

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**FACULDADE DE MEDICINA**



Estudo da diversidade genética e da resistência primária à  
lamivudina de vírus da hepatite B em coinfectados por vírus da  
imunodeficiência humana, em Maputo, Moçambique

Lúcia Mabalane Chambal

Orientador: Prof. Doutor Francisco Antunes

Co-Orientador: Prof. Doutor Eduardo Samo Gudo

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de Mestre em  
Doenças Infecciosas Emergentes

2016

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**FACULDADE DE MEDICINA**



Estudo da diversidade genética e da resistência primária à  
lamivudina de vírus da hepatite B em coinfectados por vírus da  
imunodeficiência humana, em Maputo, Moçambique

Lúcia Mabalane Chambal

Orientador: Prof. Doutor Francisco Antunes

Co-Orientador: Prof. Doutor Eduardo Samo Gudo

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de Mestre em  
Doenças Infecciosas Emergentes

2016

Esta dissertação será submetida para aprovação pelo Comité Científico da  
Faculdade de Medicina de Lisboa

## RESUMO

### Introdução

A era da TARV marcou o declínio das infecções oportunistas associadas a VIH, entretanto, foram-se revelando outras causas de morbimortalidade, dada a maior sobrevivência dos infectados, como é o caso da doença hepática crónica, associada à infecção por VHB.

A prevalência mundial estimada da hepatite B crónica é de 400 milhões, sendo maiores as taxas de prevalência na Ásia e em África, onde, também, se concentra o maior número estimado de infectados por VIH.

VHB é classificado, de acordo com resultados de análises filogenéticas, em oito génotipos designados de A a H, sendo que a prevalência desses génotipos varia de acordo com a região geográfica. Nos últimos anos vem crescendo a evidência de que os génotipos de VHB influenciam a evolução clínica da doença, as taxas de seroconversão dos marcadores víricos, os padrões de mutações nas regiões promotoras do *core* e *precore* e a resposta à terapêutica antivírica.

Em muitos países de baixos recursos o tratamento disponível para a hepatite B é a LAM, a qual apresenta baixa barreira genética, levando à emergência de resistências em 93% dos casos, ao quarto ano de tratamento.

Em Moçambique, é de se mencionar apenas um estudo publicado, em 2007, com 1.578 participantes, no qual se estimou a prevalência do AgHBs de 10,6%, em doadores de sangue. Entretanto, até a presente data, não há informação disponível sobre a diversidade genética e resistência primária à LAM de VHB.

## Objectivo

Estudar a prevalência, a diversidade genética e o perfil de resistência primária à LAM, de VHB, em infectados por VIH, sem TARV prévia, na Área de Saúde de Mavalane, Cidade de Maputo, Moçambique.

## Material e métodos

Foi feito um estudo transversal, descritivo no qual foram incluídos infectados por VIH, sem TARV prévia, com idades superiores a 18 anos, seguidos na Consulta de Doença Crónica nos Centros de Saúde (CS) de Mavalane e Polana Caniço, Área de Saúde de Mavalane, Cidade de Maputo, Moçambique. A colheita de informação foi feita por questionários fechados, exame físico e colheita de amostras de sangue para avaliação das aminotransferases, perfil imunitário do doente, perfil serológico da hepatite B, carga vírica, genótipo e perfil de resistência de VHB. Foram feitas comunicações diárias nas Unidades Sanitárias (US), com informação detalhada sobre os procedimentos do estudo, tendo o consentimento informado sido assinado por todos os participantes. O registo de dados e a análise estatística foram feitos por programas informáticos apropriados.

## Resultados

Foram incluídos 518 indivíduos infectados por VIH, com idade média de 33 anos, maioritariamente do sexo feminino (66,2%). Foi encontrada uma prevalência de infecção por VHB de 9,1%. Foram definidos dois grupos, coinfectados por VIH e VHB e monoinfectados por VIH e estes foram comparados quanto a características demográficas, clínicas e laboratoriais.

Das características sociodemográficas estudadas, como idade, género, não uso de preservativo, uso de drogas intravenosas, presença de escarificações, *piercings* ou tatuagens, história de transfusões sanguíneas, vacinação prévia para a hepatite B e múltiplos parceiros sexuais, só se notou haver diferença significativa quanto a antecedentes de transfusões sanguíneas ( $p=0,47$ ).

Quanto às características estudadas, os dados clínicos, colhidos na população do estudo, foram a presença de sinais de doença hepática crónica, como icterícia, ascite, hepatomegalia e esplenomegalia, não tendo sido observados nenhum destes sinais em ambos os grupos. Não se notaram, também, diferenças significativas entre os dois grupos, quanto ao estágio clínico da infecção por VIH, segundo a OMS.

Quanto às características laboratoriais estudadas (hemoglobina, leucócitos totais, linfócitos totais, plaquetas, linfócitos TCD4<sup>+</sup>, AST e ALT) não se notaram diferenças, estatisticamente, significativas entre os dois grupos, verificando-se, apenas, alguma tendência, para tal, no que concerne à ALT ( $p=0,054$ ).

Foi quantificada a carga vírica de VHB a 46 dos 47 indivíduos coinfectados, tendo os valores sido estratificados em três grupos – sete (15,2%) tinham ADN de VHB não detectável, 27 tinham ADN de VHB  $<10^4$  UI/mL e 12 (26,1%) tinham ADN de VHB  $>10^4$  UI/mL. Estes grupos foram, por sua vez, comparados quanto às características clínicas, não havendo diferenças, estatisticamente, significativas quanto ao estágio clínico da infecção por VIH, segundo a OMS.

Quanto às características laboratoriais (contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, AST e ALT) não se notaram diferenças, estatisticamente, significativas.

Foi feito o estudo genotípico de 27 (58,7%) amostras, tendo sido detectados o genótipo A em 25 (92,6%) indivíduos e o genótipo E em dois (7,4%). Não foram detectadas mutações de resistência à LAM nas amostras testadas.

### Conclusões

Os resultados encontrados neste estudo, no que concerne à prevalência da infecção por VHB, vão de acordo com os resultados de outros estudos realizados em Moçambique em outros grupos populacionais, o que permite concluir que a transmissão da infecção por VHB ocorre precocemente. Os genótipos aqui identificados são sobreponíveis aos encontrados em estudos realizados em Moçambique e em países vizinhos. Outros factos a realçar foram a ausência, nos coinfectados, de sinais clínicos ou laboratoriais de doença hepática descompensada e, também, a ausência de mutações que conferem resistência à LAM, o que coloca a necessidade de se efectuarem estudos prospectivos para a avaliação da evolução clínica, laboratorial e da resposta a terapêutica antivírica nesta população.

### Palavras-chave

VHB, VIH, LAM, prevalência, genótipos, resistência.

## Abstract

### Background:

Information available in Mozambique about the prevalence of HBV infection is scarce, limited to data in blood donors, with one study showing a prevalence of 10.6% in Maputo and another study of 10.2% in Tete. There is no data published on the prevalence of HBV-HIV coinfection.

In addition, no study to date has been published regarding the genetic diversity and primary lamivudine resistance profile of HBV. Knowledge of the circulating genotypes are relevant, as they are predictors of clinical outcomes and response to chronic hepatitis B treatment.

This study was conducted to evaluate the frequency, genetic diversity and prevalence of primary resistance of HBV to lamivudine in HBV-HIV treatment naive co-infected patients in Maputo, Mozambique.

### Methods

A cross-sectional, descriptive study of HIV-infected treatment naïve adults followed in two health centers in Maputo. Information was collected through closed questionnaires, physical examination and blood samples for the evaluation of hematological and aminotransferases profiles, viral load, genotype, serological and resistance profile of HBV. Participants were divided into two groups, HBV-HIV co-infected and the HIV to compare demographic, clinical and laboratory characteristics.

### Results

518 HIV-infected individuals were included with a mean age of 33 years old and

majority female (66.2%). A prevalence of HBV co-infection of 9.1% was found.

The mono-infected group was found to have more individuals with a history of blood transfusions ( $p = 0.047$ ). No significant difference was found between the two groups for age, gender, lack of condom use, intravenous drug use, presence of ritual scars, piercings or tattoos, previous vaccination for hepatitis B or multiple sexual partners.

No physical signs of chronic liver disease were observed in either group. In addition, no significant difference was found by WHO clinical stage of HIV infection.

HBV-DNA was available for 46 of 47 co-infected individuals and were stratified into three groups: 7 (15.2%) had no detectable HBV-DNA, 27 had HBV DNA  $<10^4$  IU/mL and 12 (26.1%) had HBV DNA  $> 10^4$  IU/ml. Clinical and laboratory characteristics were compared amongst these groups and demonstrated no statistically significant difference in the WHO clinical stage of HIV infection, CD4 count or transaminases.

Genotypic study of 27 (58.7%) samples was performed, with genotype A detected in 25 (92.6%) individuals and genotype E in 2 (7.4%) individuals. No lamivudine-resistance mutations were detected.

## Conclusions

This study represents a characterization of the prevalence, genotype and sociodemographic characteristics of HBV-HIV co-infected individuals in Maputo. The HBV genotypes detected matched those described in South Africa and Zimbabwe suggesting local transmission of the same strain of HBV between these countries and Mozambique. While primary resistance to lamivudine was

not detected, subsequent studies may reveal the development of secondary resistance in those co-infected individuals on anti-retrovirals with lamuvidine.

## **AGRADECIMENTOS**

Para que fosse possível chegar a esta fase, muito contribuíram as pessoas com quem, ao longo destes anos, tive a oportunidade e privilégio de lidar. De entre eles, e mesmo correndo o risco de omissões involuntárias, não posso deixar de destacar alguns.

Ao Professor Doutor Francisco Antunes, pela confiança e oportunidade que me deu de fazer o Estágio em Doenças Infecciosas e Cuidados Intensivos e o Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes, ambos tão pertinentes na prática clínica aqui em Moçambique, em que as doenças infecciosas são um importante peso em termos de Saúde Pública e, mais ainda, na actualidade em que aparecem em muitas situações associadas à infecção por VIH, tão prevalente em Moçambique, pela imensurável paciência na correcção ao detalhe deste dissertação.

Ao Professor Doutor Eduardo Samo Gudo pelo apoio dado desde a altura do desenho do protocolo, concessão da base de dados e análise estatística dos resultados do estudo.

Ao Prof. Dr. Sam Patel, meu Tutor de Especialidade, pelo apoio incondicional que deu aquando da minha ida à Portugal para a realização deste Mestrado e todos os passos subsequentes.

Ao Instituto Nacional de Saúde em geral e, em particular, ao Professor Doutor Nilesh Bhat, aos Drs Nédio Mabunda, Cremildo Gomes, Ana Flora, Adolfo Vubil, pelo apoio técnico dado na realização das análises laboratoriais e pela paciência.

A todos os intervenientes no Mestrado, os docentes da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, em particular à Professora Doutora Emília

Valadas, pelas suas infinitas simpatia e amabilidade e à Dra. Cristina Valente por ter despertado o meu interesse pelas hepatites víricas.

Agradeço a DEUS e ao meu querido pai, por tudo o que me têm proporcionado, e por me acompanharem nesta jornada.

Ao meu pai e à minha avó Aureliana, que onde quer que estejam têm-me guiado por caminhos floridos, à minha mãe, meus irmãos Xitsembisso, Maimuna, Aureliana e Edgar e, especialmente, a Pequena Victória Wami Machava que ao longo de todo este processo de formação, consentiram enormes sacrifícios para que eu pudesse alcançar os objectivos a que me propusera e me inculcaram, também, valores que hoje norteiam a minha vida profissional e social. Tento ser o espelho de todos vocês.

A estes e a todos os outros, que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação, deixo aqui registado o meu profundo sentimento de reconhecimento e gratidão.

## ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
AgHBc	antigénio do <i>core</i>
AgHBe	antigénio e de vírus da hepatite B
AgHBs	antigénio de superfície de vírus da hepatite B
AIQ	amplitude interquartil
ALT	alanina-aminotransferase
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensageiro
AST	aspartato-aminotransferase
anti-HBc	anticorpo do <i>core</i> de vírus da hepatite B
anti-HBe	anticorpo e de vírus da hepatite B
anti-HBs	anticorpo de superfície de vírus da hepatite B
cccADN	do inglês <i>replicative intermediates termed covalente closed circular DNA</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHC	carcinoma hepatocelular
CI	consentimento informado
CNBS	Comité Nacional de Bioética para a Saúde
CTL	linfócitos T citotóxicos
CS	Centro de Saúde
ELISA	do inglês <i>enzyme linked immuno assay</i>
FMUL	Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa
HCM	Hospital Central de Maputo
HLA	do inglês <i>human leucocyte antigen</i>

HPT	Hospital Provincial de Tete
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IMC	índice de massa corporal
INS	Instituto Nacional de Saúde
LAM	lamivudina
MISAU	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
SAAJ	Serviço Amigo dos Jovens e Adolescentes
SPSS	do inglês <i>statistical package for the social sciences</i>
TARV	terapêutica antirretrovírica
TCD4 <sup>+</sup>	linfócitos T da linhagem CD4
UI	Unidades Internacionais
US	Unidade Sanitária
VHB	vírus da hepatite B
VHC	vírus da hepatite C
VHD	vírus da hepatite D
VIH	vírus da imunodeficiência humana

## ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Epidemiologia.....	2
1.2	Estrutura e genoma de VHB.....	6
1.3	História natural da infecção por VHB.....	7
1.4	Diagnóstico da infecção crónica por VHB.....	15
1.5	Genótipos de VHB - significado clínico.....	20
1.6	Tratamento.....	22
1.7	Impacto de VIH na evolução clínica e laboratorial da infecção por VHB 24	
2.	JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO.....	25
3.	OBJECTIVOS.....	26
3.1	Objectivo Geral.....	26
3.2	Objectivos específicos.....	26
4.	METODOLOGIA DO ESTUDO.....	27
4.1	Desenho do estudo.....	27
4.2	Locais do estudo.....	27
4.3	População em estudo.....	27
4.4	Tamanho da amostra.....	28
4.5	Recolha de dados.....	28
4.5.1	Recrutamento.....	28
4.5.2	Caracterização dos participantes.....	29
4.5.3	Colheita e envio de amostras de sangue.....	30
4.5.4	Testes laboratoriais.....	30
4.6	Análise estatística.....	32
5.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	33
5.1	Comité Nacional de Bioética.....	33
5.2	Consentimento Informado.....	33
5.3	Confidencialidade.....	34
5.4	Biossegurança.....	34
5.5	Implicações e benefícios.....	34
6.	RESULTADOS.....	35
6.1	Características demográficas da população do estudo.....	35
6.2	Características clínicas da população do estudo.....	37
6.3	Resultados dos estudos laboratoriais da população do estudo.....	38
6.4	Determinação do ADN de VHB.....	40
6.5	Características clínicas da população coinfectada, de acordo com o ADN de VHB.....	41
6.6	Comparação dos resultados dos estudos laboratoriais da população coinfectada por VHB-VIH de acordo com o ADN de VHB.....	42
6.7	Genotipagem e resistência primária de VHB à LAM.....	43
7.	DISCUSSÃO.....	44
8.	CONCLUSÕES.....	52
9.	BIBLIOGRAFIA.....	56

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Factores de risco para a aquisição da infecção por VHB.....	3
Tabela 2 – Distinção entre portadores crónicos de VHB.....	12
Tabela 3 - Características demográficas e factores de risco da população de estudo.....	37
Tabela 4 – Características clínicas da população de estudo, de acordo com os estádios definidos pela OMS.....	38
Tabela 5 – Resultados dos estudos laboratoriais da população do estudo.....	40
Tabela 6 – Quantificação do ADN de VHB de 46 dos indivíduos com coinfeção VHB-VIH.....	41
Tabela 7 – Comparação dos estádios clínicos (OMS) da população de 46 coinfectados, de acordo com o ADN de VHB.....	42
Tabela 8: Comparação dos resultados dos estudos laboratoriais da população de coinfectados (TCD4 <sup>+</sup> e aminotransferases) e o ADN de VHB.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da infecção por VHB no Mundo. Fonte - <i>Centers for Disease Control and Prevention (CDC)</i> .....	4
Figura 2 – Distribuição dos génotipos de VHB no Mundo.....	5
Figura 3 – Representação esquemática do genoma de VHB. ....	7
Figura 4 – História natural da infecção por VHB. ....	11
Figura 5 – Evolução dos marcadores serológicos na hepatite B aguda (A) e na hepatite B crónica (B). ....	17

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção por vírus da hepatite B (VHB) constitui um dos mais graves e importantes problemas de Saúde Pública, afectando mais de dois biliões de pessoas em todo o Mundo, com cerca de 350 milhões de portadores crónicos, apesar de haver uma vacina disponível, desde 1982. Os doentes com hepatite B crónica têm entre 15-40% de risco de desenvolverem descompensação hepática, cirrose ou carcinoma hepatocelular (CHC) e entre 15-25% de risco de morte por doença relacionada com a infecção por VHB. A infecção crónica por VHB é responsável por 60-80% de CHC e por 500.000 a 1.200.000 mortes por ano e, ainda, é a 10ª causa de morte no Mundo. <sup>(1-3)</sup>

Os progressos registados na compreensão da virologia e da imunologia da hepatite B, associados à disponibilização de testes de diagnóstico sensíveis e, a partir de 1998, da terapêutica com antivíricos orais, contribuíram para um melhor conhecimento da sua história natural e para um interesse clínico renovado, em relação à infecção por VHB.

