

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - DEPARTAMENTO DE
ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
DOUTORADO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

RENATA DESSORDI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TENOFOVIR NA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA
DE PACIENTES COM HEPATITE B CRÔNICA NÃO INFECTADOS PELO HIV**

Araraquara

2019

RENATA DESSORDI

**Avaliação dos efeitos do tenofovir na densidade mineral óssea de
pacientes com hepatite B crônica não infectados pelo HIV**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição com Ênfase em Ciências Nutricionais.

Área de Concentração: Ciências Nutricionais

Orientador: Prof. Dr. Anderson Marliere Navarro.

Araraquara

2019

D475a Dessordi, Renata.
Avaliação dos efeitos do tenofovir na densidade mineral óssea de pacientes com hepatite B crônica não infectados pelo HIV / Renata Dessordi. – Araraquara, 2019.
71 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração em Ciências Nutricionais.

Orientador: Anderson Marliere Navarro.

1. Tenofovir. 2. Hepatite B. 3. Densidade óssea. 4. Osteopenia. I. Navarro, Anderson Marliere, orient. II. Título

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

CAPES: 33004030055P6
Esta ficha não pode ser modificada

DESSORDI, Renata

Avaliação dos efeitos do tenofovir na densidade mineral óssea de pacientes com hepatite B crônica não infectados pelo HIV

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Doutor em Alimentos em Nutrição com Ênfase em Ciências Nutricionais.

Aprovada em: 4/07/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. Anderson Marliere Navarro (Orientador)

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – FMRP/USP

Julgamento: Aprovado

Prof.^a Dr.^a. Rebeca Antunes Beraldo

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – FMRP/USP

Julgamento: Aprovado

Prof.^a Dr.^a Vivian Marques Miguel Suen

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – FMRP/USP

Julgamento: Aprovado

Prof.^a Dr^a Elen Almeida Romão

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo –
FMRP/USP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Rodrigo de Carvalho Santana

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo –
FMRP/USP

Julgamento: Aprovado

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Carmem e Rogério, e avós, Renato e
Aparecida, por todo o apoio e ajuda.
AMO VOCÊS!*

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pela bolsa e apoio concedido, processo n°. 2016/19284-7.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, fonte de toda minha força e esperança, por sempre estar ao meu lado iluminando meu caminho e minhas escolhas e por ter me dado força e coragem para completar mais uma etapa. Seu amparo diário se revela em todos os momentos da minha vida.

*Ao meu orientador **Anderson Marliere Navarro** por ter me concedido a oportunidade de ser sua aluna e por ter contribuído para a realização da minha meta profissional, ser docente. Obrigada por todas as lições, pelo apoio, paciência, compreensão, tolerância e amizade! Serei eternamente grata!!*

*Ao prof. Dr. **Rodrigo C. Santana**, por toda ajuda, atenção, incentivo e pela gentileza e disposição em me ensinar. Levarei o seu exemplo de apoio e dedicação para a minha vida profissional como docente.*

*A professora Dra. **Elen Almeida Romão**, por toda atenção e colaboração com a minha pesquisa. Seu apoio foi fundamental para a conclusão deste trabalho e tenho a sua dedicação e gentileza como um exemplo a ser seguido.*

*Ao meu namorado **Hugo**, pelo apoio, carinho e tolerância em mais uma etapa da minha vida que concluo. Sua presença alegrou o meu coração e me traz tranquilidade! Você é muito especial pra mim!*

*Aos meus amigos da pós-graduação, por todos os momentos compartilhados e por toda a ajuda que me proporcionaram. Em especial à **Ligia Watanabe, Mariana Guimarães e Rebeca Beraldo**. Jamais me esquecerei de vocês! Obrigada!*

*Aos técnicos dos laboratórios, em especial a **Marta Nakao e Maria Inês**, pela paciência e por toda a ajuda dedicada à realização desse trabalho. **MUITO OBRIGADA!***

A todos os professores da FCFAR-UNESP e da FMRP-USP, pelo auxílio e atenção dispensados.

*E a todos os amigos que direta ou indiretamente se envolveram na realização deste trabalho. **MUITO OBRIGADA!***

RESUMO

A hepatite B é um importante problema de saúde pública mundial e se associa a consideráveis taxas de mortalidade. As medicações de uso oral para o tratamento da hepatite B, denominados em conjunto de análogos de nucleosídeo/nucleotídeo, são de uso prolongado e apresentam potenciais efeitos colaterais, como a redução na densidade mineral óssea que está associada ao uso do tenofovir. Objetivo: avaliar os efeitos do tenofovir, em comparação com outros análogos de nucleosídeo/nucleotídeo (entecavir e lamivudina), sobre a densidade mineral óssea de um grupo de pacientes com hepatite B crônica. Materiais e Métodos: foi realizado um estudo observacional do tipo transversal com 81 pacientes adultos, com Hepatite B crônica atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP nos quais realizou-se os exames de densitometria óssea (dual energy x-ray absorptiometry-DXA), análises bioquímicas de osteocalcina, deoxipiridinolina, vitamina D, paratormônio, IGF-1, TSH, testosterona, estradiol, FSH, transaminases, ureia, creatinina, cálcio total, fósforo sérico e urinário, magnésio, FGF-23 e medidas antropométricas (peso, altura e índice massa corporal). Os participantes, de ambos os sexos, foram subdivididos segundo o uso ou não de antirretrovirais sendo: Grupo 1: 27 pacientes portadores inativos do vírus sem uso de medicamentos; Grupo 2: 27 pacientes em uso de Tenofovir; Grupo 3: 27 pacientes em uso de Lamivudina ou Entecavir. Resultados: não houve diferença entre a idade média e índice de massa corpórea dos pacientes em ambos os grupos de estudo ($p>0.05$). Foi encontrado osteopenia nas leituras de DXA para coluna lombar dos Grupos 1: 7.4%; Grupo 2: 14.8% e Grupo 3: 3.7%. Observou-se que o marcador de formação óssea, osteocalcina estava com valores normais para todos os grupos, assim como os valores de paratormônio, IGF-1 e FGF-23. O marcador de reabsorção óssea, a deoxipiridinolina urinária, em todos os grupos apresentaram valores aumentados. Os minerais cálcio, fósforo sério e urinário e magnésio estavam adequados para todos os grupos. Conclusão: o aumento no marcador de reabsorção óssea indicou uma alta atividade reabsortiva do tecido ósseo. Estes dados apontam para uma maior atividade osteoclástica na perda óssea em pacientes infectados pelo vírus da Hepatite B sem e com o uso dos antirretrovirais.

Palavras - chave: Tenofovir; Hepatite B; Densidade óssea; Osteopenia

ABSTRACT

Hepatitis B is one the most important public health problem worldwide and is associated with considerably high mortality rates. Oral medications, generally nucleoside/nucleotide analogs such as tenofovir, have been used as long-term therapy and have possible side effects such as the reduction in bone mineral density associated with their use. Objective: to evaluate the effects of tenofovir, compared with those of other nucleoside/nucleotide analogs (entecavir and lamivudine), on the bone mineral density of hepatitis B patients. Materials and Methods: a cross-sectional study was conducted with 81 adult patients with chronic hepatitis B treated. The average age of the participants was 42 years. Dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) was performed to assess bone mineral density. Biochemical analyses were performed for osteocalcin, deoxypyridinoline, parathyroid hormone, vitamin D, IGF-1, TSH, testosterone, estradiol, FSH, transaminases, urea, creatinine, calcium, serum and urinary phosphorus, magnesium, FGF-23 and anthropometric measures of weight, height, and body mass index were performed. Participants, both gender, were divided according to the use of antiretrovirals: Group 1: 27 inactive virus carriers without medication; Group 2: 27 patients using tenofovir; Group 3: 27 patients using lamivudine or entecavir. Results: We did not find differences in mean age, body mass index, lean and fat mass between patients in both groups ($p>0.05$). DXA readings diagnosed osteopenia in the lumbar spine for 7.4% individuals in Group 1, 15% in Group 2 and 3.7% in Group 3. For all groups we observed normal values in bone formation markers, osteocalcin levels as well as parathyroid hormone, insulin growth factor 1 and FGF-23. In all groups, we found increased levels of urinary deoxypyridinoline, a bone resorption marker. Normal levels of calcium, phosphorus (serum and urine) and magnesium were observed. Conclusion: Increased levels in the bone resorption markers indicated a high resorptive activity of bone tissue. These data emphasized a greater osteoclastic activity that led to bone loss in hepatitis B virus-infected patients both treated or not with antiretrovirals.

Keywords: Tenofovir; Hepatitis B; bone mineral density; Osteopenia

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
------------------	----

Capítulo 1. Influence of antiretroviral therapy on bone metabolism of patients with chronic hepatitis B	15
ABSTRACT	17
1. Introduction	18
2. Hepatitis B: General Considerations	18
3. Viral Replication	19
4. Antiretroviral Therapy	20
5. Bone Tissue	21
6. Bone Metabolism	23
7. Effects of Bone Metabolism and Antiretrovirus	24
8. Conclusion	26
Acknowledgment	26
REFERENCES	26

Capítulo 2. Perda óssea em paciente com hepatite B crônica está associada com aumento na atividade osteoclástica independente do uso de antirretrovirais	36
ABSTRACT	38
Introdução	39
Casuística e Métodos	41
Considerações Éticas	41
Casuística	41
Critérios de inclusão	42
Critérios de exclusão	42
Tamanho da Amostra	42
Métodos	43
Desenho do Estudo	43
Avaliação da Densidade Mineral Óssea	44
Marcadores Séricos de Lesão e Função Hepática	44

Marcadores Envolvidos no Metabolismo Ósseo	45
Avaliação Antropométrica.....	46
Avaliação Dietética.....	46
Análise Estatística.....	47
Resultados.....	47
Discussão	49
Conclusão.....	52
Agradecimentos:.....	52
Referencias	53
Tabelas	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERENCIAS	68

INTRODUÇÃO

A hepatite B é uma das infecções crônicas mais comuns e configura-se como importante problema de saúde pública mundial [1]. Estima-se que 2 bilhões de pessoas já se infectaram, em todo o mundo, e que cerca de 350 a 400 milhões de pessoas sejam portadores da infecção crônica pelo vírus da hepatite B (VHB) [2]. A carga imposta pela hepatite B crônica (HBC) é elevada, sendo responsável por cerca de 600.000 mortes anuais por complicações relacionadas à doença hepática, como a cirrose e o carcinoma hepatocelular [4, 5]. Novos dados da World Health Organization (WHO) revelam que cerca de 257 milhões de pessoas no mundo vivem com esta infecção crônica pelo vírus da hepatite B, sendo que as hepatites virais foram responsáveis por cerca de 887 mil de mortes em 2015 por complicações como cirrose e carcinoma hepatocelular [6].

No Brasil, foram notificados 120.343 casos de hepatite B, dentre infecções agudas e crônicas, no período de 1999 a 2011. A maioria dos casos notificados foi das regiões Sudeste (36,3%) e Sul (31,6%). Entre 2000 e 2011, foram declarados 9659 óbitos relacionados à hepatite B no país [7]. No entanto, a real dimensão do problema no Brasil não é completamente conhecida devido à subnotificação dos casos diagnosticados e do desconhecimento do diagnóstico por parte de muitos indivíduos infectados. Dados atuais relatam aproximadamente 17.000 novos casos anualmente, o que contribui para evidenciar o impacto da doença no território brasileiro [8].

Os esforços para tentar conter ou minimizar o impacto da hepatite B na saúde coletiva e individual se relacionam com medidas preventivas e terapêuticas. A prevenção de novas infecções é obtida de maneira eficiente através da vacinação e, em determinadas situações, também com o uso da imunoglobulina humana anti-hepatite B [9]. Já os indivíduos cronicamente infectados devem ser regularmente acompanhados e tratados de acordo com o estadiamento da doença, o qual se baseia em parâmetros clínicos, níveis de aminotransferases, nível de replicação viral e aspectos relacionados à histologia hepática.

Atualmente, o tratamento da HBC é realizado com medicações que pertencem a dois grupos principais: os agentes imunomoduladores (os interferons) e os análogos de nucleosídeo/nucleotídeo (ANN). Neste último grupo estão incluídas as medicações mais frequentemente usadas, com destaque para o entecavir e o tenofovir, que configuram

drogas de primeira linha. Os objetivos do tratamento são melhorar a qualidade de vida, prevenir o desenvolvimento de cirrose do fígado e suas complicações e o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular [10,3]. Para atingir estes objetivos, as medicações de uso oral (ANN) são utilizadas por longo período, às vezes por toda a vida, dependendo dos parâmetros de resposta ao tratamento apresentados pelo paciente [11]. O VHB trata-se de um vírus DNA que infecta hepatócitos e estabelece um mini cromossoma (cccDNA) que atua como modelo para replicação do vírus e produção antigênica. A terapia antirretroviral suprime a replicação viral, mas não elimina com sucesso o cccDNA, levando assim ao rebote viral e ao desenvolvimento de complicações hepáticas se o tratamento for interrompido [1]. Assim, a escolha da medicação depende da avaliação dos potenciais efeitos adversos, além de sua eficácia na redução da replicação viral. Conforme referido anteriormente, o tenofovir assume papel central no tratamento atual da HBC, pela sua elevada potência antiviral e alta barreira genética, prevenindo o desenvolvimento da resistência viral. Atualmente, não há relatos convincentes de resistência de cepas do VHB ao tenofovir [12]. Se por um lado estas características farmacológicas definem o tenofovir como medicação de primeira linha, por outro, seu uso prolongado se associa com potenciais efeitos adversos, como nefrotoxicidade e redução da densidade mineral óssea [13].

Muito do que se conhece sobre os efeitos adversos do tenofovir vem da experiência acumulada no tratamento de pacientes infectados pelo vírus HIV, já que esta medicação também faz parte do arsenal de medicações antirretrovirais. Acredita-se que a presença de proteínas virais específicas [14, 15] e o estado pró-inflamatório decorrente da infecção pelo HIV [16, 17, 18] exerçam efeito inibitório sobre os osteoblastos e estimulem a atividade osteoclástica. A redução na massa óssea e a incidência de fraturas têm sido verificadas com maior frequência em adultos infectados pelo HIV em comparação com controles não infectados [19, 20], em especial naqueles em uso do tenofovir [21].

