



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**INFECTOLOGÍA**

**Características de la coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus de hepatitis B en pacientes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”**

**TESIS DE POSGRADO**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
ESPECIALISTA EN MEDICINA (INFECTOLOGÍA)

PRESENTA

DR. DIEGO ALBERTO JAIME VILLALÓN

TUTOR DE TESIS

DR. LUIS ENRIQUE SOTO RAMÍREZ

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”

MÉXICO D.F., MARZO DE 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
Resistencia a fármacos inhibidores de nucleós(t)idos	4
Genotipos mexicanos	5
La respuesta virológica a Tenofovir	5
Potencial mutación de resistencia a Lamivudina en genotipo H	6
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	7
HIPÓTESIS	7
OBJETIVOS	7
MATERIAL Y MÉTODO	8
Población de estudio	8
Ensayos serológicos	8
Carga viral del VHB	9
Amplificación de la región RT del gen de la polimerasa	9
Marcaje de los amplicones con la técnica de Sanger	9
Análisis de las secuencias del VHB y determinación de las mutaciones relacionadas a resistencia	10
Determinación de los subtipos virales por medio del análisis filogenético	10
Análisis estadístico	10

RESULTADOS 11

Características de base 11

Carga viral del VHB 12

Estadística comparativa 12

Amplificación y secuenciación 12

DISCUSIÓN 13

CONCLUSIONES 13

TABLAS

Tabla 1. Características de base entre los pacientes infectados por VIH/VHB 14

Tabla 2. Estadística descriptiva 15

Tabla 3. Enfermedades de transmisión sexual 16

Tabla 4. Enfermedades definatorias de SIDA 17

Tabla 5. Correlación entre detectabilidad e indetectabilidad del ADN de VHB 18

Tabla 6. Genotipos, mutaciones y comentario clínico en las 10 secuencias logradas 19

Figura 1. Filogenia 20

Tabla 7. Mutaciones en genotipos H obtenidos de Genbank 21

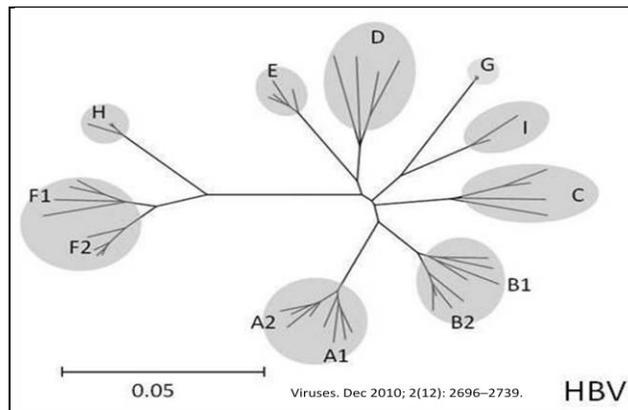
REFERENCIAS 22

## Características de la coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus de hepatitis B en pacientes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

### INTRODUCCIÓN

Se estima que existe una población de aproximadamente 350 millones de personas a nivel mundial con infección crónica por virus de Hepatitis B<sup>1</sup>. Los portadores crónicos, definidos como aquellos individuos con positividad sérica para HBsAg durante más de 6 meses, se encuentran en riesgo incrementado de desarrollo de cirrosis, descompensación hepática y carcinoma hepatocelular<sup>2</sup>.

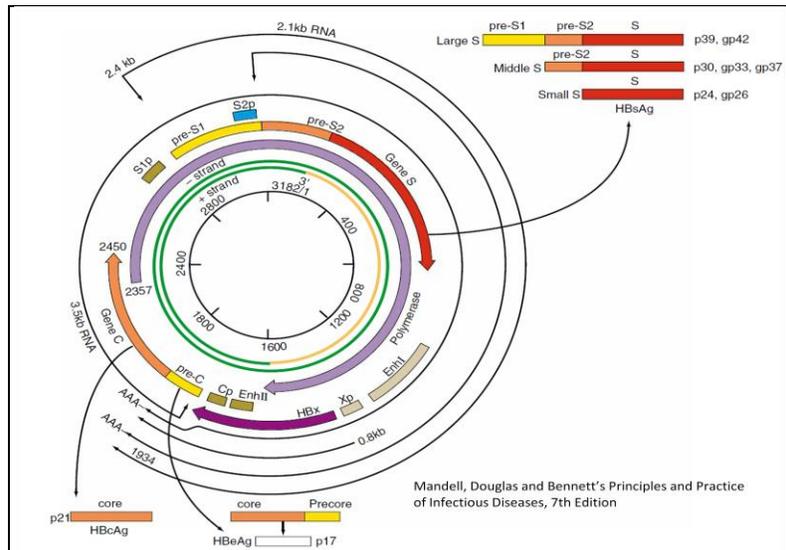
Hasta el momento, se han identificado 9 genotipos (A-I) con distribuciones geográficas específicas a nivel mundial, basados en divergencia de nucleótidos, de aproximadamente 8% del total del genoma<sup>3</sup>.



Entre los aproximadamente 36 millones de personas que viven con VIH a nivel mundial, 10% se encuentran crónicamente infectadas por VHB<sup>5</sup>.

Los análogos de nucleósidos se asocian directamente a mutaciones en la secuencia YMDD del dominio C de la polimerasa ADN-VHB, así como mutaciones compensatorias en contracorriente (upstream) en los dominios A y B, que de manera colectiva reducen la eficacia del tratamiento.

En los viriones, el genoma del VHB es una molécula circular relajada de ADN (RC-DNA), parcialmente de doble cadena.



