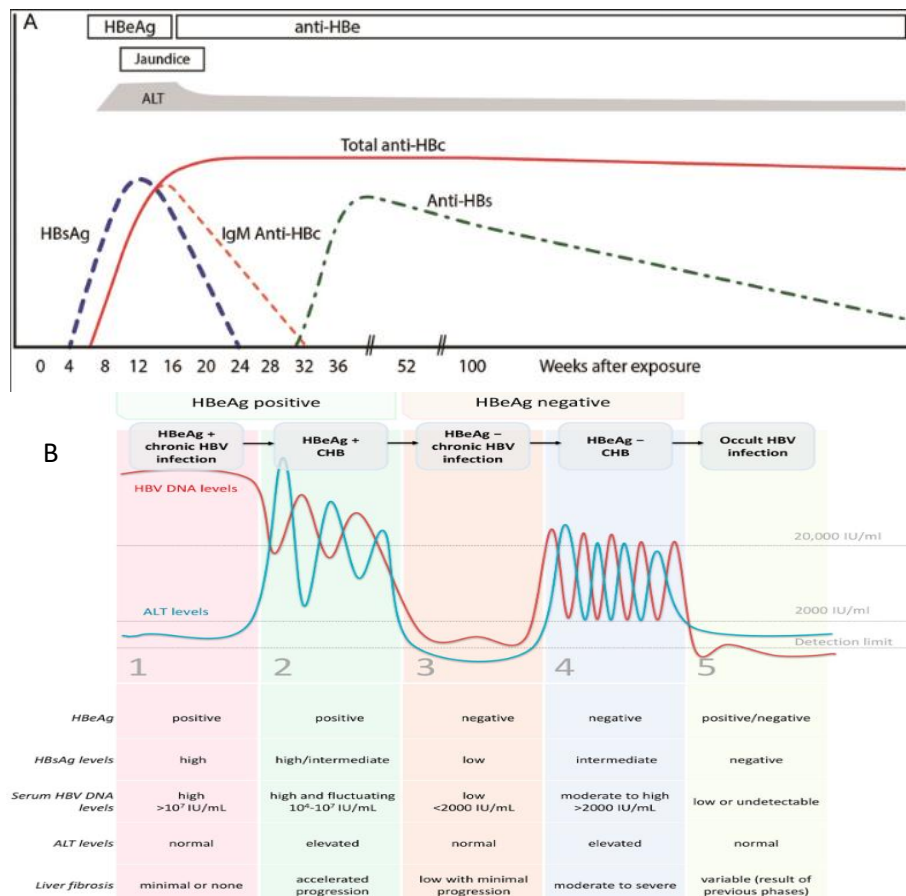
Como exemplos de riscos de exposição ao vírus, temos:

- Historial de ISTs ou múltiplos parceiros sexuais
- Infeção com HCV ou historial de infeção por HCV
- Estar ou ter estado recentemente na prisão ou outro estabelecimento de detenção
- Crianças nascidas de mães HBsAg-positivas
- Pessoas nascidas em zonas com prevalência de infeções por HBV  $\geq 2\%$
- Historial de abuso de drogas
- Pessoas com transaminases elevadas

Após infecção, a maioria dos infectados acaba por não desenvolver nenhum sintoma na fase aguda da infecção. No entanto, nos casos sintomáticos os sintomas mais comuns podem ser:<sup>341</sup>

- Febre
- Dor abdominal
- Fadiga
- Diminuição do apetite
- Náuseas
- Vômitos
- Icterícia
- Urina escura
- Fezes claras

### Testes serológicos



**Figura 37** - A - Evolução dos biomarcadores numa infecção por HBV aguda; B - Evolução dos biomarcadores numa infecção crónica por HBV.

Adaptado de<sup>380,381</sup>

### **- HBsAg quantitativo**

A função primária do HBsAg como componente estrutural dos viriões é estar presente no invólucro viral. Funcionalmente, possui um papel crucial na ligação do vírus à membrana celular dos hepatócitos e assim dar início ao processo de infecção.

Como se pode observar na **Figura 17**, os níveis de HBsAg sofrem flutuações ao longo do desenrolar da infecção. Encontrando-se particularmente elevados durante a fase aguda da infecção, mantendo-se elevados durante a primeira fase da infecção crónica e nas restantes fases variam entre valores intermédios e baixos.

A quantificação deste antigénio vai permitir o rastreio e diagnóstico de uma infecção por HBV, sendo o teste normalmente utilizado para o efeito. No entanto, com o desenvolvimento de novos testes, começou a ser possível utilizar esta quantificação como previsão do desfecho da infecção e como um instrumento de monitorização dos níveis de replicação viral, da evolução da infecção e da resposta do doente ao tratamento.<sup>137</sup>

Um exemplo de um dos testes mais utilizados nos estudos clínicos é o *Architect HBsAg QT*, da casa comercial Abbott. Trata-se de um imunoensaio, do tipo *sandwich*, com micropartículas quimioluminescentes que utiliza amostras de soro ou plasma. Baseia-se no sequestro do HBsAg presente na amostra, por anticorpos anti-HBs presentes no revestimento de micropartículas paramagnéticas e, posteriormente, a deteção destes complexos usando anticorpos anti-HBs marcados com acridínio. As unidades de luminescência emitidas vão ser medidas e inseridas numa curva de calibração, previamente calculada, determinando-se assim a concentração de antigénio HBs presente na amostra.<sup>342</sup>

### **- Anti-HBc**

O anticorpo anti-HBc é muito utilizado no rastreio de infeções agudas por HBV. Isto porque é o único sinal de infeção detetado em infeções agudas quando os níveis de HBsAg se tornam indetetáveis, como se pode observar na **Figura 17 (A)**. Sendo comum os seus níveis encontrarem-se elevados nesta fase e baixos ou indetetáveis nas infeções crónicas, à exceção de casos de hepatites fulminantes ou agudas em infeções crónicas em que os níveis destes anticorpos podem voltar a sofrer um aumento. Adicionalmente, a partir da diferenciação dos anticorpos em imunoglobulinas G ou M, podemos indicar se a infeção é atual ou se é uma infeção antiga.<sup>343</sup>

### **- Anti-Hbs**

O anticorpo anti-HBs costuma ser produzido após a seroconversão do HBsAg numa infeção por HBV ou então após a vacinação contra o vírus, fornecendo proteção contra o mesmo em futuros contactos. Este teste é frequentemente utilizado para monitorizar o sucesso da vacinação contra o HBV, a partir da sua deteção após o momento da vacinação. Para além disto, como já foi referido, este teste também é utilizado para monitorizar a resolução de uma infeção aguda ou para rastrear algum tipo de contacto prévio com o vírus, por exemplo, em pessoas com estilos de vida suscetíveis para tal acontecimento.<sup>344</sup>

### **- HBeAg**

Desde a sua descoberta na década de 1970, que o HBeAg se tornou num indicador da replicação viral e da infecciosidade de um indivíduo. No entanto, com a introdução da quantificação do DNA viral, o HBeAg deixou de ser utilizado com este intuito e passou a ser utilizado como indicador da evolução da infeção por HBV, servindo para monitorizar e distinguir as diferentes fases da mesma, como já foi demonstrado num capítulo anterior.<sup>345</sup>

Este antigénio também possui um poder preditivo da progressão ou não da doença. A persistência de HBeAg está associado à progressão da doença e também é considerada um factor de risco para o desenvolvimento de cirrose e HCC. Se esta persistência se mantiver após os 40 anos de vida é um mau indicador e está associado a piores prognósticos e maior incidência de cirrose. Por outro lado, a seroconversão espontânea do HBeAg está normalmente associada a menores níveis de DNA viral e remissão da doença.<sup>346-348</sup>

Outra utilidade deste teste é a monitorização da resposta aos tratamentos, em que uma redução rápida dos níveis séricos de HBeAg e a sua seroconversão para anti-HBe, significa o êxito do tratamento. Por outro lado, níveis elevados deste antigénio, fazem prever a não resposta ao tratamento e permite alterar antecipadamente o mesmo.<sup>349</sup>

### **- DNA do HBV**

A presença de DNA viral no soro é um marcador seguro do nível de replicação viral num dado momento, permitindo obter uma ideia, dependendo dos níveis de DNA viral, da infecciosidade do indivíduo.

Os níveis de DNA viral, normalmente, não apresentam uma relação direta com o grau de doença hepática, sendo o mais comum detetar-se o pico de DNA viral em indivíduos com o fígado normal, na terceira fase da infeção crónica. No entanto, vários estudos correlacionam níveis muito elevados de DNA viral sérico com mau prognóstico e futura progressão de doença hepática. Uma vez que estes níveis elevados refletem uma elevada atividade replicativa, como se pode observar pela elevação paralela dos níveis de HBsAg na **Figura 17 (B)**, o que está intrinsecamente interligado com a extensão da progressão da doença. Já a sua supressão para níveis indetetáveis apresenta-se associada a bons prognósticos com risco reduzido de cirrose e HCC. Juntamente com outros testes, como os já referidos, torna-se uma ferramenta crucial no delineamento de estratégias de tratamento e na monitorização da resposta ao mesmo.<sup>350-352</sup>

### **Diagnósticos *point-of-care* (POC)**

Nos países mais desfavorecidos, em que se torna complicado o rastreio deste tipo de infeções, tanto por desconhecimento da população como por falta de recursos, os testes POC podem ser uma solução plausível.

Uma meta-análise recente sumarizou os resultados de vários estudos efetuados em zonas de maior suscetibilidade e menores recursos do continente africano. Neste estudo foram avaliados diversos testes POC, com diferentes abordagens, como autotestes e testagem efetuada em laboratório. Os resultados foram bastante positivos com sensibilidades e especificidades dos autotestes de 88,5% a 90% e 99,8% a 100% respectivamente. Nos testes efetuados em laboratório os resultados foram de 93,9% a 95,3% para a sensibilidade e 93,3% a 94,7% para a especificidade. Assim, como se pode concluir com os resultados obtidos, os POC podem ser uma solução precisa, barata e rápida para o rastreio do HBV nestes países, quando comparado ao rastreio serológico laboratorial.<sup>353,354</sup>

## Marcadores genômicos e novos marcadores moleculares

Os diferentes genótipos do HBV parecem poder oferecer um poder preditivo de como será a evolução da infecção e da doença hepática e também da resposta às terapias, dependendo de que genótipo seja detetado no indivíduo infetado.<sup>355</sup>

Atualmente conhecem-se 10 genótipos do HBV, sendo cada genótipo classificado por uma divergência  $\geq 8\%$  na sequência nucleotídica dos respectivos genomas. Os genótipos mais comuns a nível mundial, são os genótipos A-D. Os genótipos A e D são os mais comuns na América do Norte, África e Europa, enquanto que os genótipos B e C são os mais comuns na Ásia.<sup>356-359</sup>

Cada genótipo apresenta suscetibilidades distintas às diferentes terapias antivirais utilizadas, sendo relatada uma melhor resposta ao tratamento com interferão nos genótipos A e B, enquanto que todos os genótipos parecem responder bem ao tratamento com inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleótidos. Por outro lado, para além das respostas às terapias serem diferentes, os diferentes genótipos apresentam diferentes taxas de progressão para doença. No caso do genótipo C, parece estar mais associado a um maior atraso na seroconversão do HBeAg e um maior risco de reativação da infecção na fase HBeAg-negativo. Adicionalmente, os infetados com o genótipo C apresentam fibrose mais avançada e maior dano hepático, do que os infetados com os restantes genótipos. Numa meta-análise de 14.545 indivíduos infetados, chegou-se à conclusão de que os indivíduos infetados com o genótipo C tinham um risco muito maior de desenvolver HCC, do que os infetados pelos restantes genótipos. Especificamente, na mesma região geográfica, os infetados pelo genótipo C apresentam mais casos de fibrose, cirrose e HCC quando comparado com os infetados com o genótipo B. No entanto, em Hong Kong e Taiwan foi possível observar-se que, apesar do maior risco de doença mais grave associada ao genótipo C, existiam mais casos de desenvolvimento de HCC em jovens não-cirróticos infetados com o genótipo B. Na Europa, o padrão é semelhante, com o genótipo D a apresentar um maior risco de cirrose e HCC do que o genótipo A.<sup>360-366</sup>

## **Avaliação e monitorização do dano e fibrose hepática**

Existem várias formas de avaliar e monitorizar o estado do tecido hepático e, no caso de estar presente, avaliar e monitorizar a evolução da fibrose no mesmo.