São escassos os dados sobre os efeitos dos ANN, incluindo o tenofovir em pacientes com hepatite B não infectados pelo HIV. Alguns estudos verificaram que a redução na densidade mineral óssea (osteopenia ou osteoporose) é achado frequente entre pacientes com HBC [22, 23, 24]. Entretanto, os efeitos dos ANN sobre a perda de massa óssea não estão bem definidos. Viganò e cols. [25] verificaram uma prevalência de 68% de redução na densidade mineral óssea (osteopenia ou osteoporose) entre

pacientes com HBC. Os fatores independentemente associados à redução na densidade óssea foram a idade, gênero e o uso de ANN. No entanto, neste estudo os ANN foram avaliados globalmente, sem avaliação separada dos efeitos do tenofovir. Em outro estudo [26], a redução na densidade mineral óssea, em pacientes em uso de ANN, ocorreu em uma minoria dos casos durante um período de 16 meses. Já no estudo de Gill e cols. [27] a prevalência de osteopenia e osteoporose foi semelhante entre pacientes com HBC, em uso do tenofovir, e nos controles sem uso da medicação. Neste estudo a deficiência de vitamina D, e não o uso do tenofovir foi o fator associado à perda de massa óssea. De fato, deficiência de vitamina D parece ser comum entre pacientes com HBC. Em estudo com 357 pacientes com HBC, níveis reduzidos de vitamina D foram encontrados em 91% dos pacientes [28]. Em estudo realizado por Nguyen e cols. [29], deficiência de vitamina D foi detectada em 81,3% de pacientes com HBC. O uso do tenofovir ou do entecavir não se associou com alterações nos níveis de vitamina D durante os 12 meses de avaliação neste estudo.

Ainda existem muitas lacunas no conhecimento sobre as alterações no metabolismo ósseo decorrente da infecção crônica pelo VHB e pelo uso dos ANN [22, 29]. Considerando que o tenofovir constitui medicação de primeira linha no tratamento da HBC e que o uso dos ANN é feito por período prolongado, a monitorização de potenciais efeitos adversos é um dos aspectos básicos do tratamento. Dentre estes efeitos, as alterações no metabolismo e na densidade mineral óssea são escassamente conhecidas em pacientes com HBC em uso dos ANN. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi comparar a densidade mineral óssea de pacientes com HBC, em uso prolongado do tenofovir, com a de pacientes em uso prolongado de entecavir e lamivudina e pacientes sem uso de medicamentos.

Capítulo 1.

Influence of antiretroviral therapy on bone metabolism of patients with chronic hepatitis B

Artigo de Revisão enviado para publicação para a revista Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine

Qualis: B1

INFLUENCE OF ANTIRETROVIRAL THERAPY ON BONE METABOLISM OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B: A REVIEW

Authors: Renata Dessordi¹, Rodrigo Carvalho², Anderson Marliere Navarro²

Affiliation:

¹Department of Food and Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, State University of São Paulo - UNESP.

²Department of Clinical Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo - FMRP/USP.

Corresponding Author: Renata Dessordi. Address: Bandeirantes Avenue, 3900. Monte Alegre, 14049-900. Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Phone-fax: (55) (16) 3602 2466. E-mail: re_dessordi@hotmail.com

ABSTRACT

Hepatitis B is a major public health problem worldwide and is associated with significant mortality. To prevent or delay the deleterious effects of chronic viral infection by the hepatitis B virus patients should be carefully followed and, antiviral therapy indicated according to specific recommendations. Currently, available drugs inhibit viral replication and slow or stop the progression of inflammation and fibrosis of the liver. However, the drugs for oral use in the treatment of hepatitis B, jointly referred to as nucleoside/nucleotide analogs, are for prolonged use and have potential side effects. The reduction in bone mineral density was associated with the use of tenofovir, already evaluated in patients infected with HIV because the drug is also part of the therapeutic arsenal for this viral infection. There are few studies on the effects of tenofovir in patients with mono hepatitis B. Therefore this literature review proposes to consider how hepatitis B acts in the body and, the mechanisms by which antiretroviral drugs (especially tenofovir) can affect bone metabolism.

Key words: tenofovir; hepatitis B; bone metabolism; bone health

1. Introduction

Hepatitis B is the most common chronic infections and is an important public health problem in the world¹. It is estimated that two billion people have already become infected worldwide and that some 350-400 million people infected with chronic hepatitis B virus (HBV)^{2,3}. The load imposed by chronic hepatitis B (CHB) is high, accounting for about 600,000 deaths annually due to complications related to liver diseases such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma.^{4,5} New data from the World Health Organization show that about 257 million people worldwide are living with chronic hepatitis B virus and viral hepatitis was responsible for about 887,000 deaths in 2015 due to complications such as cirrhosis and, hepatocellular carcinoma.^{6,7}

Currently, CHB is treated with medications that belong to two main groups: immunomodulatory agents (interferons) and analogs of nucleoside/nucleotide (ANN). The latter group includes the most frequently used medications, especially entecavir and tenofovir, which are first-line drugs. The goals of treatment are to improve the quality of life to prevent the development of liver cirrhosis and its complications and, prevent the development of hepatocellular carcinoma^{8,3}. To achieve these goals oral medications (ANNs) used over a long period of time sometimes for a lifetime, depending on the patient's response to treatment parameters⁹.

Data on the effects of ANNs in non-HIV infected patients with hepatitis B are scarce. Some studies have found that the reduction in bone mineral density (osteopenia or osteoporosis) is frequently diagnosed in patients with HBV using the drug tenofovir. However, the effects of the ANN on bone loss is not well defined^{10,11, 12}.

Based on these gaps in the knowledge about changes in bone metabolism due to chronic HBV infection and the use of ANNs, this review of the literature proposes to examine how the hepatitis B virus acts in the body and the mechanisms by which antiretroviral drugs, especially tenofovir, can affect bone metabolism.

2. Hepatitis B: General Considerations

Viral hepatitis B is caused by a DNA virus belonging to the family Hepadnaviridae. DNA viruses belonging to this family have characteristics such as an incomplete double

strand, and the reverse transcriptase enzyme is responsible for the replication of the viral genome. When analyzing the genome of this virus, it becomes possible to observe a circular and, partially duplicated DNA of approximately 3,200 base pairs and, one of its strands is smaller when compared to another. The surface antigen of hepatitis B (HBsAg) comprises spherical viral particles (42 nm) composed of an external envelope protein. HBV has ten different genotypes and ratings from A to J and is considered to be an oncogenic virus. These genotypes and, ratings differentiated by the nucleotide sequence in the genome pathogenicity and, geographical distribution^{13,14,15,16,17}.

Clinical manifestations of the disease will depend on each patient and, the most chronically infected patients acquire the virus early in life^{18,19,20}. Transmissions can occur sexually or can be perinatal and bloodborne. Virus genotypes and their global distribution are associated with the form of transmission. In Asian countries, predominant genotypes are B and C, which are transmitted perinatally (from mother to child)^{19,21}.

Estimates of people with HBV are approximately 240 million. Patients with chronic hepatitis B cannot eradicate the virus of your body by the circular DNA the presence of covalently closed (cccDNA) in the nuclei of infected hepatocytes^{22,23,24}. This viral feature only allows the patient to control viral replication through the use of antiretroviral drugs and, therefore currently the goal of treatment is reducing the risk of complications for virologic suppression^{25,22,26,27}.

3. Viral Replication

Infection with hepatitis B virus begins in hepatocytes, which form cccDNA stable mini-chromosomes in the nucleus, which is the first step of viral replication called transcription. Subsequently, five species of RNA messengers are formed: main mRNA/pregenomic (3.5 kb), precore mRNA (3.5 kb), mRNA LHBs (2.4 kb), mRNA SHBs (2,1 kb) and X mRNA (0.9 kb). The pregenomic mRNA is the precursor to the synthesis of viral DNA genome reverse transcriptase. Thus, the viral genome encapsidated by the core protein of hepatitis B virus (HBcAg) is packaged by the proteins of hepatitis B surface (HBs) in the endoplasmic reticulum and, then new viral particles are secreted into the bloodstream, resulting in a large number of new virions^{28,29}. Therefore, measurement of serum HBV DNA can provide an estimate of viral replication and widely used as a marker

for the efficacy of antiretroviral drugs. However, nucleoside/nucleotide analogs are able to act only in limited stages of the viral replication cycle and, the production of intermediate viral proteins may not be significantly affected. Thus, measurement of viral proteins can be useful for monitoring the activity of HBV, especially in patients receiving drugs when DNA levels are undetectable in HBV. One way of detection is by quantification of HBsAg, which is found in virus particles in spherical or filamentous forms. Another indicator of viral DNA levels that may be used is HBcrAg^{30,22}.

4. Antiretroviral Therapy

Antiretroviral therapy for the control of viral replication is carried out with medications known as immunomodulatory agents (interferon) and analogs of nucleoside/nucleotide³.

After starting treatment for viral control with antiretroviral therapy the patients may reach a stage where viral DNA is undetectable, but most of them will have persistent infection^{31,32}. Studies show that patients taking drugs such as interferon, lamivudine, entecavir or tenofovir for 126 months on average had undetectable viral DNA, but detectable intrahepatic cccDNA^{33,34,22}.

Regarding the decision on the initiation of antiretroviral therapy, studies suggest that it should be based, on individual and family characteristics assessing the history of liver cirrhosis, comorbidities, and pregnancy. In addition, the clinical profile must be analyzed serological (HbeAg) increased levels of transaminases and hepatic histology when possible^{8,13}. The primary goal of drug therapy is to reduce the progression of liver disease and, consequently prevent the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma^{6,13}.

Patients may be receiving monotherapy or a combination of two antiretroviral drugs depending on the case. Cases of unsatisfactory suppression of viral replication may be indicative of a combination of antiretrovirals. The drugs tenofovir and entecavir are considered to be the first-line treatment of hepatitis B and inhibitors of the enzyme reverse transcriptase. The choice of tenofovir is based on its high-potency viral suppression and, a high genetic barrier against viral resistance mutations⁵. However, this drug can cause kidney toxicity and, bone demineralization and when there is either of these manifestations in the patient, we recommend the use of entecavir^{36,37}.

Entecavir despite, being widely used in viral control has reduced effectiveness in the presence of viral mutations in patients administered with nucleoside analogs such as lamivudine. Therefore, it is necessary to know the clinical history of each patient so that the best antiretroviral therapy may be chosen because the antiviral drugs tenofovir and entecavir are excreted by the kidneys and patients with kidney disease may require adjustments in dosing^{38,26}.

With the knowledge of the viral action in the human body and based on the evidence of bone changes that chronic use of antiretroviral drugs such as tenofovir can cause in the body, it is necessary to understand how the bone is made, the operation of bone metabolism and action of antiretroviral drugs in the system.

5. Bone Tissue

Bone tissue is composed of compact and cortical bone (80%), and the diaphysis of long bones consists mainly of cortical bone, and the remaining 20% of the skeleton formed by trabecular or spongy bone. Surrounded by, these two types of structures is the bone marrow^{39,40,41,42,43,44}. The trabecular bone has a lower density than the cortical bone and interconnects and supports the cortical bone shell of long bones. Based on bone formation it was observed, that the loss of trabecular bone during life can predispose an increased risk of fractures^{39,42,45,46}.

Osteoblasts are mononuclear cells that produce osteoids and, are responsible for bone formation⁴¹. The maturation, differentiation and survival of these cells are connected to different kinds of growth and hormonal factors such as bone morphogenetic protein (BMP), wntless protein (Wnt), β growth factor (TGF- β), parathyroid hormone (PTH), growth factor derived from platelets (PDGFs), and fibroblast growth factor (FGF)^{45,42,46,47}.

The osteoclasts are responsible for bone resorption, removing the old bone⁴³. These cells participate in osteoclastogenesis, and it is known that different types of mediators participate in this process, such as nuclear κ - β factor, RANKL, osteopontin, parathyroid hormone (PTH), stimulating factor macrophage colony (M-CSF) and angiotensin II. The osteoclast can exert an effect on osteoclastogenesis in 3 ways: RANKL mediated, M-CSF mediated and by the tyrosine-based immunoreceptor (ITAMs). RANKL is a key factor in promoting osteoclast differentiation by binding to the cell surface receptor

monocyte–macrophage lineage cells, can inhibit the apoptosis induction by anti-apoptotic β kinase enzyme (PKB) and is also responsible for the production of ROS (reactive oxygen species), potent inducer of osteoclastogenesis^{42,46,48}. The dominant path regulating osteoclast differentiation is the RANKL/RANK/OPG osteoblasts, which promote the osteoclast differentiation by RANKL binding to a RANK receptor in membrane mononuclear osteoclast precursors. The osteoclast differentiation by RANKL is inhibited by osteoprotegerin (OPG) also produced by osteoblasts^{45,49,50,51}.

Addressing, bone remodeling the process of resorption is faster than formation which requires 3 to 6 months or up, to 1 year (elderly) to occur. Resorption of organic and mineral components, of bone, occurs first with, the formation of small cavities in bone surfaces and subsequently the formation of new bone occurs. This process of formation and, resorption is activated by specific hormones and cytokines, and after the process is complete the result is a new and healthy bone^{45,42,52}.

The remodeling process occurs in small clusters of cells called basic multicellular bone remodeling units and is characterized by coupling the functions of osteoclasts, osteoblasts, and osteocytes. Each unit is spatially, and chronologically separated from the other sets, suggesting that the activation sequence of cellular events responsible for remodeling is also controlled locally by factors generated in the bone microenvironment^{45,49,53,54}.

Bone loss is linked, to the deterioration of the collagen-forming organic matrix of bone as well as gradual imbalance in the remodeling process⁵⁵. Usually, bone loss is accompanied by deterioration of the bone architecture, resulting in a reduction in the number of trabecular in the spongy bone, increasing intertrabecular distance and leading to loss of trabecular connectivity. In addition, a reduction in cortical bone thickness and an increase in the porosity of the trabecular bone may result in femoral fragility⁵⁶.

Bone quality can be defined by addressing the bone characteristics of stiffness, the bone capacity to withstand deformations, flexibility, ability to deform to allow energy absorption during an impact and should be light to allow movement. Bone homeostasis between stiffness and flexibility varies according to bone mineral content, therefore the higher the mineral content the greater the stiffness and the less flexibility. The bone strength is mainly determined by the bone mass, which is reflected by bone mineral density (BMD) and microarchitecture. Therefore, bone strength arises from the bone

quantity and quality, the latter of which encompasses the geometrical and material factors that contribute to resistance to fracture. Bone quality is not specifically defined is described as a combination of all the factors that determine the strength of the skeleton fractures such as the microarchitecture of accumulated microscopic damages, collagen quality, size of mineral crystals and, bone turnover rate. From this definition, can be observed that BMD can account for 70-75% of the variation in bone strength while the rest may be related to other factors such as the accumulation of microfractures, altered microarchitecture, disordered bone remodeling or the influence of skeletal extra factors^{47,56,57}.