Posteriormente a la infección del hepatocito, el RC-DNA es transportado al núcleo y convertido por enzimas celulares en una molécula circular cerrada de manera covalente (cccDNA)<sup>4</sup>. El cccDNA sirve como plantilla para la transcripción y para el RNA pre-genómico, el cual tiene dos posibles fines<sup>4</sup>:

1. puede ser encapsulado con la polimerasa viral y servir como base para DNA de cadena simple y RC-DNA, y ser excretado extracelularmente o
2. ser reciclado en el núcleo para amplificar o aumentar la reserva de cccDNA.

### Resistencia a fármacos inhibidores de nucleós(t)idos

La resistencia a 3TC durante monoterapia se desarrolla en 15 a 30% de los individuos tratados por un año, 40 a 50% de los tratados por tres años y 70% de los tratados por cinco años<sup>6</sup>. La resistencia de alto nivel a 3TC (>1,000 veces) es causada por las mutaciones M204V/I, que se encuentran en la zona (*motif*) YMDD, adyacente a dos de los aspartatos catalíticos de la transcriptasa inversa. Las mutaciones de M204 frecuentemente se acompañan de mutaciones compensatorias como L180M y menos frecuentemente, V173L y/o L80V/I<sup>7</sup>. Las mutaciones de M204 pueden ser seleccionadas por Telbivudina sin embargo a una menor tasa en comparación con 3TC: 11% contra 26% luego de dos años de monoterapia<sup>8</sup>.

La resistencia a Entecavir de alto nivel requiere M240V/I + L180M además de dos o tres de las siguientes mutaciones: I169T, T184S/A/G, S202G/I o M250V. La falla virológica y resistencia a Entecavir son extremadamente raras cuando este es usado para tratar pacientes vírgenes a INTIs. Aunque Entecavir conserva considerable actividad antiviral contra variantes resistentes a 3TC, el riesgo de falla virológica y resistencia de alto nivel a Entecavir es considerable<sup>9</sup>. La resistencia a Adefovir emerge de manera más lenta que la resistencia a 3TC. Ocurre en aproximadamente 10 a 30% de individuos que reciben monoterapia por dos y cinco años respectivamente. Las mutaciones N236T y A181V/T reducen la susceptibilidad de Adefovir entre 3 y 10 veces<sup>10</sup>. Adefovir y Tenofovir conservan in vitro actividad antiviral completa contra virus que porte las mutaciones siguientes: M204V/I, L180M, V173L y L80I/V. Dichas mutaciones puede incluso incrementar la susceptibilidad a Adefovir y Tenofovir<sup>11</sup>.

### **Genotipos mexicanos**

En cuanto a genotipos prevalentes en la población mexicana, Mata y colaboradores<sup>12</sup> (Hospital La Raza) reportan un estudio en el que incluyen a 77 pacientes, 67 hombres y 10 mujeres, con un total de 37 coinfecciones por VHB/VIH. Se reportan 55 muestras con genotipo H (71%), 16 con genotipo G (20%), 4 con genotipo F (5.1%) y 2 con genotipo A (2.6%). La mutación más frecuente en 8 pacientes coinfectados y uno mono infectado con terapia antirretroviral fue M240V, seis de ellos con genotipo G.

### **La respuesta virológica a Tenofovir**

En un estudio publicado en AIDS en 2013<sup>13</sup>, un total de 176 pacientes con hepatitis B crónica fueron evaluados, de los cuales 138 (78.4%) se encontraban coinfectados por VIH. En este estudio se documentó exposición abundante previa a 3TC en ambos grupos y casi la mitad de los pacientes virémicos portaban mutaciones de resistencia en VHB. La mayor parte de los pacientes se encontraba en tratamiento con TDF/FTC. Se realizó seguimiento durante 24, 48 y 96 semanas de terapia con TDF. Se documentó indetectabilidad de ADN de VHB en 90% de los pacientes. Se encontró sólo un genotipo H, siendo el 41% genotipos A.

En cuanto a factores asociados a supresión viral de VHB retardada durante tratamiento con tenofovir en pacientes con coinfección VIH/VHB, de manera reciente se publica<sup>14</sup> un trabajo que consideran 397 pacientes coinfectados en tratamiento con tenofovir, 91% de manera adicional lo estaban además con emtricitabina. 92% de los examinados mostraron Ag. "e" positivo, 196(49%) tenían exposición previa a 3TC. 192 (48%) consiguieron la supresión viral en una mediana de 28 meses (IIQ 13-71). La mediana de tiempo hasta la supresión fue de 17 meses para los vírgenes a 3TC y 50 meses para los previamente expuestos. Luego de controlar otros factores, la exposición previa a 3TC, la carga viral basal de VHB mayor a 10,000 UI/mL y un nadir de células CD4+ bajo se asociaron de manera independiente con menor probabilidad de supresión del ADN de VHB.

## Potencial mutación de resistencia a lamivudina en genotipo H

A finales del 2013 se publica un estudio en *Hepatitis Monthly*, realizado por científicos chinos<sup>15</sup>, que intentó identificar nuevas mutaciones de resistencia en VHB de pacientes en tratamiento con inhibidores de la transcriptasa inversa, análogos de nucleósidos. Se nota el hecho de que previamente se observó la mutación RtQ267H en pacientes en terapia con lamivudina (3TC). Esta mutación, además de las ya establecidas como productoras de resistencia a 3TC se introdujeron en cepas silvestres (genotipo A) por medio de plásmidos. La susceptibilidad de estas cepas se comparó con una cepa silvestre (wildtype) no modificada, por medio de ensayo Southern-blot o RT-PCR. La mutación RtQ267H incrementó la capacidad replicativa del VHB no solamente en presencia de esta mutación sino en combinación con otras. El análisis de la susceptibilidad *in vitro* mostró que la existencia de RtQ267H por sí misma o en compañía de otras mutaciones fue responsable de susceptibilidad disminuida a 3TC en diversos grados, además de incrementar la capacidad replicativa del virus.