Em termos de inflamação e dano hepático são normalmente utilizados os marcadores serológicos mais comuns e conhecidos de avaliação do tecido hepático: a alanina aminotransferase sérica, a gama-glutamil transferase e a bilirrubina total.

Em termos de avaliação do nível de fibrose hepática, existem diversos tipos de processos invasivos e não-invasivos que podem ser utilizados. Nos invasivos temos a biópsia percutânea como o processo mais utilizado e considerado tradicionalmente o melhor, para quando se quer medir e diagnosticar o nível de fibrose hepática a nível clínico. Por outro lado, cada vez mais vão sendo disponibilizados novos tipos de exames e testes não-invasivos que utilizam novas tecnologias para a avaliação da fibrose hepática, como a medição por elastografia hepática por ultrassom e por ressonância magnética entre outros.

### **Marcadores serológicos hepáticos na avaliação e monitorização da doença hepática**

Apesar de ser considerada um marcador hepático específico e sensível, os níveis de alanina aminotransferase (ALT) podem variar devido a vários fatores, incluindo a fase de infeção do indivíduo. Assim, existem muitas limitações quando pensamos na mesma como marcador independente. Sendo mais eficaz e seguro, na previsão do dano e fibrose hepática, a utilização da combinação de vários marcadores serológicos, como a  $\alpha$ -2-macroglobulina, apolipoproteína A1, haptoglobina,  $\gamma$ -glutamil transpeptidase, bilirrubina total e a própria ALT. Está já documentado que estes marcadores são indicadores precisos da fibrose relacionada com a infeção por HBV, quando comparados com a biópsia. Também se demonstrou ser possível definir-se um prognóstico e estatuto de portador inativo se utilizados em conjunto com a carga viral. Adicionalmente estes marcadores podem ser também uma maneira eficaz de se fazer uma monitorização não-invasiva do estado do tecido hepático durante a terapia antiviral.<sup>367-369</sup>

## Avaliação e monitorização da fibrose hepática por testes invasivos e não invasivos

Como já foi referido anteriormente, a biópsia percutânea de tecido hepático costuma ser o melhor método de análise a ser usado quando o clínico necessita de fazer a avaliação do estado fibrótico do fígado de um indivíduo infetado com HBV. No entanto, é um teste bastante limitado como teste de prática clínica rotineira. Isto deve-se à sua natureza invasiva, com um potencial risco de complicações durante o procedimento, a dificuldade da seleção do local correto para se retirar a biópsia, a seleção de uma biópsia suficientemente grande para a análise e pela heterogeneidade dos resultados das análises efetuadas por diferentes patologistas.<sup>370,371</sup>

Noninvasive test	Features	Advantages	Disadvantages	Sensitivity (reference)	Specificity (reference)
Physical					
Shear wave elastography					
Transient elastography	Ultrasound-based liver stiffness measurement by shear wave velocity determination with a specific probe	Useful across different liver disease entities; special probes designed for different body builds; measures liver fat at the same time with CAP, can identify no or minimal fibrosis	Less reliable in obese patients, in severe acute exacerbations of hepatitis, and in posttreatment fibrosis stages in CHB or CHC patients	≥F2, 0.716; ≥F3, 0.790; =F4, 0.800 (265)	≥F2, 0.816; ≥F3, 0.846; =F4, 0.866 (265)
Point shear wave elastography (pSWE)	Uses the force of the ultrasound beam (ARFI) to assess the longitudinal displacement	No additional apparatus except an ultrasound machine is needed; can reflect disease progression; results are available in real time; fewer technical difficulties are associated with it; it is accurate with overweight or obese patients; results can be expressed in kilopascals or meters per second	Difficult to define a cutoff; experience in ultrasound B mode imaging is needed	≥F3, 0.84; =F4, 0.86 (266)	≥F3, 0.90; =F4, 0.84 (266)
Multidimensional shear wave elastography (2D-SWE, 3D-SWE)	Ultrasound measurement of shear wave velocity	No additional apparatus except an ultrasound machine is needed; elasticity can be reflected by numbers or colors; sensitive for early-stage fibrosis; results can be expressed in kilopascals or meters per second	Limited studies on its clinical application	NA	NA
Magnetic resonance elastography	Phase-contrast imaging depending on mechanical wave propagation	Less operator dependent and fewer technical failures; limited effect by obesity or ascites; can assess complications; sensitive for detection of early-stage fibrosis; reproducible results	High cost; limited availability in some countries or regions; more time-consuming; not applicable with patients with iron overload or hemochromatosis; limited studies on its clinical application	≥F2, 0.928; ≥F3, 0.896; =F4, 0.895 (265)	≥F2, 0.937; ≥F3, 0.932; =F4, 0.920 (265)

**Figura 38** - Exemplos de Procedimentos não-invasivos físicos para a avaliação da fibrose hepática. Adaptado de<sup>137</sup>.

Como é possível observar-se na **Figura 18**, têm-se vindo a desenvolver um vasto leque de procedimentos não-invasivos, classificados como testes não-invasivos físicos e, os referidos no capítulo anterior, testes de marcadores serológicos. No grupo dos físicos temos a elastografia por ultrassom e a elastografia por ressonância magnética. Começando pela elastografia por ultrassom, o teste *FibroScan* é uma das melhores ferramentas de medição do estado de fibrose hepática e das mais utilizadas no mundo. O seu princípio científico baseia-se numa sonda que transmite uma onda de cisalhamento, seguida de uma onda de ultrassom emitida por outra sonda colocada junto à região do parênquima hepático. Este procedimento permite medir o nível de rigidez do fígado e a partir de um Doppler é possível calcular-se a velocidade com que a onda passa pelo fígado, permitindo a

avaliação do nível de fibrose do tecido. Permite discriminar entre fibrose severa, fibrose inexistente ou mínima e cirrose, e fornece informação relevante para a distinção de várias doenças hepáticas, como hepatite B crónica, HCC e hepatite autoimune. No entanto, este procedimento não é eficiente em indivíduos com obesidade, sendo necessária a utilização de uma sonda de maiores dimensões, o que nem sempre é possível.<sup>372-375</sup>

Outro procedimento muito eficaz é a elastografia por ressonância magnética que permite avaliar a rigidez hepática por um método de imagem de contraste de fase. Este teste permite a avaliação em pessoas com obesidade e casos extremos de ascite, não sendo tão dependente do operador, nem tão propenso a erros técnicos como nos outros testes de elastografia, permitindo ainda distinguir estados de fibrose leve. Apresenta, no entanto, desvantagens como seja o facto de ser um procedimento mais caro, mais lento e menos tolerado pelos indivíduos do que a tecnologia por ultrassom.<sup>376,377</sup>

## Conclusão e Perspetivas Futuras

O HBV mantém-se um problema grave de saúde pública ao longo da última década. Existindo avanços na prevenção de novas infeções em idades jovens, pela adesão à vacinação geral em recém-nascidos e tratamento das grávidas. No entanto, existem ainda centenas de milhões de infetados mundialmente, com apenas uma porção destes encontrando-se diagnosticados, e contabilizando-se centenas de milhares de mortes anualmente, por complicações relacionadas a infeções crónicas por HBV.

Num indivíduo adulto imunocompetente, uma infeção por HBV costuma ser autolimitada. Sendo comum este acabar por produzir anticorpos anti-HBs que servirão de proteção contra contactos futuros com o vírus. No entanto, numa pequena porção das infeções em indivíduos adultos imunocompetentes e grande parte das infeções em crianças, as infeções por HBV acabam por evoluir para infeções crónicas. Levando em muitos dos casos a complicações graves a longo prazo, como cirrose e HCC. Os mecanismos que levam à persistência da infeção e à progressão da doença, não estão totalmente esclarecidos, sabendo-se que existe uma relação forte entre vários mecanismos virais de supressão e imunomodulação do sistema imune do hospedeiro e certos factores tanto do vírus como do hospedeiro.

As infeções crónicas apresentam um risco elevado de se desenvolver HCC. Existindo vários mecanismos propostos para como os diferentes componentes virais podem promover a progressão da doença. No entanto, devido às questões éticas e dificuldade de ter modelos fidedignos, estes mecanismos ainda não se encontram completamente esclarecidos. O que acaba por dificultar o avanço no conhecimento destes mecanismos e desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

Tendo em conta a elevada morbilidade e mortalidade a longo-prazo, devido às infeções por este vírus, o seu diagnóstico precoce e uma monitorização constante do estado da infeção tornam-se imperativos. Existindo vários biomarcadores séricos e histológicos que permitem um diagnóstico rápido, seja qual for o estado da infeção, e que também permitem uma avaliação e monitorização da progressão da doença. No entanto, o maior obstáculo ao diagnóstico geral dos indivíduos infetados, é a falta de conhecimento e o facto de normalmente se tratar de uma infeção assintomática até certo ponto da doença.

Num futuro próximo, é importante aumentar a consciencialização para esta doença e promover o rastreio em massa das populações. Para que seja possível prevenir ou atrasar a evolução da mesma

para fases mais agressivas e debilitantes e, ao mesmo tempo, prevenir a continuidade da transmissão. Por outro lado, é também importante aumentar o conhecimento científico em relação aos mecanismos de ação virais, de forma a se desenvolver novos tratamentos e abordagens mais eficazes ao tratamento dos indivíduos infectados.

## Bibliografia

1. Grzych G. "The Rising Importance of Pre-Analytical Phase in Medical and Research Laboratory, A New Challenge in the Omics Era." *Biomed J Sci Tech Res.* 2020;27(4). doi:10.26717/BJSTR.2020.27.004523
2. Najat D. Prevalence of Pre-Analytical Errors in Clinical Chemistry Diagnostic Labs in Sulaimani City of Iraqi Kurdistan. Szecsi PB, ed. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170211. doi:10.1371/journal.pone.0170211
3. Narayanan S. The Preanalytic Phase. *Am J Clin Pathol.* 2000;113(3):429-452. doi:10.1309/CONM-Q7R0-LL2E-B3UY
4. Siemens Healthcare Portugal. Solução Atellica de Analisadores de Imunoensaio & Química Clínica. Published August 19, 2018. <https://www.siemens-healthineers.com/pt/integrated-chemistry/systems/atellica-solution-analyzers>
5. Soppert J, Lehrke M, Marx N, Jankowski J, Noels H. Lipoproteins and lipids in cardiovascular disease: from mechanistic insights to therapeutic targeting. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020;159:4-33. doi:10.1016/j.addr.2020.07.019
6. Zampelas, Magriplis. New Insights into Cholesterol Functions: A Friend or an Enemy? *Nutrients.* 2019;11(7):1645. doi:10.3390/nu11071645
7. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Siemens Healthineers. Colesterol\_2 (Chol\_2), 2021.
8. Bayly GR. Lipids and disorders of lipoprotein metabolism. In: *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects.* Elsevier; 2014:702-736. doi:10.1016/B978-0-7020-5140-1.00037-7
9. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers. Triglicerídeos (Concentrado) (Trig), 2021.*
10. Moini J. Epidemiology of Diet and Diabetes Mellitus. In: *Epidemiology of Diabetes.* Elsevier; 2019:57-73. doi:10.1016/B978-0-12-816864-6.00005-5
11. Kosmas CE, Martinez I, Sourlas A, et al. High-density lipoprotein (HDL) functionality and its relevance to atherosclerotic cardiovascular disease. *Drugs Context.* 2018;7:1-9. doi:10.7573/dic.212525
12. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers. Colesterol HDL (HDL), 2022.*
13. Nakrani M, Wineland R, Anjum F. *Physiology, Glucose Metabolism.* StatPearls Publishing; 2023.
14. Michaud C. Screening and Diagnosis of Type II Diabetes. In: *Pediatric Type II Diabetes.* Elsevier; 2019:19-23. doi:10.1016/B978-0-323-55138-0.00004-8

15. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Glicose Hexoquinase\_3 (GluH\_3)*, 2022.
16. Tennant BC. Hepatic Function. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Elsevier; 1997:327-352. doi:10.1016/B978-012396305-5/50014-2
17. Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, Tuma F. *Physiology, Liver*. StatPearls Publishing; 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10573509>
18. Vroon DH, Israili Z. Aminotransferases. In: *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd ed. Reed Publishing; 1990.
19. Lala V, Zubair M, Minter DA. *Liver Function Tests*. StatPearls Publishing; 2023.
20. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Aspartato Aminotransferase (AST)*, 2021.
21. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Alanina Aminotransferase (ALT)*, 2021.
22. Lowe D, Sanvictores T, Zubair M, John S. *Alkaline Phosphatase*. StatPearls Publishing; 2023.
23. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Fosfatase Alcalina, Concentrada (ALP\_2c)*.
24. Koenig G, Seneff S. Gamma-Glutamyltransferase: A Predictive Biomarker of Cellular Antioxidant Inadequacy and Disease Risk. *Dis Markers*. 2015;2015:1-18. doi:10.1155/2015/818570
25. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Gama-Glutamil Transferase (GGT)*.
26. Kalakonda A, Jenkins BA, John S. *Physiology, Bilirubin*. StatPearls Publishing; 2022.
27. Franchini M, Targher G, Lippi G. Serum Bilirubin Levels and Cardiovascular Disease Risk. In: *Advances in Clinical Chemistry*. Vol 50. ; 2010:47-63. doi:10.1016/S0065-2423(10)50003-9
28. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Bilirrubina Direta 2 (DBil\_2)*.
29. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Bilirrubina Total\_2 (TBil\_2)*.
30. Esperto H. Rins: funções e importância. Sociedade Portuguesa de Medicina Interna. Published March 10, 2022. Accessed September 14, 2023. <https://www.spmi.pt/rins-funcoes-e-importancia/>
31. Robson L. The kidney - an organ of critical importance in physiology. *J Physiol*. 2014;592(18):3953-3954. doi:10.1113/jphysiol.2014.279216
32. Adeyomoye OI, Akintayo CO, Omotuyi KP, Adewumi AN. The Biological Roles of Urea: A Review of Preclinical Studies. *Indian J Nephrol*. 2022;32(6):539-545. doi:10.4103/ijn.ijn\_88\_21
33. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Azoto Ureico (UN\_c)*.
34. Kashani K, Rosner MH, Ostermann M. Creatinine: From physiology to clinical application. *Eur J Intern Med*. 2020;72:9-14. doi:10.1016/j.ejim.2019.10.025
35. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Creatinina\_2 (Crea\_2)*.

36. Mahomoodally MF, Désiré A.-L. D, Dilmar A. S, Rosette M. A.-L. E. Uric acid. In: *Antioxidants Effects in Health*. Elsevier; 2022:167-176. doi:10.1016/B978-0-12-819096-8.00028-8
37. Durgapal S, Jantwal A, Upadhyay J, Joshi T, Kumar A. Uric acid. In: *Antioxidants Effects in Health*. Elsevier; 2022:505-516. doi:10.1016/B978-0-12-819096-8.00008-2
38. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Ácido Úrico (UA)*.
39. Timerga A, Kelta E, Kenenisa C, Zawdie B, Habte A, Haile K. Serum electrolytes disorder and its associated factors among adults admitted with metabolic syndrome in Jimma Medical Center, South West Ethiopia: Facility based crosssectional study. Gebremedhin S, ed. *PLoS One*. 2020;15(11):e0241486. doi:10.1371/journal.pone.0241486
40. Shrimanker I, Bhattarai S. *Electrolytes*. StatPearls Publishing; 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28506519>
41. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Multissensor Integrado A-LYTE (IMT Na K Cl)*.
42. Singh A, Satchell SC. Microalbuminuria: causes and implications. *Pediatric Nephrology*. 2011;26(11):1957-1965. doi:10.1007/s00467-011-1777-1
43. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Microalbumina\_2 (MALB\_2)*.
44. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*. 2014;19(2):164-174.
45. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Ferro\_2 (Iron\_2)*.
46. Kotla NK, Dutta P, Parimi S, Das NK. The Role of Ferritin in Health and Disease: Recent Advances and Understandings. *Metabolites*. 2022;12(7):609. doi:10.3390/metabo12070609
47. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Ferritina (Fer)*.
48. Ogun AS, Adeyinka A. *Biochemistry, Transferrin*. StatPearls Publishing; 2022.
49. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Transferrina (Trf)*.
50. Faruqi A, Mukkamalla SKR. *Iron Binding Capacity*. StatPearls Publishing; 2023.
51. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Siemens Healthineers.Capacidade Total de Ligação do Ferro (TIBC).
52. Wawrzyniak A, Balawender K. Structural and Metabolic Changes in Bone. *Animals*. 2022;12(15):1946. doi:10.3390/ani12151946
53. Drake TM, Gupta V. *Calcium*. StatPearls Publishing; 2022.
54. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Cálcio\_2 (CA\_2)*.

55. Sapio L. Inorganic phosphate in the development and treatment of cancer: A Janus Bifrons? *World J Clin Oncol*. 2015;6(6):198. doi:10.5306/wjco.v6.i6.198
56. von Dadelszen P. Inorganic Phosphorus (phosphate). The Global Library of Women's Medicine. Accessed October 2, 2023. <https://www.glowm.com/lab-text/item/48>
57. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Fósforo Inorgânico (IP)*.
58. JB M. *Laboratory Medicine: Hematology*. 6th ed. C. V. Mosby Co; 1982.
59. Brewster MA. Vitamins. In: Kaplan LA, Pesce AJ, Kazmierczak SC, eds. *Clinical Chemistry : Theory, Analysis, Correlation*. C. V. Mosby Co; 1989:543-568.
60. McNeely M. Folic acid. In: Kaplan AL, Pesce AJ, Kazmierczak SC, eds. *Clinical Chemistry : Theory, Analysis, Correlation*. C. V. Mosby Co; 1987:539-542.
61. Steinkamp R. Vitamin B12 and folic acid: clinical and pathophysiological considerations. In: Brewster M, Naito H, eds. *Nutritional Elements and Clinical Biochemistry*. New York: Plenum Publishing Corp.; 1980:169-240.
62. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Folato (Fol)*.
63. Ankar A, Kumar A. *Vitamin B12 Deficiency*. StatPearls Publishing; 2023.
64. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Vitamina B12 (VB12)*.; 2023.
65. Shahid MA, Ashraf MA, Sharma S. *Physiology, Thyroid Hormone*. StatPearls Publishing; 2023.
66. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Tiroxina Livre (FT4)*.; 2023.
67. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Triiodotironina Livre (FT3)*.; 2023.
68. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Siemens Healthineers.Hormona Estimulante Da Tireoide 3-Ultra (TSH3-UL)*.; 2023.
69. Nagpal M, Singh S, Singh P, Chauhan P, Zaidi M. Tumor markers: A diagnostic tool. *Natl J Maxillofac Surg*. 2016;7(1):17. doi:10.4103/0975-5950.196135
70. Hall C, Clarke L, Pal A, et al. A Review of the Role of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Practice. *Ann Coloproctol*. 2019;35(6):294-305. doi:10.3393/ac.2019.11.13
71. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Antigénio Carcinoembrionário (CEA)*.; 2022. <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.
72. Kankanala VL, Mukkamalla SKR. *Carcinoembryonic Antigen*. StatPearls Publishing; 2023.
73. David MK, Leslie SW. *Prostate Specific Antigen*. StatPearls Publishing; 2023.
74. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Antigénio Específico Da Próstata (PSA)*.; 2022. <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

75. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Antigénio Livre Específico Da Próstata (FPSA)*.; 2022. <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.
76. Essex M. Human Immunodeficiency Viruses in The Developing World. In: *ADVANCES IN VIRUS RESEARCH*. Vol 53. ; 1999:71-88. doi:10.1016/S0065-3527(08)60343-7
77. Damond F, Descamps D, Farfara I, et al. Quantification of Proviral Load of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Subtypes A and B Using Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39(12):4264-4268. doi:10.1128/JCM.39.12.4264-4268.2001
78. Hansasuta P, Rowland-Jones SL. HIV-1 transmission and acute HIV-1 infection. *Br Med Bull*. 2001;58(1):109-127. doi:10.1093/bmb/58.1.109
79. Sarr AD, Sankalé JL, Hamel DJ, et al. Interaction with Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 2 Predicts HIV Type 1 Genotype. *Virology*. 2000;268(2):402-410. doi:10.1006/viro.2000.0192
80. Sousa AE, Chaves AF, Loureiro A, Victorino RMM. Comparison of the Frequency of Interleukin (IL)–2–, Interferon- $\gamma$ –, and IL-4–Producing T Cells in 2 Diseases, Human Immunodeficiency Virus Types 1 and 2, with Distinct Clinical Outcomes. *J Infect Dis*. 2001;184(5):552-559. doi:10.1086/322804
81. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.HIV Ag/Ab Combo (CHIV)*.; 2023.
82. McNaughton AL, D’Arienzo V, Ansari MA, et al. Insights From Deep Sequencing of the HBV Genome—Unique, Tiny, and Misunderstood. *Gastroenterology*. 2019;156(2):384-399. doi:10.1053/j.gastro.2018.07.058
83. World Health Organization. Hepatitis B. Published June 24, 2022. Accessed January 12, 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
84. Liu Y, Veeraraghavan V, Pinkerton M, et al. Viral Biomarkers for Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma Occurrence and Recurrence. *Front Microbiol*. 2021;12(June):1-18. doi:10.3389/fmicb.2021.665201
85. Salpini R, D’Anna S, Benedetti L, et al. Hepatitis B virus DNA integration as a novel biomarker of hepatitis B virus-mediated pathogenetic properties and a barrier to the current strategies for hepatitis B virus cure. *Front Microbiol*. 2022;13(September):1-18. doi:10.3389/fmicb.2022.972687
86. Seto WK, Lo YR, Pawlotsky JM, Yuen MF. Chronic hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 2018;392(10161):2313-2324. doi:10.1016/S0140-6736(18)31865-8
87. Chisari FV, Isogawa M, Wieland. SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathologie Biologie*. 2010;58(4):258-266. doi:10.1016/j.patbio.2009.11.001
88. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers.Anti-HBs2 (AHBs2)*.; 2022.