6. Bone Metabolism

The main minerals that comprise bone mineral content are calcium, phosphorus, and magnesium. These minerals are regulated by parathyroid hormone, calcitocin, and 1,25-dihydroxy vitamin D and are absorbed by the intestine. The intestinal absorption needs to attend to the increase of the bone mass during the growth phase and during the bone remodeling in the adult phase^{58,59}.

Parathyroid hormone (PTH) is a polypeptide hormone synthesized by the parathyroid glands and, has as its main functionalities the release of calcium in the extracellular fluid, conversion of 25-hydroxycholecalciferol to 1,25-dihydroxy vitamin D, reduction in phosphate reabsorption by renal tubules and, increased calcium reabsorption^{60,61}. In addition, vitamins and minerals are also essential for maintaining bone health. Vitamin D is a vital nutrient for the maintenance of bone mineralization and bone mass throughout life. The active form of this vitamin is 1,25-dihydroxy vitamin D which is responsible for the maintenance of calcium and phosphorus homeostasis and, increases the absorption of calcium in the intestine. The main function of vitamin D is to act with PTH in the maintenance of extracellular calcium concentrations^{62,63}.

Calcium is a major mineral that plays many essential functions in our organisms such as vasoconstriction, vasodilation, and the transmission of nerve impulses which is associated with the development, and maintenance of bones^{65,66}. The highest concentrations of calcium in the body are in the bones and teeth, mainly as hydroxyapatite (99%) and 1% is present in the extracellular fluid. The amount of calcium absorbed in the

gastrointestinal tract is related to the bioavailability of dietary calcium and the ability of intestinal absorption^{65,67,68}.

Therefore, proper action of hormones and, adequate intestinal absorption of nutrients are essential in maintaining the bone mass⁶¹.

7. Effects of Bone Metabolism and Antiretrovirus

The third generation of nucleotide analogs, tenofovir, and entecavir, represents the first line of treatment in the control of chronic hepatitis B. Despite the success in viral control studies show potential toxic effects of these drugs associated with indefinite antiretroviral therapy⁶⁹.

Tenofovir (TDF) is a cyclic nucleotide analog of adenosine monophosphate which has emerged as a highly effective drug in the treatment of hepatitis B^{70,71}. Recommended by most medical organizations for liver diseases, it ranks first in the line of antiretroviral drugs. Most research related to this medication is in HIV-positive patients. The focus of concern is based, on adverse effects that this drug may cause bone mineral density⁷². Randomized studies evaluating long-term use of TDF in HIV-positive patients found a reduction in BMD and bone fractures. Another study found, that HIV-positive patients experience increased the risk of osteoporotic fractures with the use of TDF under a highly active antiretroviral therapy^{69,73,74}. The use of TDF was also associated with decreased BMD as compared with the use of other medications (entecavir and lamivudine) in HIV-positive patients, but its effects on BMD in patients with chronic hepatitis B remain unclear and poorly investigated³.

The mechanism of bone toxicity is not clear. We suggest three potential mechanisms that may lead to bone changes: preferential uptake by osteoclasts (altering gene expression and resulting in increased bone resorption), uptake by osteoblasts (altering gene expression and decreased bone formation), and uptake by osteoclasts and osteoblasts (altered gene expression of both cell types and finally the balance between reabsorption and bone formation, resulting in bone loss)⁶⁹.

Concerning its performance in the kidney, renal tubule dysfunction may occur, resulting in hypophosphatemia, abnormalities in vitamin D metabolism, and defects in bone mineralization and, recent studies indicate that TDF is responsible for altering gene

expression and function of osteoblasts. In the kidney, tenofovir disoproxil fumarate is hydrolyzed into tenofovir and subsequently phosphorylated into tenofovir-diphosphate (active metabolite) by cellular kinases. TDF is excreted by the kidneys through a combination of glomerular filtration and active tubular secretion and, the main renal excretion mechanism involves the absorption of TDF on the basolateral side of the proximal tubular cell through human ion carrier 1 and protein multiple drug resistance (PTNR)^{73,75}. Literature studies indicate that the use of TDF for approximately seven years is safe and effective and that adverse renal effects occur in patients with a predisposition to kidney disease or comorbidities. But many studies have shown that prolonged use may lead to the development of Fanconi syndrome, which leads to the deregulation of calcium and phosphorus levels and acute renal failure, osteomalacia and increased risk of fractures. Moreover, it can also lead to metabolic acidosis, glycosuria, and aminoaciduria^{3,73}.

Still evaluating renal function and changes caused by the use of TDF, mainly hypophosphatemia, there is a hormone called fibroblast growth factor 23 (FGF 23) that is involved in phosphate metabolism. This hormone is secreted by osteocytes and in the kidney reduces the expression of sodium phosphate transporters in the proximal tubule through excessive induction of phosphate loss. FGF-23 is also responsible for inhibiting the hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D, leading to a reduction of 1,25-dihydroxy vitamin D (calcitriol). This mechanism leads to reduced gastrointestinal absorption of calcium and phosphate, so the excessive FGF-23, typical in the congenital osteomalacia cases, is characterized by diminished renal phosphate, hypophosphatemia, low serum calcitriol levels, loss in bone mineralization and increased risk of fractures. Recent studies have evaluated, cases of elevated serum levels of FGF-23 in men with HIV positive who is under TDF drug therapy when the medication was stopped, there was a decline in rates and reversal in the loss of phosphate. Data are still limited concerning TDF influencing the levels of FGF-23 and therefore loss of phosphate, vitamin D metabolism and BMD in patients with chronic hepatitis B^{3,76,77,78}.

In patients who, are HIV-positive and with chronic hepatitis B and C without drug treatment, the presence of liver disease was associated with an increased risk of bone changes in the case of coinfection. Also, studies have suggested that bone loss in chronic viral infection is the result of cumulative interactions and time-dependency between

classical risk factors of the patient for the development of osteoporosis and viral load-associated inflammation and use of antiretroviral^{73,79,80}.

8. Conclusion

Studies on bone metabolism and how it can be affected by factors such as chronic infections and medicine continue to evolve, and a better understanding of the physiology of bone loss is still a major challenge.

The changes caused by the antiretroviral regime, especially by the drug tenofovir, should continue to be investigated so early-onset comorbidities that affect the quality of life of the patient, such as osteopenia/osteoporosis, can be diagnosed.

Therefore, new therapeutic strategies need to be studied and explored to prevent or reverse bone changes and better understand the mechanisms by which these disorders develop for a better quality of life for patients with chronic hepatitis B.

Acknowledgment

I would like to thank the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES), finance code 001 and, Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) for the support provided for grant #2016/19284-7.

REFERENCES

1. Rivino L, Le-Bert N, Gill US, Kunasegaran K, Cheng Y, Damien Z M, et al. Hepatitis B virus-specific T cells associate with viral control upon nucleos(t)ide-analogue therapy discontinuation. *J Clin Invest*. 2018;128(2):668-681.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol*. 2003;39 Suppl (1):S64-9.

3. Saeedi R, Mojebi-Mogharar A, Sandhu SK, Dubland JA, Ford JA, Yousefi M et al. Lamivudine, Entecavir, or Tenofovir treatment of hepatitis B infection: effects on calcium, phosphate, FGF23 and indicators of bone metabolism. *Ann Hepatol.* 2017;16(2):207-214.
4. 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.
5. Centers of Disease Control and Prevention CDC. Recommendations and Reports [Internet]. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention CDC; 2006 [update 2006 Dec 8; cited 2018 Nov 19]. Available from: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5516a2.htm?s_cid=rr5516a2_e.
6. World Health Organization. Global hepatitis report. Geneva: World Health Organization; 2017 [update 2017 Apr 3; cited Aug 23]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>.
7. Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(7):395-403.
8. European Association For The Study Of The L. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2012;57(1):167-85.
9. Yapali S, Talaat N, Lok AS. Management of hepatitis B: our practice and how it relates to the guidelines. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014;12(1):16-26.
10. Gill US, Al-shamma S, Burke K, Ross V, Marley RTC, Kooner P, et al. Bone mineral density loss in tenofovir treated Chronic Hepatitis B Virus (HBV) patients is a consequence of Vitamin D deficiency and not Tenofovir therapy. *Gut.* 2011;60(Suppl 2):A28.
11. Vigano M, Lampertico P, Soffredini R, Invernizzi F, Chiodini I, Facchetti F, et al. Decline of Bone Mineral Density during Long-Term Nucleos(T)ide Analog Therapy: A

Longitudinal Cohort Study of 135 Patients with Chronic Hepatitis B. *Journal of hepatology*. 2012;(56):S216-S.

12. Vigano M, Lampertico P, Eller-Vainicher C, Soffredini R, Facchetti F, Chiodini I, et al. High Prevalence of Reduced Bone Mineral Density in Patients with Chronic Hepatitis B under Nucleos(T)ides Analogues Treatment. *Hepatology*. 2010;52(4):526A-A.

13. Ministry of Health. Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines for Hepatitis B and Coinfections. 2017 [update 2017 Sep 27]. Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2016/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-hepatite-b-e-coinfecoes>.

14. Seetharam A, Perrillo R, Gish, R. Immunosuppression in patients with chronic hepatitis B. *Curr Hepatol Rep*. 2014;(13):235-244.

15. Taylor JM. Hepatitis delta virus. *Virology*. 2006;344; (1):71-76.

16. Lau JY, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet*. 1993;27;342(8883):1335-40.

17. Lin CL, Kao JH. HBV genotypes and variants. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(5):a021436.

18. Abbas, ZW, Raza, SJ. Hepatitis D: scenario in the Asia-Pacific region. *World J Gastroenterol*. 2010;16(5):554-62.

19. Chih-Lin Lin MD, Jia-Horng Kao JH. Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017;31(3):249-255.

20. Beasley RP. Rocks along the road to the control of HBV and HCC. *Ann Epidemiol*. 2009;19(4):231-4.

21. Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *Int J Med Sci.* 2005;2(1):50-57.
22. Mak LY, D. Wong¹ KH, Cheung KS, Seto WK, Lai¹ CL, Yuen MF. Review article: hepatitis B core-related antigen (HBcrAg): na emerging marker for chronic hepatitis B virus infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;47(1):43-54.
23. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2008;49(4):652-7.
24. Bonilla GR, Roberts LR. The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2005;42(5):760-77.
25. Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2016;63(1):261-83.
26. European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2017;67(2):370-398.
27. Yuen MF, Wong DK, Fung J, Ip P, But D, Hung I et al. HBsAg Seroclearance in chronic hepatitis B in Asian patients: replicative level and risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2008;135(4):1192-9.
28. Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol* 2010;(52):282e4.
29. Kao JH. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17(6):643-50.

30. Kimura T, Ohno N, Terada N, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S et al. Hepatitis B virus DNA-negative Dane particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C-terminal arginine-rich domain. *J Biol Chem*. 2005;280(23):21713-9.
31. Wong DK, Yuen MF, Yuan H, Sum SS, Hui CK, Hall J et al. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology*. 2004;40(3):727-37.
32. Song G, Yang R, Rao H, Feng B, Ma H, Jin Q, et al. Serum HBV core-related antigen is a good predictor for spontaneous HBeAg seroconversion in chronic hepatitis B patients. *J Med Virol*. 2017;89(3):463-468.
33. Lai CL, Wong D, Ip P, Kopaniszen M, Seto WK, Fung J, et al. Reduction of covalently closed circular DNA with long-term nucleos(t)ide analogue treatment in chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2017;66(2):275-281.
34. Lutgehetmann M, Volzt T, Quaas A, Zankel M, Fischer C, Dandri M, Petersen J. Sequential combination therapy leads to biochemical and histological improvement despite low ongoing intrahepatic hepatitis B virus replication. *Antivir Ther*. 2008;13(1):57-66.
35. Ke W, Liu L, Zhang C, Ye X, Gao Y, Zhou S, et al. Comparison of efficacy and safety of tenofovir and entecavir in chronic hepatitis B virus infection: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(6):e98865.
36. Grigsby IF, Pham L, Mansky LM, Gopalakrishnan R, Mansky KC. Tenofovir-associated bone density loss. *Ther Clin Risk Manag*. 2010;6:41-7.
37. Liu AY, Vittinghoff E, Sellmeyer DE, Irvin R, Mulligan K, Mayer K, et al. Bone mineral density in HIV-negative men participating in a tenofovir pre-exposure prophylaxis randomized clinical trial in San Francisco. *PLoS One*. 2011;6(8):e23688.

38. Lee JH, Cho Y, Lee DH, Lee M, Yoo JJ, Choi WM, et al. Prior exposure to lamivudine increases entecavir resistance risk in chronic hepatitis B patients without detectable lamivudine resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(3):1730-7.
39. Kohli N, Ho S, Brown SJ, Sawadkar P, Sharma V, Snow M et al. E. Bone remodelling in vitro: Where are we headed?: -A review on the current understanding of physiological bone remodelling and inflammation and the strategies for testing biomaterials in vitro. *Bone.* 2018;110:38-46.
40. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem.* 2010;285(33):25103-8.
41. Mizuno H, Kikuta J, Ishii M. In vivo live imaging of bone cells. *Histochem Cell Biol.* 2018; doi: 10.1007/s00418-018-1638-0.
42. Anderson, JJB. Nutrição e Saúde Óssea. In: L. Kathleen Mahan, Sylvia Escott-Stump, editors. *Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*, 13th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013, p. 614-627.
43. ASBMR 2013 REPORT. Meeting Report on the ASBMR. Topics for basic or clinical research in ASBMR 2013. *Clin Calcium.* 2014;24(1):114-8.
44. Ralston SH. Bone structure and metabolism. *Medicine.* 2013; 41(10):581-585.
45. Taipaleenmäki H. Regulation of Bone Metabolism by microRNAs. *Curr Osteoporos Rep.* 2018;16(1):1-12.
46. Lampropoulos CE, Papaioannou I, D'Cruz DP. Osteoporosis – a risk factor for cardiovascular disease? *Nat Rev Rheumatol.* 2010;8(10):587-98.
47. Kuo TR, Chen CH. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives. *Biomark Res.* 2017;5:18.