Este hecho toma significancia por la sencilla observación de que, en acuerdo con la base de datos del sistema de la Universidad de Stanford para el rastreo y registro de mutaciones de resistencia en VIH y VHB, el 95% de las cepas virales salvajes de VHB pertenecientes al genotipo H presentan histidina en la posición 267 de la transcriptasa inversa, en vez de glutamina, característica que no es compartida por ninguno de los otros genotipos, a excepción del F, aunque en mucho menor medida.

Esto significa que lo que representa una mutación adaptativa de resistencia a lamivudina en el resto de los genotipos virales, para el genotipo H constituye un rasgo nativo, por lo que puede emitirse la teoría de que este genotipo podría demostrar poseer una capacidad replicativa incrementada y susceptibilidad a lamivudina disminuida, lo que pone en riesgo a cualquiera de las monoterapias o a la terapia dual tenofovir/lamivudina o tenofovir/emtricitabina, en el entendido de que no sería una terapia dual real, sino probablemente el uso de un fármaco 100% activo (TDF) y uno en riesgo (3TC/FTC).

## **Justificación del estudio**

La prevalencia de viremia detectable de virus de hepatitis B (VHB) en nuestra población coinfectada con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), durante el uso de TARAA, no es conocida. La supresión viral es una meta trascendental en el tratamiento de ambos virus.

La prevalencia y caracterización de mutaciones de resistencia a los inhibidores análogos de la transcriptasa inversa del VHB posiblemente presentes en aquellas muestras con virus detectable no son conocidas.

La prevalencia de los diversos genotipos de VHB en los pacientes con carga viral detectable y suficiente no es conocida.

## **Hipótesis**

Se espera encontrar una viremia de VHB detectable (o porcentaje de supresión viral) comparables a las cifras reportadas en la literatura internacional (alrededor de 90% de pacientes en supresión).

Se esperan encontrar mutaciones debidas al uso de lamivudina de igual manera a lo ya descrito.

Probable dominio de genotipos H en aquellas muestras que resultasen con VHB detectable, amplificable y posteriormente secuenciable.

## **Objetivos**

Determinar la prevalencia de carga viral de VHB detectable (y por lo tanto el porcentaje de pacientes en supresión virológica) en el grupo de pacientes portadores de esta infección crónica (antígeno de superficie de VHB detectable luego de al menos 6 meses de infección) en coinfección con el VIH, que se encuentren en tratamiento con uno o más inhibidores análogos nucleós(t)idos de la transcriptasa inversa (INTIs).

Determinar la prevalencia y distribución de genotipos individuales de VHB en muestras con carga viral detectable, amplificable y secuenciable, así como de mutaciones de resistencia a INTIs.

Recolección de características clínicas y en historial clínico previo para correlación entre grupos o mera descripción.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **Población de estudio**

Como criterios de inclusión se consideraron, en pacientes con registro y expediente en nuestra clínica, que se encontrasen en estado administrativo activo, es decir, con consulta dentro del último semestre previo a la inclusión; historia previa de infección por VHB, en coinfección con VIH, la presencia de antígeno de superficie del virus de hepatitis B (Ag-s VHB) durante más de 6 meses, sin importar la presencia o ausencia de otros antígenos o anticuerpos relacionados al VHB, que sin embargo se recaudaron para cuestiones de descripción (anticuerpo anti antígeno de superficie del VHB, antígeno “e”, anticuerpo anti antígeno “e”, anticuerpo IgM anti-Core).

Como criterios de eliminación se consideró la presencia de patrón de resolución virológica (Ag-s VHB indetectable, Ac. Anti Ag-s VHB positivo), por lo tanto no calificando como infección crónica, así como el estado inactivo en la consulta y por lo tanto sin muestra de plasma disponible. Como criterio de eliminación adicional se consideró la ausencia de reserva reciente (máximo 3 meses) de plasma, lo que haría imposible la cuantificación de la carga viral de VHB, aún si hubiese tenido consulta reciente.

Se realizó una búsqueda en la base de datos de la clínica local de VIH, que comprende aproximadamente 1,500 pacientes activos, además de la revisión de expedientes durante los tiempos propios de la consulta, lo que arrojó un total de 88 pacientes con registro clínico o por laboratorio de infección crónica por VHB. 20 de estos pacientes mostraban patrón de resolución, por lo que fueron eliminados del total, así como 18 pacientes adicionales eliminados sin consulta reciente en el servicio de VIH y por lo tanto sin muestra disponible en la plasmoteca del laboratorio de virología molecular. De los restantes 50 pacientes con características de infección crónica por VHB se comprobó la existencia de reserva de plasma y de su expediente físico y electrónico se obtuvieron datos clínicos relevantes a las patologías en estudio, cronología de la coinfección y valores de rubros específicos del laboratorio clínico como la presencia o ausencia reciente de antígenos y anticuerpos ya mencionados, carga viral de VIH, conteo y relación entre células CD4+ y CD8+, etc.

### **Ensayos serológicos**

La serología para determinación de presencia de anticuerpos anti-Core total y de antígeno de superficie se realizó con muestras recientes (máximo de 3 meses) provenientes de la seroteca del laboratorio de Serología de la misma institución. Estos se realizaron por medio de la técnica de inmunoluminiscencia (*VITROS ECIQ Immunodiagnostic*).

## **Carga viral del VHB**

Se realizó la cuantificación de carga viral de VHB de 50 pacientes con el estuche comercial *Abbott Real Time HBV (Abbott molecular)*, a partir de 500 µl de plasma. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se extrajo el ADN viral en forma automatizada con el robot *m2000 System* para su posterior cuantificación con la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), con un rango dinámico de 10 a  $1 \times 10^9$  UI/ml (Unidades Internacionales que equivale a 5.4 copias/mL).