89. Siemens Healthcare. Atellica® 1500 Automated Urinalysis System. Siemens Healthineers. Accessed October 17, 2023. <https://www.siemens-healthineers.com/urinalysis/systems/atellica-1500-automated-urinalysis-system>
90. Banfi G, Salvagno GL, Lippi G. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*. 2007;45(5). doi:10.1515/CCLM.2007.110
91. Beckman Coulter Inc. DxH 800 Hematology Analyzer. Beckman Coulter Life Sciences. Accessed October 20, 2023. <https://www.beckmancoulter.com/products/hematology/dxh-800>
92. Al-Sheibani S, Osman Taha S, Balkam F, et al. Validation Hematological Analyzer for Assay of Erythrogram in Hodeidah City, Yemen. *Asian Hematology Research Journal*. 2018;1(1):33-40. doi:10.9734/AHRJ/2018/39571
93. Rhyner M, Giovanni P, Kumar K, Lee L. Cellular Analysis using the Coulter Principle. Measurement with Great Accuracy and Speed.
94. Azevedo AP, Silva P, Marcelo C, et al. Hemogram reference values for Lisbon metropolitan area population. In: *Acta Médica Portuguesa*. Vol 23. 4th ed. ; 2010:597-604. Accessed October 26, 2023. <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/697>
95. Turner J, Parsi M, Badireddy M. *Anemia*. StatPearls Publishing; 2023.
96. Robinson JP. COULTER® 3-D VCS TECHNOLOGY. Purdue University Cytometry Laboratories. Accessed October 30, 2023. <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto2/6/coulter/ss000125.htm>
97. Campos MG. Neutropenia: o que ocorre quando faltam células da sua primeira linha de defesa? INGOH. Published March 25, 2022. Accessed October 31, 2023. <https://ingoh.com.br/neutropenia-o-que-ocorre-quando-faltam-celulas-da-sua-primeira-linha-de-defesa-2/>
98. Tahir N, Zahra F. *Neutrophilia*. StatPearls Publishing; 2023.
99. Hamad H, Mangla A. *Lymphocytosis*. StatPearls Publishing; 2023.
100. LYMPHOPENIA. NIH. Published May 31, 2022. Accessed October 31, 2023. <https://www.nhlbi.nih.gov/health/lymphopenia/causes>
101. Kovalszki A, Weller PF. Eosinophilia. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2016;43(4):607-617. doi:10.1016/j.pop.2016.07.010
102. Zini G. Abnormalities in leukocyte morphology and number. In: *Blood and Bone Marrow Pathology*. 2ª. Elsevier; 2011:247-261. doi:10.1016/B978-0-7020-3147-2.00016-X

103. Mangaonkar AA, Tande AJ, Bekele DI. Differential Diagnosis and Workup of Monocytosis: A Systematic Approach to a Common Hematologic Finding. *Curr Hematol Malig Rep.* 2021;16(3):267-275. doi:10.1007/s11899-021-00618-4
104. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2017;36(2):195-198. doi:10.1007/s10555-017-9677-x
105. Rokkam VR, Killeen RB, Kotagiri R. *Secondary Thrombocytosis.* StatPearls Publishing; 2023.
106. Thrombocythemia and Thrombocytosis. NIH. Published March 24, 2022. Accessed November 2, 2023. <https://www.nhlbi.nih.gov/health/thrombocythemia-thrombocytosis>
107. Thrombocytopenia. Platelet disorders.
108. Beckman Coulter. DxH Slidemaker Stainer Cellular Analysis System. Hematology. Accessed October 30, 2023. <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto2/6/coulter/ss000125.htm>
109. Gulati G, Song J, Florea AD, Gong J. Purpose and Criteria for Blood Smear Scan, Blood Smear Examination, and Blood Smear Review. *Ann Lab Med.* 2013;33(1):1-7. doi:10.3343/alm.2013.33.1.1
110. Failace R. *Hemograma - Manual De Interpretação.* 5th ed. Artmed Editora S.A.; 2009.
111. Samson Adewoyin A, Adeyemi O, Omolola Davies N, Abiola Ogbenna A. Erythrocyte Morphology and Its Disorders. In: *Erythrocyte.* IntechOpen; 2019. doi:10.5772/intechopen.86112
112. Universidade Federal de Goiás. Alterações Patológicas - Série Branca. Alterações Patológicas - Série Branca. Published August 1, 2022. Accessed November 13, 2023. <https://lacs.icb.ufg.br/p/20105-alteracoes-patologicas-serie-branca>
113. ALIFAX®. ALIFAX® TEST 1. ALIFAX® ERYTHROCYTE SEDIMENTATION ANALYZER. Accessed November 14, 2023. <https://sysmex-alifax.com/#about-section>
114. Tishkowski K, Gupta V. *Erythrocyte Sedimentation Rate.* StatPearls Publishing; 2023.
115. BIO-RAD. D-100 Hemoglobin Testing System. Diabetes Testing. Accessed November 16, 2023. <https://www.bio-rad.com/en-pt/product/d-100-hemoglobin-testing-system?ID=NVVIV7E8Z>
116. Sherwani SI, Khan HA, Ekhzaimy A, Masood A, Sakharkar MK. Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomark Insights.* 2016;11:BMI.S38440. doi:10.4137/BMI.S38440
117. Eyth E, Naik R. *Hemoglobin A1C.* StatPearls Publishing; 2023.
118. Siemens Healthcare. BCS XP System. Siemens Healthineers. Accessed November 21, 2023. <https://www.siemens-healthineers.com/pt/hemostasis/systems/bcs-xp-system>
119. LaPelusa A, Dave HD. *Physiology, Hemostasis.* StatPearls Publishing; 2023.
120. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers. Thromborel® S.*; 2021.

121. Yang R, Moosavi L. *Prothrombin Time*. StatPearls Publishing; 2022.
122. Coen Herak D, Leniček Krleža J, Radišić Biljak V, et al. Reporting of activated partial thromboplastin time (aPTT): Could we achieve better comparability of the results? *Biochem Med (Zagreb)*. 2021;31(2):302-308. doi:10.11613/BM.2021.020708
123. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers. Pathromtin® SL*.; 2021.
124. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers. Multifibren® U*.; 2021.
125. Pieters M, Wolberg AS. Fibrinogen and fibrin: An illustrated review. *Res Pract Thromb Haemost*. 2019;3(2):161-172. doi:10.1002/rth2.12191
126. Kattula S, Byrnes JR, Wolberg AS. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(3). doi:10.1161/ATVBAHA.117.308564
127. Bounds EJ, Kok SJ. *D Dimer*. StatPearls Publishing; 2023.
128. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. *Siemens Healthineers. INNOVANCE® D-Dimer*.; 2021.
129. BECKMAN COULTER Inc. Navios EX. BECKMAN COULTER Life Sciences. Accessed November 29, 2023. <https://www.beckman.com/flow-cytometry/clinical-flow-cytometers/navios-ex#product-specification-wrapper>
130. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120(1). doi:10.1002/cpim.40
131. Han X, Jorgensen JL, Brahmandam A, et al. Immunophenotypic Study of Basophils by Multiparameter Flow Cytometry. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(5):813-819. doi:10.5858/2008-132-813-ISOBMM
132. Gorczyca W, Sun ZY, Cronin W, Li X, Mau S, Tugulea S. Immunophenotypic Pattern of Myeloid Populations by Flow Cytometry Analysis. In: ; 2011:221-266. doi:10.1016/B978-0-12-385493-3.00010-3
133. Testing.com. Immunophenotyping by Flow Cytometry. Immunophenotyping by Flow Cytometry. Published November 9, 2021. Accessed December 1, 2023. <https://www.testing.com/tests/immunophenotyping-flow-cytometry/>
134. Pathology Tests Explained. Immunophenotyping. Immunophenotyping. Accessed December 1, 2023. <https://pathologytestsexplained.org.au/ptests-pro.php?q=Immunophenotyping>
135. Herold NC, Mitra P. *Immunophenotyping*. StatPearls Publishing; 2023.
136. World Health Organization. *Laboratory Quality Management System: Handbook*. (World Health Organization, ed.); 2011.

137. Nguyen MH, Wong G, Gane E, Kao JH, Dusheiko G. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(2):1-38. doi:10.1128/CMR.00046-19
138. Winer BY, Ploss A. Determinants of hepatitis B and delta virus host tropism. *Curr Opin Virol.* 2015;13:109-116. doi:10.1016/j.coviro.2015.06.004
139. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy. Hepadnaviridae.
140. Venkatakrisnan B, Zlotnick A. The Structural Biology of Hepatitis B Virus: Form and Function. *Annu Rev Virol.* 2016;3(1):429-451. doi:10.1146/annurev-virology-110615-042238
141. Iannacone M, Guidotti LG. Immunobiology and pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Nat Rev Immunol.* 2022;22(1):19-32. doi:10.1038/s41577-021-00549-4
142. Liang TJ. Hepatitis B: The virus and disease. *Hepatology.* 2009;49(S5):S13-S21. doi:10.1002/hep.22881
143. Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol.* 2010;52(2):282-284. doi:10.1016/j.jhep.2009.10.031
144. Tu T, Budzinska M, Shackel N, Urban S. HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Viruses.* 2017;9(4):75. doi:10.3390/v9040075
145. Beck J. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol.* 2007;13(1):48. doi:10.3748/wjg.v13.i1.48
146. Zlotnick A, Venkatakrisnan B, Tan Z, Lewellyn E, Turner W, Francis S. Core protein: A pleiotropic keystone in the HBV lifecycle. *Antiviral Res.* 2015;121:82-93. doi:10.1016/j.antiviral.2015.06.020
147. Jones SA, Hu J. Hepatitis B virus reverse transcriptase: diverse functions as classical and emerging targets for antiviral intervention. *Emerg Microbes Infect.* 2013;2(1):1-11. doi:10.1038/emi.2013.56
148. Grudda T, Hwang HS, Taddese M, et al. Integrated hepatitis B virus DNA maintains surface antigen production during antiviral treatment. *Journal of Clinical Investigation.* 2022;132(18). doi:10.1172/JCI161818
149. Yang W, Summers J. Integration of Hepadnavirus DNA in Infected Liver: Evidence for a Linear Precursor. *J Virol.* 1999;73(12):9710-9717. doi:10.1128/JVI.73.12.9710-9717.1999
150. Bill CA, Summers J. Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2004;101(30):11135-11140. doi:10.1073/pnas.0403925101
151. Tu T, Budzinska MA, Vondran FWR, Shackel NA, Urban S. Hepatitis B Virus DNA Integration Occurs Early in the Viral Life Cycle in an *In Vitro* Infection Model via Sodium Taurocholate Cotransporting

- Polypeptide-Dependent Uptake of Enveloped Virus Particles. Ou JHJ, ed. *J Virol*. 2018;92(11). doi:10.1128/JVI.02007-17
152. Mason WS, Gill US, Litwin S, et al. HBV DNA Integration and Clonal Hepatocyte Expansion in Chronic Hepatitis B Patients Considered Immune Tolerant. *Gastroenterology*. 2016;151(5):986-998.e4. doi:10.1053/j.gastro.2016.07.012
153. Freitas N, Lukash T, Gunewardena S, Chappell B, Slagle BL, Gudima SO. Relative Abundance of Integrant-Derived Viral RNAs in Infected Tissues Harvested from Chronic Hepatitis B Virus Carriers. Sandri-Goldin RM, ed. *J Virol*. 2018;92(10). doi:10.1128/JVI.02221-17
154. Shamay M, Agami R, Shaul Y. HBV integrants of hepatocellular carcinoma cell lines contain an active enhancer. *Oncogene*. 2001;20(47):6811-6819. doi:10.1038/sj.onc.1204879
155. Ruan P, Dai X, Sun J, et al. Different types of viral-host junction found in HBV integration breakpoints in HBV-infected patients. *Mol Med Rep*. 2018;19(2):1410-1416. doi:10.3892/mmr.2018.9709
156. Locarnini S, Hatzakis A, Chen DS, Lok A. Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. *J Hepatol*. 2015;62(1):S76-S86. doi:10.1016/j.jhep.2015.01.018
157. Yuen MF, Chen DS, Dusheiko GM, et al. Hepatitis B virus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):18035. doi:10.1038/nrdp.2018.35
158. Revill PA, Chisari F V, Block JM, et al. A global scientific strategy to cure hepatitis B. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019;4(7):545-558. doi:10.1016/S2468-1253(19)30119-0
159. Noordeen F. Hepatitis B virus infection: An insight into infection outcomes and recent treatment options. *Virusdisease*. 2015;26(1-2):1-8. doi:10.1007/s13337-015-0247-y
160. Adujna A. Antigen Recognition and Immune Response to Acute and Chronic Hepatitis B Virus Infection. *J Inflamm Res*. 2023;Volume 16:2159-2166. doi:10.2147/JIR.S411492
161. Yang G, Wan P, Zhang Y, et al. Innate Immunity, Inflammation, and Intervention in HBV Infection. *Viruses*. 2022;14(10):2275. doi:10.3390/v14102275
162. Katze MG, Fornek JL, Palermo RE, Walters KA, Korth MJ. Innate immune modulation by RNA viruses: emerging insights from functional genomics. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(8):644-654. doi:10.1038/nri2377
163. Kopitar-Jerala N. The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation. *Front Immunol*. 2017;8. doi:10.3389/fimmu.2017.00873
164. Nguyen DH, Gummuluru S, Hu J. Deamination-Independent Inhibition of Hepatitis B Virus Reverse Transcription by APOBEC3G. *J Virol*. 2007;81(9):4465-4472. doi:10.1128/JVI.02510-06