48. Hodge JM, Collier FM, Pavlos NJ, Kirkland MA, Nicholson GC. M-CSF potently augments RANKL-induced resorption activation in mature human osteoclasts. *PLoS One*. 2011;6(6):e21462.
49. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010;11(4):219-27.
50. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011;26(2):229-38.
51. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3 Suppl 3:S131-9.
52. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:121-45.
53. Little N, Rogers B, Flannery M. Bone formation, remodelling and healing. *Surgery (Oxford)*. 2011; 29(4):141-145.
54. Pajevic PD, Krause DS. Osteocyte regulation of bone and blood. *Bone*. 2018; S8756-3282(18)30071-1.
55. Shapses SA, Riedt CS. S. Bone, Body Weight, and Weight Reduction: What Are the Concerns? *J Nutr*. 2006;136(6):1453-6.
56. Jackuliak P, Payer J. Osteoporosis, fractures, and diabetes. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:820615.
57. Sanyal A, Gupta A, Bayraktar HH, Kwon RY, Keaveny TM, Kwon Y. Shear strength behavior of human trabecular bone. *J Biomech*. 2012;45(15):2513-9.
58. Florencio-Silva R, Sasso GRS, Cerri ES, Simoes MJ, Cerri OS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:421746.

59. Pacific R. The immune system and bone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010; 503(1):41-53.
60. Datta NS. Osteoporotic fracture and parathyroid hormone. *World J Orthop*. 2011; 18(2):67-74.
61. Ryan JW, Anderson PH, Turner AG, Morris HA. Vitamin D activities and metabolic bone disease. *Clin Chim Acta*. 2013;425:148-52.
62. Rosen CJ, Gallagher JC. The 2011 IOM Report on Vitamin D and Calcium Requirements for North America: Clinical Implications for Providers Treating Patients With Low Bone Mineral Density. *Journal of Clinical Densitometry: Assessment of Skeletal Health*. 2011; 14(2):79-84.
63. Tsiaras WG, Weinstock MA. Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol*. 2011; 91(2):115-24.
64. Carnevale V, Nieddu L, Romagnoli E, Battista C, Mascia ML, Chiodini I, et. al. Regulation of PTH secretion by 25- ydroxyvitamin D and ionized calcium depends on vitamin D status: A study in a large cohort of healthy subjects. *Bone*. 2010; 47:626-630.
65. Chung M, Balk EM, Brendel M, Ip S, Lau J, Lee J, et al. Vitamin D and calcium: a systematic review of health outcomes. *Evid Rep Technol*. 2009; 183:1-420.
66. Bronne F. Calcium nutrition and metabolism. *Dent Clin N Am*. 2003; 47:209-224.
67. Christakos S, Dhawan P, Porta A, Mady LJ, Seth T. Vitamin D and intestinal calcium absorption. *Mol Cell Endocrinol*. 2011; 347(1-2):25-9.
68. Bonjour JP. Calcium and phosphate: a duet of ions playing for bone health. *J Am Coll Nutr*. 2011; 30(5):438S-48S.

69. Gill US, Zissimopoulos A, Al-Shamma S, Burke K, McPhail MJW, Barr DA et al. Assessment of Bone Mineral Density in Tenofovir-Treated Patients With Chronic Hepatitis B: Can the Fracture Risk Assessment Tool Identify Those at Greatest Risk? *J Infect Dis.* 2015;211(3):374-82.
70. Köklü S, Tuna Y, Gülşen MT, Demir M, Köksal AŞ, Koçkar MC, et al. Long-term efficacy and safety of lamivudine, entecavir, and tenofovir for treatment of hepatitis B virus-related cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(1):88-94.
71. Fontana RJ. Side effects of long-term oral antiviral therapy for hepatitis B. *Hepatology* 2009; 49:S185-S195.
72. Grigby IF, Pham L, Mansky LM, Gopalakrishnan R, Mansky KC. Tenofovir-associated bone density loss. *Ther Clin Risk Manag* 2010; 2(6):41-7.
73. Maggi P, Montinaro V, Leone A, Fasano M, Volpe A, Bellacosa C. Bone and kidney toxicity induced by nucleotide analogues in patients affected by HBV-related chronic hepatitis: a longitudinal study. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(4):1150-4.
74. Biver E, Calmy A, Rizzoli R. Bone health in HIV and hepatitis B or C infections. *The Adv Musculoskelet Dis.* 2017;9(1):22-34.
75. Hall AM, Hendry BM, Nitsch D, Connolly JO. Tenofovir-associated kidney toxicity in HIV-infected patients: a review of the evidence. *Am J Kidney Dis.* 2011;57(5):773-80.
76. Saeedi R, Jiang SY, Holmes DT, Kendler DL. Fibroblast growth factor 23 is elevated in tenofovir-related hypophosphatemia. *Calcif Tissue Int.* 2014;94(6):665-8.
77. Ramon I, Kleynen P, Body JJ, Karmali R. Fibroblast growth factor 23 and its role in phosphate homeostasis. *Eur J Endocrinol.* 2010;162(1):1-10.

78. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphonate homeostasis. *J Bone Miner Res* 2004; 19:429-35.

79. Gallant J, Staszewski S, Pozniak A, DeJesus E, Suleiman JM, Miller MD et al. Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naïve patients: a randomized trial. *Jama* 2004; 292:191–201.

80. Molina J, Podsadecski T, Johnson MA, Wilkin A, Domingo P, Myers R et al. A lopinavir/ritonavir based oncedaily regimen results in better compliance and is noninferior to a twicedaily regimen through 96 weeks. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23:1505–14.

Capítulo 2.

Perda óssea em paciente com hepatite B crônica está associada com aumento na atividade osteoclástica independente do uso de antirretrovirais

Artigo que será enviado para a revista Journal of Bone and Mineral Metabolism

Qualis: A1

PERDA ÓSSEA EM PACIENTE COM HEPATITE B CRÔNICA ESTÁ ASSOCIADA COM AUMENTO NA ATIVIDADE OSTEOCLÁSTICA INDEPENDENTE DO USO DE ANTIRRETROVIRAIS

Autores: Renata Dessordi¹, Elen Almeida Romão², Rodrigo Santana de Carvalho², Anderson Marliere Navarro²

Filiação:

¹Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmaceuticas do Estado de São Paulo – UNESP.

²Departamento de Clínica Médica, Escola de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP/USP.

Autor correspondente: Renata Dessordi. Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900. Monte Alegre, 14049-900. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Telefone: (55) (16) 3602 2466. E-mail: re_dessordi@hotmail.com

ABSTRACT

Hepatitis B is one the most important public health problem worldwide and is associated with considerably high mortality rates. Oral medications, generally nucleoside/nucleotide analogs such as tenofovir, have been used as long-term therapy and have possible side effects such as the reduction in bone mineral density associated with their use. Objective: to evaluate the effects of tenofovir, compared with those of other nucleoside/nucleotide analogs (entecavir and lamivudine), on the bone mineral density of hepatitis B patients. Materials and Methods: a cross-sectional study was conducted with 81 adult patients with chronic hepatitis B treated. The average age of the participants was 42 years. Dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) was performed to assess bone mineral density. Biochemical analyses were performed for osteocalcin, deoxypyridinoline, parathyroid hormone, vitamin D, IGF-1, TSH, testosterone, estradiol, FSH, transaminases, urea, creatinine, calcium, serum and urinary phosphorus, magnesium, FGF-23 and anthropometric measures of weight, height, and body mass index were performed. Participants, both gender, were divided according to the use of antiretrovirals: Group 1: 27 inactive virus carriers without medication; Group 2: 27 patients using tenofovir; Group 3: 27 patients using lamivudine or entecavir. Results: We did not find differences in mean age, body mass index, lean and fat mass between patients in both groups ($p>0.05$). DXA readings diagnosed osteopenia in the lumbar spine for 7.4% individuals in Group 1, 15% in Group 2 and 3.7% in Group 3. For all groups we observed normal values in bone formation markers, osteocalcin levels as well as parathyroid hormone, insulin growth factor 1 and FGF-23. In all groups, we found increased levels of urinary deoxypyridinoline, a bone resorption marker. Normal levels of calcium, phosphorus (serum and urine) and magnesium were observed. Conclusion: Increased levels in the bone resorption markers indicated a high resorptive activity of bone tissue. These data emphasized a greater osteoclastic activity that led to bone loss in hepatitis B virus-infected patients both treated or not with antiretrovirals.

Keywords: Tenofovir; Hepatitis B; bone mineral density; Osteopenia

Introdução

A hepatite B é uma das infecções crônicas mais comuns e configura-se como importante problema de saúde pública mundial [1]. Estima-se que 2 bilhões de pessoas já se infectaram, em todo o mundo, e que cerca de 350 a 400 milhões de pessoas sejam portadores da infecção crônica pelo vírus da hepatite B (VHB) [2]. A carga imposta pela hepatite B crônica (HBC) é elevada, sendo responsável por cerca de 780.000 mortes anuais por complicações relacionadas à doença hepática, como a cirrose e o carcinoma hepatocelular [3, 5]. Novos dados da World Health Organization (WHO) revelam que cerca de 257 milhões de pessoas no mundo vivem com esta infecção crônica pelo vírus da hepatite B, sendo que as hepatites virais foram responsáveis por cerca de 887 mil de mortes em 2015 por complicações como cirrose e carcinoma hepatocelular [5].

No Brasil, foram notificados 718.837 casos de hepatite B, dentre infecções agudas e crônicas, no período de 1999 a 2017. A maioria dos casos notificados foi das regiões Sudeste (36,3%) e Sul (31,6%). Entre 2000 e 2011, foram declarados 9659 óbitos relacionados à hepatite B no país [6]. No entanto, a real dimensão do problema no Brasil não é completamente conhecida devido à subnotificação dos casos diagnosticados e do desconhecimento do diagnóstico por parte de muitos indivíduos infectados. Dados atuais relatam aproximadamente 40.198 casos novos de hepatites virais em 2017, o que contribui para evidenciar o impacto da doença no território brasileiro [7].

Os esforços para tentar conter ou minimizar o impacto da hepatite B na saúde coletiva e individual se relacionam com medidas preventivas e terapêuticas. A prevenção de novas infecções é obtida de maneira eficiente através da vacinação e, em determinadas situações, também com o uso da imunoglobulina humana anti-hepatite B [8].

Atualmente, o tratamento da HBC é realizado com medicações que pertencem a dois grupos principais: os agentes imunomoduladores (os interferons) e os análogos de nucleosídeo/nucleotídeo (ANN). Neste último grupo estão incluídas as medicações mais frequentemente usadas, com destaque para o entecavir e o tenofovir, que configuram drogas de primeira linha. Os objetivos do tratamento são melhorar a qualidade de vida, prevenir o desenvolvimento de cirrose do fígado e suas

complicações e o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular [9,2]. Para atingir estes objetivos, as medicações de uso oral (ANN) são utilizadas por longo período, às vezes por toda a vida, dependendo dos parâmetros de resposta ao tratamento apresentados pelo paciente [10]. O VHB trata-se de um vírus DNA que infecta hepatócitos e estabelece um mini cromossoma (cccDNA) que atua como modelo para replicação do vírus e produção antigênica. A terapia antirretroviral suprime a replicação viral, mas não elimina com sucesso o cccDNA, levando assim ao rebote viral e ao desenvolvimento de complicações hepáticas se o tratamento for interrompido [1]. Assim, a escolha da medicação depende da avaliação dos potenciais efeitos adversos, além de sua eficácia na redução da replicação viral. Conforme referido anteriormente, o tenofovir assume papel central no tratamento atual da HBC, pela sua elevada potência antiviral e alta barreira genética, prevenindo o desenvolvimento da resistência do vírus. Atualmente, não há relatos convincentes de resistência de cepas do VHB ao tenofovir [11]. Se por um lado estas características farmacológicas definem o tenofovir como medicação de primeira linha, por outro, seu uso prolongado se associa com potenciais efeitos adversos, como nefrotoxicidade e redução da densidade mineral óssea [12].

Muito do que se conhece sobre os efeitos adversos do tenofovir vem da experiência acumulada no tratamento de pacientes infectados pelo vírus HIV, já que esta medicação também faz parte do arsenal de medicações antirretrovirais. Acredita-se que a presença de proteínas virais específicas [13, 14] e o estado pró-inflamatório decorrente da infecção viral [15, 16, 17] exerçam efeito inibitório sobre os osteoblastos e estimulem a atividade osteoclástica. A redução na massa óssea e a incidência de fraturas têm sido verificadas com maior frequência em adultos infectados pelo HIV em comparação com controles não infectados [18,19] em especial naqueles em uso do tenofovir [20].

São escassos os dados sobre os efeitos dos ANN, incluindo o tenofovir em pacientes com hepatite B não infectados pelo HIV. Alguns estudos verificaram que a redução na densidade mineral óssea (osteopenia ou osteoporose) é achado frequente entre pacientes com HBC [21, 22, 23]. Entretanto, os efeitos dos ANN sobre a perda de massa óssea não estão bem definidos. Viganò e cols. [24] verificaram uma prevalência de 68% de redução na densidade mineral óssea (osteopenia ou osteoporose) entre pacientes com HBC. Os fatores independentemente associados à redução na densidade óssea foram a idade,

gênero e o uso de ANN. No entanto, no estudo citado os ANN foram avaliados globalmente, sem avaliação separada dos efeitos do tenofovir. Em outro estudo do mesmo autor [25], a redução na densidade mineral óssea, em pacientes em uso de ANN, ocorreu em uma minoria dos casos durante um período de 16 meses. Já no estudo de Gill e cols. [26] a prevalência de osteopenia e osteoporose foi semelhante entre pacientes com HBC, em uso do tenofovir, e nos controles sem uso da medicação [27,28].

Ainda existem muitas lacunas no conhecimento sobre as alterações no metabolismo ósseo decorrente da infecção crônica pelo VHB e pelo uso dos ANN [21, 29]. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi comparar a densidade mineral óssea de pacientes com HBC, em uso prolongado do tenofovir, com a de pacientes em uso prolongado de entecavir e lamivudina e pacientes sem uso de medicamentos.

Casuística e Métodos

Considerações Éticas

A inclusão dos pacientes no protocolo de estudo foi iniciada após o projeto de pesquisa e os termos de consentimento livres e esclarecidos (TCLE) terem sido devidamente avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), Processo HCRP nº 2691/2016, parecer nº 1.497.995. O paciente foi incluído no estudo após assinatura dos TCLEs.