## **Amplificación de la región RT del gen de la polimerasa**

Con el volumen remanente de la extracción para carga viral, se realizó la amplificación o PCR de un fragmento de 1,329 pares de bases (incluyente del área de resistencia a INTIs) Se utilizaron 6 µl de material de extracción, que se añadieron a un volumen total de reacción de 25 µl, utilizando los siguientes primers: P1 (*sentido, de la posición 55 a la 76 del genoma*) [5'CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC3'] y OUT2 (*antisentido, de la posición 1394 a la 1365*) [5'CTAGCAGCCATGGAAAGGAG3'], sus posiciones establecidas de acuerdo a la secuencia de referencia NC-003977 (genoma completo de virus de hepatitis B) del GenBank (*NCBI, National Center for Biotechnology Information*). Se empleó la enzima Taq HiFi (*Invitrogen*), conveniente debido a su alta fidelidad y a su actividad de corrección (actividad de exonucleasa 3'-5'). Las condiciones del termociclador fueron, como temperatura inicial de desnaturalización, 94°C durante 10 minutos y 40 ciclos con tres temperaturas, 94°C durante 45 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, seguido de un tiempo de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Se observó la región amplificada con el método de electroforesis de capilar (*2100Bioanalyzer, Agilent Technology*). Se purificaron los amplicones con 250 µl de KCl [200mM] en las columnas de filtración de membrana (*MilliPore, Montage*) y se re-suspendieron en 40 µl de H<sub>2</sub>O (*Milli-Q, Milipore*) para su posterior marcaje.

## **Marcaje de los amplicones con la técnica de Sanger**

Se utilizaron 6 µl de los amplicones y 7.5 µl de una mezcla con BigDye v3.1 (*Applied Biosystems*) para marcar la región de interés. Se utilizaron 4 primers con dirección 5'a 3' P1 (55-76) [5' CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC 3'], S1-2 (685-704) [5' CGAACCACTGAACAAATGGC 3'], P4 (230-254) [5' CCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACT 3'] y POL-S (638-658) [5' CTATGGGAGTGGGCCTCAGTC 3'] y 2 con dirección 3' a 5', IN3 (512-493) [5' GTCCCGTGCTGGTAGTTGAT 3'] y OUT2 (1384-1365) [5' CTAGCAGCCATGGAAAGGAG 3']. Las condiciones del termociclador fueron, como temperatura inicial de desnaturalización, 94°C durante 1 minuto y 25 ciclos con tres temperaturas, 94°C durante 10 segundos, 56.6°C durante 05 segundos y 60°C durante 4 minutos. Posteriormente se purificaron los productos con 80 µl de alcohol isopropílico al 10%, se centrifugaron 60 min a 3700 rpm (2020.31 g), se decantó y agregó 80 µl de etanol al 70% y centrifugó a 3700 rpm (2020.31 g) durante 20 minutos, por último se resuspendió el material marcado con formamida de alta pureza

(*Hi-Di de Applied Biosystems*), para su lectura en el secuenciador (*ABI 3130xL Genetic Analyzer de Applied Biosystems*).

### **Análisis de las secuencias del VHB y determinación de las mutaciones relacionadas a resistencia.**

Los electroferogramas de cada una de las secuencias obtenidas de cada muestra, se acoplaron y alinearon a la secuencia NC-003977 por medio del programa *SeqScape v2.1.1 (Applied Biosystems)*, para obtener una secuencia consenso. Esta secuencia se envió vía internet al algoritmo de interpretación del Instituto Max Planck de Informática en Alemania, *Geno2pheno*, para obtener las mutaciones relacionadas a resistencia a fármacos.

### **Determinación de los subtipos virales por medio del análisis filogenético.**

Para el análisis filogenético se usó el programa MEGA v6.0 (*Tamura, Stecher, Peterson, Filipski y Kumar 2013*), donde se alineó la secuencia consenso con secuencias de subtipo G [AB064310, AF160501, AF405706], del subtipo I [AF241808, FJ023674, FJ882615], del subtipo A [X65259, AF090842, X02763, X51970], del subtipo D [M32138, X85254], del subtipo E [AB032431, X75657], del subtipo B [AF100309, D00329, AB033554], del subtipo C [AB014381, X04615, NC003977], del subtipo F [AB036910, AF223965, X69798] y del subtipo H [AY090454, AY090457, AB375159.1, AB375162.1, AB375160.1, AB516393.1, AB516394.1, AY090460, AB516395.1, AB375164.1, AB298362.1, AB179747.1, AB275308.1, AB846650.1, AP007261.1, AB375163.1, AB375161.1]. El fragmento de aproximadamente 1,329 pares de bases permite de manera adecuada la genotipificación tanto en la aplicación *Geno2pheno* como en filogenia.

### **Análisis estadístico**

La muestra necesaria para calcular una prevalencia de aproximadamente 10% (viremia detectable de VHB en pacientes coinfectados con el VIH, en tratamiento con INTIs, incluyendo Tenofovir), para un universo cerrado de 68 pacientes es de 48, con un nivel de confianza de 95%, intervalo de confianza de 0.05 y error estándar de 0.02. Un tamaño de muestra de 50 pacientes permitiría explorar prevalencias de 15% por lo que se decidió en esta cifra, coincidente con el número de pacientes disponibles para estudio.

Los variables dicotomizadas se analizaron mediante  $X^2$  de Pearson o prueba exacta de Fisher, según correspondiese. Las variables continuas se analizaron mediante la U de Mann-Whitney.

## RESULTADOS

### Características de base

Se recaudaron los datos (tabla 1) de 50 pacientes de nuestra clínica de atención a personas que viven con VIH, con antígeno de superficie de hepatitis B detectable. 49 de éstos (98%) fueron originarios de México y uno de España. De entre los estados mexicanos, el Distrito Federal aportó la mayoría de los casos con 34 (68%), tomando en cuenta el lugar de mayor tiempo de habitación. En segundo lugar, el Estado de México con 8. De manera notoria, el 100% fueron del sexo masculino.