165. Chen J, Li Y, Lai F, et al. Functional Comparison of Interferon- $\alpha$  Subtypes Reveals Potent Hepatitis B Virus Suppression by a Concerted Action of Interferon- $\alpha$  and Interferon- $\gamma$  Signaling. *Hepatology*. 2021;73(2):486-502. doi:10.1002/hep.31282
166. Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, et al. IFN- $\alpha$  inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(2):529-537. doi:10.1172/JCI58847
167. Yan R, Zhao X, Cai D, et al. The Interferon-Inducible Protein Tetherin Inhibits Hepatitis B Virus Virion Secretion. *J Virol*. 2015;89(18):9200-9212. doi:10.1128/JVI.00933-15
168. Li X, Liu X, Tian L, Chen Y. Cytokine-Mediated Immunopathogenesis of Hepatitis B Virus Infections. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016;50(1):41-54. doi:10.1007/s12016-014-8465-4
169. Xia Y, Stadler D, Lucifora J, et al. Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology*. 2016;150(1):194-205. doi:10.1053/j.gastro.2015.09.026
170. Bouezzedine F, Fardel O, Gripon P. Interleukin 6 inhibits HBV entry through NTCP down regulation. *Virology*. 2015;481:34-42. doi:10.1016/j.virol.2015.02.026
171. Isorce N, Testoni B, Locatelli M, et al. Antiviral activity of various interferons and pro-inflammatory cytokines in non-transformed cultured hepatocytes infected with hepatitis B virus. *Antiviral Res*. 2016;130:36-45. doi:10.1016/j.antiviral.2016.03.008
172. Lin SJ, Shu PY, Chang C, Ng AK, Hu C po. IL-4 Suppresses the Expression and the Replication of Hepatitis B Virus in the Hepatocellular Carcinoma Cell Line Hep3B. *The Journal of Immunology*. 2003;171(9):4708-4716. doi:10.4049/jimmunol.171.9.4708
173. Kaiser G. Cytokines Important in Innate Immunity. In: *Microbiology*. LibreTexts. LibreTexts; 2023. Accessed December 21, 2023. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology\\_\(Kaiser\)/Unit\\_5%3A\\_Innate\\_Immunity/11.4%3A\\_Early\\_Induced\\_Innate\\_Immunity/11.3C%3A\\_Cytokines\\_Important\\_in\\_Innate\\_Immunity](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Kaiser)/Unit_5%3A_Innate_Immunity/11.4%3A_Early_Induced_Innate_Immunity/11.3C%3A_Cytokines_Important_in_Innate_Immunity)
174. Chokshi S, Cooksley H, Riva A, et al. Identification of Serum Cytokine Profiles Associated with HBeAg Seroconversion Following Antiviral Treatment Interruption. *Viral Immunol*. 2014;27(5):235-244. doi:10.1089/vim.2014.0022
175. Zhong S, Zhang T, Tang L, Li Y. Cytokines and Chemokines in HBV Infection. *Front Mol Biosci*. 2021;8. doi:10.3389/fmolb.2021.805625

176. Lin SJ, Shu PY, Chang C, Ng AK, Hu C po. IL-4 Suppresses the Expression and the Replication of Hepatitis B Virus in the Hepatocellular Carcinoma Cell Line Hep3B. *The Journal of Immunology*. 2003;171(9):4708-4716. doi:10.4049/jimmunol.171.9.4708
177. Bouezzedine F, Fardel O, Gripon P. Interleukin 6 inhibits HBV entry through NTCP down regulation. *Virology*. 2015;481:34-42. doi:10.1016/j.virol.2015.02.026
178. Palumbo GA, Scisciani C, Pediconi N, et al. IL6 Inhibits HBV Transcription by Targeting the Epigenetic Control of the Nuclear cccDNA Minichromosome. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142599. doi:10.1371/journal.pone.0142599
179. Hösel M, Quasdorff M, Wiegmann K, et al. Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2009;50(6):1773-1782. doi:10.1002/hep.23226
180. Heufler C, Koch F, Stanzl U, et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- $\gamma$  production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol*. 1996;26(3):659-668. doi:10.1002/eji.1830260323
181. Rossol S, Marinos G, Carucci P, Singer M V, Williams R, Naoumov N V. Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;99(12):3025-3033. doi:10.1172/JCI119498
182. Xiong SQ, Lin BL, Gao X, Tang H, Wu CY. IL-12 promotes HBV-specific central memory CD8+ T cell responses by PBMCs from chronic hepatitis B virus carriers. *Int Immunopharmacol*. 2007;7(5):578-587. doi:10.1016/j.intimp.2006.12.007
183. Li J, Ren W, Ma W, Zhang J, Shi J, Qin C. Interleukin-21 Responses in Patients with Chronic Hepatitis B. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2015;35(2):134-142. doi:10.1089/jir.2013.0119
184. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23–IL-17 immune pathway. *Trends Immunol*. 2006;27(1):17-23. doi:10.1016/j.it.2005.10.003
185. Zang M, Li Y, He H, et al. IL-23 production of liver inflammatory macrophages to damaged hepatocytes promotes hepatocellular carcinoma development after chronic hepatitis B virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2018;1864(12):3759-3770. doi:10.1016/j.bbadis.2018.10.004
186. Xia Y, Stadler D, Lucifora J, et al. Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology*. 2016;150(1):194-205. doi:10.1053/j.gastro.2015.09.026

187. Biermer M, Puro R, Schneider RJ. Tumor Necrosis Factor Alpha Inhibition of Hepatitis B Virus Replication Involves Disruption of Capsid Integrity through Activation of NF- $\kappa$ B. *J Virol.* 2003;77(7):4033-4042. doi:10.1128/JVI.77.7.4033-4042.2003
188. Wang H, Luo H, Wan X, et al. TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  profile of HBV-specific CD4 T cells is associated with liver damage and viral clearance in chronic HBV infection. *J Hepatol.* 2020;72(1):45-56. doi:10.1016/j.jhep.2019.08.024
189. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines. *Immunity.* 2000;12(2):121-127. doi:10.1016/S1074-7613(00)80165-X
190. Zhou Y, Wang S, Ma JW, et al. Hepatitis B Virus Protein X-induced Expression of the CXC Chemokine IP-10 Is Mediated through Activation of NF- $\kappa$ B and Increases Migration of Leukocytes. *Journal of Biological Chemistry.* 2010;285(16):12159-12168. doi:10.1074/jbc.M109.067629
191. Kaiser G. Defense Cells in the Tissue - Dendritic Cells, Macrophages, and Mast Cells. In: LibreTexts, ed. *Microbiology.* LibreTexts; 2023. Accessed December 25, 2023. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology\\_\(Kaiser\)/Unit\\_5%3A\\_Innate\\_Immunity/11.3%3A\\_Defense\\_Cells\\_in\\_the\\_Tissue\\_-\\_Dendritic\\_Cells\\_Macrophages\\_and\\_Mast\\_Cells](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Kaiser)/Unit_5%3A_Innate_Immunity/11.3%3A_Defense_Cells_in_the_Tissue_-_Dendritic_Cells_Macrophages_and_Mast_Cells)
192. Li X, Wang Y, Chen Y. Cellular immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Microb Pathog.* 2014;74:59-62. doi:10.1016/j.micpath.2014.07.010
193. Sun H, Zhou D, Zhou J. The role of DCs in the immunopathogenesis of chronic HBV infection and the methods of inducing DCs maturation. *J Med Virol.* 2016;88(1):13-20. doi:10.1002/jmv.24306
194. van der Molen RG, Sprengers D, Binda RS, et al. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2004;40(3):738-746. doi:10.1002/hep.20366
195. Crispe IN. The Liver as a Lymphoid Organ. *Annu Rev Immunol.* 2009;27(1):147-163. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132629
196. Knolle P, Löhr H, Treichel U, et al. Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in the local immune response. *Z Gastroenterol.* 1995;33(10):613-620.
197. Tang TJ, Kwekkeboom J, Laman JD, et al. The role of intrahepatic immune effector cells in inflammatory liver injury and viral control during chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat.* 2003;10(3):159-167. doi:10.1046/j.1365-2893.2003.00412.x
198. Heydtmann M. Macrophages in Hepatitis B and Hepatitis C Virus Infections. *J Virol.* 2009;83(7):2796-2802. doi:10.1128/JVI.00996-08

199. Boltjes A, Movita D, Boonstra A, Woltman AM. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *J Hepatol.* 2014;61(3):660-671. doi:10.1016/j.jhep.2014.04.026
200. Doherty DG, O'Farrelly C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev.* 2000;174(1):5-20. doi:10.1034/j.1600-0528.2002.017416.x
201. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood.* 2001;97(10):3146-3151. doi:10.1182/blood.V97.10.3146
202. Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, et al. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut.* 2009;58(7):974-982. doi:10.1136/gut.2008.163600
203. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari F V. Viral Clearance Without Destruction of Infected Cells During Acute HBV Infection. *Science (1979).* 1999;284(5415):825-829. doi:10.1126/science.284.5415.825
204. Kaiser G. An Overview of Innate and Adaptive Immunity. In: LibreTexts, ed. *Microbiology.* LibreTexts; 2021. Accessed December 26, 2023. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology\\_\(Kaiser\)/Unit\\_6%3A\\_Adaptive\\_Immunity/12%3A\\_Introduction\\_to\\_Adaptive\\_Immunity/12.1%3A\\_An\\_Overview\\_of\\_Innate\\_and\\_Adaptive\\_Immunity](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Kaiser)/Unit_6%3A_Adaptive_Immunity/12%3A_Introduction_to_Adaptive_Immunity/12.1%3A_An_Overview_of_Innate_and_Adaptive_Immunity)
205. Althwaiqeb SA, Bordoni B. *Histology, B Cell Lymphocyte.* StatPearls Publishing; 2023.
206. Pan J, Yao T, Cheng H, Zhu Y, Wang Y. B lymphocyte-mediated humoral immunity in the pathogenesis of chronic hepatitis B infection. *Liver Res.* 2020;4(3):124-128. doi:10.1016/j.livres.2020.07.001
207. Bertoletti A, Ferrari C. Adaptive immunity in HBV infection. *J Hepatol.* 2016;64(1):S71-S83. doi:10.1016/j.jhep.2016.01.026
208. Alberts B, Johnson A, Lewis J. Helper T Cells and Lymphocyte activation. In: *Molecular Biology of the Cell.* 4th ed. Garland Science; 2002. Accessed January 3, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26827/>
209. Karnell JL, Rieder SA, Ettinger R, Kolbeck R. Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;141:92-103. doi:10.1016/j.addr.2018.12.005
210. Andreu-Sanz D, Kobold S. Role and Potential of Different T Helper Cell Subsets in Adoptive Cell Therapy. *Cancers (Basel).* 2023;15(6):1650. doi:10.3390/cancers15061650