O projeto de pesquisa foi enviado em Novembro de 2017 ao Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos tendo sido aprovado sob o registro: RBR-6f4x7p.

Casuística

O estudo foi conduzido com pacientes adultos de ambos os sexos, portadores de HBC em acompanhamento no Ambulatório de Hepatites do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Foram incluídos 81 pacientes com HBC, os quais foram divididos em três grupos: 1 - pacientes sem uso prévio de ANN, 2- pacientes em uso de tenofovir, 3- pacientes em uso de lamivudina e entecavir.

Critérios de inclusão

- Ter diagnóstico confirmado de hepatite B crônica;
- Ter idade maior que 30 anos e menor que 50;
- Estar em uso de tenofovir há pelo menos 12 meses para os indivíduos do grupo 1;
- Estar em uso de outros ANN, que não o tenofovir, há pelo menos 12 meses para os indivíduos do grupo 2;
- Não ter feito uso prévio de ANN para o grupo 3.

Critérios de exclusão

- Uso de suplementos de cálcio e vitamina D no último ano de inclusão no estudo;
- Cirrose hepática score CHILD B ou C;
- Diagnóstico de obesidade ou subnutrição;
- Diagnóstico de diabetes tipo 1 ou 2;
- Uso de medicamentos para tratamento de osteoporose;
- Participantes com história de tireoidectomia prévia;
- Presença de insuficiência renal;
- Infecção concomitante pelo vírus HIV;
- Infecção concomitante pelo vírus da hepatite C;
- Uso de corticosteroides em dose maior ou igual a 1mg/kg de peso corporal por mais de 14 dias de inclusão no estudo, bem como durante o decorrer do estudo;
- Doença reumatológica em atividade;
- Mulheres na menopausa ou com amenorreia secundária;
- Mulheres em uso de terapia de reposição hormonal.

Tamanho da Amostra

Para o cálculo do tamanho amostral foi considerada a variável densidade mineral óssea do quadril, considerado um marcador utilizado em estudos que avaliam o metabolismo ósseo. Com a escassez de dados sobre os efeitos do tenofovir no metabolismo ósseo em indivíduos mono infectados pelo VHB, foram utilizados dados de estudos com indivíduos infectados pelo HIV [30] A partir desta

referência foram usados os valores de densidade mineral óssea em indivíduos em uso de tenofovir, e em pacientes sem uso desta medicação. Os valores encontrados foram respectivamente, 0.96 ± 0.16 e 1.06 ± 0.14 g/cm². Para a variância, foi tomada a maior variância encontrada entre os grupos.

Adotando um nível de significância de 0,05 e 0,80 de poder do teste, utilizou-se a seguinte equação para o cálculo do tamanho amostral [30]:

$$n = \frac{2\sigma^2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

onde μ_1 e μ_2 são as médias de cada grupo.

n= 81 participantes

Métodos

Desenho do Estudo

Estudo observacional do tipo transversal que avaliou a prevalência de redução na densidade mineral óssea de pacientes em uso de tenofovir em comparação com indivíduos em uso de lamivudina/entecavir e sem uso prévio de antirretrovirais. Foram incluídos 27 pacientes em cada um dos três grupos conforme esquematizado na Figura 1. Os participantes foram submetidos a 2 encontros, no primeiro encontro (momento da inclusão) houve inicialmente a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e entrega e orientação para o preenchimento do registro alimentar de 3 dias. Neste momento foi realizado o agendamento prévio para a realização da avaliação da densidade mineral óssea, através do exame de densitometria óssea, coleta de amostras de sangue e urina para determinação dos parâmetros bioquímicos, aferição do peso e altura e revisão dos registros alimentares, caracterizando o segundo encontro. As amostras de sangue e urina foram devidamente armazenadas até a realização das análises.

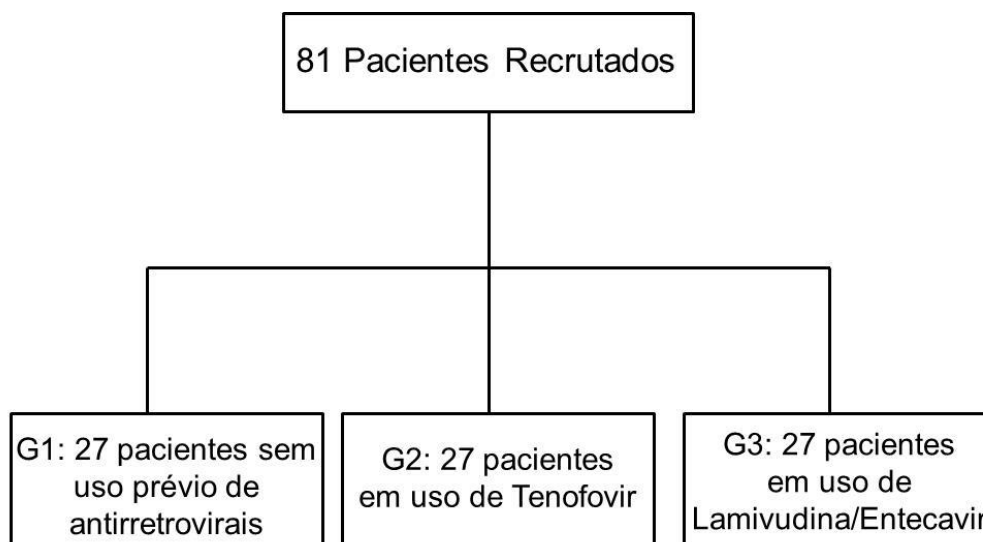


Figura 1. Recrutamento dos pacientes em seguimento no Ambulatório de Hepatite B do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Avaliação da Densidade Mineral Óssea

Realizou-se o exame de densitometria óssea - DXA (Dual energy x-ray absorptiometry) para avaliar a densidade mineral óssea dos seguintes sítios ósseos: quadril total, colo do fêmur e coluna lombar, utilizando o aparelho Hologic QDR 4500A scanner; Hologic Inc., Waltham, MA, USA do serviço de Radiologia do HCFMRP-USP. A avaliação da densidade mineral óssea foi realizada de acordo com as classificações propostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) [23]. Desta forma o critério de classificação da densitometria óssea foi definido após o recrutamento. Assim, como os voluntários apresentaram idade inferior a 50 anos, foram classificados segundo o Z-score.

Marcadores Séricos de Lesão e Função Hepática

Através da avaliação dos registros do prontuário do paciente foram avaliados os exames que caracterizam lesão e/ou função do fígado. Foram avaliadas, quando disponíveis, as dosagens de albumina, tempo de protrombina, gama glutamil transferase, bilirrubinas e aminotransferases (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase).

Demais dados, como avaliação histopatológica da biópsia hepática, quantificação de plaquetas, ultrassonografia do fígado e endoscopia digestiva alta, quando disponíveis, foram utilizados para a caracterização da presença de cirrose hepática.

Marcadores Envolvidos no Metabolismo Ósseo

Para as análises bioquímicas foram realizadas coletas de sangue venoso periférico em tubos a vácuo BD Vacutainer®/Vacuette®: 1 tubo de 8 ml com gel separador e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), 1 tubo de 4 ml com EDTA e 1 tubo de 4 ml sem EDTA, após 12 horas de jejum, no período da manhã. Para a coleta da 2ª amostra da urina da manhã foi entregue ao participante um frasco coletor universal estéril de 80 ml, protegido da luz e realizado em ambiente com pouca luz. Após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas utilizando o aparelho de centrifuga Universal 320R Hettich® por 10 minutos, à 23°C e a 3500 rotações/minuto (rpm), do Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). O soro e a urina obtidos ficaram armazenados em freezer a -80°C até a realização das análises. As coletas foram realizadas na Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto - HCFMRP-USP.

As determinações de paratormônio (PTH), hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), testosterona, estradiol e o hormônio de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) foram realizadas pelo método de imunoquimioluminescência, utilizando o analisador IMMULITE® 1000. As dosagens de albumina, creatinina e ureia foram realizadas pelo método colorimétrico, usando kits da Labtest®. Estas dosagens foram determinadas no Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

A determinação do fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF 23) e 25-hidroxivitamina D foram realizados pelo método de imunoensaio de quimioluminescência (CLIA), usando o teste LIAISON® no analisador da DIASORIN® The 4000th Series. A determinação da deoxipiridinolina urinária (marcador de reabsorção óssea) e osteocalcina foram realizadas pelo método de imunoensaio enzimático (ELISA), usando o kit da marca Quidel e Diasource Immuno

Assays S.A, respectivamente. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia e Metabologia do HCFMRP-USP.

As dosagens de cálcio total, fósforo e magnésio foram realizadas por método colorimétrico no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – HCFMRP.

A dosagem de fósforo urinário foi realizada no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, com um Espectrômetro de Massa (DRC-ICP-MS ELAN DRCII, Perkin Elmer, Sciex, Norwalk, CT, EUA).

A estimativa da taxa de filtração glomerular (eTFG) foi calculada através da equação Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI, Colaboração para a epidemiologia da doença renal crônica).

$TGF = 141 \times \min(Scr/k, 1)^a \times \max(Scr/k, 1)^{-1.209} \times 0,993^{\text{idade}} \times 1,018$ [para o sexo feminino] - 1,159 [para afrodescendentes], onde:

Scr é a creatinina sérica; k vale 0,7 para pacientes de sexo feminino e 0,9 para pacientes do sexo masculino; a é igual a -0,329 para pacientes do sexo feminino e - 0,411 para pacientes do sexo masculino, min indica o valor mínimo de Scr/k ou 1; e max indica o valor máximo de Scr/k ou 1 [30, 31, 32].

Avaliação Antropométrica

Foram aferidos o peso, a estatura e o índice de massa corporal (IMC) dos voluntários. Os participantes foram classificados de acordo com a recomendação da OMS [33]. A composição corporal (massa magra e massa gorda) foi analisada pelo aparelho de densitometria óssea (DXA).

Avaliação Dietética

A avaliação dietética foi realizada por registro alimentar de três dias consecutivos. Os participantes foram orientados a preencherem os formulários logo após se alimentarem para minimizar os erros e evitar subnotificações. Os registros foram revisados com cada participante.

Foram analisados por meio do registro alimentar a ingestão dos macronutrientes (carboidrato, lipídio e proteína) e dos micronutrientes, cálcio, fósforo

e magnésio, que estão relacionados com a saúde óssea. Os dados dietéticos obtidos em medidas caseiras foram convertidos em grama e mililitro para posterior análise do consumo alimentar. As informações foram processadas pelo programa de análise nutricional Dietpro®, versão 5i (DIET PRO). As tabelas utilizadas para análise dos alimentos foram: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) e National Nutrients Database for Standard Reference (USDA).

Para recomendação do consumo de macronutrientes e micronutrientes foram considerados os conceitos propostos pela Dietary Reference Intake (DRI's).

Foi considerado na avaliação dietética a média do consumo dos nutrientes obtidos nos três registros alimentares.

Análise Estatística

Primeiramente foi realizada a análise exploratória dos dados para uma visão global das características das variáveis obtidas. Foram calculadas as estatísticas de média, desvio padrão. Após a análise da distribuição dos dados foi realizado o testes de Shapiro-Wilk para testar a igualdade entre os grupos.

Foi aplicado teste de análise de variância ANOVA *one way* com correção de Greenhouse-Geisser e utilizou-se o pós teste de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos para verificar diferenças significativas ($p \leq 0,05$). O teste t de student foi aplicado para a comparação entre duas variáveis independentes. Foi realizado o teste de correlação de Pearson por grupos para quantificar a associação entre duas variáveis quantitativas.

Foi realizada a análise de regressão linear multivariada por grupos para avaliar a influência da variável independente sobre a dependente, para aquelas que apresentaram significância no teste de correlação. O software utilizado para as análises estatística foi o SPSS Statistics versão 22.0.

Resultados

A Tabela 1 apresenta as características gerais dos pacientes com hepatite B crônica de acordo com o grupo de estudo. A idade média dos participantes de ambos os grupos não apresentou diferença ($p=0,13$). Os parâmetros

antropométricos e de composição corporal de peso, índice de massa corporal, massa de gordura e massa muscular foram iguais para os três grupos. Não houve diferença com relação à duração da infecção, tempo de exposição a medicação e foi observado maior carga viral para o Grupo 1 em comparação com os Grupos 2 e 3 ($p=0.001$). O exame de densitometria óssea não apresentou diferença para os parâmetros coluna lombar, quadril total e colo do fêmur. Foi observado a presença de osteopenia em 14,8% para o Grupo 2 no sítio ósseo coluna lombar.

Na tabela 2 observam-se os resultados referentes aos parâmetros bioquímicos séricos e urinários de todos os grupos de estudo. A análise do marcador de reabsorção óssea, deoxipiridinolina urinária, revelou índices aumentados para todos os grupos de estudo (acima de 7.4 nmol/mmol). Os valores de osteocalcina e paratormônio estavam dentro dos limites de normalidade com maiores níveis para o Grupo 2 ($p=0.01$) quando comparado aos Grupo 1 e 3. As dosagens de vitamina D apresentaram valores desejáveis, sendo maiores para os Grupos 2 e 3 em comparação com o Grupo 1 ($p=0.01$). Os parâmetros FGF-23 e IGF-1 apresentaram níveis normais para todos os grupos e sem diferença entre eles. Com relação à dosagem de minerais no sangue e urina, também não houve diferença entre os grupos e seus valores foram adequados.

Não houve diferença para as concentrações dos hormônios testosterona, LH, FSH e estradiol e todos os participantes apresentaram valores dentro dos parâmetros de referencia. A taxa de filtração glomerular estava dentro da faixa de normalidade para todos os grupos e os exames de creatinina, ureia, albumina e transaminases hepáticas também estavam adequados.

Foi observado correlação entre os parâmetros IFG-1, fósforo urinário e magnésio para o Grupo 1. No Grupo 2 houve correlação entre osteocalcina e FGF-23 e para o Grupo 3 entre IMC, osteocalcina e cálcio total para o sítio ósseo coluna lombar (Tabela 3). Com relação ao parâmetro colo do fêmur (Tabela 4), houve correlação entre o IMC para o Grupo 1 e para o Grupo 3 entre tempo de medicação, IMC, massa gorda e osteocalcina. A densidade mineral óssea do quadril apresentou correlação com IMC para o Grupo 01 e osteocalcina, IMC e magnésio para o Grupo 3 (Tabela 5).