El rango de edad con más representación fue el de 40 a 49 años, con 22 (44%), seguido del de mayores de 50 años, con 12 (24%). La mediana de la edad fue de 43 años, con rango de 37.5 a 49.25 años. 41 (82%) reportaron contacto sexual con hombres y el 100% negaron el uso actual o pasado de drogas intravenosas.

La mediana de evolución de la infección por VIH fue de 9.5 años y la de VHB de 7 años, con un valor de  $p=0.07$ , por lo tanto no representando una diferencia significativa entre ambos tiempos.

El 100% se encontraban en terapia antirretroviral altamente activa (TARAA) al momento del ingreso al estudio, con uso de uno o más fármacos análogos de nucleós(t)idos, reportando el historial clínico el que al menos 23 de ellos (46%) habían indicado mal adherencia en algún momento de su evolución. 37 de los pacientes (74%) habían mantenido 5 años o más de TARAA ininterrumpida por motivos médicos, además de que 44 (88%) contaban con terapia de análogos de nucleós(t)idos doble (tenofovir y emtricitabina o lamivudina).

En cuanto parámetros relevantes de laboratorio, se encontró una mediana en el nadir de células T CD4+ de  $94/\mu\text{L}$  (IIQ 37.5 – 237.5), una relación CD4+/CD8+ actual de 0.553 (IIQ 0.265 – 0.558) y una mediana de células CD4+ actuales de  $396/\mu\text{L}$  (IIQ 298.7 – 592.7).

Con datos recientes y adecuados de laboratorio clínico, se calcularon los puntajes APRI y fib-4 para predicción de fibrosis hepática, con resultados en tabla 2.

En cuanto a otras enfermedades de transmisión sexual (tabla 3), se encontró una alta prevalencia de casos de condilomatosis genital, con 16 (32%), con latencia de sífilis en segundo lugar. Se encontró sólo un caso de coinfección de virus hepatotrópicos (B y C).

En lo que respecta a enfermedades definatorias de SIDA (tabla 4), el padecimiento infeccioso más frecuente fue la tuberculosis en cualquier presentación (7 casos), seguida de enfermedad por *Pneumocystis spp.* y candidiasis oroesofágica, con 6 y 5 casos respectivamente.

## **Carga viral del VHB**

Con el uso del kit ya mencionado para la cuantificación de la carga viral de VHB, se encontraron cifras detectables en 22 (44%) de los 50 pacientes, en el rango de 15 a más de 1,000'000,000 UI/mL. 12 de las 22 cargas se encontraron por encima de 1,000 UI/mL.

## **Estadística comparativa**

Luego de dividir las variables en dicotómicas y continuas, se compararon contra el factor de detectabilidad o indetectabilidad de ADN de VHB, resultando los siguientes datos (tabla 5): en cuanto a variables dicotómicas se encontró diferencia significativa (asociación positiva para detectabilidad de VHB) para los rubros de carga viral de VIH ( $p=0.03$ , IC95 1.11 – 91.87), nivel menor a 200 células T CD4+/ $\mu\text{L}$  ( $p=0.03$ , IC95 1.11 – 91.87) y la maladherencia histórica (actual o previa) a la TAAA ( $p=0.02$ , IC95 1.8 – 8.06).

En las variables continuas, se encontró significancia en cuanto a la relación CD4+/CD8+ actual, mediana de 0.28 (IIQ 0.23 – 0.54) en VHB detectable contra 0.61 (0.49 – 0.82) en VHB no detectable, con  $p<0.01$ . Se encontró además diferencia significativa en el nivel actual de CD4+/ $\mu\text{L}$ , con mediana de 342 (IIQ 204 – 500) en VHB detectable contra 455 (IIQ 328 – 617) en VHB no detectable, con  $p=0.03$ . Por último, se encontró diferencia en cuanto al tiempo de tratamiento con Tenofovir, asociándose de manera inversa a la detectabilidad, con una mediana de tiempo de 4 años (IIQ 1.0 – 7.5) en VHB detectable contra 6 años (5.0 – 7.0) en VHB no detectable, con una  $p=0.01$ .

Las variables que no demostraron asociación en este estudio fueron un nivel de células T CD4+ actual menor a 500/ $\mu\text{L}$  (pero mayor a 200), historia de enfermedades definitorias de SIDA, la presencia de nivel detectable de anticuerpo anti-Core de VHB total, la edad de los pacientes, el nadir de células T CD4+ o los tiempos de evolución de ambas enfermedades.

## **Amplificación y secuenciación**

Se logró secuenciar por método de Sanger la transcriptasa inversa de 10 de 12 muestras (tabla 6), con éxito a partir de las 5,547 UI/mL. 3 de las muestras manifestaron mutaciones de resistencia a L-nucleósidos (lamivudina, telbivudina) y análogos de guanósina (entecavir), por medio de las mutaciones habituales (L180V, A181V) y las propias del motif YMDD (S202G, M204V, M204I). No se detectaron mutaciones de resistencia contra fosfonatos acíclicos análogos de nucleótidos (tenofovir, adefovir).

Se determinó la presencia de 7 genotipos H, 2 genotipos G y un genotipo F1, por medio de la aplicación en línea de *Geno2pheno* (Instituto Max Planck), verificándose de manera positiva dicha determinación por medio del uso de la filogenia. En éste método de análisis filogenético molecular

se utilizó la modalidad de máxima verosimilitud (maximum likelihood), la cual infiere la historia evolutiva en base al método GTR (general time reversible). El consenso “bootstrap” infirió la historia evolutiva a partir de 500 repeticiones. Con la adición de muestras disponibles de todos los genotipos registrados, provenientes de GenBank, se diseñó una imagen ilustrativa de la distribución por subtipos (figura 1).