211. Milich DR. Influence of T-helper cell subsets and crossregulation in hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat.* 1997;4(s2):48-59. doi:10.1111/j.1365-2893.1997.tb00180.x
212. XING T, XU H, YU W. Role of T follicular helper cells and their associated molecules in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *Exp Ther Med.* 2013;5(3):885-889. doi:10.3892/etm.2012.864
213. Tan A, Koh S, Bertoletti A. Immune Response in Hepatitis B Virus Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(8):a021428. doi:10.1101/cshperspect.a021428
214. Walker JA, McKenzie ANJ. TH2 cell development and function. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(2):121-133. doi:10.1038/nri.2017.118
215. BECKMAN COULTER Life Sciences. Cytotoxic T cells. Accessed January 8, 2024. <https://www.beckman.com/resources/cell-types/blood-cells/leukocytes/lymphocytes/t-cells/cytotoxic-t-cells>
216. Zhang N, Bevan MJ. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity.* 2011;35(2):161-168. doi:10.1016/j.immuni.2011.07.010
217. Maini MK, Boni C, Ogg GS, et al. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8+ T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology.* 1999;117(6):1386-1396. doi:10.1016/S0016-5085(99)70289-1
218. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs M V, Matzke B, Schreiber R, Chisari F V. Intracellular Inactivation of the Hepatitis B Virus by Cytotoxic T Lymphocytes. *Immunity.* 1996;4(1):25-36. doi:10.1016/S1074-7613(00)80295-2
219. Chisari F V. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *Journal of Clinical Investigation.* 1997;99(7):1472-1477. doi:10.1172/JCI119308
220. Phillips S, Chokshi S, Riva A, Evans A, Williams R, Naoumov N V. CD8+ T Cell Control of Hepatitis B Virus Replication: Direct Comparison between Cytolytic and Noncytolytic Functions. *The Journal of Immunology.* 2010;184(1):287-295. doi:10.4049/jimmunol.0902761
221. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari F V. Viral Clearance Without Destruction of Infected Cells During Acute HBV Infection. *Science (1979).* 1999;284(5415):825-829. doi:10.1126/science.284.5415.825
222. Guidotti LG, Inverso D, Sironi L, et al. Immunosurveillance of the Liver by Intravascular Effector CD8 + T Cells. *Cell.* 2015;161(3):486-500. doi:10.1016/j.cell.2015.03.005
223. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology.* 2015;479-480:672-686. doi:10.1016/j.virol.2015.02.031

224. Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari F V. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med*. 1996;2(10):1104-1108. doi:10.1038/nm1096-1104
225. Noordeen F. Hepatitis B virus infection: An insight into infection outcomes and recent treatment options. *Virusdisease*. 2015;26(1-2):1-8. doi:10.1007/s13337-015-0247-y
226. Yuen MF, Chen DS, Dusheiko GM, et al. Hepatitis B virus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):18035. doi:10.1038/nrdp.2018.35
227. Michalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S, Chisari F V. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *Journal of Clinical Investigation*. 1994;93(1):230-239. doi:10.1172/JCI116950
228. Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology*. 2018;67(4):1560-1599. doi:10.1002/hep.29800
229. Lampertico P, Agarwal K, Berg T, et al. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2017;67(2):370-398. doi:10.1016/j.jhep.2017.03.021
230. Valsamakis A. Molecular Testing in the Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):426-439. doi:10.1128/CMR.00009-07
231. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol*. 2008;48(2):335-352. doi:10.1016/j.jhep.2007.11.011
232. Chen YC, Chu CM, Liaw YF. Age-specific prognosis following spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2010;51(2):435-444. doi:10.1002/hep.23348
233. Papatheodoridis G V., Manolakopoulos S, Liaw YF, Lok A. Follow-up and indications for liver biopsy in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection with persistently normal ALT: A systematic review. *J Hepatol*. 2012;57(1):196-202. doi:10.1016/j.jhep.2011.11.030
234. Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy<sup>1</sup> ☆. *Gastroenterology*. 2004;126(7):1750-1758. doi:10.1053/j.gastro.2004.03.018
235. Yuki N. Long-term histologic and virologic outcomes of acute self-limited hepatitis B. *Hepatology*. 2003;37(5):1172-1179. doi:10.1053/jhep.2003.50171
236. Michalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S, Chisari F V. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *Journal of Clinical Investigation*. 1994;93(1):230-239. doi:10.1172/JCI116950

237. Shi Y, Zheng M. Hepatitis B virus persistence and reactivation. *BMJ*. 2020;370:m2200. doi:10.1136/bmj.m2200
238. Revill P, Yuan Z. New Insights into how HBV Manipulates the Innate Immune Response to Establish Acute and Persistent Infection. *Antivir Ther*. 2013;18(1):1-15. doi:10.3851/IMP2542
239. Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut*. 2012;61(12):1754-1764. doi:10.1136/gutjnl-2011-301073
240. Tsai KN, Kuo CF, Ou JHJ. Mechanisms of Hepatitis B Virus Persistence. *Trends Microbiol*. 2018;26(1):33-42. doi:10.1016/j.tim.2017.07.006
241. Ma Z, Cao Q, Xiong Y, Zhang E, Lu M. Interaction between Hepatitis B Virus and Toll-Like Receptors: Current Status and Potential Therapeutic Use for Chronic Hepatitis B. *Vaccines (Basel)*. 2018;6(1):6. doi:10.3390/vaccines6010006
242. Lang T, Lo C, Skinner N, Locarnini S, Visvanathan K, Mansell A. The Hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the Toll-like receptor signaling pathway. *J Hepatol*. 2011;55(4):762-769. doi:10.1016/j.jhep.2010.12.042
243. Chen Z, Cheng Y, Xu Y, et al. Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. *Clinical Immunology*. 2008;128(3):400-408. doi:10.1016/j.clim.2008.04.006
244. Op den Brouw ML, Binda RS, Van Roosmalen MH, et al. Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus. *Immunology*. 2009;126(2):280-289. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02896.x
245. Jiang M, Broering R, Trippler M, et al. Toll-like receptor-mediated immune responses are attenuated in the presence of high levels of hepatitis B virus surface antigen. *J Viral Hepat*. 2014;21(12):860-872. doi:10.1111/jvh.12216
246. Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, et al. Hepatitis B Virus Impairs TLR9 Expression and Function in Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS One*. 2011;6(10):e26315. doi:10.1371/journal.pone.0026315
247. Wu J, Meng Z, Jiang M, et al. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology*. 2009;49(4):1132-1140. doi:10.1002/hep.22751
248. Li M, Sun R, Xu L, et al. Kupffer Cells Support Hepatitis B Virus–Mediated CD8+ T Cell Exhaustion via Hepatitis B Core Antigen–TLR2 Interactions in Mice. *The Journal of Immunology*. 2015;195(7):3100-3109. doi:10.4049/jimmunol.1500839

249. Zhijian Y, Zhen H, Fan Z, Jin Y, Qiwen D, Zhongming Z. Hepatitis B virus core protein with hot-spot mutations inhibit MxA gene transcription but has no effect on inhibition of virus replication by interferon  $\alpha$ . *Virology*. 2010;7(1):278. doi:10.1186/1743-422X-7-278
250. Wang X, Li Y, Mao A, Li C, Li Y, Tien P. Hepatitis B virus X protein suppresses virus-triggered IRF3 activation and IFN- $\beta$  induction by disrupting the VISA-associated complex. *Cell Mol Immunol*. 2010;7(5):341-348. doi:10.1038/cmi.2010.36
251. Jiang J, Tang H. Mechanism of inhibiting type I interferon induction by hepatitis B virus X protein. *Protein Cell*. 2010;1(12):1106-1117. doi:10.1007/s13238-010-0141-8
252. Mannion NM, Greenwood SM, Young R, et al. The RNA-Editing Enzyme ADAR1 Controls Innate Immune Responses to RNA. *Cell Rep*. 2014;9(4):1482-1494. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.041
253. Wang L, Sun Y, Song X, et al. Hepatitis B virus evades immune recognition via RNA adenosine deaminase ADAR1-mediated viral RNA editing in hepatocytes. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(8):1871-1882. doi:10.1038/s41423-021-00729-1
254. Liu D, Wu A, Cui L, et al. Hepatitis B Virus Polymerase Suppresses NF- $\kappa$ B Signaling by Inhibiting the Activity of IKKs via Interaction with Hsp90 $\beta$ . *PLoS One*. 2014;9(3):e91658. doi:10.1371/journal.pone.0091658
255. Liu Y, Li J, Chen J, et al. Hepatitis B Virus Polymerase Disrupts K63-Linked Ubiquitination of STING To Block Innate Cytosolic DNA-Sensing Pathways. *J Virol*. 2015;89(4):2287-2300. doi:10.1128/JVI.02760-14
256. Wang H, Ryu WS. Hepatitis B Virus Polymerase Blocks Pattern Recognition Receptor Signaling via Interaction with DDX3: Implications for Immune Evasion. *PLoS Pathog*. 2010;6(7):e1000986. doi:10.1371/journal.ppat.1000986
257. Yonejima A, Mizukoshi E, Tamai T, et al. Characteristics of Impaired Dendritic Cell Function in Patients With Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology*. 2019;70(1):25-39. doi:10.1002/hep.30637
258. Buschow SI, Biesta PJ, Groothuisink ZMA, et al. TLR7 polymorphism, sex and chronic HBV infection influence plasmacytoid DC maturation by TLR7 ligands. *Antiviral Res*. 2018;157:27-37. doi:10.1016/j.antiviral.2018.06.015
259. Xu Y, Hu Y, Shi B, et al. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- $\alpha$  production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol Immunol*. 2009;46(13):2640-2646. doi:10.1016/j.molimm.2009.04.031

- 
260. Op den Brouw ML, Binda RS, Van Roosmalen MH, et al. Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus. *Immunology*. 2009;126(2):280-289. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02896.x
261. Lan S, Wu L, Wang X, et al. Impact of HBeAg on the maturation and function of dendritic cells. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016;46:42-48. doi:10.1016/j.ijid.2016.03.024
262. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol*. 2013;14(10):996-1006. doi:10.1038/ni.2691
263. Zhao HJ, Hu YF, Han QJ, Zhang J. Innate and adaptive immune escape mechanisms of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol*. 2022;28(9):881-896. doi:10.3748/wjg.v28.i9.881
264. Li M, Sun R, Xu L, et al. Kupffer Cells Support Hepatitis B Virus–Mediated CD8+ T Cell Exhaustion via Hepatitis B Core Antigen–TLR2 Interactions in Mice. *The Journal of Immunology*. 2015;195(7):3100-3109. doi:10.4049/jimmunol.1500839
265. Boltjes A, van Montfoort N, Biesta PJ, et al. Kupffer Cells Interact With Hepatitis B Surface Antigen In Vivo and In Vitro, Leading to Proinflammatory Cytokine Production and Natural Killer Cell Function. *J Infect Dis*. 2015;211(8):1268-1278. doi:10.1093/infdis/jiu599
266. Yu X, Lan P, Hou X, et al. HBV inhibits LPS-induced NLRP3 inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production via suppressing the NF- $\kappa$ B pathway and ROS production. *J Hepatol*. 2017;66(4):693-702. doi:10.1016/j.jhep.2016.12.018
267. Wang S, Chen Z, Hu C, et al. Hepatitis B Virus Surface Antigen Selectively Inhibits TLR2 Ligand–Induced IL-12 Production in Monocytes/Macrophages by Interfering with JNK Activation. *The Journal of Immunology*. 2013;190(10):5142-5151. doi:10.4049/jimmunol.1201625
268. Li H, Zhai N, Wang Z, et al. Regulatory NK cells mediated between immunosuppressive monocytes and dysfunctional T cells in chronic HBV infection. *Gut*. 2018;67(11):2035-2044. doi:10.1136/gutjnl-2017-314098
269. Dai K, Huang L, Sun X, Yang L, Gong Z. Hepatic CD206-positive macrophages express amphiregulin to promote the immunosuppressive activity of regulatory T cells in HBV infection. *J Leukoc Biol*. 2015;98(6):1071-1080. doi:10.1189/jlb.4A0415-152R
270. Stelma F, Willems SB, Erken R, et al. Dynamics of the Immune Response in Acute Hepatitis B Infection. *Open Forum Infect Dis*. 2017;4(4). doi:10.1093/ofid/ofx231
271. Yu WH, Cosgrove C, Berger CT, et al. ADCC-Mediated CD56dim NK Cell Responses Are Associated with Early HBsAg Clearance in Acute HBV Infection. *Pathog Immun*. 2018;3(1):2. doi:10.20411/pai.v3i1.228