Para a regressão linear foi utilizado como variável dependente os sítios de densidade mineral óssea (coluna lombar, colo do fêmur e quadril total) e como variável independente o IMC e a carga viral. Ao analisar os coeficientes de

determinação (R^2) - Tabela 6, foi possível observar que o IMC apresentou maior influência sobre a densidade mineral óssea do colo do fêmur e quadril total para os grupos 1 e 3 e para a variável carga viral para o grupo 1 e 3 relacionado a densidade mineral óssea da coluna lombar.

A avaliação da ingestão alimentar está demonstrada na Tabela 7. Baseando-se na recomendação de ingestão diária de 2200 kcal, todos os grupos apresentaram inadequação na ingestão calórica. Com relação à ingestão de macronutrientes, houve consumo adequado de carboidratos (45 a 65%), proteínas (10 a 35%) e lipídios para os Grupos 2 e 3 (20 a 35%). O consumo de cálcio (mg) foi maior no Grupo 2: $519,8 \pm 13,06$ e menor para os grupos 1 e 3, porém nenhum atingiu a recomendação preconizada de 800 mg/dia. Com relação ao fósforo, o Grupo 3 apresentou maior consumo ($1548,5 \pm 173$) em comparação com os Grupos 1 e 2 e todos os grupos apresentaram ingestão acima do recomendado (580 mg/dia). O consumo de magnésio foi inadequado para todos os grupos (350 mg/dia). As recomendações de referencia estão de acordo com as DRIs (Ingestão Dietética de Referência) e não houve diferença entre os grupos e as variáveis mencionadas.

Discussão

O presente estudo investigou as possíveis alterações no metabolismo ósseo e mineral influenciados pelo uso de antirretrovirais em pacientes com hepatite B crônica e encontrou alterações no marcador de reabsorção óssea para todos os grupos, sugerindo que a infecção viral pode levar a alterações ósseas independente do uso dos medicamentos.

A maioria dos participantes desta pesquisa apresentaram idade abaixo dos 50 anos e peso corporal dentro da faixa de normalidade. Pesquisas demonstram que a idade avançada, o baixo ou excesso de peso corporal são fatores associados ao risco aumentado para o desenvolvimento de alterações ósseas como a osteoporose [34,35,36]. Estudo conduzido em pacientes HIV positivo que avaliou a associação entre o IMC e o peso corporal, mostrou que pacientes com excesso ou baixo de peso apresentavam maior propensão a desenvolverem alterações na densidade mineral óssea [37, 38].

Avaliando pacientes com hepatite B crônica, a presença de doença hepática foi associada um aumento no risco de alterações ósseas. Além disso, estudos sugerem que a perda óssea em infecções virais crônicas é o resultado de interações acumulativas e dependentes do tempo entre os fatores de riscos clássicos do paciente para o desenvolvimento da osteoporose, como carga viral, inflamação associada e uso de antirretrovirais [39,40,41]. No presente estudo foi observado baixo percentual de alterações na densidade mineral óssea para os três grupos. Esse fato pode estar associado a não presença de cirrose descompensada, níveis hormonais adequados, taxa de filtração glomerular normal ou ainda a ausência de outras alterações hepáticas graves que levam a maior prevalência de osteopenia/osteoporose [42,43,44]. Importante mencionar também que achados de e Gill et al [26], foram semelhantes com o presente estudo, pois também encontraram baixa prevalência de osteopenia/osteoporose em pacientes com hepatite B crônica sem alterações hepáticas em uso ou não de tenofovir.

Além disso, sabe-se também que a própria infecção viral e o uso de antirretrovirais contribui para o desenvolvimento de uma inflamação sistêmica, o que pode resultar em envelhecimento precoce de tecidos e alterações metabólicas ósseas [45,46].

A avaliação dos minerais (cálcio, fósforo sérico e urinário e magnésio), mostrou que os participantes deste estudo apresentaram esses parâmetros dentro da faixa de normalidade. A análise de correlação revelou associação dos níveis de magnésio, cálcio e fósforo urinário na densidade mineral óssea nos sítios coluna lombar para os grupos 1 e 3 e dos níveis de magnésio na densidade mineral óssea do quadril para o grupo 3. Estudos apontam que alterações nos níveis de fósforo, cálcio e magnésio podem afetar a formação e a reabsorção óssea, assim como a própria infecção pelo vírus da hepatite B, uso dos antirretrovirais e consequentemente a inflamação sistêmica [47,48,49].

Com relação ao marcador de formação óssea, osteocalcina, todos os grupos apresentaram valores adequados, porém os níveis de deoxipiridinolina urinária (marcador de reabsorção óssea) estavam aumentados, mostrando a existência de uma atividade de remodelação óssea acentuada. Sugere-se que o aumento da deoxipiridinolina em todos os grupos pode estar associado com a infecção viral, o estado inflamatório e a terapia antirretroviral como citado anteriormente [47,48,49].

Estudos sugerem que o valor aumentado do PTH favorece a reabsorção óssea, e a redução da vitamina D prejudica seu papel como inibidor na produção do PTH, diminuindo a absorção de cálcio no trato intestinal, ocasionando assim uma disfunção no metabolismo ósseo [50, 51]. Neste estudo as concentrações de PTH e vitamina D encontraram-se dentro dos níveis de normalidade. Em estudo realizado por Nguyen e cols. [22], em pacientes com hepatite B crônica, verificaram que o uso do tenofovir ou do entecavir por um período de doze meses não se associou com a redução nos níveis de vitamina D, evidência semelhante com o presente estudo que não encontrou alteração nos níveis dessa vitamina associado ao uso de antirretrovirais.

Pesquisas mostram que o IGF-1 está relacionado com a regulação no metabolismo ósseo. Esse hormônio é sintetizado nos tecidos e o esqueleto é um dos seus maiores reservatórios, portanto a redução dos níveis séricos está associada com o aumento no risco de fraturas [52]. Nesse estudo os níveis de IGF-1 estavam dentro da faixa de normalidade, porém é importante mencionar que houve correlação para o Grupo 1 nos níveis desse hormônio com a DMO da coluna lombar. Esse fato pode ser explicado, devido a maior carga viral desse grupo, que não fazia uso da terapia antirretroviral e segundo estudos a infecção viral pode levar ao aumento no risco de alterações nos parâmetros bioquímicos relacionados à saúde óssea.

Com relação à atuação do TDF no rim, foram avaliadas as concentrações de fósforo sério, urinário e os níveis do hormônio FGF-23. Existe na literatura estudos que indicam que o uso do TDF há aproximadamente sete anos é seguro e eficaz e que os efeitos renais adversos ocorrem em pacientes com predisposição a doenças renais ou com comorbidades. Porém, outros estudos apontam que o uso prolongado do TDF pode levar a desregulação dos níveis de fósforo [53, 54]. No presente estudo, não foi observado nenhuma alteração nas funções renais e nas concentrações de fósforo sérico e urinário. O hormônio FGF-23 apresentou valores normais para todos os grupos e estudos revelam que quando esse hormônio se encontra aumentado pode estar ocorrendo um aumento na excreção de fosfato pelos rins e interferência na conversão da vitamina D para a sua forma ativa (calcitriol) [55,56,57]. Importante mencionar que a análise de correlação revelou que há uma associação entre os níveis de FGF-23 e a densidade mineral óssea da coluna lombar para o Grupo 2, confirmando os dados da literatura que sugerem que

os maiores níveis de FGF-23 podem levar ao risco aumentado no desenvolvimento de alterações ósseas por meio da influência no metabolismo do fosfato e da vitamina D.

Conclusão

Através dos resultados dos parâmetros bioquímicos e da densidade mineral óssea conclui-se que a presença da infecção viral leva a um aumento no risco de alterações na saúde óssea independente do uso do tenofovir, lamivudina ou entecavir.

O aumento no marcador de reabsorção óssea indica alta atividade reabsortiva do tecido ósseo em pacientes com hepatite B crônica independente do uso de antirretrovirais.

Os estudos sobre o metabolismo ósseo e como ele pode ser afetado por fatores como infecções crônicas e medicamentos continua a evoluir e é um grande desafio para entender melhor a fisiologia da perda óssea. Portanto, mais estudos são necessários para correlacionar as alterações no metabolismo ósseo e riscos de fraturas, a fim de prevenir ou minimizar as alterações na densidade mineral óssea de pacientes com hepatite B crônica.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), código de financiamento 001 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio concedido à outorga 2016/19284-7.

Referencias

1. Rivino L, Le-Bert N, Gill US, Kunasegaran K, Cheng Y, Damien Z M, et al. Hepatitis B virus–specific T cells associate with viral control upon nucleos(t)ide-analogue therapy discontinuation. *J Clin Invest*. 2018 Feb 1;128(2):668-681.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol*. 2003;39 Suppl (1):S64-9.
3. Saeedi R, Mojebi-Mogharar A, Sandhu SK, Dubland JA, Ford JA, Yousefi M et al. Lamivudine, Entecavir, or Tenofovir treatment of hepatitis B infection: effects on calcium, phosphate, FGF23 and indicators of bone metabolism. *Ann Hepatol*. 2017 March-April;16(2):207-214.
4. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*. 2004 Mar;11(2):97-107.
5. Immunization Management Issues. Atlanta: Center for disease control and prevention CDC. [update 2006 Dec 8]. Available from: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5516a2.htm?s_cid=rr5516a2_e
6. Global hepatitis report, 2017. USA: World Health Organization. Hepatitis B. [update 2017 Apr]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>
7. Brazil: Department of Health Surveillance - Ministry of Health. Epidemiological bulletin. 2018 Jul;49(31):1-2. ISSN 2358-9450.
8. Ministry of Health. Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines for Hepatitis B and Coinfections. [update 2017 Sep 27]. Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2016/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-hepatite-b-e-coinfecoes>.

9. Fung J, Lai CL, Seto WK, Yuen MF. Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011 Dec;66(12):2715-25. PubMed PMID: 21965435.
10. Fakruddin JM, Laurence J. HIV envelope gp120-mediated regulation of osteoclastogenesis via receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) secretion and its modulation by certain HIV protease inhibitors through interferon-gamma/RANKL cross-talk. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Nov 28;278(48):48251-8. PubMed PMID: 12975380.
11. Fakruddin JM, Laurence J. HIV-1 Vpr enhances production of receptor of activated NF-kappaB ligand (RANKL) via potentiation of glucocorticoid receptor activity. *Archives of virology*. 2005 Jan;150(1):67-78. PubMed PMID: 15449141.
12. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *Journal of immunology*. 1990 Nov 15;145(10):3297-303. PubMed PMID: 2121824.
13. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *The Journal of clinical investigation*. 2000 Dec;106(12):1481-8. PubMed PMID: 11120755. Pubmed Central PMCID: 387259.
14. Hashizume M, Hayakawa N, Mihara M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17. *Rheumatology*. 2008 Nov;47(11):1635-40. PubMed PMID: 18786965.
15. Hansen AB, Gerstoft J, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen C, Pedersen G, et al. Incidence of low and high-energy fractures in persons with and without HIV infection: a Danish population-based cohort study. *Aids*. 2012 Jan 28;26(3):285-93. PubMed PMID: 22095195.

16. Triant VA, Brown TT, Lee H, Grinspoon SK. Fracture prevalence among human immunodeficiency virus (HIV)-infected versus non-HIV-infected patients in a large U.S. healthcare system. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008 Sep;93(9):3499-504. PubMed PMID: 18593764. Pubmed Central PMCID: 2567857.
17. Bedimo R, Maalouf NM, Zhang S, Drechsler H, Tebas P. Osteoporotic fracture risk associated with cumulative exposure to tenofovir and other antiretroviral agents. *Aids*. 2012 Apr 24;26(7):825-31. PubMed PMID: 22301411.
18. Fakruddin JM, Laurence J. HIV envelope gp120-mediated regulation of osteoclastogenesis via receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) secretion and its modulation by certain HIV protease inhibitors through interferon-gamma/RANKL cross-talk. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Nov 28;278(48):48251-8. PubMed PMID: 12975380.
19. Fakruddin JM, Laurence J. HIV-1 Vpr enhances production of receptor of activated NF-kappaB ligand (RANKL) via potentiation of glucocorticoid receptor activity. *Archives of virology*. 2005 Jan;150(1):67-78. PubMed PMID: 15449141.
20. Hansen AB, Gerstoft J, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen C, Pedersen G, et al. Incidence of low and high-energy fractures in persons with and without HIV infection: a Danish population-based cohort study. *Aids*. 2012 Jan 28;26(3):285-93. PubMed PMID: 22095195.
21. Elkashab M FG, Kim YJ et al. High prevalence of vitamin D deficiency among chronic hepatitis B patients entering a large global prospective trial (Study GS-US-174-0149). *Hepatol. Int*. 2013; 7: S189.
22. Nguyen HL A-FM, Sherwood RA et al. No effect of tenofovir or entecavir on vitamin D levels in chronic hepatitis B mono-infected patients. Single centre "real life" cohort experience. *Hepatology* 2011; 54: 610A.

23. WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Assessment of fracture risk and Its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series G, p. 853, 1994.
24. Vigano M, Lampertico P, Soffredini R, Invernizzi F, Chiodini I, Facchetti F, et al. Decline of Bone Mineral Density during Long-Term Nucleos(T)Ide Analog Therapy: A Longitudinal Cohort Study of 135 Patients with Chronic Hepatitis B. *Journal of hepatology*. 2012 Apr;56:S216-S. PubMed PMID: WOS:000303241301105. English.
25. Vigano M, Lampertico P, Eller-Vainicher C, Soffredini R, Facchetti F, Chiodini I, et al. High Prevalence of Reduced Bone Mineral Density in Patients with Chronic Hepatitis B under Nucleos(T)Ides Analogues Treatment. *Hepatology*. 2010 Oct;52(4):526A-A. PubMed PMID: WOS:000288775600419. English.
26. Gill US, Al-shamma S, Burke K, Ross V, Marley RTC, Kooner P, et al. P61 Bone mineral density loss in tenofovir treated Chronic Hepatitis B Virus (HBV) patients is a consequence of Vitamin D deficiency and not Tenofovir therapy. *Gut*. 2011 September 1, 2011;60(Suppl 2):A28.
27. Ibrahim F, Hamzah L, Jones R et al. Comparison of CKD-EPI and MDRD to estimate baseline renal function in HIV-positive patients. *Nephrol Dial Transplant*, 2012; 27: 2291-2297.
28. Bedimo R, Cutrella J, Zhangb S, Drechslera H, Gaob A, Browna G, Farukhia I, Castanona R, Tebasc P, M. Maaloufb N. Mechanisms of bone disease in HIV and hepatitis C virus: impact of bone turnover, tenofovir exposure, sex steroids and severity of liver disease. 2016 Feb 20;30(4):601-8. doi: 10.1097.
29. Singer J. A simple procedure to compute the sample size needed to compare two independent groups when the population variances are unequal. *Statistics in medicine*. 2001 Apr 15;20(7):1089-95. PubMed PMID: 11276038.