O espectro das manifestações clínicas da infecção por VHB varia de doença aguda a crónica, sendo que, na fase aguda, as manifestações clínicas evoluem desde hepatite subclínica ou anictérica (autolimitada) a casos graves de hepatite fulminante e, na fase de cronicidade, há o risco acrescido de descompensação hepática, cirrose e CHC, podendo, em qualquer das fases, ocorrer manifestações extrahepáticas da doença.

VHB é membro da família *Hepadnaviridae* [*Hepa* de *hepatotropic*, *dna* de genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN)] e replica-se, assimetricamente, via transcrição reversa, a partir de um intermediário do ácido ribonucleico (ARN). Devido ao facto de a polimerase vírica perder a actividade de prova de leitura,

as mutações são comuns, contribuindo para a heterogeneidade de VHB. A taxa de mutações espontâneas do genoma dos hepadnavirus é de, aproximadamente,  $2 \times 10^4$  substituições de bases por sítio/ano.

De acordo com análises filogenéticas, VHB é classificado em oito genótipos *major* designados de A a H, fundamentado na divergência de, no mínimo, 8% na sequência completa de nucleotídeos. Estes genótipos podem, ainda, ser subdivididos em subgrupos, baseados nas suas origens étnicas ou geográficas, sendo que se encontram reportados, com maior frequência, subgrupos dos genótipos A, B e C. <sup>(4-8)</sup>

Nos últimos anos vem crescendo a evidência de que os genótipos de VHB influenciam a evolução clínica da doença, as taxas de seroconversão dos marcadores víricos, padrões de mutações nas regiões promotoras do *core* e *precore* e a resposta à terapêutica antivírica. <sup>(9)</sup>

### 1.1 Epidemiologia

VHB é transmitido por via percutânea ou por exposição inaparente mucocutânea a sangue ou a outros fluídos orgânicos infectados, sendo de maior importância as transmissões por via sexual e perinatal (da mãe para filho).

Os factores de risco para a aquisição da infecção por VHB são múltiplos (tabela 1).

Tabela 1 – Factores de risco para a aquisição da infecção por VHB

---

- História de transfusões de sangue
  - Promiscuidade sexual
  - Partilha de seringas e agulhas em toxicodependentes
  - Tatuagens
  - Actividade profissional em instituição de saúde
  - Reclusão num estabelecimento prisional
  - Diálise renal
  - Partilha por tempo prolongado de habitação ou contacto não-sexual com um indivíduo AgHBs positivo
- 

Em regiões de prevalência baixa, a infecção por VHB afecta, principalmente, adultos jovens, com riscos comportamentais – relações sexuais não protegidas ou partilha de seringas e agulhas – e através da exposição a equipamentos contaminados, utilizados para terapêutica parentérica e para outros procedimentos. Em regiões de prevalência elevada, a maioria das infecções ocorre no período perinatal ou em crianças muito jovens. Cerca de 90% das mães com antígeno e de vírus da hepatite B (AgHBe) positivas transmitem VHB aos seus filhos. Em África, apenas 15% das mães portadoras do antígeno de superfície de vírus da hepatite B (AgHBs) são AgHBe positivas, pelo que a transmissão da infecção é, principalmente, horizontal.<sup>(9)</sup>

Calcula-se que o número de infectados por VHB seja cerca de 350 milhões e de infectados por vírus da imunodeficiência adquirida (VIH) de cerca de 33 milhões, estando África em primeiro lugar na prevalência da infecção por VIH e em segundo na prevalência da infecção por VHB, a seguir à Ásia. Devido ao

facto de as vias de transmissão e dos factores de risco, no geral, serem os mesmos é, relativamente, comum a ocorrência da dupla infecção VIH-VHB.

Embora a infecção por VHB tenha distribuição universal, a prevalência local, as vias de transmissão e os genótipos variam, amplamente, entre regiões geográficas (figura 1). As áreas com maior prevalência da designada hepatite B crónica (AgHBs<sup>+</sup> > 8%) incluem a África subsariana e o sudeste da Ásia. As áreas com prevalência intermediária (AgHBs<sup>+</sup> 2-7%) são o Japão, a Índia, algumas regiões da Ásia Central, Oriente Médio, Leste e Sul da Europa. A prevalência é menor (AgHBs<sup>+</sup> < 2%) na América do Norte, Europa Ocidental e Austrália. <sup>(1)</sup>

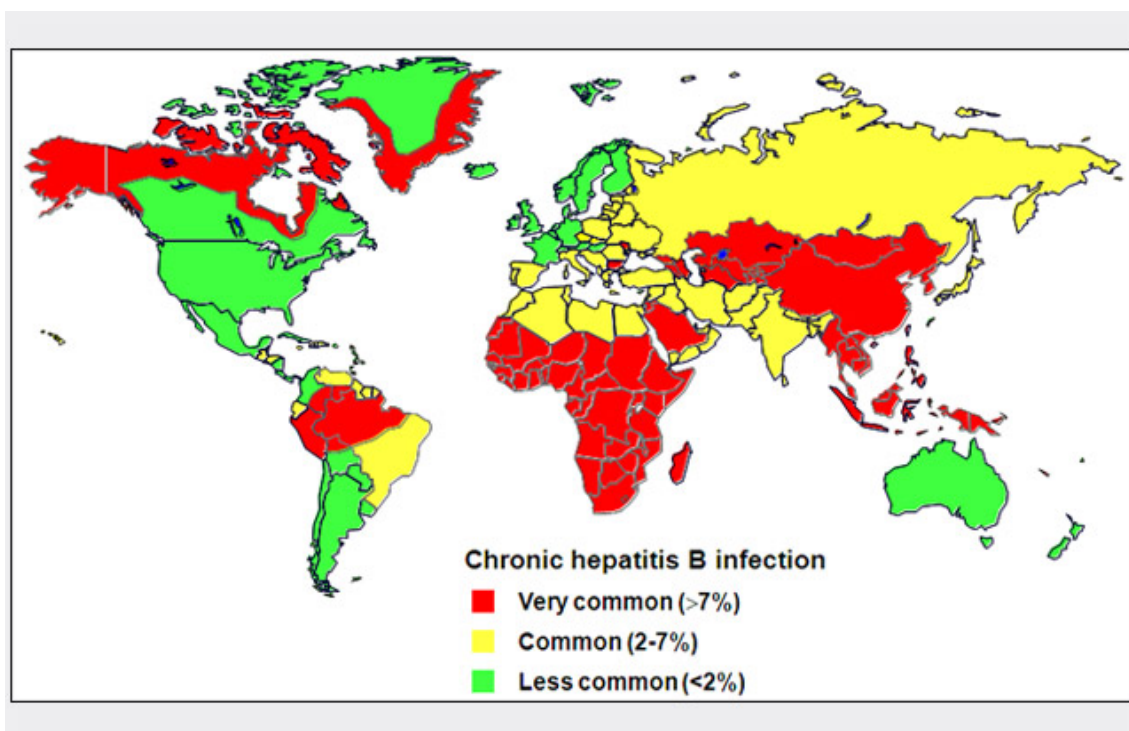


Figura 1 – Distribuição da infecção por VHB no Mundo. Fonte - *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*

Como é sabido, o acesso à terapêutica antirretrovírica (TARV) vem melhorando, progressivamente, em países de baixos recursos, o que contribui

para uma maior sobrevida destes doentes, em paralelo com uma maior morbimortalidade associada à infecção por VHB.<sup>(2)</sup>

VHB apresenta oito genótipos diferentes, designados de A a H. A prevalência dos genótipos de VHB varia, geograficamente, sendo o genótipo A encontrado mais em África, no Norte da Europa e da América, os genótipos B e C têm maior prevalência no Sudeste da Ásia, o genótipo D é mais comum na Europa Central e na região mediterrânica, Norte de África, Oriente Médio e Índia, o genótipo E é originário da África e os genótipos F e H são mais encontrados na América Central e do Sul e no centro da América do Norte, respectivamente (figura 2). Contudo, os dados disponíveis sobre a prevalência estão incompletos, porque esta informação não está disponível na maior parte do Mundo e/ou porque os dados existentes são baseados em amostras pequenas de doentes.<sup>(1, 6, 7, 10)</sup>

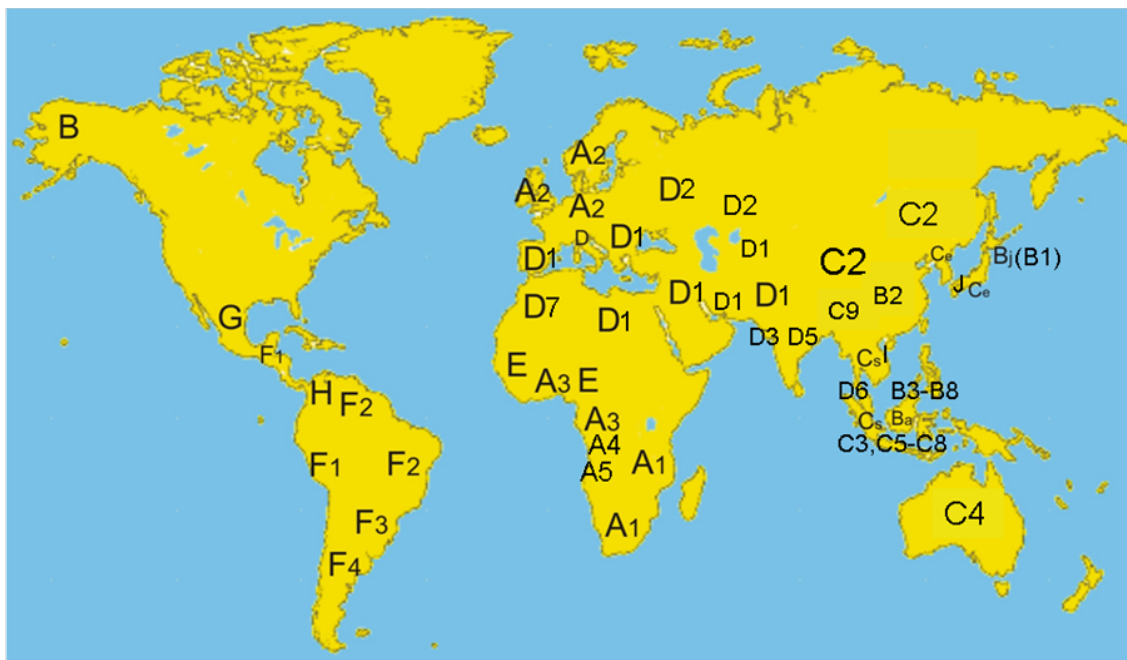


Figura 2 – Distribuição dos genótipos de VHB no Mundo.<sup>(11)</sup>

## 1.2 Estrutura e genoma de VHB

VHB pertence à família *Hepadnaviridae*, que compreende um pequeno número de vírus que partilham uma série de características, como o tropismo pelas células hepáticas e um genoma constituído de uma molécula de ADN de cadeia, parcialmente, dupla. <sup>(12)</sup>

VHB apresenta, através de um mecanismo único, entre vírus que infectam o homem, a capacidade de produção e de circulação de diferentes tipos de partículas víricas, nomeadamente partículas completas infecciosas (com diâmetro de 42 nm), partículas incompletas esféricas e filamentosas (com diâmetro de 12 nm). O AgHBs é expresso no exterior de todas estas partículas, no entanto as partículas incompletas não contêm ADN genómico do vírus, sendo não infecciosas. <sup>(12)</sup>

O genoma de VHB possui, aproximadamente, 3.200 pares de bases e é constituído por uma molécula de ADN circular, de cadeia parcialmente dupla (figura 3). Todo o genoma de VHB é codificante e apresenta quatro fases de leitura aberta, designadas de pré-S/S, pré-C/C, P e X. Todos os genes são codificados pela cadeia longa e possuem, pelo menos, uma região de sobreposição a outro gene. O gene pré-S/S [que está dividido em proteína S (pequena), M (média) e L (grande)] codifica as glicoproteínas externas que formam o AgHBs, o gene pré-C/C é responsável pela síntese do antigénio do core (AgHBc) e do AgHBe, o gene P codifica a polimerase vírica e a região X é responsável pela síntese de uma proteína reguladora denominada proteína X, ainda não bem conhecida. <sup>(12)</sup>

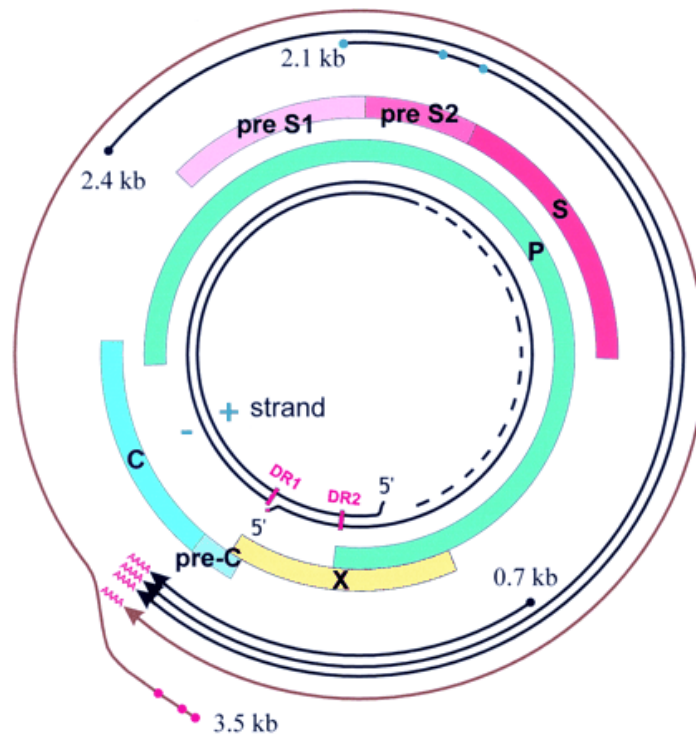


Figura 3 – Representação esquemática do genoma de VHB.<sup>(13)</sup>

### 1.3 História natural da infecção por VHB

A resposta à infecção por VHB é dependente dos linfócitos B, que produzem anticorpos contra os antígenos das regiões S e pré-S de VHB, bem como dos linfócitos T. Na infecção autolimitada torna-se evidente uma vigorosa resposta policlonal HLA (*human leucocyte antigen*) classe I restrita dos linfócitos T citotóxicos (CTL) contra os múltiplos epítopos presentes nas regiões do envelope, do nucleocapsídeo ou *core* (com a maior proteína do *core* denominada AgHBc) e da polimerase de VHB. Esta resposta é mantida por fragmentos residuais de VHB que podem ser detectados no fígado e nos linfócitos T, na circulação sanguínea, o que mostra que a eliminação completa de VHB raramente é observada. Quando a resposta dos CTL é fraca e limitada a poucos epítopos, a infecção pode tornar-se crónica.<sup>(14)</sup>

Durante o ciclo de replicação de VHB, nos hepatócitos, ocorrem dois fenómenos importantes. Um é a formação do cccADN (*replicative intermediates*

*termed covalente closed circular DNA*) no núcleo dos hepatócitos (sem se integrar no genoma da célula hospedeira), o qual se mantém como uma cópia simples de ADN, funcionando como o reservatório do genoma de VHB, permitindo a persistência da infecção pela sua amplificação, que por meio da polimerase do ARN celular leva à produção de vários ácido ribonucleico mensageiros (ARNm). Outro facto é a etapa da transcrição reversa, destinada à síntese do ADN e à replicação de VHB, sendo, ainda, responsável pela emergência de populações víricas muito heterogéneas. <sup>(14)</sup>

Como foi referido, o espectro da hepatite B aguda varia de infecção assintomática a hepatite autolimitada e a hepatite fulminante, dependendo dos factores associados ao próprio VHB e ao hospedeiro. A hepatite aguda sintomática é rara em recém-nascidos (<1%) e ocorre em cerca de 10% das crianças com idades compreendidas entre 1-5 anos e a hepatite aguda fulminante é muito rara em idades pediátricas. Nos adultos, 1/3 das infecções agudas são sintomáticas e a hepatite fulminante ocorre em <1% dos casos, estando associada a uma mortalidade de cerca de 70%. A resolução da hepatite B aguda, com a eliminação do AgHBs, observa-se em mais de 95% dos casos em adultos.