## **DISCUSIÓN**

Este trabajo analiza, de manera transversal y por primera vez en México, la eficacia de la terapia supresiva contra la infección crónica por VHB en coinfección con VIH, encontrándose valores elevados de detectabilidad, contrarios a la literatura internacional. Los pacientes con viremia detectable y mutaciones relacionadas a resistencia tienen en común un tratamiento en monoterapia, ya sea lamivudina o tenofovir. El resto se encuentra en terapia dual (tenofovir/emtricitabina). Además establece factores asociados a dicha falla en la supresión viral y sugiere de manera adicional la necesidad de investigación sobre la susceptibilidad del genotipo H a lamivudina, debido a características nativas de este genotipo, en donde la mutación rtQ267H le confiere susceptibilidad disminuida a dicho fármaco y probablemente le conceda a este subtipo viral una mayor capacidad replicativa, con la posibilidad de potenciar a otras mutaciones de resistencia a inhibidores análogos de nucleós(t)idos.

## **CONCLUSIONES**

Se encontró viremia de VHB detectable en los pacientes coinfectados con VIH, en una proporción muy superior a la esperada. Esta viremia se asocia con factores clínicos como carga viral de VIH detectable, <200 células T CD4+/μL recientes, mala adherencia histórica a la terapia antirretroviral, relación CD4+/CD8+ baja, mediana de células T CD4+ inferior y menor tiempo de tratamiento con tenofovir. Se halló una predominancia del subtipo H (70%) similar a la hallada en otros estudios. La monoterapia es factor común a los pacientes en los que se detectaron mutaciones de resistencia. Consideramos necesario el estudio a profundidad del genotipo H y su asociación con la mutación rtQ267H, así como su potencial relación a la susceptibilidad disminuida a la lamivudina.

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE BASE / DATOS DEMOGRÁFICOS

<b>Características de base entre los pacientes infectados por VIH/VHB</b>					
Característica	No.	%	Característica	No.	%
Total	50	100	Ac. Anti-core VHB total (+)	41	82
País			Ac. IgM anti-core VHB (+)	1	2
<b>México</b>	<b>49</b>	<b>98</b>	TARAA actual	50	100
España	1	2	Tiempo de TARAA		
Estado mexicano			<2 años	6	12
<b>Distrito Federal</b>	<b>34</b>	<b>68</b>	2-5 años	7	14
Estado de México	8	16	<b>&gt; 5 años</b>	<b>37</b>	<b>74</b>
Oaxaca	2	4	Uso actual de INTI	50	100
Veracruz	2	4	Historia de maladerencia	23	46
Sinaloa	1	2	Componente anti VHB		
Tamaulipas	1	2	3TC ó FTC	4	8
Tlaxcala	1	2	TDF	2	4
Rango de edad			<b>TDF/FTC ó 3TC</b>	<b>44</b>	<b>88</b>
<30	5	10	CD4+/mm <sup>3</sup> , actuales		
30-39	11	22	<200	6	12
<b>40-49</b>	<b>22</b>	<b>44</b>	<b>200-500</b>	<b>26</b>	<b>52</b>
≥50	12	24	>500	18	36
Sexo masculino	50	100	CD4+/mm <sup>3</sup> , nadir		
<b>Contacto homosexual</b>	<b>41</b>	<b>82</b>	<b>&lt;200</b>	<b>34</b>	<b>68</b>
Contacto heterosexual	9	18	200-500	11	22
Cirrosis	1	2	>500	5	10
Historia de DIV	0	0	Detectabilidad de VIH	7	14
Ag 'e' VHB (+)	24	48			
Ac. anti-ag 'e' VHB (+)	13	26	<b>Detectabilidad de VHB</b>	<b>22</b>	<b>44</b>
Ac. anti-ag 's' VHB (+)	4	8			

DIV: drogas intravenosas; VHB: virus de Hepatitis B; TARAA: terapia antirretroviral altamente activa; INTI: inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa; 3TC: lamivudina; FTC: emtricitabina; TDF: tenofovir; VIH: virus de inmunodeficiencia humana.

TABLA 2. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.

<b>Características</b>	<b>Mediana</b>	<b>IIQ</b>
Edad	43	37.5-49.25
Nadir de CD4+/mm <sup>3</sup>	94	38-237.50
Relación CD4+/CD8+ actual	0.553	0.337-0.674
CD4+/mm <sup>3</sup> actuales	396	298.75-592.75
Puntaje APRI	0.323	0.265-0.558
Puntaje fib-4	1.11	0.768-1.598

Un puntaje APRI  $\geq 0.7$  posee una sensibilidad de 77% y especificidad de 72% para predecir fibrosis significativa. Un puntaje fib-4 mayor a 1.45-3.25 diferencia la ausencia o la presencia de fibrosis leve de la fibrosis severa.

TABLA 3. ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL.

	No. de casos
Condilomatosis anogenital	16
Sífilis latente	6
Molusco contagioso	4
Herpes anogenital	3
Sífilis primaria	3
Infección por virus de Hepatitis C	2
Sífilis secundaria	2
Neurosífilis	1
Uretritis <i>N. gonorrhoeae</i>	1
Uretritis por <i>Ureaplasma spp</i>	1

TABLA 4. ENFERMEDADES DEFINITORIAS DE SIDA.

	No. de casos
Tuberculosis	7
Infección por <i>Pneumocystis spp</i>	6
Candidiasis oroesofágica	5
Sarcoma de Kaposi	5
Herpes zóster diseminado	4
Cyptococcosis extrapulmonar	3
Cryptosporidiasis	3
Colitis por CMV	3
Linfoma no Hodgkin	3
Infección por complejo MAC	2
Histoplasmosis diseminada	2
Cystoisosporidiasis	1
Neumonitis por CMV	1
Retinitis por CMV	1
LEMFP	1
Infección recurrente por <i>Salmonella</i>	1

CMV: *Cytomegalovirus*; MAC: *Mycobacterium avium* complex;  
 LEMFP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva.

