

## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS.

### **4.1. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES DE LA REGIÓN DEL PROMOTOR BÁSICO DEL GEN PRECORE-CORE DEL VHB: RELACIÓN CON LAS MUTACIONES DE LA REGIÓN PRECORE Y LOS GENOTIPOS VIRALES.**

Se incluyeron en este estudio muestras de suero de 182 pacientes HBsAg positivo. Ciento dieciséis (64%) presentaban una hepatitis crónica por el VHB y 66 (36%) eran portadores asintomáticos del VHB. En el grupo de las hepatitis crónicas, treinta (16%) eran HBeAg positivo con ALT persistentemente elevada, 58 (32%) HBeAg negativo con ALT persistentemente elevada y 28 (15%) HBeAg negativo con valores fluctuantes de ALT durante el seguimiento. Todos los pacientes portadores asintomáticos eran HBeAg negativo.

Las características demográficas, serológicas e histológicas de los pacientes estudiados se muestran en la Tabla 3. Se encontraron diferencias significativas en la proporción de hombres y mujeres entre el grupo de portadores asintomáticos y todos los demás grupos; en el grupo de portadores asintomáticos había un 56% de mujeres frente a un 20% en los HBeAg positivo con ALT elevada ( $p=0.001$ ), un 21% en los HBeAg negativo con ALT elevada ( $p<0.001$ ) y un 29% en el grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante ( $p=0.015$ ). No se observaron diferencias significativas en la edad de los pacientes entre los grupos estudiados.

Al evaluar el tiempo transcurrido desde que se conocía la infección se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos ( $p=0.003$ ). Globalmente se observó una tendencia lineal creciente en el sentido HBeAg positivo con ALT elevada (mediana=2.8 años, 1.5-17 años), HBeAg negativo con ALT elevada (mediana=6.9 años, 1.1-28 años) portador asintomático (mediana=8.3 años, 3-22 años) y ALT fluctuante (mediana=9.2 años, 2-15 años) (tendencia lineal,  $p=0.002$ ; desviación de la linealidad,  $p=n.s.$ ). Al comparar los diferentes grupos entre sí, las diferencias en la duración de la infección entre los HBeAg positivo con ALT elevada y los ALT fluctuante o los portadores asintomáticos fueron claramente significativas ( $p=0.015$  y  $p=0.002$ , respectivamente). Estas diferencias fueron próximas a la significación al comparar los pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativo y ALT elevada con los portadores asintomáticos ( $p=0.051$ ), los ALT fluctuante ( $p=0.099$ ) o con los HBeAg positivo ALT elevada ( $p=0.066$ ). Con relación al valor de la ALT no se observaron diferencias entre los pacientes HBeAg positivo de ALT elevada y los HBeAg negativo de ALT elevada.

La punción biopsia hepática se practicó a 56 (49%) pacientes con hepatitis crónica, con un máximo de más menos tres años (mediana=1.3 años, -1.74 – 2.96) a partir de la fecha en que se incluyeron en el estudio, demostrándose lesiones de HCA en 44 (79%) casos y de CH en 12 (21%) casos. Al comparar el grado de lesión hepática entre los diferentes grupos se observaron diferencias próximas a la significación entre los HBeAg negativo con ALT elevada (70% de HCA y 30% de CH) y las hepatitis crónicas con ALT fluctuante (100% HCA) ( $p=0.13$ ). Las diferencias fueron menos próximas a la significación entre los HBeAg negativo con ALT elevada (70% de HCA y 30% de CH) y las hepatitis crónicas HBeAg positivo con ALT elevada (88% de HCA) ( $p=0.2$ ).

**Tabla 3. Datos demográficos, serológicos e histológicos de los pacientes incluidos en el estudio.**

	HBeAg (+) ALT elevada	HBeAg (-) ALT elevada	HBeAg (-) ALT fluctuante	Portador asintomático
Nº casos (%)	30 (16%)	58 (32%)	28 (15%)	66 (37%)
Edad años (rango)	42 (18-70)	45 (22-70)	42 (21-73)	45 (20-64)
Hombres/mujeres	24 / 6	46 / 12	20 / 8	29 / 37
Duración de la infección (años)	2.8 (1.5-17)	6.9 (1.1-28)	9.2 (2-26)	8.3 (3-22)
ALT (UI/L)	102 (48-750)	93 (50-425)	39 (16-367)	22 (19-41)

HBeAg (+)	30	0	1	0
ADN-VHB (+)	30	58	23	30
ADN-VHB copias /mL (mediana)	$3.8 \times 10^8$	$6.6 \times 10^6$	$4.5 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$
Lesión histológica HCA/CH	14/2	24/10	6/0	
<b>Factores de riesgo:</b>				
Transmisión sexual	0	2	0	1
Transfusión		4	2	3
Intrafamiliar	6	10	7	15
Intervenciones Quirúrgicas	6	13	7	7
Desconocido	18	43	17	40