O risco de evolução para a cronicidade correlaciona-se, principalmente, com a idade de aquisição da infecção. A infecção persiste em 90% das crianças infectadas à nascença, em 20-30% daquelas infectadas entre as idades de 1-5 anos, em 6% das infectadas entre os 5-15 anos e, apenas, em 1-5% dos infectados em idade adulta. <sup>(3)</sup> Uma possível explicação para a evolução elevada para a cronicidade nas crianças infectadas à nascença é o facto de o

feto desenvolver tolerância ao vírus *in utero*, após a passagem transplacentária de VHB. <sup>(15)</sup>

Distinguem-se três fases importantes na história natural da hepatite B crônica, resultantes da interação entre o vírus, os hepatócitos e a resposta imunitária do hospedeiro (figura 4). <sup>(14, 16)</sup>

Todas estas fases são observadas na infecção crônica adquirida no período perinatal ou durante a infância. No adulto, a persistência do AgHBs condiciona uma evolução clínica semelhante, no entanto não existe a fase inicial de imunotolerância. <sup>(17)</sup>

A primeira fase, designada por imunotolerância, pode durar 15-35 anos e é caracterizada por altos níveis de replicação de VHB, em indivíduos assintomático e AgHBe seropositivos [com taxas baixas de seroconversão espontânea do AgHBe para o anticorpo e de vírus da hepatite B (anti-HBe)], com níveis normais de alanina-aminotransferase (ALT), sendo a histologia hepática quase normal. Os mecanismos da imunotolerância não estão, ainda, clarificados. Estudos no ratinho sugerem que possa haver deficiente resposta T-citotóxica ao AgHBe, nos recém-nascidos. Não existe progressão da doença (ou é mínima), mantendo-se normais os valores da ALT. Esta fase é curta ou mesmo ausente nos indivíduos imunocompetentes, que adquirem a infecção por VHB numa fase adulta. <sup>(14, 16)</sup> A manutenção desta fase, de imunotolerância, parece estar dependente da carga vírica elevada.

A fase seguinte corresponde à imunoeliminação (*imunoclearance*) ou, designada, também, de imunorreactiva, estando associada à diminuição das concentrações do ADN de VHB. Durante esta fase 2-15%, dos infectados (dependendo da idade, das concentrações de ALT e do genótipo de VHB)

podem seroconverter, para o anti-HBe, ocorrendo aumentos intermitentes (*flares*) de ALT, sem sintomatologia evidente, indicando uma vigorosa actividade do sistema imunitário, através de uma resposta celular específica mediada pelos CTL, com destruição mais alargada dos hepatócitos infectados por VHB. <sup>(18)</sup> Esta actividade pode ser complicada por descompensação hepática (0,5%) ou mesmo por cirrose.<sup>(19)</sup> Após alguns episódios de elevação da ALT, ocorre normalização dos níveis séricos daquela enzima, assumindo-se um padrão de infecção não replicativa. Porém, enquanto não houver eliminação de VHB, poderão manter-se as tentativas de supressão dos hepatócitos infectados, com intermitentes ou contínuas elevações da ALT, e a hepatite crónica persistirá e poderá, mesmo, progredir. <sup>(14, 16)</sup>

Por último segue-se a fase residual não replicativa (de imunoccontrolo). Uma proporção apreciável de infectados é capaz de inactivar a replicação de VHB e entrar nesta fase, também referida como “estado de portador inactivo”. Este período é caracterizado pela persistência do AgHBs no sangue, ausência de AgHBe e presença do anti-HBe, valores normais de ALT e níveis baixos de ADN de VHB (<2.000 UI/ml), que, na maioria dos doentes, associa-se à regressão da actividade inflamatória do fígado. Alguns indivíduos apresentarão flutuações discretas nos níveis de ALT, devido à presença de estirpes residuais de VHB selvagens (que ainda não seroconverteram para anti-HBe) ou à presença de mutações do *core promoter*, sem produção do AgHBe. <sup>(14, 16)</sup>

A seroconvesão do AgHBe é, em regra, seguida por remissão clínica, com excelente prognóstico, no entanto alguns doentes podem desenvolver CHC.<sup>(20, 21)</sup> A eliminação, espontânea, do AgHBs pode ocorrer, a uma taxa de 1-2% ao ano, o que confere um bom prognóstico.<sup>(22)</sup> No entanto, pequenas quantidades de ADN de VHB podem persistir, no estado designado por infecção oculta. <sup>(23)</sup> Após a seroconversão do AgHBe, em 1-4% dos doentes

pode haver recaída (de novo AgHBe<sup>+</sup>), enquanto que a maioria dos doentes desenvolve hepatite B crónica anti-HBe, pela reactivação de VHB com mutações no *core* ou no *pre-core*.<sup>(20, 21, 24, 25)</sup> O maior risco de recaída está associado à idade (>40 anos), ao género masculino, ao genótipo C e à concentração de ADN > 10.000 cópias/mL.<sup>(26)</sup>

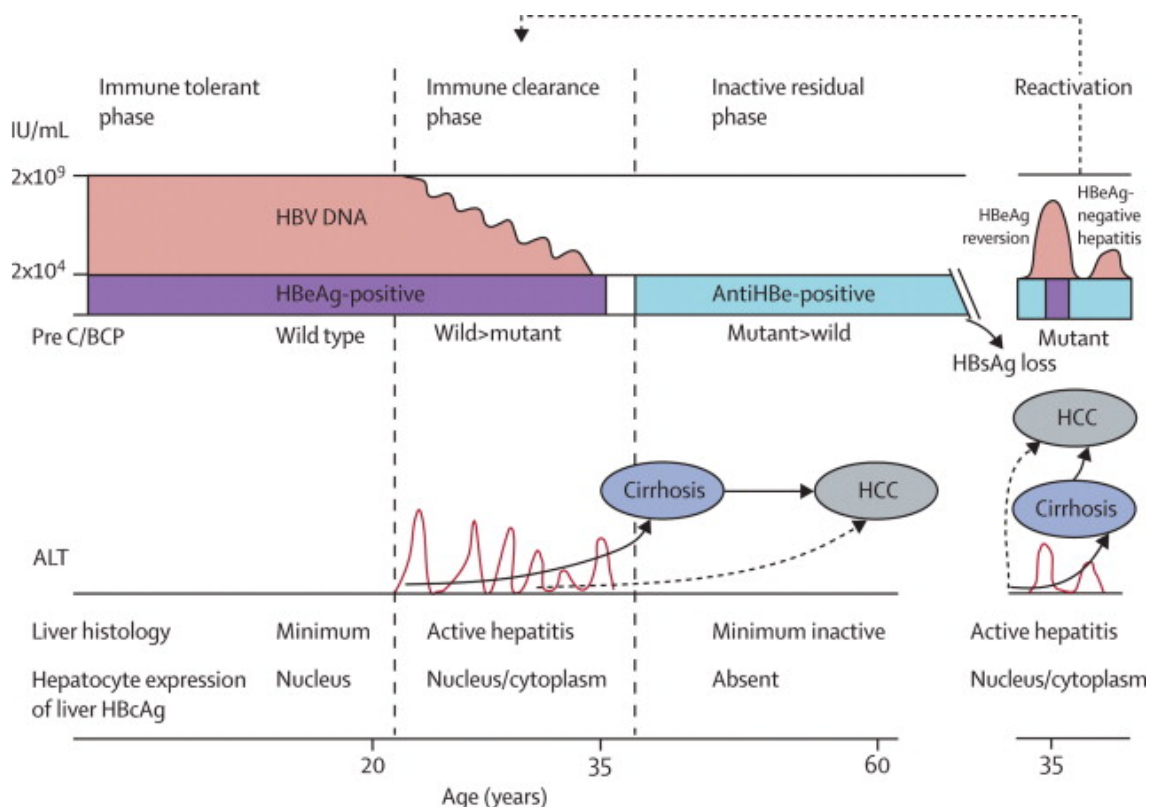


Figura 4 – História natural da infecção por VHB.<sup>(27)</sup>

A infecção crónica caracteriza-se, serologicamente, pela persistência do AgHBs, no entanto é necessário referir que existem diferenças entre os portadores crónicos de VHB – por níveis de replicação de VHB, por razões epidemiológicas ou pela presença de variantes víricas (tabela 2).

Tabela 2 – Distinção entre portadores crónicos de VHB

---

Níveis de replicação de VHB

- ADN-VHB  $\geq 10^5$ - $10^6$  viriões/ml vs  $\leq 10^3$ - $10^4$  viriões/ml
- Estirpe selvagem AgHBe reactivo vs AgHBe não-reactivo.

Características epidemiológicas

- Áreas de prevalência elevada – transmissão perinatal, imunotolerância, infecção clinicamente inaparente, evolução para a cronicidade > 90%, risco elevado de cirrose e CHC.
- Áreas de prevalência baixa – transmissão sexual ou percutânea em adolescentes/adultos, não-tolerância imunitária, infecção sintomática, evolução para a cronicidade < 1%, risco baixo de cirrose e CHC.

Presença de variantes víricas

- Vírus selvagens, AgHBe reactivo vs *precore* ou *core-promotor* (AgHBe – negativo) variantes.

---

No entretanto, é de realçar que a replicação de VHB ocorre, exclusivamente, nos hepatócitos, apesar do AgHBs poder ser detectado em células de outros tecidos. Na fase aguda e crónica da infecção por VHB, o efeito citopático é imunomediado e não devido à accção directa do vírus nos hepatócitos, sendo as manifestações clínicas extrahepáticas da fase aguda (por exemplo, exantema urticariforme e artrite) ou da fase crónica (por exemplo, vasculite e glomerulonefrite) devidas, também, à formação de imunocomplexos.

Os mecanismos associados à persistência (cronicidade) da infecção por VHB não estão, totalmente, esclarecidos, no entretanto sabe-se que estão

associados à idade, sugerindo-se a sua relação com a autogenia da expressão das citocinas e das várias classes de linfócitos T auxiliares.

A cirrose ou o CHC, ou ambos, podem desenvolver-se durante o curso da história natural da infecção crónica por VHB quer naqueles indivíduos com anti-HBe (na larga maioria dos casos – 85%), quer nos AgHBe<sup>+</sup>, estando proporcionalmente relacionados com o aumento das concentrações do ADN > 1x10<sup>4</sup> cópias/mL. <sup>(28, 29)</sup>

A progressão da doença hepática, causada por VHB, resulta da replicação de VHB e da destruição dos hepatócitos, mediada pela imunidade. Os factores de risco para o desenvolvimento da cirrose incluem: a) Sexo masculino; b) idade; c) AgHBe<sup>+</sup>; d) genótipo C; e) recaídas de AgHBe ou reactivação vírica; f) persistência de seropositividade para AgHBe ou da presença de ADN vírico; g) elevação persistente da ALT; h) superinfecções víricas; i) gravidade (descompensação hepática), extensão (necrose hepática em ponte) e frequência dos *flares*. Pelo menos 1/3 dos doentes são positivos para o AgHBe ou têm ADN de VHB à data do diagnóstico, podendo haver progressão da doença. A probabilidade de descompensação hepática é quatro vezes maior nos doentes com replicação vírica do que naqueles sem ADN-VHB detectável, sendo a taxa de ocorrência de CHC de 3-6%, ao ano. A taxa de sobrevivência, aos cinco anos, é de 80-85% e de 30-50%, respectivamente, com cirrose compensada e com cirrose descompensada. <sup>(30, 31)</sup>

O CHC desenvolve-se, na maioria dos doentes, com cirrose, porém, os factores de risco são idênticos aos da cirrose, acrescido de história familiar de CHC, para além do consumo de álcool, tabagismo e exposição a aflatoxinas.

(32)

A progressão para a cirrose, em doentes com hepatite B crónica, ocorre em taxas de 2-7% por ano. Estima-se que, anualmente, 3% dos doentes com cirrose irão descompensar, no entretanto esta taxa poderá aumentar, face à replicação vírica activa, demonstrada pela presença do AgHBe ou altos níveis de ADN de VHB. A sobrevida, aos cinco anos, varia de 84% em doentes que desenvolvem cirrose compensada para 14-28% naqueles com cirrose descompensada. O risco de CHC, em doentes com AgHBs positivo, varia de 5-98 vezes mais em relação àqueles com AgHBs negativo. O risco estimado de morte em doentes com CHC e hepatite B crónica é de 20-25%. Os factores conhecidos, associados a progressão da hepatite B crónica, incluem presença do AgHBs e do AgHBe, do nível sérico da ALT, idade, sexo, consumo de álcool, exposição a aflatoxinas, factores hormonais, história familiar, factores genéticos do hospedeiro e dos níveis séricos de ADN de VHB. Outros factores importantes incluem genótipo de VHB e coinfeção com outros vírus, como VIH, vírus da hepatite C (VHC) e vírus da hepatite D (VHD).

Dois estudos feitos no Continente Asiático, sobre o desenvolvimento de cirrose e CHC, trouxeram importantes avanços no conhecimento da história natural da hepatite B crónica. Num deles estudou-se a relação entre os níveis de ADN de VHB e a progressão para a cirrose, em que foram incluídos 3.582 indivíduos com infecção por VHB, em Taiwan, não tratados, de 1991 a 1992. A incidência cumulativa de cirrose (diagnosticada por ecografia hepática) aumentou de acordo com os níveis de ADN de VHB, variando de 4,5% a 36,2% para aqueles com ADN de VHB de menos de 300 cópias/ml e 106.000 cópias/ml ou mais, respectivamente ( $p < 0.001$ ). Estes dados mostram que a progressão para a cirrose, em infectados por VHB, está, fortemente, correlacionado com o nível

de ADN de VHB. Num outro foi avaliada a relação entre o nível sérico de ADN de VHB e o risco de CHC, estudo prospectivo de base populacional de uma coorte de 3.653 indivíduos (com idades entre 30-65 anos), que eram seropositivos para AgHBe e seronegativos para VHC, entre 1991 e 1992. O objectivo era estimar a incidência de CHC durante o seguimento e por dados de ligação com o registo nacional de cancro e dos sistemas de certificação de óbitos. Houve 164 casos de CHC e 346 óbitos, durante o seguimento médio de 11,4 anos e 41.779 pessoas/ano. A incidência de CHC aumentou com o nível sérico de ADN de VHB, numa relação que variava de 108 por 100.000 pessoas/ano para um nível de ADN de VHB < 300 cópias a 1.152 por 100.000 pessoas/ano para um nível de ADN de VHB  $\geq$  1.000.000 cópias. O nível de incidência cumulativa de CHC, para os doentes com menos de 300 cópias e para mais de 1.000.000 cópias/ml de ADN de VHB, foi de 1,3% e 14,9%, respectivamente. Assim, concluiu-se que níveis séricos de ADN de VHB superiores a 10.000 cópias/ml são o mais forte preditor de CHC, independentemente do AgHBe, da ALT e da cirrose hepática. <sup>(14, 16, 28)</sup>

#### 1.4 Diagnóstico da infecção crónica por VHB

A infecção crónica por VHB varia, clinicamente, desde as formas assintomáticas até aos casos de expressão grave, debilitante e com risco de vida, como é a descompensação hepática, a cirrose e o CHC. No entanto, mesmo nos infectados assintomáticos, pode haver ansiedade (atribuída a factores psicológicos, sociais e físicos). Mesmo aqueles com cirrose podem permanecer assintomáticos, mas na cirrose descompensada para além da

icterícia, pode ocorrer perda de peso, ascite, edemas, hemorragia gastrointestinal e encefalopatia hepática.