272. Fiscaro P, Rossi M, Vecchi A, et al. The Good and the Bad of Natural Killer Cells in Virus Control: Perspective for Anti-HBV Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20):5080. doi:10.3390/ijms20205080
273. Han W, Ni Q, Liu K, et al. Decreased CD122 on CD56 dim NK associated with its impairment in asymptomatic chronic HBV carriers with high levels of HBV DNA, HBsAg and HBeAg. *Life Sci.* 2018;195:53-60. doi:10.1016/j.lfs.2018.01.001
274. Ghosh S, Nandi M, Pal S, et al. Natural killer cells contribute to hepatic injury and help in viral persistence during progression of hepatitis B e-antigen-negative chronic hepatitis B virus infection. *Clinical Microbiology and Infection.* 2016;22(8):733.e9-733.e19. doi:10.1016/j.cmi.2016.05.009
275. Yang Y, Han Q, Zhang C, Xiao M, Zhang J. Hepatitis B virus antigens impair NK cell function. *Int Immunopharmacol.* 2016;38:291-297. doi:10.1016/j.intimp.2016.06.015
276. Li TY, Yang Y, Zhou G, Tu ZK. Immune suppression in chronic hepatitis B infection associated liver disease: A review. *World J Gastroenterol.* 2019;25(27):3527-3537. doi:10.3748/wjg.v25.i27.3527
277. Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, et al. Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Dysfunction in Chronic HBV Infection. *J Virol.* 2007;81(8):4215-4225. doi:10.1128/JVI.02844-06
278. Heim K, Neumann-Haefelin C, Thimme R, Hofmann M. Heterogeneity of HBV-Specific CD8+ T-Cell Failure: Implications for Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.02240
279. Ye B, Liu X, Li X, Kong H, Tian L, Chen Y. T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance. *Cell Death Dis.* 2015;6(3):e1694-e1694. doi:10.1038/cddis.2015.42
280. Milich D. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 2003;38(5):1075-1086. doi:10.1053/jhep.2003.50453
281. Li X, Kong H, Tian L, et al. Changes of Costimulatory Molecule CD28 on Circulating CD8 + T Cells Correlate with Disease Pathogenesis of Chronic Hepatitis B. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1-6. doi:10.1155/2014/423181
282. Zhou S, Ou R, Huang L, Price GE, Moskophidis D. Differential Tissue-Specific Regulation of Antiviral CD8 + T-Cell Immune Responses during Chronic Viral Infection. *J Virol.* 2004;78(7):3578-3600. doi:10.1128/JVI.78.7.3578-3600.2004
283. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology.* 2010;129(4):474-481. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03255.x
284. Li M, Sun XH, Zhu XJ, et al. HBcAg induces PD-1 upregulation on CD4+T cells through activation of JNK, ERK and PI3K/AKT pathways in chronic hepatitis-B-infected patients. *Laboratory Investigation.* 2012;92(2):295-304. doi:10.1038/labinvest.2011.157

- 
285. Wang H, Wu D, Wang X, et al. Hepatitis B virus surface protein-induced *hPIAS1* transcription requires TAL1, E47, MYOG, NFI, and MAPK signal pathways. *Biol Chem*. 2016;397(11):1173-1185. doi:10.1515/hsz-2015-0290
286. Boni C, Lampertico P, Talamona L, et al. Natural killer cell phenotype modulation and natural killer/T-cell interplay in nucleos(t)ide analogue-treated hepatitis e antigen-negative patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2015;62(6):1697-1709. doi:10.1002/hep.28155
287. Qi H. T follicular helper cells in space-time. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(10):612-625. doi:10.1038/nri.2016.94
288. Ryg-Cornejo V, Ioannidis LJ, Ly A, et al. Severe Malaria Infections Impair Germinal Center Responses by Inhibiting T Follicular Helper Cell Differentiation. *Cell Rep*. 2016;14(1):68-81. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.006
289. Vyas AK, Sharma BC, Sarin SK, Trehanpati N. Immune correlates of hepatitis B surface antigen spontaneous seroconversion in hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B patients. *Liver International*. 2018;38(1):38-49. doi:10.1111/liv.13475
290. Wang R, Xie R, Song Z. Circulating regulatory Tfh cells are enriched in patients with chronic hepatitis B infection and induce the differentiation of regulatory B cells. *Exp Cell Res*. 2018;365(2):171-176. doi:10.1016/j.yexcr.2018.02.031
291. Corti D, Benigni F, Shouval D. Viral envelope-specific antibodies in chronic hepatitis B virus infection. *Curr Opin Virol*. 2018;30:48-57. doi:10.1016/j.coviro.2018.04.002
292. Liu Y, Cheng L sha, Wu S di, et al. IL-10-producing regulatory B-cells suppressed effector T-cells but enhanced regulatory T-cells in chronic HBV infection. *Clin Sci*. 2016;130(11):907-919. doi:10.1042/CS20160069
293. Tian C, Chen Y, Liu Y, et al. Use of ELISpot assay to study HBs-specific B cell responses in vaccinated and HBV infected humans. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1):1-10. doi:10.1038/s41426-018-0034-0
294. Burton AR, Pallett LJ, McCoy LE, et al. Circulating and intrahepatic antiviral B cells are defective in hepatitis B. *Journal of Clinical Investigation*. 2018;128(10):4588-4603. doi:10.1172/JCI121960
295. Poonia B, Ayithan N, Nandi M, Masur H, Kottlilil S. HBV induces inhibitory FcRL receptor on B cells and dysregulates B cell-T follicular helper cell axis. *Sci Rep*. 2018;8(1):15296. doi:10.1038/s41598-018-33719-x

296. XING T, XU H, YU W. Role of T follicular helper cells and their associated molecules in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *Exp Ther Med*. 2013;5(3):885-889. doi:10.3892/etm.2012.864
297. Zhang Z, Wang C, Liu Z, Zou G, Li J, Lu M. Host Genetic Determinants of Hepatitis B Virus Infection. *Front Genet*. 2019;10. doi:10.3389/fgene.2019.00696
298. Matei HV, Vica ML, Siserman CV. Association between HLA class II alleles and hepatitis B virus infection in Transylvania, Romania. *Immunol Invest*. 2018;47(7):735-744. doi:10.1080/08820139.2018.1489832
299. Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, et al. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nat Genet*. 2009;41(5):591-595. doi:10.1038/ng.348
300. Choga WT, Anderson M, Zumbika E, et al. In Silico Prediction of Human Leukocytes Antigen (HLA) Class II Binding Hepatitis B Virus (HBV) Peptides in Botswana. *Viruses*. 2020;12(7):731. doi:10.3390/v12070731
301. Asabe S, Wieland SF, Chattopadhyay PK, et al. The Size of the Viral Inoculum Contributes to the Outcome of Hepatitis B Virus Infection. *J Virol*. 2009;83(19):9652-9662. doi:10.1128/JVI.00867-09
302. Tian Y, Chen W ling, Ou J hsiung J. Effects of Interferon- $\alpha/\beta$  on HBV Replication Determined by Viral Load. *PLoS Pathog*. 2011;7(7):e1002159. doi:10.1371/journal.ppat.1002159
303. Tian Y, Chen W ling, Kuo C fu, Ou J hsiung J. Viral-Load-Dependent Effects of Liver Injury and Regeneration on Hepatitis B Virus Replication in Mice. *J Virol*. 2012;86(18):9599-9605. doi:10.1128/JVI.01087-12
304. Cote PJ, Korba BE, Miller RH, et al. Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology*. 2000;31(1):190-200. doi:10.1002/hep.510310128
305. Publicover J, Goodsell A, Nishimura S, et al. IL-21 is pivotal in determining age-dependent effectiveness of immune responses in a mouse model of human hepatitis B. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(3):1154-1162. doi:10.1172/JCI44198
306. Publicover J, Gaggar A, Nishimura S, et al. Age-dependent hepatic lymphoid organization directs successful immunity to hepatitis B. *Journal of Clinical Investigation*. 2013;123(9):3728-3739. doi:10.1172/JCI68182

307. Tian Y, Kuo C fu, Akbari O, Ou J hsiung J. Maternal-Derived Hepatitis B Virus e Antigen Alters Macrophage Function in Offspring to Drive Viral Persistence after Vertical Transmission. *Immunity*. 2016;44(5):1204-1214. doi:10.1016/j.immuni.2016.04.008
308. Tzeng HT, Tsai HF, Liao HJ, et al. PD-1 Blockage Reverses Immune Dysfunction and Hepatitis B Viral Persistence in a Mouse Animal Model. *PLoS One*. 2012;7(6):e39179. doi:10.1371/journal.pone.0039179
309. Wenjin Z, Chuanhui P, Yunle W, Lateef SA, Shusen Z. Longitudinal fluctuations in PD1 and PD-L1 expression in association with changes in anti-viral immune response in chronic hepatitis B. *BMC Gastroenterol*. 2012;12(1):109. doi:10.1186/1471-230X-12-109
310. Bility MT, Cheng L, Zhang Z, et al. Hepatitis B Virus Infection and Immunopathogenesis in a Humanized Mouse Model: Induction of Human-Specific Liver Fibrosis and M2-Like Macrophages. *PLoS Pathog*. 2014;10(3):e1004032. doi:10.1371/journal.ppat.1004032
311. El-Serag HB. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1264-1273.e1. doi:10.1053/j.gastro.2011.12.061
312. Shi Y, Wu YH, Wu W, Zhang WJ, Yang J, Chen Z. Association between occult hepatitis B infection and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Liver International*. 2012;32(2):231-240. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02481.x
313. Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia MA. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathologie Biologie*. 2010;58(4):267-272. doi:10.1016/j.patbio.2010.03.005
314. Kawanaka M, Nishino K, Nakamura J, et al. Quantitative Levels of Hepatitis B Virus DNA and Surface Antigen and the Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatitis B Receiving Long-Term Nucleos(t)ide Analogue Therapy. *Liver Cancer*. 2014;3(1):41-52. doi:10.1159/000343857
315. Yip TCF, Wong GLH, Chan HLY, et al. HBsAg seroclearance further reduces hepatocellular carcinoma risk after complete viral suppression with nucleos(t)ide analogues. *J Hepatol*. 2019;70(3):361-370. doi:10.1016/j.jhep.2018.10.014
316. Yan H, Yang Y, Zhang L, et al. Characterization of the genotype and integration patterns of hepatitis B virus in early- and late-onset hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2015;61(6):1821-1831. doi:10.1002/hep.27722
317. Hao X, Chen Y, Bai L, Wei H, Sun R, Tian Z. HBsAg-specific CD8+ T cells as an indispensable trigger to induce murine hepatocellular carcinoma. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(1):128-137. doi:10.1038/s41423-019-0330-1