30. Barth JH, Jones RG, Payne RB. Calculation of renal tubular reabsorption of phosphate: the algorithm performs better than the nomogram. *Ann Clin Biochem* 2000; 37 (Pt 1): 79-81.
31. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150: 604-612.
32. Ibrahim F, Hamzah L, Jones R et al. Comparison of CKD-EPI and MDRD to estimate baseline renal function in HIV-positive patients. *Nephrol Dial Transplant*, 2012; 27: 2291-2297.
33. WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. BMI CLASSIFICATION DehawibAedmd.
34. Rosen CJ, Gallagher JC. The 2011 IOM report on vitamin D and calcium requirements for north america: clinical implications for providers treating patients with low bone mineral density. *J Clin Densitom.* 2011 Apr-Jun;14(2):79-84. doi: 10.1016/j.jocd.2011.03.004.
35. Garriguet D. Bone health: osteoporosis, calcium and vitamin D. *Health Rep.* 2011 Sep;22(3):7-14.
36. Newberry SJ, Chung M, Shekelle PG, et al. Vitamin D and Calcium: A Systematic Review of Health Outcomes (Update). *Evid Rep Technol Assess (Full Rep).* 2014 Sep;(217):1-929. doi: 10.23970/AHRQEPERTA217.
37. Calmy A, Fux CA, Norris R, et al. Low bone mineral density, renal dysfunction, and fracture risk in HIV infection: a cross-sectional study. *J Infect Dis* 2009; 200:1746–54.
38. Gill US,¹ Zissimopoulos A, Al-Shamma S, Burke K, McPhail MJW, Barr DA et al. Assessment of Bone Mineral Density in Tenofovir-Treated Patients With Chronic Hepatitis B: Can the Fracture Risk Assessment Tool Identify Those at Greatest Risk? *J Infect Dis.* 2015 Feb 1;211(3):374-82.

39. Grigby IF, Pham L, Mansky LM, Gopalakrishan R, Mansky KC. Tenofovir-associated bone density loss. *Ther Clin Risk Manag* 2010; 2(6):41-7.
40. Gallant J, Staszewski S, Pozniak A et al. Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naïve patients: a randomized trial. *JAMA* 2004; 292: 191–201.
41. Molina J, Podsadecki T, Johnson M et al. A lopinavir/ritonavir based once-daily regimen results in better compliance and is noninferior to a twice-daily regimen through 96 weeks. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007; 23:1505–14.
42. Huang Z, Wei H, Cheng C, Yang S, Wang J, Liu X. Low bone mineral density in chronic hepatitis B virus infection: A case-control study. *Pak J Med Sci*. 2017 Mar-Apr;33(2):457-461.
43. Collier J. Bone disorders in chronic liver disease. *Hepatology* 2007; 46:1271–8.
44. Collier J, Ninkovic M, Comstom JE. Guidelines on the management of osteoporosis associated chronic liver disease. *Gut* 2002; 50:i1–9.
45. Calmy A, Fux CA, Norris R, et al. Low bone mineral density, renal dysfunction, and fracture risk in HIV infection: a cross-sectional study. *J Infect Dis*. 2009 Dec 1;200(11):1746-54. doi: 10.1086/644785.
46. Grund B, Peng G, Gibert CL, et al. Continuous antiretroviral therapy decreases bone mineral density. *AIDS*. 2009 Jul 31;23(12):1519-29. doi: 10.1097/QAD.0b013e32832c1792.
47. Biver E, Calmy A, Rizzoli R. Bone health in HIV and hepatitis B or C infections. *The Adv Musculoskelet Dis*. 2017 Jan; 9(1):22-34.
48. Overton ET, Chan ES, Brown TT, et al. High-Dose Vitamin D and Calcium Attenuates Bone Loss with Antiretroviral Therapy Initiation: A Prospective,

Randomized Placebo-Controlled Trial for Bone Health in HIV-Infected Individuals. *Ann Intern Med.* 2015 June 16; 162(12): 815–824. doi:10.7326/M14-1409.

49. Gaffney-Stomberg E. The Impact of Trace Minerals on Bone Metabolism. *Biol Trace Elem Res.* 2018 Nov 23. doi: 10.1007/s12011-018-1583-8.

50. Rosenvinge MM, Gedela K, Copas AJ, et al. Tenofovir-linked hyperparathyroidism is independently associated with the presence of vitamin D deficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010 Aug;54(5):496-9.

51. Haskelberg H, Hoy JF, Amin J, et al. Changes in bone turnover and bone loss in HIV-infected patients changing treatment to tenofovir-emtricitabine or abacavir-lamivudine. *PLoS One.* 2012;7(6):e38377. doi: 10.1371/journal.pone.0038377.

52. Leder BZ. Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Protein Analogs in Osteoporosis Therapy. *Curr Osteoporos Rep.* 2017 Apr;15(2):110-119. doi: 10.1007/s11914-017-0353-4.

53. Saeedi R, Mojebi-Mogharar A, Sandhu SK, Dubland JA, Ford JA, Yousefi M et al. Lamivudine, Entecavir, or Tenofovir treatment of hepatitis B infection: effects on calcium, phosphate, FGF23 and indicators of bone metabolism. *Ann Hepatol.* 2017 March-April;16(2):207-214.

54. Maggi P, Montinaro V, Leone A, Fasano M, Volpe A, Bellacosa C. Bone and kidney toxicity induced by nucleotide analogues in patients affected by HBV-related chronic hepatitis: a longitudinal study. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Apr;70(4):1150-4.

55. Saeedi R, Jiang SY, Holmes DT, Kendler DL. Fibroblast growth factor 23 is elevated in tenofovir-related hypophosphatemia. *Calcif Tissue Int.* 2014 Jun;94(6):665-8.

56. Ramon I, Kleynen P, Body JJ, Karmali R. Fibroblast growth factor 23 and its role in phosphate homeostasis. *Eur J Endocrinol.* 2010 Jan;162(1):1-10.

57. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphonate homeostasis. *J Bone Miner Res* 2004; 19:429-35.

Tabelas

Tabela 1. Características gerais de pacientes com hepatite B crônica em uso ou não de antirretrovirais.

Variáveis	Grupo 1 Sem uso de medicamentos	Grupo 2 Tenofovir	Grupo 3 Lamivudina/Entecavir	P valor
n	27	27	27	
Homens (%)	40.7	50	48.1	-
Mulheres (%)	59.2	50	51.8	-
Idade (anos)	39.9 ± 7.2	41.5 ± 8.4	44.1 ± 6.8	0.130
Peso (kg)	74.1 ± 15.4	72.9 ± 12.2	71.8 ± 15.8	0.842
IMC (kg/m ²)	27.5 ± 5.1	26.5 ± 4.7	23.9 ± 4.8	0,782
eGFR, mL/min/1.73 m ²	105 ± 9,6	102.5 ± 9.1	104.6 ± 7.2	0.701
Composição corporal				
Gordura corporal (%)	35.1 ± 11.7	34.8 ± 12.8	34.1 ± 8.7	0.940
Massa Magra (%)	66.6 ± 11.1	66.5 ± 12.1	68 ± 9.4	0.847
HBC				
Duração da infecção em anos	8.7 ± 3.6 ^a	11 ± 4.6 ^b	8.9 ± 3.8 ^a	0.040
Tempo de exposição à medicação em anos	-	6.7 ± 3.3	6.1 ± 13.6	0.0001
Carga Viral (log)	2.8 ± 1.1 ^a	1.25 ± 1.7 ^b	1.54 ± 1.9 ^b	0.001
Carga Viral Indetectável (%)	7.4%	50%	40.9%	-
DMO (g/cm²)				
Coluna lombar Z score	1.221 ± 0.19	1.145 ± 0.14	1,251 ± 0.16	0.068
Osteopenia [n (%)]	2 (7.4)	4 (14.8)	2 (7.4)	-
Osteoporose [n(%)]	-	-	1 (3.7)	-
Quadril total Z score	1.062 ± 0.14	1.005 ± 0.12	1.069 ± 0.14	0.210
Osteopenia [n (%)]	-	1 (3.7)	2 (7.4)	-
Osteoporose [n(%)]	-	-	-	-
Colo do fêmur Z score	1.039 ± 0.13	0.961 ± 0.22	1.030 ± 0.16	0.231
Osteopenia [n (%)]	-	2 (7.4)	1 (3.7)	-
Osteoporose [n(%)]	-	-	1 (3.7)	-

Nota: ANOVA one way e teste t de *student* para amostras independentes (tempo de exposição à medicação em anos). Os valores são expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes p≤0.05. eTFG: estimativa da taxa de filtração glomerular; HBC: hepatite B crônica; DMO: densidade mineral óssea.

Tabela 2. Comparação das concentrações dos parâmetros bioquímicos séricos e urinários de pacientes com hepatite B crônica em uso ou não de antirretrovirais.

Variáveis	Grupo 1 Sem uso de medicamentos	Grupo 2 Tenofovir	Grupo 3 Lamivudina/ Entecavir	P valor	Valores de referência
n	27	27	27		
DPD (nmol/mmol)	8.09 ± 2.98	9.23 ± 2.4	8.29 ± 2.5	0.295	2.3 – 7.4
Osteocalcina (ng/ml)	7.3 ± 3.95 ^a	10.6 ± 5.67 ^b	7.50 ± 3.85 ^{ab}	0.025	< 2 – 21
PTH (pg/ml)	35.1 ± 16.0 ^{ab}	43.2 ± 25.0 ^b	28.0 ± 9.5 ^a	0.011	10 – 65
IGF-1 (ng/ml)	191.5 ± 115.4	145.1 ± 69.2	137.1 ± 91.9	0.236	101 – 267
FGF-23 (pg/ml)	62.2 ± 24.7	54 ± 14.1	49.1 ± 19.2	0.168	23.2 – 95.4
25 OH vitamina D (ng/mL)	27.1 ± 7.1 ^a	32.8 ± 9.2 ^b	32.8 ± 7.9 ^b	0.015	>20
Cálcio total (mg/dl)	9.23 ± 0.48	9.08 ± 0.42	9.17 ± 0.33	0.539	8.8 – 11
Fósforo (mg/dl)	3.97 ± 0.64	3.66 ± 0.52	3.64 ± 0.61	0.086	3 – 7
Magnésio (mg/dl)	2.19 ± 0.18	2.21 ± 0.19	2.23 ± 0.18	0.686	1.9 – 2.5
Fósforo urinário (mg/l)	538,6 ± 317,9	652,6 ± 349,2	487,9 ± 273,7	0.133	400 – 1300
TGO (U/L)	24.5 ± 10.3	24.0 ± 6.14	24.4 ± 9.2	0.982	5 – 40
TGP (U/L)	28.2 ± 18.4	27.7 ± 16.0	30.1 ± 20.1	0.876	7 – 56
Creatinina (mg/dl)	0.87 ± 0.1	0.90 ± 0.2	0.96 ± 0.2	0.375	0.6 – 1.2
Uréia (mg/dl)	27.8 ± 7.9	28.6 ± 6.9	30.5 ± 8.0	0.413	10 – 40
Albumina (g/dl)	4.3 ± 0.5	4.3 ± 0.3	4.5 ± 0.3	0.099	3.5 – 4.7

Nota: ANOVA one way. Os valores são expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes p≤0.05. DPD: deoxipiridinolina; PTH: paratormônio; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1; FGF-23: fator de crescimento de fibroblasto 23; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica. FGF-23 n = 16-17 por grupo.

Tabela 3. Correlação por grupos entre os marcadores bioquímicos, composição corporal e parâmetros virais com a densidade mineral óssea da coluna lombar de pacientes com hepatite B crônica em uso ou não de antirretrovirais.

Variáveis	Coluna lombar					
	Grupo 1 Sem uso de medicamentos	<i>P</i> <i>valor</i>	Grupo 2 Tenofovir	<i>P</i> <i>valor</i>	Grupo 3 Lamivudina/ Entecavir	<i>P</i> <i>valor</i>
Idade (anos)	0.075	0.709	-0.214	0.292	0.189	0.344
Carga viral (log)	-0.044	0.019	0.156	0.434	0.062	0.758
Tempo de medicação (anos)	-	-	-0.162	0.428	-0.259	0.190
Vitamina D (ng/ml)	0.092	0.645	0.368	0.064	0.002	0.988
IMC (kg/m ²)	0.071	0.723	0.247	0.222	0.369	0.05*
Massa gorda (kg)	0.016	0.933	0.123	0.547	0.173	0.387
Massa Magra (kg)	0.0004	0.998	0.109	0.594	0.051	0.798
IGF-1 (ng/ml)	0.373	0.05*	0.155	0.448	0.010	0.957
DPD (nmol/mmol)	-0.194	0.363	-0.131	0.540	0.011	0.955
Osteocalcina (ng/ml)	-0.108	0.613	-0.526	0.008*	-0.535	0.007*
Cálcio total (mg/dl)	-0.231	0.244	0.261	0.188	0.253	0.002*
Fósforo (mg/dl)	-0.119	0.552	-0.097	0.630	0.156	0.437
Magnésio (mg/dl)	-0.026	0.05*	0.304	0.122	0.315	0.108
Fósforo urinário (mg/l)	0.135	0.05*	0.266	0.179	0.002	0.988
PTH (pg/mL)	0.170	0.395	0.075	0.708	-0.030	0.879
FGF-23 (pg/ml)	0.225	0.401	-0.680	0.002*	0.205	0.427

Nota: Correlação de Pearson, nível de significância $p \leq 0.05$ indicado por *. DPD: deoxipiridinolina; PTH: paratormônio; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1; FGF-23: fator de crescimento de fibroblasto 23; IMC: índice de massa corporal. FGF-23 n = 16-17 por grupo.

Tabela 4. Correlação por grupos entre os marcadores bioquímicos, composição corporal e parâmetros virais com a densidade mineral óssea do colo do fêmur de pacientes com hepatite B crônica em uso ou não de antirretrovirais.