Os testes convencionais bioquímicos de função hepática são essenciais no diagnóstico da hepatite – incluindo a ALT, para a determinação da destruição hepatocelular, a bilirrubina para a função de conjugação e excreção, a albumina e o tempo de protrombina para a função e síntese hepática. A biopsia hepática é importante para a avaliação da necroinflamação e para o estadiamento da fibrose. Os meios não-invasivos de imagem (ecografia e tomografia axial computadorizada) são indispensáveis para detectar a cirrose e o CHC. Os marcadores serológicos, específicos da infecção por VHB, são mandatórios para detecção e diagnóstico da hepatite B.

O diagnóstico da infecção por VHB foi revolucionado com a descoberta do antigénio Austrália (glicoproteína do invólucro), em 1965, designado por AgHBs. Durante as décadas seguintes foram, sucessivamente, descobertos outros marcadores serológicos e os avanços na biologia molecular permitiram o desenvolvimento de técnicas de hibridização e a PCR (*polymerase chain reaction*), para a determinação directa do ADN de VHB, possibilitando, assim, a quantificação da carga vírica.

A infecção por VHB é associada a alterações características nos níveis séricos de antigénios e anticorpos que são usados para descrever diferentes estádios da doença (figuras 4 e 5).

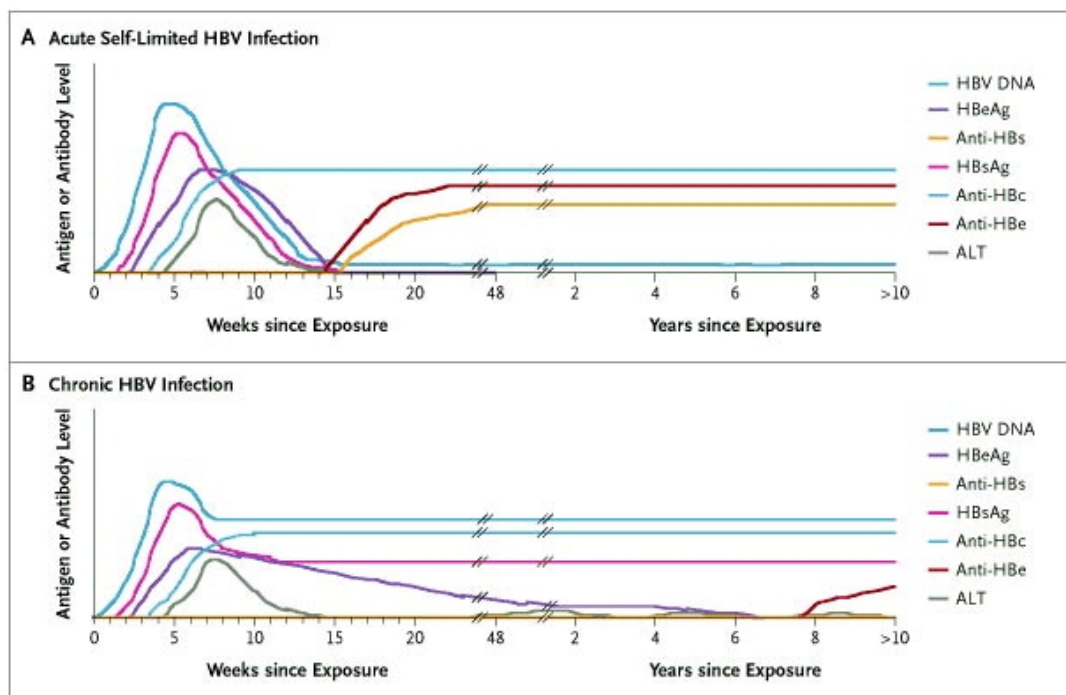


Figura 5 – Evolução dos marcadores serológicos na hepatite B aguda (A) e na hepatite B crónica (B).<sup>(33)</sup>

O AgHBs é o principal marcador serológico da infecção por VHB (aguda ou crónica). Na hepatite aguda, surge no sangue uma a 10 semanas após a exposição a VHB, precedendo, uma a seis semanas, o aparecimento das manifestações clínicas e do aumento da ALT. A persistência do AgHBs, para além dos seis meses, define a infecção crónica. A imunoglobulina M contra o anticorpo do *core* de vírus de hepatite B (IgM anti-HBc) surge uma a duas semanas depois do AgHBs e perdura por mais de seis meses, após o AgHBs ter desaparecido. A presença de AgHBs, sem IgM anti-HBc, num indivíduo com manifestações clínicas sugestivas de hepatite, aponta para uma exacerbação de uma hepatite B, em portador crónico de infecção por VHB, não diagnosticada ou por superinfecção por outro vírus da hepatite, na sua expressão aguda. O teste IgM anti-HBc é indispensável para o serodiagnóstico da hepatite B aguda. O desaparecimento do AgHBs é seguido do

desenvolvimento do anticorpo de superfície de vírus da hepatite B (anti-HBs), que confere imunidade. A coexistência dos dois marcadores, AgHBs e anti-HBs, foi reportada em 24% dos casos de hepatite B aguda. Os portadores do AgHBs devem ser considerados, potencialmente, infecciosos, no entanto o relativo grau de infecciosidade deve ser determinado por outros marcadores, tais como o AgHBe ou pelo ADN de VHB. O anti-HBs não é utilizado para a avaliação da infecção por VHB, mas é útil como marcador do estado imunitário, relacionado ou com uma infecção antiga (assim como o anti-HBc) ou como resposta à vacinação. Nalguns doentes, em fase de transição de AgHBs para o anti-HBs, pode haver um período de janela, que pode durar semanas, em que ambos os marcadores não são detectados, podendo ser o resultado da formação de complexos antígeno-anticorpo, não identificados nos testes serológicos. Neste período de janela, a IgM anti-HBc pode ser o único teste que permite o diagnóstico da hepatite B aguda. <sup>(34-36)</sup>

O AgHBc faz parte do nucleocapsídeo do vírus e não é solúvel, pelo que não é detectado no sangue, não existindo, assim, um teste serológico disponível para a sua identificação, contrariamente ao que se verifica em relação ao anti-HBc. O AgHBc localiza-se no núcleo dos hepatócitos infectados e pode ser identificado por técnicas imunohistoquímicas, em amostras de biopsias hepáticas. O anti-HBc é detectável pouco depois do início da infecção, persiste durante a convalescência da infecção aguda e durante a infecção crónica. Na infecção aguda, o anti-HBc é predominantemente do tipo IgM e é identificado no sangue até seis meses após o início das manifestações clínicas. No entanto, é de referir que IgM anti-HBc pode permanecer positivo por mais dois anos, após a infecção aguda e, por outro lado, pode tornar-se positivo nas

fases de exacerbação da infecção crónica, o que pode, incorrectamente, sugerir uma hepatite B aguda. Em infectados que progridem para hepatite B crónica o anti-HBc do tipo imunoglobulina G (IgG) ou total persiste. (34, 37, 38)

O AgHBe é considerado marcador de replicação e de infecciosidade de VHB. A presença do AgHBe associa-se, em regra, a níveis elevados de ADN de VHB no soro e à taxa elevada de transmissão neonatal de VHB. A persistência de AgHBe, por mais de 10 semanas, sugere uma probabilidade elevada de evolução para a cronicidade. Os indivíduos com hepatite B crónica AgHBe positivo têm, em regra, títulos levados de ADN de VHB, enquanto que os indivíduos sem AgHBe têm concentrações normais. A seroconversão de AgHBe para anti-HBe pode ocorrer antes mesmo da seroconversão de AgHBs para anti-HBs. A presença de AgHBe, na infecção crónica por VHB, está dependente da idade, das concentrações de ALT e do genótipo de VHB. (18, 24, 39-44)

Actualmente, para a detecção do ADN de VHB é usada a técnica de PCR em tempo real com sensibilidade elevada ( $10^3$  UI/mL), podendo alcançar cargas víricas até  $10^5$  UI/mL. A determinação da carga vírica é, principalmente, útil para os seguintes propósitos: a) Avaliação do risco de progressão da doença; b) identificação dos candidatos à terapêutica antivírica; c) monitorização da resposta à terapêutica; d) distinção entre hepatite B activa e portadores crónicos de AgHBs inactivos com outras causas de aumento da ALT.

A cirrose e o CHC podem ocorrer no decurso da hepatite B crónica, sendo o seu risco proporcional à carga vírica de VHB, quando superior a  $1 \times 10^4$  cópias/mL. São considerados factores de risco de progressão para cirrose: a) Sexo masculino; b) grupo etário mais avançado; c) AgHBe<sup>+</sup>; d) genótipo C (vs

B); c) presença de AgHBe em processo de reversão ou de reactivação vírica; d) seropositividade persistente para AgHBe ou persistência de ADN de VHB; e) subida persistente da ALT; f) superinfecções víricas (VIH, VHC, VHD); g) gravidade da doença (descompensação hepática); h) extensão da necrose hepática; i) frequência dos *flares* hepáticos; j) extensão da necrose hepática; l) duração das alterações hepáticas lobulares. <sup>(28)</sup>

Nos doentes com cirrose, a probabilidade de descompensação hepática aos cinco anos é de 15-20% e é quatro vezes mais alta em doentes com replicação vírica, do que naqueles com carga vírica não detectável. A sobrevivência aos cinco anos é de 80-85% e de 30-50%, respectivamente, nos doentes com cirrose compensada e cirrose descompensada. O CHC desenvolve-se, principalmente, em doentes com cirrose e com história familiar de CHC, para além de outros cofactores como atrás referidos, tais como: a) Carga vírica (ADN de VHB); b) genótipos de VHB; c) mutações pré-S e mutações no *core* A1762T/G1764A; d) consumo de álcool; e) hábitos tabágicos; f) exposição a aflatoxinas. <sup>(45-47)</sup>

### 1.5 Genótipos de VHB - significado clínico

Recentemente, as variantes de VHB foram classificadas em oito genótipos identificados pelas letras A, B, C, D, E, F, G e H, que divergem na sequência nucleotídica do genoma completo maior do que 8% e mais do que 4% na sequência do gene S. Por sua vez, os genótipos são, ainda, classificados em subgenótipos, que apresentam menos de 4% de diferença entre os nucleotídeos. Estão identificados, pelo menos, 24 subgenótipos, excepto para os genótipos E e G. <sup>(48)</sup>

Os genótipos de VHB têm sido associados a características clínicas e víricas diferentes, tais como a gravidade da doença e a resposta à terapêutica antivírica, o que condiciona a história natural da doença. Entretanto, é importante ter em atenção que essas diferenças podem ser o resultado do tempo de circulação do vírus em determinada região, do país estudado, da etnia e da idade do doente, da carga vírica, da prevalência do tipo vírico circulante, dos esquemas de vacinação utilizados e das formas de transmissão.<sup>(48)</sup>

A seroconversão do AgHBs e do AgHBe são importantes fenómenos na história natural da hepatite B crónica. A persistência do AgHBe está relacionada com maior probabilidade de evolução para doença hepática grave. Resultados de estudos de revisão mostram maior associação à seroconversão espontânea e precoce do AgHBe dos genótipos A, B, D e F, comparando com o genótipo C.<sup>(48)</sup>

A maior parte dos dados disponíveis sobre o significado clínico dos genótipos de VHB é fundamentada em resultados de estudos na Ásia, onde são mais prevalentes os genótipos B e C.

Num dos estudos realizados no Japão, envolvendo 1.774 doentes, foi possível concluir que o genótipo C está mais associado a insuficiência hepática e a um maior risco de progressão para cirrose hepática e CHC. Por outro lado, foi possível constatar que a prevalência de AgHBe é maior em doentes com genótipo C, comparativamente aos daqueles com genótipo B e, ainda, nestes últimos, é mais comum a seroconversão do AgHBe para anti-HBe e menos comuns os *flares* de ALT. A presença de níveis elevados de ADN de VHB pode

contribuir para a doença hepática mais agressiva e para a progressão mais rápida para cirrose hepática, em infectados com o genótipo C.<sup>(49)</sup>

Os genótipos A e D são prevalentes na Índia e foi possível constatar que o genótipo D está associado a maior risco de doença hepática mais grave, cirrose hepática e CHC. Em Espanha, outro estudo, que incluiu 258 doentes, encontrou uma taxa similar de seroconversão do AgHBe nos genótipos A e D, mas maior taxa de remissão vírica e bioquímica nos doentes com genótipo A, após a seroconversão.<sup>(50)</sup>

## 1.6 Tratamento

Os fármacos aprovados para a terapêutica da hepatite B são: a) interferão  $\alpha$  e interferão  $\alpha$  peguilhado; b) lamivudina (LAM); c) entecavir; d) telbivudina; e) adefovir; f) tenofovir.

Todos os doentes com hepatite B crónica, potencialmente infecciosos e com risco de complicações hepáticas, são eventuais candidatos para o tratamento. Contudo, porque a erradicação da infecção é quase impossível, apenas são tratados os doentes com hepatite B crónica AgHBe<sup>+</sup> ou anti-HBe, por apresentarem risco elevado de progressão para doença hepática e cirrose. Os portadores de AgHBs inactivos, por outro lado, por terem uma progressão favorável a longo prazo não requerem tratamento, contudo devem ser, periodicamente, monitorizados. Indivíduos AgHBe<sup>+</sup>, em fase de imunotolerância no geral não devem ser tratados, a não ser que apresentem evidência histológica de doença hepática.<sup>(51)</sup>

Em termos práticos, devem ser tratados os indivíduos AgHBe<sup>+</sup> com carga vírica de VHB superior a  $2 \times 10^4$  UI/mL, elevação intermitente ou persistente da ALT

(maior que duas vezes o limite superior do normal) e sem sinais de descompensação e os indivíduos anti-HBe, com carga vírica superior a  $2 \times 10^3$  UI/ml, elevação intermitente ou persistente da ALT (maior que duas vezes o limite superior do normal), actividade necroinflamatória moderada ou severa e/ou fibrose moderada, na ausência de outras causas de doença hepática ou sinais de descompensação. <sup>(51)</sup>

O objectivo, a longo prazo, do tratamento da hepatite B crónica é a erradicação de VHB, através da seroconversão do AgHBs para anti-HBs. Como a erradicação raramente é alcançada com os antivíricos actualmente disponíveis, os objectivos definidos do tratamento da hepatite B crónica incluem a normalização da ALT, a inibição persistente ou a supressão significativa da replicação de VHB e a prevenção da cirrose e do CHC. <sup>(51)</sup>

Independentemente do antivírico usado a resposta terapêutica pode ser classificada em: a) Bioquímica, baseada no valor da ALT; b) vírica, baseada na carga vírica e na seroconversão de AgHBe para anti-HBe; c) histológica, baseada na histologia hepática. A resposta completa é definida como o conjunto da resposta bioquímica e vírica, acompanhada da seroconversão do AgHBs para anti-HBs. <sup>(51)</sup>

A emergência de mutações de resistência a VHB é a limitação principal da terapêutica antivírica [aumento da carga vírica (ADN-VHB) superior a 10x o valor *nadir*, atingido após a resposta inicial e aumento dos valores de ALT (em mais de 90% dos doentes)], causada pela selecção de estirpes mutantes resistentes à terapêutica da hepatite B crónica.