TABLA 5. CORRELACIÓN ENTRE DETECTABILIDAD E INDETECTABILIDAD DEL ADN DE VHB

Variable	CV VHB detectable (No., %)	CV VHB no detectable (No., %)	OR	IC 95%	p*
CV VIH detectable	6 (27.3)	1 (3.6)	10.125	1.11-91.87	0.03
CD4+ <500 cel/mm <sup>3</sup> actuales	16 (72.5)	16 (57.1)	2.1	0.6-6.64	0.25
CD4+ <200 cel/mm <sup>3</sup> actuales	6 (27.3)	1 (3.6)	10.125	1.11-91.87	0.03
Enfermedad definitiva de SIDA	12 (54.5)	10(35.7)	2.16	0.69-6.7	0.18
Anticuerpo antiCore total	17(77.3)	24(85.7)	0.56	0.13-2.42	0.44
Maladherencia a TARA	15(68)	8(28)	2.5	1.8-8.06	0.02

	CV VHB detectable (mediana, IIQ)	CV VHB no detectable (mediana, IIQ)	p**
Edad	40 (34.5-47)	43.5 ( 41- 56.5)	0.07
Relación CD4/CD8 actual	0.28 (0.23-0.54)	0.61 (0.49-0.82)	<0.01
CD4+/mm <sup>3</sup> actuales	342 (204-500)	455 (328-617)	0.03
Tiempo de evolución de VHB	5.5 (3-10.5)	8 (5-11.5)	0.07
Tiempo de tratamiento con TDF	4 (1-7.5)	6 (5-7)	0.01
Nadir de CD4+	99 (55.5-260)	82 (37-233)	0.91
Tiempo de evolución de VIH	7.5(3-16)	10 (6.5-16.5)	0.2

\*Calculado mediante prueba X2 de Pearson o prueba exacta de Fisher según corresponda

\*\* Calculado mediante prueba U de Mann-Whitney

TABLA 6. GENOTIPOS, MUTACIONES Y COMENTARIO CLÍNICO EN LAS 10 SECUENCIAS LOGRADAS

Paciente	ADN VHB (UI/mL)	Genotipo	Mutaciones de la transcriptasa inversa	Comentario
994	>1000'000,000	H	Y122N, F178V, L179F, <b>L180V, A181V</b> , Q182G, F183L, S185R, A186L, I187S, C188G, S189A, V190F, V191K, R192V, R193Y, <b>A194N</b> , F195G, P196D, H197G, C198V, L199G, A200V, F201Y, <b>S202G, Y203D</b> , L207V, Y221F, A223S, V224L, <b>Q267H*</b>	Múltiples fallas a la TARAA. Suspensión de TDF (monoterapia) luego de falla renal aguda. Resistencia a 3TC, AFV y LdT. Susceptibilidad intermedia a ETV.
619	403'694,713	H	G6CS, S21PS, G25AG, H35HP, F61FL, S68PS, T70PT, L77FL, Y122D, <b>Q267H*</b>	Brote de hepatitis luego de suspensión de tratamiento. Tratamiento con TDF/FTC. Sin mutaciones de resistencia.
239	10,413	H	<b>Y203I, V231GV, Q267H*</b>	Infección de >1 año de evolución. Tratamiento con TDF/FTC. Sin mutaciones de resistencia.
355	5,547	H	<b>Q267H*</b>	2 años desde diagnóstico. 1 año de tratamiento con TDF/FTC. Sin mutaciones de resistencia.
802	911,847	H	Y122W, N123S, I162K, I163G, L164F, <b>Q267H*</b>	1 año desde diagnóstico. Tratamiento con TDF/FTC.
945	177'000,000	H	<b>L180M, M204V</b> , T237A, <b>Q267H*</b>	5 años desde diagnóstico. Tratamiento previo con 3TC. Resistente a 3TC, ETV y LdT.
139	144,788	H	Y122W, N123S, L147LR, L164G, <b>Q267H*</b> , V341A	1 año desde diagnóstico. Tratamiento con TDF/FTC.
492	48,977	G	A38AT, S53ST, A54T, N131D	10 años desde diagnóstico. Tratamiento con TDF/FTC. Mutación Q101H (escape) en AgS.
552	128,824	G	T7Y, I16T, A21S, S53T, A54T, <b>L180M, M204I</b> , L229W	11 años desde diagnóstico. Tratamiento previo con 3TC. TDF suspendido (proteinuria). Resistente a 3TC, ETV, LdT.
382	23,634	F1	N246T, H248N, T259S, I269L, T313A, K333Q	6 años desde diagnóstico. Tratamiento con TDF/FTC, posible maladherencia. Sin mutaciones de resistencia.

ADN VHB (UI/mL): carga viral de hepatitis B en unidades internacionales por mililitro (una unidad siendo equivalente a 5.4 copias). TDF: tenofovir disoproxil fumarato; ETV: entecavir; 3TC: lamivudina; AFV: adefovir dipivoxil; FTC: emtricitabina. AgS: antígeno de superficie. Q267H\*: mutación de la transcriptasa inversa de potencial valor en resistencia a 3TC y capacidad de replicación incrementada.