318. Cheng S, Zhang B, Du JY, Jin YH, Lang HY, Zeng LH. Hepatitis B Surface Antigen Promotes the Invasion of Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma Cells by Upregulation of Toll-Like Receptor 2. *Viral Immunol.* 2017;30(3):232-239. doi:10.1089/vim.2016.0162
319. Hsieh YH. Pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2004;25(10):2023-2032. doi:10.1093/carcin/bgh207
320. Wang H, Huang W, Lai M, Su I. Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci.* 2006;97(8):683-688. doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00235.x
321. Yang F, Yan S, He Y, et al. Expression of hepatitis B virus proteins in transgenic mice alters lipid metabolism and induces oxidative stress in the liver. *J Hepatol.* 2008;48(1):12-19. doi:10.1016/j.jhep.2007.06.021
322. Hsieh Y, Chang Y, Su I, et al. Hepatitis B virus pre-S2 mutant large surface protein inhibits DNA double-strand break repair and leads to genome instability in hepatocarcinogenesis. *J Pathol.* 2015;236(3):337-347. doi:10.1002/path.4531
323. Álvarez EG, Demeulemeester J, Otero P, et al. Aberrant integration of Hepatitis B virus DNA promotes major restructuring of human hepatocellular carcinoma genome architecture. *Nat Commun.* 2021;12(1):6910. doi:10.1038/s41467-021-26805-8
324. Ramirez R, van Buuren N, Gamelin L, et al. Targeted Long-Read Sequencing Reveals Comprehensive Architecture, Burden, and Transcriptional Signatures from Hepatitis B Virus-Associated Integrations and Translocations in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *J Virol.* 2021;95(19). doi:10.1128/JVI.00299-21
325. Péneau C, Imbeaud S, La Bella T, et al. Hepatitis B virus integrations promote local and distant oncogenic driver alterations in hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2022;71(3):616-626. doi:10.1136/gutjnl-2020-323153
326. Kawai-Kitahata F, Asahina Y, Tanaka S, et al. Comprehensive analyses of mutations and hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma with clinicopathological features. *J Gastroenterol.* 2016;51(5):473-486. doi:10.1007/s00535-015-1126-4
327. Sung WK, Zheng H, Li S, et al. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2012;44(7):765-769. doi:10.1038/ng.2295
328. Tang D, Li B, Xu T, et al. VISDB: a manually curated database of viral integration sites in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D633-D641. doi:10.1093/nar/gkz867

- 
329. Péneau C, Imbeaud S, La Bella T, et al. Hepatitis B virus integrations promote local and distant oncogenic driver alterations in hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2022;71(3):616-626. doi:10.1136/gutjnl-2020-323153
330. Jang JW, Kim HS, Kim JS, et al. Distinct Patterns of HBV Integration and TERT Alterations between in Tumor and Non-Tumor Tissue in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):7056. doi:10.3390/ijms22137056
331. Sze KM, Ho DW, Chiu Y, et al. Hepatitis B Virus–Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Integration Harnesses Host ELF4, Resulting in Telomerase Reverse Transcriptase Gene Transcription in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2021;73(1):23-40. doi:10.1002/hep.31231
332. Heikenwalder M, Protzer U. LINE(1)s of Evidence in HBV-Driven Liver Cancer. *Cell Host Microbe*. 2014;15(3):249-250. doi:10.1016/j.chom.2014.02.015
333. Lau CC, Sun T, Ching AKK, et al. Viral-Human Chimeric Transcript Predisposes Risk to Liver Cancer Development and Progression. *Cancer Cell*. 2014;25(3):335-349. doi:10.1016/j.ccr.2014.01.030
334. Zhang Y, Yan Q, Gong L, et al. C-terminal truncated HBx initiates hepatocarcinogenesis by downregulating TXNIP and reprogramming glucose metabolism. *Oncogene*. 2021;40(6):1147-1161. doi:10.1038/s41388-020-01593-5
335. Ng KY, Chai S, Tong M, et al. C-terminal truncated hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinogenesis through induction of cancer and stem cell-like properties. *Oncotarget*. 2016;7(17):24005-24017. doi:10.18632/oncotarget.8209
336. Ding D, Lou X, Hua D, et al. Recurrent Targeted Genes of Hepatitis B Virus in the Liver Cancer Genomes Identified by a Next-Generation Sequencing–Based Approach. *PLoS Genet*. 2012;8(12):e1003065. doi:10.1371/journal.pgen.1003065
337. Zhao LH, Liu X, Yan HX, et al. Genomic and oncogenic preference of HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*. 2016;7(1):12992. doi:10.1038/ncomms12992
338. Tu T, Budzinska M, Shackel N, Urban S. HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Viruses*. 2017;9(4):75. doi:10.3390/v9040075
339. Álvarez EG, Demeulemeester J, Otero P, et al. Aberrant integration of Hepatitis B virus DNA promotes major restructuring of human hepatocellular carcinoma genome architecture. *Nat Commun*. 2021;12(1):6910. doi:10.1038/s41467-021-26805-8
340. Centers for Disease Control and Prevention. Screening and Testing for Hepatitis B Virus Infection: CDC Recommendations — United States, 2023. Recommendations and Reports .
341. SNS24. Vírus da hepatite B (VHB). Vírus da hepatite B (VHB).

342. Abbot. Architect HBsAg QT. *Abbott, Diagnostic Division*. Published online 2008.
343. Wong VW, Chan HL. Severe acute exacerbation of chronic hepatitis B: A unique presentation of a common disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(7):1179-1186. doi:10.1111/j.1440-1746.2009.05924.x
344. Abbott. Architect Anti-HBs. *Abbott Diagnostics Division*. Published online 2009.
345. European Association for the Study of the Liver. Corrigendum to: “EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection” [J Hepatol 2012;57:167–185]. *J Hepatol*. 2013;58(1):201. doi:10.1016/j.jhep.2012.09.013
346. Chu CM, Hung SJ, Lin J, Tai DI, Liaw YF. Natural history of hepatitis b e antigen to antibody seroconversion in patients with normal serum aminotransferase levels. *Am J Med*. 2004;116(12):829-834. doi:10.1016/j.amjmed.2003.12.040
347. Liaw YF. HBeAg seroconversion as an important end point in the treatment of chronic hepatitis B. *Hepatol Int*. 2009;3(3):425-433. doi:10.1007/s12072-009-9140-3
348. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, et al. Hepatitis B e Antigen and the Risk of Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(3):168-174. doi:10.1056/NEJMoa013215
349. Funk ML, Rosenberg DM, Lok ASF. World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J Viral Hepat*. 2002;9(1):52-61. doi:10.1046/j.1365-2893.2002.00304.x
350. Chen CJ. Risk of Hepatocellular Carcinoma Across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level. *JAMA*. 2006;295(1):65. doi:10.1001/jama.295.1.65
351. Wong GLH, Chan HLY, Mak CWH, et al. Entecavir treatment reduces hepatic events and deaths in chronic hepatitis B patients With liver cirrhosis. *Hepatology*. 2013;58(5):1537-1547. doi:10.1002/hep.26301
352. Wong GL, Chan HL, Chan H, et al. Accuracy of Risk Scores for Patients With Chronic Hepatitis B Receiving Entecavir Treatment. *Gastroenterology*. 2013;144(5):933-944. doi:10.1053/j.gastro.2013.02.002
353. Khuroo MS, Khuroo NS, Khuroo MS. Accuracy of Rapid Point-of-Care Diagnostic Tests for Hepatitis B Surface Antigen—A Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Exp Hepatol*. 2014;4(3):226-240. doi:10.1016/j.jceh.2014.07.008
354. Njai HF, Shimakawa Y, Sanneh B, et al. Validation of Rapid Point-of-Care (POC) Tests for Detection of Hepatitis B Surface Antigen in Field and Laboratory Settings in the Gambia, Western Africa. *J Clin Microbiol*. 2015;53(4):1156-1163. doi:10.1128/JCM.02980-14

355. Lin CL, Kao JH. Hepatitis B Virus Genotypes and Variants. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(5):a021436-a021436. doi:10.1101/cshperspect.a021436
356. Lin C, Kao J. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(s1):123-130. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06541.x
357. Lai-Hung Wong G, Lik-Yuen Chan H. Molecular virology in chronic hepatitis B: genotypes. *Br J Hosp Med*. 2005;66(1):13-16. doi:10.12968/hmed.2005.66.1.17529
358. Orito E. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology*. 2001;34(3):590-594. doi:10.1053/jhep.2001.27221
359. Chan HL. Significance of hepatitis B virus genotypes and mutations in the development of hepatocellular carcinoma in Asia. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(1):8-12. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06514.x
360. Lin CL, Kao JH. Hepatitis B viral factors and treatment responses in chronic hepatitis B. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2013;112(6):302-311. doi:10.1016/j.jfma.2013.02.001
361. Chan HL, Wong GL, Tse C, et al. Hepatitis B Virus Genotype C Is Associated With More Severe Liver Fibrosis Than Genotype B. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2009;7(12):1361-1366. doi:10.1016/j.cgh.2009.08.004
362. Wong GL -H., Chan HL -Y., Yiu KK -L., et al. Meta-analysis: the association of hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;37(5):517-526. doi:10.1111/apt.12207
363. Kao J, Chen P, Lai M, Chen D. Hepatitis B virus genotypes and spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in Taiwanese hepatitis B carriers. *J Med Virol*. 2004;72(3):363-369. doi:10.1002/jmv.10534
364. Chan HLY. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2004;53(10):1494-1498. doi:10.1136/gut.2003.033324
365. Kao JH. Hepatitis B Virus Genotypes and Hepatocellular Carcinoma in Taiwan. *Intervirology*. 2003;46(6):400-407. doi:10.1159/000074999
366. Kao JH, Chen PJ, Chen DS. Recent Advances in the Research of Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. In: ; 2010:21-72. doi:10.1016/B978-0-12-380888-2.00002-9
367. Zeng MD, Lu LG, Mao YM, et al. Prediction of significant fibrosis in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B by a noninvasive model. *Hepatology*. 2005;42(6):1437-1445. doi:10.1002/hep.20960

- 
368. Mohamadnejad M, Montazeri G, Fazlollahi A, et al. Noninvasive Markers of Liver Fibrosis and Inflammation in Chronic Hepatitis B-Virus Related Liver Disease. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(11):2537-2545. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00788.x
369. Myers RP, Tainturier MH, Ratziu V, et al. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2003;39(2):222-230. doi:10.1016/S0168-8278(03)00171-5
370. Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol*. 2007;47(4):598-607. doi:10.1016/j.jhep.2007.07.006
371. Amarapurkar D, Amarapurkar A. Indications of Liver Biopsy in the Era of Noninvasive Assessment of Liver Fibrosis. *J Clin Exp Hepatol*. 2015;5(4):314-319. doi:10.1016/j.jceh.2015.08.005
372. Wong GLH. Update of liver fibrosis and steatosis with transient elastography (Fibroscan). *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2013;1(1):19-26. doi:10.1093/gastro/got007
373. Barr RG, Ferraioli G, Palmeri ML, et al. Elastography Assessment of Liver Fibrosis: Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference Statement. *Radiology*. 2015;276(3):845-861. doi:10.1148/radiol.2015150619
374. Wong GL, Wong VW, Chim AM, et al. Factors associated with unreliable liver stiffness measurement and its failure with transient elastography in the Chinese population. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(2):300-305. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06510.x
375. Wong VWS, Vergniol J, Wong GLH, et al. Liver Stiffness Measurement Using XL Probe in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2012;107(12):1862-1871. doi:10.1038/ajg.2012.331
376. Wagner M, Besa C, Bou Ayache J, et al. Magnetic Resonance Elastography of the Liver. *Invest Radiol*. 2016;51(9):575-581. doi:10.1097/RLI.0000000000000269
377. Huwart L, van Beers BE. MR elastography. *Gastroenterol Clin Biol*. 2008;32(6):68-72. doi:10.1016/S0399-8320(08)73995-2
378. Ghany MG, Lok AS. Functional cure of hepatitis B requires silencing covalently closed circular and integrated hepatitis B virus DNA. *Journal of Clinical Investigation*. 2022;132(18). doi:10.1172/JCI163175
379. Shin EC, Sung PS, Park SH. Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(8):509-523. doi:10.1038/nri.2016.69
380. Sintusek P, Wanlapakorn N, Poovorawan Y. Strategies to Prevent Mother-to-child Transmission of Hepatitis B Virus. *J Clin Transl Hepatol*. 2023;000(000):000-000. doi:10.14218/JCTH.2022.00332

381. Lazarevic I, Banko A, Miljanovic D, Cupic M. Clinical Utility of Quantitative HBV Core Antibodies for Solving Diagnostic Dilemmas. *Viruses*. 2023;15(2):373. doi:10.3390/v15020373