Muitos países com baixos recursos só dispõem da LAM para o tratamento da hepatite B crónica, como tratamento antivírico de primeira linha. O maior

problema associado ao uso da LAM no coinfectado (VIH-VHB) é a sua baixa barreira genética, que promove o aparecimento de resistências, associadas a mutação única no segmento YMDD *motif* da transcriptase reversa. A taxa de selecção dessa resistência calcula-se que seja de 50% em menos de dois anos, 73% de dois a quatro anos e 93% em quatro anos e o surgimento de resistências está associado ao aumento da contagem dos linfócitos da linhagem CD4 (TCD4<sup>+</sup>), provavelmente devido a melhoria da resposta imunitária, o que leva a maior pressão selectiva de vírus mutantes. Sabe-se, ainda, que o perfil de resistência à LAM é diferente de acordo com o genótipo de VHB, embora existam poucos estudos conclusivos sobre esta matéria.<sup>(52-55)</sup>

### 1.7 Impacto de VIH na evolução clínica e laboratorial da infecção por VHB

As taxas elevadas de prevalência mundial de VIH e VHB têm determinado maior interesse por estudos no sentido de se perceberem as interacções entre estas duas entidades, que partilham as mesmas vias de transmissão. A co-infecção com VIH tem um grande impacto na história natural, no diagnóstico, na progressão da doença e na morbimortalidade associadas à infecção por VHB. A hepatite B crónica condiciona maiores taxas de hepatotoxicidade relacionada com a TARV.

Nos imunocompetentes, a eliminação espontânea de VHB é superior a 90%, enquanto que nos indivíduos com infecção por VIH a infecção crónica desenvolve-se em 20% dos casos, após exposição a VHB.<sup>(56)</sup>

A história natural da infecção por VHB está acelerada nos infectados por VIH, isto é maiores taxas de progressão para cirrose, para doença hepática descompensada e para morte, particularmente naqueles indivíduos com

contagem baixa de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e excessivo consumo de álcool. Além do mais, os coinfectados VHB-VIH, quando em comparação com os monoinfectados por VHB, apresentam níveis mais elevados de carga vírica (ADN de VHB). Os valores de ALT têm menos utilidade nos coinfectados VHB-VIH para se avaliar a necessidade de terapêutica antivírica, porque os seus níveis são mais baixos, em comparação com os daqueles descritos nos monoinfectados. A correlação entre cirrose e CHC não foi, ainda, avaliada nos coinfectados VHB-VIH, o mesmo acontecendo em relação à da dos genótipos de VHB e à resposta à terapêutica, comprovada nos monoinfectados por VHB.<sup>(56, 57)</sup>

## 2. JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO

A informação disponível sobre a prevalência da infecção por VHB em Moçambique é escassa, sendo de mencionar um estudo de 2007, com 1.578 participantes, no qual se estimou a prevalência de 10,6%, em dadores de sangue, através da pesquisa de AgHBs.<sup>(58)</sup>

A TARV de 1<sup>a</sup> linha para adultos, actualmente disponível no País, é constituída por uma combinação de nevirapina, zidovudina e LAM, a qual engloba, apenas, um fármaco activo para VHB, isto é, a LAM, que apresenta uma barreira genética baixa, o que predispõe a ocorrência de resistências a curto-médio prazo.<sup>(53, 54)</sup>

De referir, ainda, que nunca se realizou, até a data, qualquer estudo sobre a diversidade genética e perfil de resistência primária à LAM de VHB, na população em geral, e, em particular, naqueles que são a população alvo deste estudo, isto é, nos coinfectados por VIH, sendo tal conhecimento relevante,

bem como o conhecimento dos genótipos, dado que são factores preditivos da evolução clínica e da resposta ao tratamento dos portadores crónicos de VHB.

### 3. OBJECTIVOS

#### 3.1 Objectivo Geral

Estudar a prevalência, diversidade genética e perfil de resistência primária à LAM de VHB, em infectados por VIH, sem TARV prévia na Área de Saúde de Mavalane, Cidade de Maputo.

#### 3.2 Objectivos específicos

- Determinar a prevalência da infecção por VHB em infectados por VIH, sem TARV prévia, através do rastreio do AgHBs.
- Determinar a carga vírica (ADN de VHB) nos indivíduos com serologia positiva para AgHBs.
- Determinar os genótipos de VHB presentes nos portadores de AgHBs e carga vírica (ADN de VHB)  $\geq 80$  UI/mL.
- Determinar a presença de resistência primária à LAM, nos indivíduos com carga vírica (ADN-VHB)  $\geq 80$  UI/mL.
- Determinar os parâmetros clínicos [índice de massa corporal (IMC), estágio clínico da infecção por VIH segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS)] e imunitários (linfócitos TCD4<sup>+</sup>) nos monoinfectados por VIH e nos coinfectados por VHB-VIH.
- Determinar a correlação entre o grau de doença hepática com base no valor da ALT nos doentes com AgHBs positivo.

## 4. METODOLOGIA DO ESTUDO

### 4.1 Desenho do estudo

Foi feito um estudo do tipo observacional, transversal e descritivo no qual foram incluídos infectados por VIH, seguidos na Consulta Externa de Doença Crónica de duas Unidades Sanitárias (US) seleccionadas da Área de Saúde de Mavalane, Cidade de Maputo, Moçambique, durante o período entre 29 de Maio e 14 de Novembro de 2012.

### 4.2 Locais do estudo

Os Centros de Saúde (CS) onde foi feito o recrutamento dos participantes deste estudo foram:

- CS de Mavalane.
- CS de Polana Caniço.

### 4.3 População em estudo

Foram recrutados indivíduos com infecção por VIH seguidos em ambulatório na Consultas Externa de Doença Crónica dos CS de Mavalane e Polana Caniço, ambos pertencentes à Área de Saúde de Mavalane, Cidade de Maputo, Moçambique,

Foram critérios de inclusão:

- Serologia positiva para VIH.
- Idade igual ou superior a 18 anos.
- Sem TARV prévio.
- Consentimento informado (CI) escrito e assinado para a participação no estudo.

Foram critérios de exclusão:

- Mulheres grávidas.
- Doentes mentais ou incapazes de entenderem/assinarem o consentimento informado.

#### 4.4 Tamanho da amostra

Existem poucos estudos de prevalência da infecção por VHB em Moçambique. O estudo mais recente (2007) refere uma prevalência de 10,6% e, com base neste estudo, foi feito o cálculo do tamanho amostral para o presente estudo, com um intervalo de confiança de 95% e precisão de 3%, usando a fórmula: <sup>(58)</sup>

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 \cdot p \cdot q}{E^2}$$

n = tamanho da amostra

Z = n° estatístico para o nível de confiança

P = prevalência esperada

d = valor de precisão

O tamanho da amostra mínimo calculado foi de 404 participantes, os quais foram recrutados de forma consecutiva nas US em estudo.

#### 4.5 Recolha de dados

##### 4.5.1 Recrutamento

Foram feitas comunicações diárias nas US para todos os utentes da Consulta Externa de Doença Crónica, dirigidas pelo investigador principal do estudo e/ou Coordenador Local do estudo, em cada US, com informação detalhada sobre a infecção por VHB, no que respeita à sua importância, prevalência e

consequências da coinfeção com VIH, dos procedimentos e vantagens da participação no estudo, bem como sobre aspectos ligados à confidencialidade. Após a realização da consulta pelos clínicos alocados nas US, aqueles que foram considerados elegíveis para participar no estudo foram conduzidos até ao Coordenador Local do estudo, o qual explicou novamente os procedimentos do estudo.

Todos os doentes que concordaram em participar no estudo assinaram um CI, que lhes foi prontamente disponibilizado pelo Coordenador Local ou Investigador Principal do estudo.

#### 4.5.2 Caracterização dos participantes

Com vista a uma melhor caracterização clínica e imunitária dos participantes, cada um foi submetido a um questionário fechado contendo dados:

- Sociodemográficos.
- Relacionados com factores de risco para a aquisição da infecção por VIH e VHB.
- Relacionados com comorbilidades existentes.

Foi determinado o estágio clínico da infecção por VIH, de acordo com a classificação da OMS, de todos os participantes recrutados.

Foi feito um exame físico sumário pelos investigadores ou pelos clínicos alocados às US do estudo, com dados referentes a sinais vitais e alguns sinais de doença hepática provável, como a presença (ou não) de icterícia, ascite, hepatomegalia e esplenomegalia.

#### 4.5.3 Colheita e envio de amostras de sangue

Foi colhido de forma asséptica um total de 9 mL de sangue venoso a todos os participantes do estudo, dos quais 6 mL foram recolhidos em tubos com anticoagulante (K3EDTA) e os restantes 3 ml em tubos sem anticoagulante. As amostras de sangue foram enviadas para os laboratórios locais dos estudos e para o Laboratório de Imunologia do Instituto Nacional de Saúde (INS), num período não superior a seis horas após a colheita.

No laboratório, 5 mL da amostra anticoagulada foram separados para a realização da citometria de fluxo. O remanescente da amostra de sangue foi centrifugado por 10 minutos a 3000rpm. O soro e o plasma foram, respectivamente, transferidos para criotubos, previamente identificados com o número de registo e data de colheita. Os criotubos foram armazenados à temperatura de  $- 20^{\circ}\text{C}$ , até a realização dos estudos serológicos e moleculares.

#### 4.5.4 Testes laboratoriais

Os testes laboratoriais foram realizados em três locais:

- Laboratórios locais (Hospital Geral de Mavalane e CS Polana Caniço), onde foram feitos o hemograma, determinação das transaminases e TCD4<sup>+</sup>.
- Laboratório de Imunologia do INS onde foram feitos os testes serológicos para a determinação da infecção por VHB e cargas víricas de VHB.
- Laboratório de Biologia Molecular do Hospital dos Capuchos onde foi feita a determinação dos génotipos de VHB e perfil de resistências.

a) Hemograma

- Eritrograma
- Leucograma
- Contagem de plaquetas

Foram determinados utilizando reagentes comercialmente disponíveis.

b) Determinação dos parâmetros bioquímicos no soro

Foram determinados os níveis séricos das aminotransferases [ALT e aspartato-aminotransferase (AST)], como marcadores da presença (ou não) de doença hepática. Estes testes foram feitos utilizando um auto-analizador de bioquímica e reagentes comercialmente disponíveis.

c) Determinação dos marcadores serológicos

Foram determinados os seguintes marcadores serológicos:

- AgHBs para diagnóstico da infecção por VHB.
- Anti-HBs para avaliar presença de anticorpos para VHB.
- Anti-HBc total para avaliar a presença de infecção antiga (IgG) por VHB.

Todos os marcadores serológicos da hepatite B foram determinados usando o método de ELISA (*enzyme linked immuno assay*).

d) Imunofenotipagem das sub-população de células T

A imunofenotipagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> foi determinada para a caracterização do estado imunitário dos doentes. Foi utilizada a citometria de fluxo, com o aparelho FACSCalibur e reagentes Multitest (todos da Beckton Dickinson).

e) Determinação do ADN de VHB, genotipagem e determinação do perfil de resistência de VHB à LAM

A carga vírica de VHB foi determinada por PCR em tempo real utilizando reagentes comercialmente disponíveis (Roche Diagnostics)

A genotipagem de VHB e a determinação do perfil de mutações que conferem resistência à LAM foi efectuada por sequenciamento genético, utilizando o sistema TRUGENE (TRUGENETM HBV Genotyping Kit, Visible Genetics/Bayer, Tarrytown NY, USA)

#### 4.6 Análise estatística

Os dados foram introduzidos, duplamente, em base apropriada, pelo investigador principal e colaboradores, usando o programa *Access 2010*. Antes da análise estatística foi realizado um controlo de qualidade da informação para a verificação das discrepâncias entre as bases de dados.

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa estatístico *statistical package for the social sciences (SPSS) v.15*. A prevalência foi determinada utilizando o teste de proporção. Variáveis qualitativas foram comparadas, usando o teste qui-quadrado. O teste não paramétrico *Mann-Whitney* foi usado para a comparação das medianas entre os grupos. O teste de correlação de *Spearman* foi utilizado para a determinação da associação entre variáveis quantitativas. A análise de regressão logística foi utilizada para correcção dos factores de confusão. As análises foram realizadas utilizando um nível significância estatística de 5%.

## 5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

### 5.1 Comité Nacional de Bioética

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS), Maputo, Moçambique e pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (FMUL). Após a conclusão do estudo, será elaborado um relatório final que será submetido e apresentado ao CNBS, autoridades administrativas e ao Comité Técnico-Científico do INS.

O investigador do estudo concordou em dar acesso directo aos comités de revisão ética a todos os documentos do estudo relevantes, sempre que solicitado.

O investigador principal foi responsável por garantir que o protocolo, o formulário do CI e qualquer outra informação apresentada aos potenciais participantes (por exemplo, anúncios ou informação que suporta ou suplementa o consentimento informado), fossem revistos e aprovadas pelos respectivos Comités de Revisão Ética apropriados.

Este estudo foi realizado de acordo com as Boas Práticas Clínicas (*GCP*) e todos os requisitos regulamentares, incluindo, onde aplicável, a versão 2008 da Declaração de Helsinquia.

### 5.2 Consentimento Informado

O CI, escrito em português, foi lido para cada doente elegível ou seu guardião, pelo investigador ou pelo coordenador local, treinado em local adequado, usando uma linguagem clara e acessível ao destinatário.

Ao doente ou ao guardião foi solicitado um CI escrito e assinado (ou com impressão digital). Sempre que necessário, foi dado tempo ao candidato

elegível para discutir a informação recebida com os membros da comunidade ou com a família, antes de decidir o consentimento.

A inclusão no estudo foi voluntária e, apenas, foi concretizada após a assinatura do CI. Os doentes tiveram a possibilidade de se retirar do estudo em qualquer altura e continuarem o tratamento ou o seguimento gratuito dentro dos programas nacionais

### 5.3 Confidencialidade

A confidencialidade foi garantida por um sistema de código apropriado. Os dados que identificam o doente não foram difundidos fora do local de estudo. Os planos de seguimento dos doentes e qualquer informação pessoal foi restrita ao pessoal médico e aos investigadores envolvidos, directamente, no estudo.

### 5.4 Biossegurança

As amostras de sangue foram colhidas seguindo normas de biossegurança e todo o cuidado foi tomado para evitar acidentes aos participantes e ao pessoal de saúde.

### 5.5 Implicações e benefícios

Será proposta a vacinação contra a hepatite B aos doentes que ainda não estejam protegidos contra esta infecção. É importante referir que todos os participantes, desde que tenham critérios de vacinação, serão encaminhados para o Programa de Vacinação do Ministério da Saúde (MISAU), para eventual benefício da imunização, se disponível.

Os participantes com hepatite B crónica receberão tratamento para VIH, de acordo com as normas nacionais, que consiste na administração de dois antirretrovíricos activos contra VHB (tenofovir e LAM), caso indicado.

A equipa do estudo irá convidar os parceiros dos participantes, identificados com VIH e VHB crónica, para uma sessão de aconselhamento e testagem de ambos os vírus, sempre que possível.

## 6. RESULTADOS

O estudo realizou-se no período de 29 de Maio a 14 de Novembro de 2012, nos CS de Mavalane e Polana Caniço, ambos pertencentes à Área de Saúde de Mavalane, na Cidade de Maputo. Foram recrutados um total de 571 indivíduos infectados por VIH, dos quais foram excluídos 53 pelos seguintes motivos: a) Desistência, antes da colheita de amostra biológica (41 indivíduos), b) desistência após a colheita de amostra biológica (cinco indivíduos), morte (três indivíduos) e exposição prévia à TARV (quatro indivíduos).

Os indivíduos incluídos no estudo (n=518) foram testados para a presença do AgHBs, tendo sido considerados portadores 47 dos indivíduos (9,1%), dos quais 19 eram do sexo masculino (40,4%). Os indivíduos portadores do AgHBs (coinfectados com VIH) foram comparados com o resto da população do estudo (monoinfectados por VIH), no que diz respeito às características demográficas, factores de risco para aquisição da infecção por VIH e VHB, características clínicas e laboratoriais, que são apresentadas a seguir.

### 6.1 Características demográficas da população do estudo

Quinhentos e dezoito indivíduos foram incluídos no estudo, destes 175 (33,8%) eram do sexo masculino, com idade mediana de 33 anos [amplitude

interquartil (AIQ): 28-42] no grupo dos monoinfectados por VIH e de 32 anos (AIQ: 28-42) no grupo dos coinfectados VHB-VIH ( $p=0.541$ ).

Os monoinfectados por VIH ( $n=471$ ) foram comparados com os co-infectados VHB-VIH ( $n=47$ ), no que diz respeito a características demográficas (tabela 3). Em ambos os grupos houve predomínio de mulheres, sendo 313 (66,8%) no grupo dos monoinfectados por VIH e 30 (63,8%) no grupo dos coinfectados por VHB-VIH ( $p=0,944$ ).