Variáveis	Colo do femur					
	Grupo 1 Sem uso de medicamentos	P valor	Grupo 2 Tenofovir	P valor	Grupo 3 Lamivudina/ Entecavir	P valor
Idade (anos)	-0.144	0.570	0.232	0.253	-0.006	0.744
Carga viral (log)	-0.254	0.209	0.273	0.176	-0.071	0.724
Tempo de medicação (anos)	-	-	-0.122	0.550	-0.470	0.013*
Vitamina D (ng/ml)	0.156	0.435	0.128	0.524	-0.042	0.831
IMC (kg/m ²)	0.393	0.042*	0.092	0.645	0.604	0.0008*
Massa gorda (kg)	0.058	0.773	0.046	0.818	0.466	0.014*
Massa magra (kg)	0.004	0.982	-0.032	0.872	-0.266	0.179
IGF-1 (ng/ml)	0.086	0.668	0.010	0.960	-0.041	0.837
DPD (nmol/mmol)	-0.205	0.335	-0.138	0.518	-0.066	0.757
Osteocalcina (ng/ml)	-0.070	0.744	-0.261	0.217	-0.558	0.004*
Cálcio total (mg/dl)	-0.113	0.581	-0.211	0.300	0.215	0.279
Fósforo (mg/dl)	-0.064	0.752	-0.031	0.877	0.197	0.323
Magnésio (mg/dl)	-0.268	0.185	0.080	0.690	0.310	0.115
Fósforo urinário (mg/l)	-0.107	0.602	0.077	0.700	-0.221	0.266
PTH (pg/mL)	-0.082	0.689	-0.006	0.972	-0.288	0.145
FGF-23 (pg/ml)	0.074	0.783	-0.304	0.234	0.162	0.532

Nota: Correlação de Pearson, nível de significância $p \leq 0.05$ indicado por *. DPD: deoxipiridinolina; PTH: paratormônio; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1; FGF-23: fator de crescimento de fibroblasto 23; IMC: índice de massa corporal. FGF-23 n = 16-17 por grupo.

Tabela 5. Correlação por grupos entre os marcadores bioquímicos, composição corporal e parâmetros virais com a densidade mineral óssea do quadril total de pacientes com hepatite B crônica em uso ou não de antirretrovirais.

Variáveis	Quadril total					
	Grupo 1 Sem uso de medicamentos	<i>P</i> <i>valor</i>	Grupo 2 Tenofovir	<i>P</i> <i>valor</i>	Grupo 3 Lamivudina/ Entecavir	<i>P</i> <i>valor</i>
Idade (anos)	0.131	0.513	-0.135	0.509	-0.004	0.980
Carga viral (log)	-0.262	0.186	0.336	0.092	0.126	0.529
Tempo de medicação (anos)	-	-	0.066	0.746	-0.325	0.097
Vitamina D (ng/ml)	0.127	0.525	0.172	0.399	0.092	0.647
IMC (kg/m ²)	0.482	0.010*	0.133	0.516	0.572	0.001*
Massa gorda (kg)	0.057	0.774	0.053	0.796	0.343	0.079
Massa magra (kg)	-0.014	0.943	-0.043	0.833	-0.136	0.497
IGF-1 (ng/ml)	0.005	0.978	0.049	0.811	-0.012	0.949
DPD (nmol/mmol)	-0.159	0.457	0.042	0.845	-0.164	0.442
Osteocalcina (ng/ml)	-0.135	0.528	-0.263	0.212	-0.571	0.003*
Cálcio total (mg/dl)	0.061	0.759	-0.096	0.638	0.295	0.134
Fósforo (mg/dl)	-0.063	0.752	0.206	0.311	0.153	0.444
Magnésio (mg/dl)	-0.233	0.241	0.029	0.887	0.392	0.043*
Fósforo urinário (mg/l)	-0.030	0.880	0.146	0.475	-0.108	0.590
PTH (pg/mL)	-0.019	0.922	-0.339	0.089	-0.296	0.132
FGF-23 (pg/ml)	-0.027	0.918	-0.406	0.105	0.347	0.171

Nota: Correlação de Pearson, nível de significância $p \leq 0.05$ indicado por *. DPD: deoxipiridinolina; PTH: paratormônio; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1; FGF-23: fator de crescimento de fibroblasto 23; IMC: índice de massa corporal.

Tabela 6. Modelos de regressão linear múltipla por grupos para coluna lombar (modelo I), colo do fêmur (modelo II) e quadril total (modelo III) de pacientes com hepatite B crônica em uso ou não de antirretrovirais.

Modelo	Parâmetros	Estimativa (beta)	SQ	p-valor	R ²	
I	G1				0.22	
	IMC (kg/m ²)	0.005	0.813	0.42		
	Carga viral (log)	-0.081	-2.586	0.01		
	G2					0.12
		IMC (kg/m ²)	0.009	1.549	0.13	
		Carga viral (log)	0.22	1.340	0.19	
	G3					0.14
		IMC (kg/m ²)	0.006	0.420	0.67	
		Carga viral (log)	0.010	1.970	0.05	
II	G1				0.25	
	IMC (kg/m ²)	0.011	2.491	0.01		
	Carga viral (log)	-0.030	-1.801	0.08		
	G2					0.04
		IMC (kg/m ²)	0.005	0.557	0.58	
		Carga viral (log)	0.02	1.010	0.32	
	G3					0.36
		IMC (kg/m ²)	0.020	3.706	0.001	
		Carga viral (log)	-0.003	-0.255	0.80	
III	G1				0.35	
	IMC (kg/m ²)	0.015	3.238	0.003		
	Carga viral (log)	-0.047	-2.101	0.04		
	G2					0.04
		IMC (kg/m ²)	0.005	0.557	0.58	
		Carga viral (log)	0.027	1.015	0.32	
	G3					0.35
		IMC (kg/m ²)	0.017	3.528	0.001	
		Carga viral (log)	0.012	0.942	0.35	

Nota: Diferença estatística: $p \leq 0.05$ IMC: índice de massa corporal; G1: grupo sem uso de medicamentos; G2: grupo tenofovir; G3: grupo lamivudina/entecavir.

Tabela 7. Média dos valores de ingestão de energia, macronutrientes, cálcio, fósforo e magnésio obtidos através do registro alimentar de três dias de pacientes com hepatite B crônica em uso ou não de antirretrovirais.

Variáveis	Grupo 1 Sem uso de medicamentos	Grupo 2 Tenofovir	Grupo 3 Lamivudina/Entecavir
Energia (kcal)	1954,9±417,9	1604±433	2114±117,6
CHO (%)	48.3	45.9	47.4
PTN (%)	13.4 ^a	20 ^{ab}	28 ^b
LIP (%)	18	21	23.6
Cálcio (mg)	446,6±120.7	519,8±13.06	345,4±30.5
Fósforo (mg)	920,9±142.8	1192,4±243.1	1548,5±173
Magnésio (mg)	267,8±90.7	343,1±96.6	265,6±50.9

Nota: ANOVA one way. Os valores são expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes $p \leq 0.05$.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A área de metabolismo ósseo continua a evoluir e tornou-se um desafio para melhor compreender a fisiologia e a perda óssea relacionada às infecções virais como pelo vírus da hepatite B crônica e o uso de diferentes antirretrovirais.

O vírus da hepatite B pode desencadear mudanças na interface imuno-esquelética e levar a alterações na saúde óssea através de processos que ainda não estão esclarecidos, envolvendo não apenas o uso dos antirretrovirais, mas também a inflamação associada.

Os resultados do presente trabalho evidenciaram que a presença viral no organismo pode levar a perturbações na saúde do osso independente do uso dos antirretrovirais. Além disso, fatores relacionados ao estilo de vida, níveis hormonais, índice de massa corporal, alterações em parâmetros bioquímicos ósseos em conjunto com a infecção viral e tempo de uso dos medicamentos podem contribuir significativamente para a perda óssea.

Sendo assim, novas estratégias terapêuticas são necessárias para prevenir alterações ósseas e promover melhor qualidade de vida para esses pacientes.

REFERENCIAS

1. Rivino L, Le-Bert N, Gill US, Kunasegaran K, Cheng Y, Damien Z M, et al. Hepatitis B virus–specific T cells associate with viral control upon nucleos(t)ide-analogue therapy discontinuation. *J Clin Invest*. 2018 Feb 1;128(2):668-681.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol*. 2003;39 Suppl (1):S64-9.
3. Saeedi R, Mojebi-Mogharar A, Sandhu SK, Dubland JA, Ford JA, Yousefi M et al. Lamivudine, Entecavir, or Tenofovir treatment of hepatitis B infection: effects on calcium, phosphate, FGF23 and indicators of bone metabolism. *Ann Hepatol*. 2017 March-April;16(2):207-214.
4. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*. 2004 Mar;11(2):97-107.
5. Immunization Management Issues. Atlanta: Center for disease control and prevention CDC. [update 2006 Dec 8]. Available from: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5516a2.htm?s_cid=rr5516a2_e
6. Global hepatitis report, 2017. USA: World Health Organization. Hepatitis B. [update 2017 Apr]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>
7. Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2002 Jul;2(7):395-403.
8. Ministry of Health. Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines for Hepatitis B and Coinfections. [update 2017 Sep 27]. Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2016/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-hepatite-b-e-coinfeccoes>.

9. Fung J, Lai CL, Seto WK, Yuen MF. Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011 Dec;66(12):2715-25. PubMed PMID: 21965435.
10. Fakruddin JM, Laurence J. HIV envelope gp120-mediated regulation of osteoclastogenesis via receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) secretion and its modulation by certain HIV protease inhibitors through interferon-gamma/RANKL cross-talk. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Nov 28;278(48):48251-8. PubMed PMID: 12975380.
11. Fakruddin JM, Laurence J. HIV-1 Vpr enhances production of receptor of activated NF-kappaB ligand (RANKL) via potentiation of glucocorticoid receptor activity. *Archives of virology*. 2005 Jan;150(1):67-78. PubMed PMID: 15449141.
12. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *Journal of immunology*. 1990 Nov 15;145(10):3297-303. PubMed PMID: 2121824.
13. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *The Journal of clinical investigation*. 2000 Dec;106(12):1481-8. PubMed PMID: 11120755. Pubmed Central PMCID: 387259.
14. Hashizume M, Hayakawa N, Mihara M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17. *Rheumatology*. 2008 Nov;47(11):1635-40. PubMed PMID: 18786965.
15. Hansen AB, Gerstoft J, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen C, Pedersen G, et al. Incidence of low and high-energy fractures in persons with and without HIV infection: a Danish population-based cohort study. *Aids*. 2012 Jan 28;26(3):285-93. PubMed PMID: 22095195.

16. Triant VA, Brown TT, Lee H, Grinspoon SK. Fracture prevalence among human immunodeficiency virus (HIV)-infected versus non-HIV-infected patients in a large U.S. healthcare system. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008 Sep;93(9):3499-504. PubMed PMID: 18593764. Pubmed Central PMCID: 2567857.
17. Bedimo R, Maalouf NM, Zhang S, Drechsler H, Tebas P. Osteoporotic fracture risk associated with cumulative exposure to tenofovir and other antiretroviral agents. *Aids*. 2012 Apr 24;26(7):825-31. PubMed PMID: 22301411.
18. Fakruddin JM, Laurence J. HIV envelope gp120-mediated regulation of osteoclastogenesis via receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) secretion and its modulation by certain HIV protease inhibitors through interferon-gamma/RANKL cross-talk. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Nov 28;278(48):48251-8. PubMed PMID: 12975380.
19. Fakruddin JM, Laurence J. HIV-1 Vpr enhances production of receptor of activated NF-kappaB ligand (RANKL) via potentiation of glucocorticoid receptor activity. *Archives of virology*. 2005 Jan;150(1):67-78. PubMed PMID: 15449141.
20. Hansen AB, Gerstoft J, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen C, Pedersen G, et al. Incidence of low and high-energy fractures in persons with and without HIV infection: a Danish population-based cohort study. *Aids*. 2012 Jan 28;26(3):285-93. PubMed PMID: 22095195.
21. Elkashab M FG, Kim YJ et al. High prevalence of vitamin D deficiency among chronic hepatitis B patients entering a large global prospective trial (Study GS-US-174-0149). *Hepatol. Int*. 2013; 7: S189.
22. Nguyen HL A-FM, Sherwood RA et al. No effect of tenofovir or entecavir on vitamin D levels in chronic hepatitis B mono-infected patients. Single centre "real life" cohort experience. *Hepatology* 2011; 54: 610A.

23. WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Assessment of fracture risk and Its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series G, p. 853, 1994.
24. Vigano M, Lampertico P, Soffredini R, Invernizzi F, Chiodini I, Facchetti F, et al. Decline of Bone Mineral Density during Long-Term Nucleos(T)Ide Analog Therapy: A Longitudinal Cohort Study of 135 Patients with Chronic Hepatitis B. *Journal of hepatology*. 2012 Apr;56:S216-S. PubMed PMID: WOS:000303241301105. English.
25. Vigano M, Lampertico P, Eller-Vainicher C, Soffredini R, Facchetti F, Chiodini I, et al. High Prevalence of Reduced Bone Mineral Density in Patients with Chronic Hepatitis B under Nucleos(T)Ides Analogues Treatment. *Hepatology*. 2010 Oct;52(4):526A-A. PubMed PMID: WOS:000288775600419. English.
26. Gill US, Al-shamma S, Burke K, Ross V, Marley RTC, Kooner P, et al. P61 Bone mineral density loss in tenofovir treated Chronic Hepatitis B Virus (HBV) patients is a consequence of Vitamin D deficiency and not Tenofovir therapy. *Gut*. 2011 September 1, 2011;60(Suppl 2):A28.
27. Ibrahim F, Hamzah L, Jones R et al. Comparison of CKD-EPI and MDRD to estimate baseline renal function in HIV-positive patients. *Nephrol Dial Transplant*, 2012; 27: 2291-2297.
28. Bedimo R, Cutrella J, Zhangb S, Drechslera H, Gaob A, Browna G, Farukhia I, Castanona R, Tebasc P, M. Maaloufb N. Mechanisms of bone disease in HIV and hepatitis C virus: impact of bone turnover, tenofovir exposure, sex steroids and severity of liver disease. 2016 Feb 20;30(4):601-8. doi: 10.1097.
29. Singer J. A simple procedure to compute the sample size needed to compare two independent groups when the population variances are unequal. *Statistics in medicine*. 2001 Apr 15;20(7):1089-95. PubMed PMID: 11276038.