TABLA 7. MUTACIONES EN GENOTIPOS H DE VHB OBTENIDOS DE GENBANK

Secuencia GenBank	Genotipo	Mutaciones
1 Hepatitis B Virus DNA, complete genome, strain: MEXICO35-H GenBank: AB375164.1	H	<b>Q267H</b> , M336L
2 Hepatitis B Virus DNA, complete genome, strain: MEXICO34-H GenBank: AB375163.1	H	<b>Q267H</b> , Y122N, L207V
3 Hepatitis B Virus DNA, complete genome, strain: MEXICO33-H GenBank: AB375162.1	H	<b>Q267H</b>
4 Hepatitis B Virus DNA, complete genome, strain: MEXICO32 GenBank: AB375161.1	H	<b>Q267H</b>
5 Hepatitis B Virus DNA, complete genome, strain: MEXICO30-H GenBank: AB375160.1	H	<b>Q267H</b> , L82S, M98R
6 Hepatitis B Virus DNA, complete genome, strain: MEX8-H GenBank: AB375159.1	H	<b>Q267H</b>
7 HBV genotype H DNA, complete genome, isolate: B-MHJ9014 GenBank: AB846650.1	H	<b>Q267H</b> , T38K, V142A, D271E
8 HBV genotype H DNA, complete genome, isolate: MEX914M GenBank: AB516395.1	H	H267Q, Y7HY, H100S, L101P, L102F, V103A, G104C, S105V, A194T, W242R, I253V, Y339*CY
9 HBV genotype H DNA, complete genome, isolate: MEX912M GenBank: AB516394.1	H	<b>Q267H</b> , S135A, Q149K, S219A, A238S, I253V, C332R, K333H
10 HBV genotype H DNA, complete genome, isolate: 904MEXM GenBank: AB516393.1	H	<b>Q267H</b> , K333Q
11 HBV genotype H DNA, complete genome, isolate: HB-JI260F GenBank: AP007261.1	H	<b>Q267H</b> , T38K, S246T, I253R
12 HBV genotype H DNA, complete genome, isolate: HBV ST0404 GenBank: AB298362.1	H	<b>Q267H</b> , T38K, I253V, F296L
13 Hepatitis B virus DNA, complete genome, genotype: H GenBank: AB275308.1	H	<b>Q267H</b> , T38K, N139T
14 Hepatitis B virus, genomic DNA, complete genome, isolate: HB-JBDH1 GenBank: AB179747.1	H	<b>Q267H</b> , T38K, Y122NY, T316AT

## REFERENCIAS

1. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004; 11: 97-107
2. Thio C, Seaberg E, Skolasky R. HIV-1, hepatitis B virus, and risk of liver-related mortality in the Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet* 2002; 360: 1921-6.
3. Kao JH. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 643-50.
4. Margeridon-Thermet S, Shafer RW. Comparison of the Mechanisms of Drug Resistance among HIV, Hepatitis B, and Hepatitis C. *Viruses*. Dec 2010; 2(12): 2696–2739.
5. Lia YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2009; 373: 582-92.
6. Lok, A.S.; Lai, C.L.; Leung, N.; Yao, G.B.; Cui, Z.Y.; Schiff, E.R.; Dienstag, J.L.; Heathcote, E.J.; Little, N.R.; Griffiths, D.A.; *et al.* Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **2003**, *125*, 1714–1722.
7. Allen, M.I.; Deslauriers, M.; Andrews, C.W.; Tipples, G.A.; Walters, K.A.; Tyrrell, D.L.; Brown, N.; Condeay, L.D. Identification and characterization of mutations in hepatitis B Virus Resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* **1998**, *27*, 1670–1677.
8. Liaw, Y.F.; Gane, E.; Leung, N.; Zeuzem, S.; Wang, Y.; Lai, C.L.; Heathcote, E.J.; Manns, M.; Bzowej, N.; Niu, J.; *et al.* 2-Year GLOBE trial results: Telbivudine Is superior to lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 486–495.
9. Sherman, M.; Yurdaydin, C.; Simsek, H.; Silva, M.; Liaw, Y.F.; Rustgi, V.K.; Sette, H.; Tsai, N.; Tenney, D.J.; Vaughan, J.; *et al.* Entecavir therapy for lamivudine-refractory chronic hepatitis B: Improved virologic, biochemical, and serology outcomes through 96 weeks. *Hepatology* **2008**, *48*, 99–108.
10. Santantonio, T.; Fasano, M.; Durantel, S.; Barraud, L.; Heichen, M.; Guastadisegni, A.; Pastore, G.; Zoulim, F. Adefovir dipivoxil resistance patterns in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Antivir. Ther.* **2009**, *14*, 557–565.
11. Rapti, I.; Dimou, E.; Mitsoula, P.; Hadziyannis, S.J. Adding-on versus switching-to adefovir therapy in lamivudine-resistant HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* **2007**, *45*, 307–313.

## REFERENCIAS

12. Mata MJA, et al. *Annals of Hepatology*, 2012; (1): 47-51.
13. Influence of HIV infection on response to tenofovir in patients with chronic hepatitis B. Plaza Z, Aguilera A, Mena A, Vispo E, Sierra-Enguita R, Tomé S, Pedreira J, Rodriguez C, Barreiro P, del Romero J, Soriano V, Poveda E. *AIDS* 2013, 27:2219–2224.
14. Factors associated with delayed hepatitis B viral suppression on tenofovir among patients coinfecting with HBV-HIV in the CNICS cohort. Kim HN<sup>1</sup>, Rodriguez CV, Van Rompaey S, Eron JJ, Thio CL, Crane HM, Overton ET, Saag MS, Martin J, Geng E, Mugavero M, Rodriguez B, Mathews WC, Boswell S, Moore R, Kitahata MM; Centers for AIDS Research Network of Integrated Clinical Systems. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2014 May 1;66(1):96-101.
15. Substitution Rtq267h of Hepatitis B Virus Increases the Weight of Replication and Lamivudine Resistance. Bo Qin, Bo Zhang, Xiaodong Zhang, Tingting He, Wenying Xu, Lijun Fu, and Chunyu Tu. *Hepat Mon*. Oct 2013; 13(10): e12160.