Entre os dois grupos, a história de múltiplos parceiros sexuais, definida como dois ou mais parceiros, foi reportada em 90 (19,1%) dos indivíduos monoinfectados e em oito (17,1%) dos coinfectados ( $p=0,723$ ). O uso do preservativo foi reportado em 171 (36,4%) dos monoinfectados e em 23 (48,9%) dos coinfectados ( $p=0,66$ ). A história de escarificações foi reportada em 200 (42,8%) dos monoinfectados e em 19 (49,3%) dos coinfectados ( $p=0,833$ ). A história de tatuagens/*piercings* foi reportada em 73 (15,6%) dos monoinfectados e em cinco (19,4%) dos coinfectados ( $p=0,455$ ). A história de transfusões sanguíneas foi reportada em 55 (11,7%) dos monoinfectados e em um (2,2%) dos coinfectado ( $p=0,047$ ). A história de vacinação prévia para a hepatite B foi reportada em três (0,6%) dos monoinfectados e em um (2,2%) coinfectado ( $p=0.258$ ). A história de consumo de álcool foi reportada em 176 (37,4%) dos monoinfectados e em 19 (40,4%) dos coinfectados ( $p=0,688$ ).

Usando o teste de qui-quadrado e de *t-student*, para comparar o grupo dos monoinfectados com o dos coinfectados, constatou-se que não havia diferenças, estatisticamente, significativas quanto à idade ( $p=0,581$ ) e ao género ( $p=0,944$ ). Quanto aos factores de risco a diferença foi, estatisticamente, significativa quanto aos antecedentes de transfusões

sanguíneas ( $p=0,044$ ) e não foi, estatisticamente, significativa quanto a outros factores de risco, como múltiplos parceiros sexuais ( $p=0,723$ ), uso de preservativo ( $p=0,090$ ), escarificações ( $p=0,833$ ), *piercings*/tatuagens ( $p=0,455$ ), vacinação prévia para hepatite B ( $p=0,258$ ) e consumo de álcool ( $p=0,658$ ).

Tabela 3 - Características demográficas e factores de risco da população de estudo

Características	Monoinfectados	Co infectados	Análise
	VIH (n=471)	VHB-VIH (n=47)	univariada <i>Valor de p</i>
Idade (anos)			
Mediana	33	32	
AIQ	28 – 42	28 – 42	0,581
Género			
Masculino	158 (33,2)	17 (36,2)	
Feminino	313 (66,8)	30 (63,8)	0,944
Múltiplos parceiros			
Sim	90 (19,1)	8 (17,0)	
Não	381 (80,9)	39 (83,0)	0.723
Uso de preservativo			
Sim	171 (36,4)	23 (48,9)	
Não	299 (63,6)	24 (51,1)	0.090
Escarificações			
Sim	200 (42,9)	19 (41,3)	
Não	266 (57,1)	27 (58,9)	0.833
Tatuagens/ <i>piercings</i>			
Sim	73 (15,6)	5 (11,4)	
Não	395 (84,4)	39 (88,6)	0.455
Transfusão sanguínea			
Sim	55 (11,7)	1 (2,2)	
Não	415 (88,3)	45 (97,8)	<b>0.047</b>
Vacinação prévia para hepatite B			
Sim	3 (0,6)	1 (2,2)	
Não	466 (99,4)	45 (97,8)	0.258
Consumo de álcool			
Sim	176 (37,5)	19 (40,4)	
Não	294 (62,5)	28 (59,6)	0.688

AIQ – amplitude interquartil

## 6.2 Características clínicas da população do estudo

Os indivíduos monoinfectados foram comparados com os co infectados, no que diz respeito às características clínicas (tabela 4). A informação clínica colhida

foi a presença (ou não) de sinais de doença hepática crónica descompensada como icterícia, ascite, hepatomegalia e esplenomegalia, não tendo sido observado nenhum destes sinais clínicos em ambos os grupos.

Os dois grupos foram, também, comparados no respeitante ao estágio clínico da infecção por VIH, segundo os critérios da OMS, sendo que 214 (45,5%) dos monoinfectados estavam no estágio I, comparado com 22 (46,8%) dos coinfectados, 142 (30,1%) dos monoinfectados estavam no estágio II, comparado com 14 (29,8%) dos coinfectados, 111 (23,6%) estavam no estágio III, comparado com 10 (21,3%) dos coinfectados e, finalmente, quatro (0,9%) dos monoinfectados estavam no estágio IV, comparado com um dos coinfectados (2,1%). (p=0,878)

Usando o teste de qui-quadrado e de *t-student*, para comparar o grupo dos monoinfectados com o dos coinfectados, constatou-se que não havia diferenças, estatisticamente, significativas quanto ao estágio clínico da infecção por VIH segundo a OMS (p=0,878).

Tabela 4 – Características clínicas da população de estudo, de acordo com os estádios definidos pela OMS

<b>Características</b>	<b>Monoinfectados (n=471)</b>	<b>Coinfectados (n=47)</b>	<b>Análise univariada Valor de p</b>
<b>Estádio clínico (OMS)</b>			
I n (%)	214 (45,5)	22 (46,8)	
II n (%)	142 (30,1)	14 (29,8)	
III n (%)	111 (23,6)	10 (21,3)	
IV n (%)	4 (0,9)	1 (2,1)	0,848

OMS – Organização Mundial da Saúde

### 6.3 Resultados dos estudos laboratoriais da população do estudo

Os indivíduos monoinfectados foram comparados com os coinfectados, no que diz respeito às características laboratoriais (tabela 5). Das análises clínicas realizadas constatou-se que o valor médio de hemoglobina, no grupo dos

monoinfectados, foi de 11,6 g/dL, enquanto que no grupo dos coinfectados foi de 12,1 g/dL. O valor médio de leucócitos no grupo dos monoinfectados foi de  $4,7 \times 10^3$  céls/ $\mu$ L, enquanto que no grupo dos coinfectados foi de  $4,5 \times 10^3$  céls/ $\mu$ L. O valor médio das plaquetas no grupo dos monoinfectados foi de  $226 \times 10^6$  céls/ $\mu$ L, enquanto que no grupo dos coinfectados foi de  $212 \times 10^6$  céls/ $\mu$ L. O valor médio dos linfócitos TCD4<sup>+</sup>, no grupo dos monoinfectados, foi de 363 céls/ $\mu$ L (204-508), enquanto que no grupo dos coinfectados foi de 327 céls/ $\mu$ L (131-462). O valor médio da ALT foi de 21,4 UI no grupo dos monoinfectados enquanto que no grupo dos coinfectados foi de 26,2 UI. O valor médio da AST foi de 28,8 UI no grupo dos monoinfectados enquanto que no grupo dos coinfectados foi de 29,4 UI.

Usando o teste de qui-quadrado e de *t-student*, para comparar o grupo dos monoinfectados com o dos coinfectados, no que diz respeito ao hemograma e ALT e AST não se verificaram diferenças, estatisticamente, significativas [hemoglobina ( $p=0,288$ ), leucócitos ( $p=0,177$ ), linfócitos ( $p=0,186$ ), plaquetas ( $p=0,278$ ), linfócitos T CD4<sup>+</sup> ( $p=0,203$ ), ALT ( $p=0,054$ ) e AST ( $p=0,244$ )].

Tabela 5 – Resultados dos estudos laboratoriais da população do estudo

Características	Monoinfetados (n=471)	Coinfetados (n=48)	Análise univariada Valor de p
Hemoglobina (g/dL)			
Mediana	11,6	12,1	
AIQ	10,2 – 13,0	11,0 – 12,8	0,288
Leucócitos			
Mediana	4,7	4,5	
AIQ	3,8 – 5,8	3,6 – 5,2	0,177
Linfócitos			
Mediana	2,0	2,0	
AIQ	1,0 – 2,0	1,0 – 2,0	0,186
Plaquetas			
Mediana	226	212	
AIQ	177 – 269	176 – 286	0,278
Linfócitos T CD4			
Mediana	363	327	
AIQ	204 – 508	131 – 462	0,203
ALT			
Mediana	21,4	26,2	
AIQ	16,0 – 30,1	18,0 – 35,0	<b>0,054</b>
AST			
Mediana	28,8	29,4	
AIQ	22,1 – 38,1	26,0 – 39,8	0,244

ALT – alanina aminotransferase; AST – aspartato-aminotransferase; AIQ – amplitude interquartil

#### 6.4 Determinação do ADN de VHB

A determinação do ADN de VHB foi feita em 46 dos 47 indivíduos que foram identificados como coinfectados, tendo os valores sido estratificados em três grupos: Grupo I – sete (15,2%) tinham ADN de VHB não detectável (<20UI/mL); Grupo II – 27 tinham ADN-VHB  $\geq 20$  UI/mL – < 10.000 UI/mL; Grupo III – 12 (26,1%) tinham ADN-VHB  $\geq 10.000$  UI/mL (tabela 6). De referir que o limiar de detecção do ADN de VHB, do sistema utilizado, é de 20 UI/mL.

Tabela 6 – Quantificação do ADN de VHB de 46 dos indivíduos com coinfeção VHB-VIH

ADN de VHB (UI/mL)*	Coinfectados VHB-VIH (n=46)
< 20 UI/mL n (%)	7 (15,2)
≥ 20 – < 10.000 UI/mL n (%)	27 (58,7)
≥10.000 n (%)	12 (26,1)

< 20 UI/mL (não detectável); ADN - ácido desoxirribonucleico; UI/mL – Unidades Internacionais/mililitro; VHB – vírus da hepatite B; VIH – vírus da imunodeficiência humana.

### 6.5 Características clínicas da população coinfectada, de acordo com o ADN de VHB

Os 46 indivíduos coinfectados foram comparados, no que diz respeito a características clínicas, de acordo com os valores de ADN-VHB. Não se tendo identificado nenhum sinal sugestivo de doença hepática crónica, a comparação dos grupos foi feita de acordo com o estágio clínico da infecção por VIH, segundo a OMS (tabela 7). Cinco (71,4%) dos indivíduos com ADN de VHB não detectável estavam no estágio I da OMS, comparado com 10 (37,0%) com ADN de VHB ≥ 20 UI/mL – < 10.000 UI/mL e seis (50,0%) com ADN de VHB ≥ 10.000 UI/mL. Um (14,3%) dos indivíduos com ADN de VHB não detectável estava em estágio II, comparado com 10 (37,0%) com ADN de VHB ≥ 20 UI/mL – < 10.000 UI/mL e três (25,0%) com ADN de VHB ≥ 10.000 UI/mL. Um (14,3%) dos indivíduos com ADN de VHB não detectável estava em estágio III, comparado com sete (25,9%) com ADN de VHB ≥ 20 UI/mL – < 10.000 UI/mL e dois (16,7%) com ADN de VHB ≥ 10.000 UI/mL. Um (8,3%) dos indivíduos com ADN de VHB ≥ 10.000 UI/mL estava no estágio IV, não tendo sido identificados indivíduos neste estágio, com ADN de VHB não detectável (<20 UI/mL) ou detectável (mas ≥ 20 UI/mL – < 10.000 UI/mL).

Usando o teste de qui-quadrado e de *t-student*, para comparar os indivíduos mono infectados, segundo o ADN de VHB e estágio clínico da infecção por VIH, constatou-se que não havia diferenças, estatisticamente, significativas entre os grupos ( $p=0,848$ ).

Tabela 7 – Comparação dos estádios clínicos (OMS) da população de 46 coinfectados, de acordo com o ADN de VHB

Estádio clínico (OMS)	ADN – VHB	ADN-VHB	ADN-VHB	Análise univariada
	<20UI/mL (n=7)	≥ 20 UI/mL – < 10.000 UI/mL (n=27)	≥10.000 UI/mL (n=12)	
I n (%)	5 (71.4)	10 (37.0)	6 (50.0)	0.425
II n (%)	1 (14.3)	10 (37.0)	3 (25.0)	
III n (%)	1 (14.3)	7 (25.9)	2 (16.7)	
IV n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (8.3)	

ADN - ácido desoxirribonucleico; OMS – Organização Mundial da Saúde; UI/mL – Unidades Internacionais/mililitro; VHB – vírus da hepatite B.

#### 6.6 Comparação dos resultados dos estudos laboratoriais da população coinfectada por VHB-VIH de acordo com o ADN de VHB

Os 46 indivíduos coinfectados foram comparados, no que diz respeito aos resultados dos estudos laboratoriais, como a contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, AST e ALT e os valores de ADN de VHB.

O valor mediano da contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> foi de 275 céls/μL (AIQ = 233-430), nos indivíduos com ADN de VHB não detectável (<20 UI/mL), de 369 céls/μL (AIQ = 104-501), nos indivíduos com ADN de VHB ≥ 20 UI/mL – < 10.000 UI/mL e de 257 céls/μL (AIQ = 160-423), nos indivíduos com ADN de VHB ≥ 10.000 UI/mL.

O valor mediano da ALT foi de 26,5 UI (AIQ = 14,5-46,5) nos indivíduos com ADN de VHB < 20 UI/mL, 29,1 UI (AIQ = 26,9-34,3), nos indivíduos com ADN de VHB ≥ 20 UI/mL – < 10.000 UI/mL e 39,4 UI (AIQ = 27-52,2), nos indivíduos com ADN de VHB ≥ 10.000 UI/mL.

Usando o teste de qui-quadrado e de *t-student*, para comparar os indivíduos coinfectados segundo o respectivo ADN de VHB e as características laboratoriais não foram encontradas diferenças, estatisticamente, significativas entre os grupos no respeitante aos valores da contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> (p=0,413), da ALT (p=0,248) e da AST (p=0,03).

Tabela 8: Comparação dos resultados dos estudos laboratoriais da população de coinfectados (TCD4<sup>+</sup> e aminotransferases) e o ADN de VHB.

Parâmetro laboratorial	ADN – VHB <20UI/mL (n=7)	ADN-VHB ≥ 20 UI/mL – < 10.000 UI/mL (n=27)	ADN-VHB ≥10.000 UI/mL (n=12)	Análise univariada Valor de p
TCD4 <sup>+</sup>				
Mediana	275	369	257	
AIQ	233 – 430	104 – 501	160 – 423	0.413
AST				
Mediana	28.0	23.0	35.2	<b>0.030</b>
AIQ	19.9 – 53.5	16.6 – 27.0	26.9 – 45.5	
ALT				
Mediana	26.5	29.1	39.4	0.248
AIQ	14.5 – 46.5	26.9 – 34.3	27.0 – 52.2	

ADN - ácido desoxirribonucleico; ALT – alanina-aminotransferase; AST – aspartato-aminotransferase; TCD4<sup>+</sup> - linfócitos T da linhagem CD4; UI/mL – Unidades Internacionais/mililitro; VHB – vírus da hepatite B;

### 6.7 Genotipagem e resistência primária de VHB à LAM

Devido ao limiar de ADN de VHB, requerido pela técnica usada, para que seja viável a genotipagem, para o estudo genotípico e para a detecção e identificação de mutações de resistência à LAM, aquela não foi exequível em 18 (39,1%) das amostras com ADN de VHB < 300 UI/mL, e em uma (2,2%) com ADN de VHB > 300 UI/mL, por má qualidade da amostra. Assim, foram seleccionadas 27 (58,7%) amostras para o estudo genotípico, tendo sido detectados o genótipo A em 25 (92,6%) indivíduos e o genótipo E em 2 (7,4%).

Não foram detectadas mutações de resistência à LAM em todas as amostras testadas.

## 7. DISCUSSÃO

Apesar de se conhecerem trabalhos sobre a prevalência da coinfeção VIH-VHB em Moçambique, este é o primeiro estudo feito em Maputo, Moçambique em coinfectados VHB-VIH, com informação adicional sobre os génotipos de VHB que circulam nesta população.

A TARV tem estado disponível em Moçambique desde 1996 e, no final de Dezembro de 2010, o número cumulativo de doentes em TARV era de 218.991, em que 17.395 eram crianças com idade inferior a 15 anos (8%) e 64% eram mulheres <sup>(59)</sup>. Devido a expansão da TARV, o número cumulativo de infectados por VIH tem vindo a aumentar, proporcionando um aumento na esperança de vida, reduzindo a mortalidade relacionada com a infecção por VIH, pela diminuição do risco de ocorrência das doenças oportunistas. Entretanto, devido a esta maior sobrevida, tem vindo a emergir o risco de ocorrência de comorbilidades não associadas à sida, como é o caso da doença hepática crónica por VHB.

A coinfeção VHB-VIH condiciona uma mudança na história natural, no diagnóstico, na progressão da doença e na morbimortalidade associadas à infecção por VHB. Assim, neste caso há taxas maiores de progressão para cirrose, doença hepática descompensada e morte, particularmente naqueles indivíduos com contagens baixas de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e com excessivo consumo de álcool. Sabe-se, também, que na coinfeção a resposta à

terapêutica da infecção por VHB é menor, comparativamente à monoinfecção por VHB <sup>(56, 60, 61)</sup>

Na altura em que o estudo foi feito, em Moçambique, a TARV de 1ª linha fundamentava-se na combinação de nevirapina, zidovudina e LAM, a qual englobava, apenas, um fármaco activo para VHB, isto é, a LAM, que tem uma baixa barreira genética, predispondo à ocorrência de resistências a curto-médio prazo. <sup>(53, 54)</sup>

Neste estudo foi encontrada uma prevalência de coinfeção VHB-VIH de 9,1%. Cunha L *et al* encontraram uma prevalência de infecção por VHB e de coinfeção VHB-VIH de 10,6% e 2%, respectivamente, num estudo feito em doadores de sangue no Hospital Central de Maputo (HCM) <sup>(58)</sup>. Sokx *et al* identificaram prevalência similar de infecção por VHB, num estudo feito em doadores de sangue no Hospital Provincial de Tete (HPT) <sup>(62)</sup>. Viegas EO *et al* encontraram uma prevalência de infecção por VHB e de coinfeção VHB-VIH, de 12,2% e 4,9%, respectivamente, em estudo feitos em jovens seguidos no Serviço Amigo dos Jovens e Adolescentes (SAAJ) <sup>(63)</sup>. Os estudos mencionados mostram prevalências de coinfeção inferiores às encontradas neste estudo, o que pode ser resultado do tipo de população e das amostras dos estudos, a título de exemplo os dois primeiros foram feitos em doadores de sangue, que são considerados uma população de baixo risco.

Outro facto a mencionar é que o presente estudo foi feito numa população com serologia positiva para VIH, tendo-se encontrado uma prevalência de infecção por VHB quase similar à encontrada nos outros estudos mencionados, realizados em Moçambique, o que pode ser explicado pelo facto da infecção por VHB, na África Subsariana, ocorrer por via horizontal, por transmissão

antes dos cinco anos de idade, diferindo do que acontece em países desenvolvidos, em que a infecção ocorre em adolescentes e adultos com comportamentos de risco. <sup>(60, 64)</sup>

A análise dos dois grupos do estudo, os mono e os coinfectedos, permite afirmar que houve tendência para o predomínio da infecção nas mulheres, embora não tenha significado estatístico. Os resultados de alguns estudos, efectuados em África, mostram maior prevalência da infecção por VHB em homens do que em mulheres, ao contrário do deste e de outros estudos feitos em Moçambique. Tal pode ser reflexo destes estudos, em Moçambique, terem recrutado mais mulheres do que homens. <sup>(60, 64, 65)</sup>

Apesar de estar documentado um risco acrescido de infecção por VHB, em indivíduos expostos a diversos factores, tais como múltiplos parceiros sexuais e prática de sexo desprotegido, neste estudo não foram encontradas diferenças, estatisticamente, significativas entre os dois grupos. Tal pode, em parte, explicar-se pelo facto da amostra de coinfectedos VHB-VIH ser relativamente pequena ou da infecção por VHB ter sido adquirida na infância.

As escarificações, tatuagens e *piercings* descritos noutros estudos como factores de risco na transmissão da infecção por VHB não foi comprovada no presente estudo, em mono e coinfectedos. Tal pode ser explicado pelo facto de ambos grupos terem exposição similar a estes factores de risco. <sup>(64)</sup>

Quanto às transfusões de sangue notou-se ter havido maior ocorrência deste factor de risco em indivíduos monoinfectedos (11,7%) em comparação com os coinfectedos (2,2%) e a diferença entre os dois grupos foi, estatisticamente, significativa ( $p=0,047$ ). Estudos feitos em dadores de sangue no HCM e no HPT mostraram prevalências de VIH de 4% e 8,5%, respectivamente, o que

levanta a hipótese de alguns casos de infecção por VIH ocorrerem, ainda, devido às transfusões sanguíneas. Apenas um indivíduo com coinfeção VHB-VIH relatou antecedente de transfusão sanguínea o que pode ser justificado pelo tamanho da amostra e pela história natural da infecção por VHB. <sup>(58, 62)</sup>

A vacinação para a hepatite B foi referida com uma frequência muito baixa em ambos grupos e mesmo os quatro indivíduos que fizeram referência a esta imunização não apresentaram nenhum documento comprovativo. Tal facto pode dever-se ao facto de a vacina contra a hepatite B ter sido introduzida no calendário de vacinações apenas em 2002, não tendo abrangido a população deste estudo ou, ainda, de não se recordarem de terem sido vacinados.

Apesar de não ser um factor de risco directo para a aquisição da infecção por VIH e/ou por VHB, notou-se uma alta prevalência de consumo de álcool no grupo dos mono e dos coinfectados, 37,5% e 40,4%, respectivamente, embora a diferença entre os dois grupos não tenha sido, estatisticamente, significativa. Este factor foi aqui incluído porque o consumo de álcool é um factor que está associado ao risco de maior rapidez da progressão da doença hepática crónica em infectados por VHB. <sup>(32)</sup>

Em nenhum dos participantes foram identificados sinais de doença de doença hepática descompensada (icterícia, ascite, hepatomegalia e esplenomegalia), o que não é de estranhar, dado que a maioria evoluirá, durante vários anos, com doença compensada. Está descrito que em zonas em que a prevalência da hepatite B é alta a transmissão é, basicamente, perinatal, passando nestes casos por uma fase de imunotolerância, caracterizada por uma infecção clínica inaparente, que evolui para a cronicidade em mais de 90% dos casos e, nestes últimos, o risco de desenvolvimento de doença hepática depende de vários

factores, dentre os quais níveis altos de ADN de VHB > 100.000, a persistência do AgHBe e de valores elevados de ALT e do genótipo de VHB, segundo foi demonstrado em estudos realizados no continente asiático. <sup>(32)</sup>

Os dois grupos foram comparados quanto ao estágio clínico da infecção por VIH, segundo a OMS, não tendo sido encontradas diferenças, estatisticamente, significativas entre eles. Está descrito que a história natural da infecção por VHB está acelerada nos coinfectados por VIH, implicando taxas maiores de progressão para cirrose, CHC, doença hepática descompensada e morte, particularmente naqueles com contagens baixas de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e com consumo excessivo de álcool. A maioria dos infectados por VIH, deste estudo, foi classificada como estando em estádios precoces da infecção por VIH, com alguma preservação da resposta imunitária, sendo que 45% dos indivíduos, nos dois grupos, foram diagnosticados em estágio clínico I e, apenas, 0,9% dos monoinfectados e 2,1% dos coinfectados foram diagnosticados em estágio clínico IV. <sup>(56, 57)</sup>

Os dois grupos foram, de seguida, comparados quanto à variáveis laboratoriais.

Quanto aos parâmetros hematológicos verificou-se que em ambos grupos os valores medianos da hemoglobina, dos leucócitos totais, dos linfócitos e das plaquetas estavam dentro dos parâmetros considerados normais e, comparando os dois grupos, não foram encontradas diferenças, estatisticamente, significativas. Estudos feitos na Nigéria demonstraram, também, que não havia diferenças, quanto àqueles parâmetros, em monoinfectados quando comparados com os coinfectados. <sup>(66)</sup> No que diz respeito à contagem total de linfócitos, outro estudo feito na Nigéria mostrou

haver uma redução significativa dos linfócitos totais nos indivíduos coinfectados, quando comparados com os monoinfectados ( $p < 0,05$ ). A este propósito de referir que o ADN de VHB pode estar presente em linfócitos de indivíduos com infecção por VIH, mesmo naqueles em que os testes serológicos não evidenciam infecção por VHB. <sup>(67)</sup>

Quanto à contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, apesar de se verificar que o valor médio, nos coinfectados, era menor do que nos monoinfectados, não se verificou diferença, estatisticamente, significativa entre os dois grupos ( $p=0,203$ ). Os resultados de um estudo feito no Quénia, num Hospital Distrital, mostraram que havia uma redução na contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> em indivíduos coinfectados (120 +/- 112 céls/mL) em comparação com os monoinfectados (694 +/-140). <sup>(68)</sup> Outro estudo, feito na Itália, não mostrou diferenças significativas na contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> em indivíduos coinfectados, quando comparados com os monoinfectados. <sup>(69)</sup>

Quanto aos marcadores de necroinflamação hepática, como as aminotransferases (ALT e AST), não foram encontradas diferenças, estatisticamente, significativas entre os dois grupos. Na Nigéria, os resultados encontrados foram similares aos nossos. <sup>(70)</sup> Sabe-se que os valores das aminotransferases, nos doentes com hepatite B crónica, são flutuantes (estes doentes podem alternar períodos de aumentos das aminotransferases e, mesmo, de icterícia, com períodos de normalização bioquímica) e uma determinação única não permite tirar conclusões sobre o estágio da doença. No entretanto, vários estudos de coortes asiáticas mostraram que os valores basais de ALT têm importante valor prognóstico, na hepatite B crónica. Aqueles

com valores persistentemente normais de ALT têm melhor prognóstico do que aqueles que apresentam valores de ALT duas vezes acima do normal. <sup>(44, 71, 72)</sup>

O ADN-VHB foi quantificado em 46 dos 47 indivíduos coinfectados e estes foram subdivididos em três grupos, dos quais sete (15,2%) tinham ADN de VHB não detectável (< 20 UI/mL) e 39 (84,8%) com ADN de VHB detectável [27 (58,7%) com ADN de VHB  $\geq$  20 UI/mL – < 10.000 UI/mL e 12 (26,1%) com ADN de VHB  $\geq$  10.000UI/L]. Vários estudos feitos na Ásia comprovaram que o ADN de VHB é um importante marcador da evolução da hepatite B crónica para cirrose ou CHC e, por este motivo, recomendam a sua monitorização. <sup>(73)</sup>

Em Taiwan foram seguidos 3160 com infecção crónica por VHB, tendo sido demonstrado que as variações nos níveis de ADN de VHB e da ALT são preditores independentes do risco de ocorrência do CHC, tendo, ainda, revelado que aqueles que iniciaram o estudo com ADN de VHB <10.000 UI/mL tiveram menos CHC, em relação aos que iniciaram com valores superiores, tendo como recomendação a monitorização regular do ADN de VHB e da ALT, como marcadores importantes no seguimento de doentes com hepatite B crónica. <sup>(74)</sup> Analisando os resultados obtidos neste estudo, se se usasse como valor de base o ADN de VHB poder-se-ia afirmar que 26,1% dos coinfectados teriam maior risco de desenvolver CHC, em relação aos restantes coinfectados. Contudo, há outros factores a considerar, antes de tais dados serem extrapolados para a população deste estudo, como o facto de esta ser constituída por coinfectados VHB-VIH, em que a história natural da hepatite B está alterada, com maiores taxas de progressão para a doença hepática crónica e, também, pelo facto dos genótipos, que circulam na população

asiática, serem diferentes dos que circulam na África Subsariana, facto que, também, influencia a história natural da hepatite B.

Os três grupos de coinfectados foram, também, comparados entre si, quanto a características clínicas e os resultados dos estudos laboratoriais, não tendo sido encontrados sinais de doença hepática descompensada. Quanto ao estágio clínico da infecção por VIH, segundo a OMS, não se notou diferença significativa entre os três grupos, sendo de realçar o facto de maior parte destes indivíduos estar em estádios precoces da infecção por VIH.

Quanto às características laboratoriais, como a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, AST e ALT, não se registaram diferenças significativas. Sabe-se que a coinfeção modifica a história natural da infeção por VHB, aumentando as taxas de replicação vírica e o risco de cronicidade da hepatite B, nos indivíduos infectados em idade adulta, contudo, sem modificar o processo necroinflamatório a nível do fígado. <sup>(72)</sup>

Quanto à diversidade genética de VHB na população estudada, nas 27 amostras em que foi possível a genotipagem, 25 (92,6%) tinham o genótipo A e duas (7,4%) o genótipo E. Estudos feitos em Moçambique e em países vizinhos mostraram resultados similares ao nosso estudo. Cunha L *et al*, num estudo feito em doadores de sangue no HCM, atrás referido, encontrou uma prevalência do genótipo A de 86,3%, seguido dos genótipos E e D <sup>(58)</sup>. A análise de 404 amostras, num estudo feito na África do Sul, mostrou haver maior prevalência do genótipo A (74,3%), seguida do genótipo D (19,3%), genótipo C (1,5%) e genótipo E (1,2%). Noutro estudo, realizado no Zimbabwe, em 29 doadores de sangue, detectou-se, apenas, o genótipo A nessa população. <sup>(75-77)</sup> Vários estudos mostraram que os genótipos de VHB podem influenciar, de forma

significativa, a história natural da hepatite B, nas taxas de seroconversão do AgHBe, na carga vírica de VHB e nos padrões de mutação de VHB, factores estes que podem, por sua vez, influenciar a heterogeneidade das manifestações clínicas e a resposta ao tratamento antivírico, pelo que, o conhecimento dos genótipos de VHB pode permitir que se faça uma optimização individualizada do tratamento na prática clínica. <sup>(78, 79)</sup>

Quanto à presença de mutações que conferem resistência primária à LAM, esta não foi identificada em nenhuma das amostras. A presença de mutações de resistência à LAM, foi registada na África do Sul. Estudo feito em indivíduos mono (n=15) e coinfectados (n=20), mostrou a presença de mutação de resistência a LAM em 3/15 e 10/20 mono e coinfectados, respectivamente. <sup>(80)</sup>

## 8. CONCLUSÕES

Com o presente estudo foi possível caracterizar, usando parâmetros demográficos, clínicos e laboratoriais, uma população de indivíduos coinfectados por VHB-VIH comparando-os com a de indivíduos monoinfectados, todos eles seguidos em Consulta de Doenças Crónicas em dois CS da Cidade de Maputo.

Os resultados encontrados no concernente à prevalência da hepatite B (9,1%) vão de acordo com resultados dos estudos realizados em Moçambique e aqui mencionados, em dadores de sangue, grupo este considerado de baixo risco, o que sugere que a transmissão de VHB possa ocorrer, primariamente, no período perinatal e que factores de risco, como múltiplos parceiros sexuais, não uso do preservativo, escarificações, transfusões sanguíneas, tatuagens/

*piercings* podem não ter peso tão importante na transmissão de VHB, como têm na transmissão da infecção por VIH, podendo, ainda, concluir-se que a infecção por VHB ocorre mais precocemente que a infecção por VIH, havendo, contudo, ainda, casos em que as duas infecções são transmitidas, em simultâneo no período perinatal (transmissão mãe-filho).

Este estudo confirma a endemicidade da infecção por VHB em Moçambique, reforçando a necessidade de disponibilização de meios de diagnóstico com base em testes simples e acessíveis a países com recursos limitados em todas as US, para o rastreio de grupos-alvo, como mulheres grávidas, recém-nascidos, trabalhadores de saúde e indivíduos infectados por VIH para posterior imunização, por forma a diminuir o impacto da infecção por VHB. Existe, ainda, alguma controvérsia quanto ao efeito da coinfeção VIH-VHB na história natural da infecção por VIH, contudo, sabe-se que indivíduos com infecção prévia por VIH, que adquirem a infecção por VHB, têm maior probabilidade de se tornarem portadores crónicos de VHB e sabe-se, ainda, que a coinfeção aumenta as taxas de replicação de VHB e de reactivação da infecção, advindo daí a necessidade de rastreio da infecção por VHB em indivíduos VIH positivos.

Outro facto a realçar foi a ausência, nos coinfectados, de sinais clínicos ou laboratoriais de doença hepática descompensada, mesmo naqueles com valores de ADN de VHB elevados, o que pode estar de acordo com o facto de que a coinfeção VHB-VIH modifica a história natural da infeção por VHB, sem alterar o processo necroinflamatório a nível do fígado.

Os génotipos identificados neste estudo são sobreponíveis aos encontrados em estudos feitos em Moçambique e em países vizinhos. Em termos de

implicações clínicas da presença do genótipo A da infecção por VHB, está demonstrado, em estudos feitos noutras áreas, que os portadores deste genótipo têm maior risco de progressão para a cronicidade, quando comparados com os portadores de outros genótipos. Por outro lado têm, também, seroconversão do AgHBe mais sustentada, maiores taxas de eliminação do AgHBs e menor ocorrência do processo necroinflamatório do fígado. <sup>(80)</sup> Não se conhece, contudo, a sua implicação na história natural da coinfeção VHB-VIH, porque não estão disponíveis estudos prospectivos em portadores coinfectados, com estes ou com outros genótipos, na África Subsariana. A maioria dos estudos disponíveis sobre a evolução clínica e resposta a terapêutica antivírica é baseada nos genótipos B e C, que são endémicos na Ásia.

Não foram identificadas mutações que confirmam resistência à LAM, nas amostras analisadas, o que pode se dever ao facto de a população estudada nunca ter sido exposta a este antivírico. Os estudos disponíveis, com a demonstração da presença de mutações à LAM, foram feitos em indivíduos expostos, previamente, à este fármaco.

Outro facto, aqui a realçar, é de que os participantes neste estudo foram recrutados em estádios precoces da infecção por VIH (I-II), com contagens medianas de linfócitos TCD4<sup>+</sup> no grupo dos mono e coinfectados de 363 céls/ $\mu$ L e 327 céls/ $\mu$ L, respectivamente, e sem exposição prévia à TARV, podendo sugerir que o diagnóstico da infecção por VIH começa a ser feito mais cedo.

Com base no que foi aqui exposto, o presente estudo pode servir como base para que se possam fazer outros prospectivos para avaliar a evolução clínica e resposta a terapêutica antivírica em indivíduos coinfectados portadores dos genótipos aqui descritos.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Hugo Alberto Fainboim CE. Epidemiologia da Hepatite B. Tratado de Hepatites Virais e Doenças Associadas. 3ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2013. p. 287-9.
2. Barth RE, Huijgen Q, Taljaard J, Hoepelman AI. Hepatitis B/C and HIV in sub-Saharan Africa: an association between highly prevalent infectious diseases. A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 14(12):e1024-31.
3. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat.* 2004;11(2):97-107.
4. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell.* 1982;29(2):403-15.
5. Girones R, Miller RH. Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology.* 1989;170(2):595-7.
6. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology.* 1994;198(2):489-503.
7. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 1):67-74.
8. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 8):2059-73.
9. Botha JF, Ritchie MJ, Dusheiko GM, Mouton HW, Kew MC. Hepatitis B virus carrier state in black children in Ovamboland: role of perinatal and horizontal infection. *Lancet.* 1984;1(8388):1210-2.
10. Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus-large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis.* 1997;175(6):1285-93.
11. Zhang Q, Cao G. Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon.* 11(2):86-91.
12. Selma de Andrade NMdA. Genoma do Virus da Hepatite B. Tratado de Hepatites Virais Doenças Associadas. 3ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2013. p. 291-300.
13. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 6):1267-80.
14. Junior FLG. Hepatite por Vírus B: História Natural da Infecção. Tratado de Hepatites Virais e Doenças Associadas. 3ª Edição ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2013. p. 327-39.
15. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 2003;38(5):1075-86.
16. Chen CJ, Iloeje UH, Yang HI. Long-term outcomes in hepatitis B: the REVEAL-HBV study. *Clin Liver Dis.* 2007;11(4):797-816, viii.
17. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet.* 2003;362(9401):2095-100.
18. Liaw YF. Hepatitis flares and hepatitis B e antigen seroconversion: implication in anti-hepatitis B virus therapy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;18(3):246-52.

19. Chu CM, Liaw YF. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with a higher risk of reactivation of hepatitis B and progression to cirrhosis than genotype B: a longitudinal study of hepatitis B e antigen-positive patients with normal aminotransferase levels at baseline. *J Hepatol.* 2005;43(3):411-7.
20. Hsu YS, Chien RN, Yeh CT, Sheen IS, Chiou HY, Chu CM, et al. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2002;35(6):1522-7.
21. Fattovich G, Olivari N, Pasino M, D'Onofrio M, Martone E, Donato F. Long-term outcome of chronic hepatitis B in Caucasian patients: mortality after 25 years. *Gut.* 2008;57(1):84-90.
22. Chu CM, Liaw YF. HBsAg seroclearance in asymptomatic carriers of high endemic areas: appreciably high rates during a long-term follow-up. *Hepatology.* 2007;45(5):1187-92.
23. Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2007;46(1):160-70.
24. Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, Hui CK, Wong DK, Doutreloigne J, et al. Relationship between the development of precore and core promoter mutations and hepatitis B e antigen seroconversion in patients with chronic hepatitis B virus. *J Infect Dis.* 2002;186(9):1335-8.
25. Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, Coco B, Ciccorossi P, Bonino F. Treatment of HBeAg-negative chronic hepatitis B with interferon or pegylated interferon. *J Hepatol.* 2003;39 Suppl 1:S164-7.
26. Feld JJ, Ayers M, El-Ashry D, Mazzulli T, Tellier R, Heathcote EJ. Hepatitis B virus DNA prediction rules for hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2007;46(4):1057-70.
27. Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet.* 2009;373(9663):582-92.
28. Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology.* 2006;130(3):678-86.
29. Iloeje UH, Yang HI, Jen CL, Su J, Wang LY, You SL, et al. Risk and predictors of mortality associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5(8):921-31.
30. Chu CM, Liaw YF. Hepatitis B virus-related cirrhosis: natural history and treatment. *Semin Liver Dis.* 2006;26(2):142-52.
31. Chen YC, Chu CM, Yeh CT, Liaw YF. Natural course following the onset of cirrhosis in patients with chronic hepatitis B: a long-term follow-up study. *Hepatol Int.* 2007;1(1):267-73.
32. Yu MW, Chang HC, Liaw YF, Lin SM, Lee SD, Liu CJ, et al. Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Nat Cancer Inst.* 2000;92(14):1159-64.
33. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med.* 2004;350(11):1118-29.
34. Chu CM, Liaw YF, Pao CC, Huang MJ. The etiology of acute hepatitis superimposed upon previously unrecognized asymptomatic HBsAg carriers. *Hepatology.* 1989;9(3):452-6.
35. Liaw YF, Sheen IS, Chen TJ, Chu CM, Pao CC. Incidence, determinants and significance of delayed clearance of serum HBsAg in chronic hepatitis B virus infection: a prospective study. *Hepatology.* 1991;13(4):627-31.

36. Tsang TK, Blei AT, O'Reilly DJ, Decker R. Clinical significance of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody positivity. *Dig Dis Sci.* 1986;31(6):620-4.
37. Maruyama T, Schodel F, Lino S, Koike K, Yasuda K, Peterson D, et al. Distinguishing between acute and symptomatic chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology.* 1994;106(4):1006-15.
38. Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Sjogren MH, Roumeliotou-Karayannis A, Gerin JL, Purcell RH. Natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greek adults. *Gastroenterology.* 1987;92(6):1844-50.
39. Okada K, Kamiyama I, Inomata M, Imai M, Miyakawa Y. e antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infants. *N Engl J Med.* 1976;294(14):746-9.
40. Beasley RP, Trepo C, Stevens CE, Szmuness W. The e antigen and vertical transmission of hepatitis B surface antigen. *Am J Epidemiol.* 1977;105(2):94-8.
41. Hwang LY, Roggendorf M, Beasley RP, Deinhardt F. Perinatal transmission of hepatitis B virus: role of maternal HBeAg and anti-HBc IgM. *J Med Virol.* 1985;15(3):265-9.
42. Chu CM, Yeh CT, Lee CS, Sheen IS, Liaw YF. Precore stop mutant in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B: clinical characteristics and correlation with the course of HBeAg-to-anti-HBe seroconversion. *J Clin Microbiol.* 2002;40(1):16-21.
43. Yuen MF, Sablon E, Hui CK, Li TM, Yuan HJ, Wong DK, et al. Prognostic factors in severe exacerbation of chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis.* 2003;36(8):979-84.
44. Yuen MF, Yuan HJ, Wong DK, Yuen JC, Wong WM, Chan AO, et al. Prognostic determinants for chronic hepatitis B in Asians: therapeutic implications. *Gut.* 2005;54(11):1610-4.
45. Liaw YF. Hepatitis B virus replication and liver disease progression: the impact of antiviral therapy. *Antivir Ther.* 2006;11(6):669-79.
46. Liaw YF, Tai DI, Chu CM, Chen TJ. The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. *Hepatology.* 1988;8(3):493-6.
47. Lin SM, Yu ML, Lee CM, Chien RN, Sheen IS, Chu CM, et al. Interferon therapy in HBeAg positive chronic hepatitis reduces progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2007;46(1):45-52.
48. Cavalheiro NdP. Genótipos da Hepatite B: Prevalência Global - Implicações Clínicas. *Tratado de Hepatites Virais e Doenças Associadas.* 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2013. p. 301-12.
49. Shiina S, Fujino H, Uta Y, Tagawa K, Unuma T, Yoneyama M, et al. Relationship of HBsAg subtypes with HBeAg/anti-HBe status and chronic liver disease. Part I: Analysis of 1744 HBsAg carriers. *Am J Gastroenterol.* 1991;86(7):866-71.
50. Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology.* 2002;123(6):1848-56.
51. Papatheodoridis GV, Manolakopoulos S, Dusheiko G, Archimandritis AJ. Therapeutic strategies in the management of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2008;8(3):167-78.

52. Cho EY, Choi CS, Cho JH, Kim HC. Association between hepatitis B virus X gene mutations and clinical status in patients with chronic hepatitis B infection. *Gut Liver*.5(1):70-6.
53. Hoff J, Bani-Sadr F, Gassin M, Raffi F. Evaluation of chronic hepatitis B virus (HBV) infection in coinfecting patients receiving lamivudine as a component of anti-human immunodeficiency virus regimens. *Clin Infect Dis*. 2001;32(6):963-9.
54. Benhamou Y, Bochet M, Thibault V, Di Martino V, Caumes E, Bricaire F, et al. Long-term incidence of hepatitis B virus resistance to lamivudine in human immunodeficiency virus-infected patients. *Hepatology*. 1999;30(5):1302-6.
55. Dore GJ, Cooper DA, Barrett C, Goh LE, Thakrar B, Atkins M. Dual efficacy of lamivudine treatment in human immunodeficiency virus/hepatitis B virus-coinfecting persons in a randomized, controlled study (CAESAR). The CAESAR Coordinating Committee. *J Infect Dis*. 1999;180(3):607-13.
56. Hadler SC, Judson FN, O'Malley PM, Altman NL, Penley K, Buchbinder S, et al. Outcome of hepatitis B virus infection in homosexual men and its relation to prior human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*. 1991;163(3):454-9.
57. Thio CL, Seaberg EC, Skolasky R, Jr., Phair J, Visscher B, Munoz A, et al. HIV-1, hepatitis B virus, and risk of liver-related mortality in the Multicenter Cohort Study (MACS). *Lancet*. 2002;360(9349):1921-6.
58. Cunha L, Plouzeau C, Ingrand P, Gudo JP, Ingrand I, Mondlane J, et al. Use of replacement blood donors to study the epidemiology of major blood-borne viruses in the general population of Maputo, Mozambique. *J Med Virol*. 2007;79(12):1832-40.
59. Instituto Nacional de Saúde (INS) INdEsl, e ICF Macro. Inquérito Nacional de Prevalência, Riscos Comportamentais e Informação sobre o HIV e SIDA em Moçambique 2009. In: INS IeIM, editor. Calverton, Maryland, EUA2010.
60. Burnett RJ, Francois G, Kew MC, Leroux-Roels G, Meheus A, Hoosen AA, et al. Hepatitis B virus and human immunodeficiency virus co-infection in sub-Saharan Africa: a call for further investigation. *Liver international : official Journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2005;25(2):201-13.
61. Gisselquist D, Perrin L, Minkin SF. Parallel and overlapping HIV and bloodborne hepatitis epidemics in Africa. *Int J STD & AIDS*. 2004;15(3):145-52.
62. Stokx J, Gillet P, De Weggheleire A, Casas EC, Maendaenda R, Beulane AJ, et al. Seroprevalence of transfusion-transmissible infections and evaluation of the pre-donation screening performance at the Provincial Hospital of Tete, Mozambique. *BMC Infect Dis*. 2011;11:141.
63. Viegas EO, Tembe N, Macovela E, Goncalves E, Augusto O, Ismael N, et al. Incidence of HIV and the prevalence of HIV, hepatitis B and syphilis among youths in Maputo, Mozambique: a cohort study. *PLoS one*. 2015;10(3):e0121452.
64. Kiire CF. The epidemiology and prophylaxis of hepatitis B in sub-Saharan Africa: a view from tropical and subtropical Africa. *Gut*. 1996;38 Suppl 2:S5-12.
65. Uneke CJ, Ogbu O, Inyama PU, Anyanwu GI, Njoku MO, Idoko JH. Prevalence of hepatitis-B surface antigen among blood donors and human immunodeficiency virus-infected patients in Jos, Nigeria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(1):13-6.

66. Kolawole OM, Wahab AA, Adekanle DA, Sibanda T, Okoh AI. Seroprevalence of hepatitis B surface antigenemia and its effects on hematological parameters in pregnant women in Osogbo, Nigeria. *Virology*. 2012;9:317.
67. Laure F, Zagury D, Saimot AG, Gallo RC, Hahn BH, Brechot C. Hepatitis B virus DNA sequences in lymphoid cells from patients with AIDS and AIDS-related complex. *Science*. 1985;229(4713):561-3.
68. Attia KA, Eholie S, Messou E, Danel C, Polneau S, Chenal H, et al. Prevalence and virological profiles of hepatitis B infection in human immunodeficiency virus patients. *World J Hepatol*. 2012;4(7):218-23.
69. Sinicco A, Raiteri R, Sciandra M, Bertone C, Lingua A, Salassa B, et al. Coinfection and superinfection of hepatitis B virus in patients infected with human immunodeficiency virus: no evidence of faster progression to AIDS. *Scand J Infect Dis*. 1997;29(2):111-5.
70. Adekunle AE, Oladimeji AA, Temi AP, Adeseye AI, Akinyeye OA, Taiwo RH. Baseline CD4+ T lymphocyte cell counts, hepatitis B and C viruses seropositivity in adults with Human Immunodeficiency Virus infection at a tertiary hospital in Nigeria. *The Pan Afr Med J*. 2011;9:6.
71. Tai DI, Lin SM, Sheen IS, Chu CM, Lin DY, Liaw YF. Long-term outcome of hepatitis B e antigen-negative hepatitis B surface antigen carriers in relation to changes of alanine aminotransferase levels over time. *Hepatology*. 2009;49(6):1859-67.
72. Herrero Martinez E. Hepatitis B and hepatitis C co-infection in patients with HIV. *Rev Med Virol*. 2001;11(4):253-70.
73. McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2009;49(5 Suppl):S45-55.
74. Chen CF, Lee WC, Yang HI, Chang HC, Jen CL, Iloeje UH, et al. Changes in serum levels of HBV DNA and alanine aminotransferase determine risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2011;141(4):1240-8, 8 e1-2.
75. Kimbi GC, Kramvis A, Kew MC. Distinctive sequence characteristics of subgenotype A1 isolates of hepatitis B virus from South Africa. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 5):1211-20.
76. Gulube Z, Chirara M, Kew M, Tanaka Y, Mizokami M, Kramvis A. Molecular characterization of hepatitis B virus isolates from Zimbabwean blood donors. *J Med Virol*. 2011;83(2):235-44.
77. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol Res*. 2010;40(1):14-30.
78. Lin CL, Kao JH. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(5).
79. Datta S. An overview of molecular epidemiology of hepatitis B virus (HBV) in India. *Virology*. 2008;5:156.
80. Croagh CM, Desmond PV, Bell SJ. Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. *World J Hepatol*. 2015;7(3):289-303.