#### 4.1.1. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL HBeAg EN LAS HEPATITIS CRÓNICA HBeAg POSITIVO.

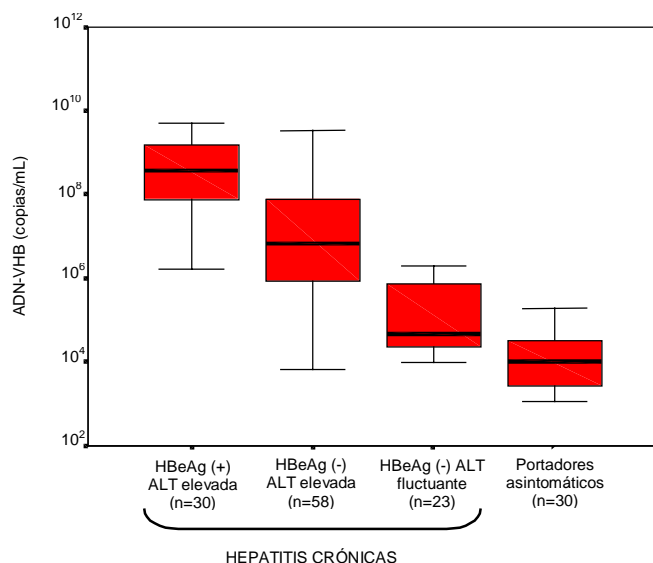
La cuantificación del HBeAg se realizó en las muestras de suero de todos los 30 pacientes HBeAg positivo con ALT elevada. La mediana de la concentración de HBeAg fue de 518 UPE/mL con un mínimo de 0.12 UPE/mL y un máximo de 17600 UPE/mL.

#### 4.1.2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DEL ADN-VHB.

La determinación cualitativa del ADN-VHB se realizó en todos los casos mediante la técnica de doble PCR. El ADN-VHB fue positivo en 141 (77%) de los 182 pacientes; en los 30 (100%) HBeAg positivo con ALT elevada, en los 58 (100%) de los HBeAg negativo con ALT elevada, en 23 (82%) de los 28 ALT fluctuante y en 30 (45%) de los 66 portadores asintomáticos ( $p < 0.001$ ). Mediante la prueba de tendencia lineal de Mantel-Haenszel se observó que la proporción de pacientes ADN-VHB positivo decrecía de forma lineal siguiendo el orden indicado anteriormente ( $p < 0.001$ ). Al comparar los diferentes grupos entre sí se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre todos los grupos excepto entre los HBeAg positivo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT elevada.

#### 4.1.3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL ADN-VHB.

La determinación cuantitativa del ADN-VHB mediante la técnica de PCR a tiempo real se realizó en todos los pacientes ADN-VHB positivo por la técnica de doble PCR. Se observó que la mediana de la concentración de ADN-VHB en el grupo de los HBeAg positivo con ALT elevada era de  $3.8 \times 10^8$  copias/mL (rango  $1.7 \times 10^6 - 5 \times 10^9$ ), en el grupo HBeAg negativo ALT elevada era de  $6.6 \times 10^6$  copias/mL (rango  $6.3 \times 10^3 - 3.2 \times 10^9$ ), en el grupo de ALT fluctuante era de  $4.47 \times 10^4$  copias/mL (rango  $1.1 \times 10^4 - 1.9 \times 10^6$ ) y en los portadores asintomáticos era de  $1 \times 10^4$  copias/mL (rango  $1.1 \times 10^3 - 1.9 \times 10^5$ ) ( $p < 0.001$ ). Se observó una tendencia lineal decreciente en el sentido HBeAg positivo ALT elevada, HBeAg negativo ALT elevada, ALT fluctuante y portador asintomático (tendencia lineal,  $p < 0.001$ ; desviación de la linealidad,  $p = n.s.$ ). Al comparar las concentraciones de ADN-VHB entre los diferentes grupos las diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los casos ( $p < 0.05$ ) (Figura 14).



**Figura 14. Determinación cuantitativa del ADN-VHB en los grupos estudiados. Los diagramas de cajas representan la amplitud intercuartil que contiene el 50% de los valores centrales. Los "bigotes" son las líneas que se extienden desde la caja hasta los valores más altos y más bajos, excluyendo los valores atípicos. Una línea que atraviesa la caja indica la situación de la mediana.**

Al relacionar el grado de lesión histológica con la concentración de ADN-VHB en el grupo de las hepatitis crónicas HBeAg negativo con ALT elevada no se observó diferencia en la concentración de ADN-VHB entre los pacientes con HCA (mediana=1.5x10<sup>7</sup>, 4.4x10<sup>4</sup>–3.2x10<sup>9</sup> copias ADN-VHB/mL) y CH (mediana=1.7x10<sup>7</sup>, 2.6x10<sup>4</sup>–1.1x10<sup>9</sup> copias ADN-VHB/mL). En los demás grupos no se pudo realizar esta comparación debido a que en el examen histológico no había pacientes que presentasen lesiones características de CH.

#### 4.1.4. GENOTIPADO DEL VHB.

Los genotipos del VHB se determinaron mediante homología de secuencias en un total de 129 (71%) pacientes ADN-VHB positivo, 30 (100%) pacientes HBeAg positivo con ALT elevada, 58 (100%) pacientes HBeAg negativo con ALT alta, 18 (78%) pacientes con ALT fluctuante y 23 (77%) portadores asintomáticos.

En el grupo HBeAg positivo con ALT elevada, 18 (60%) eran genotipo A, 10 (33%) genotipo D y 2 (7%) genotipo F. En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada 17 (30%) eran genotipo A, 35 (60%) genotipo D, 2 (3%) genotipo F, 2 (3%) genotipo B y 2 (3%) mezcla de genotipos A y D. En el grupo de pacientes con ALT fluctuante 9 (50%) eran genotipo A y 9 (50%) genotipo D. Finalmente, en el grupo de portadores asintomáticos 11 (48%) eran genotipo A, 10 (43%) genotipo D, 1 (4%) genotipo B y 1 (4%) mezcla de genotipos A y D. Si se consideraran la totalidad de los casos, el genotipo A se encontraría en el 43% de los pacientes y el genotipo D en un 50%, y dentro de los HBeAg negativo, el genotipo A se encontraría en un 37% de casos y el genotipo D en un 55%.

Al considerar únicamente los genotipos mayoritarios A y D, globalmente se encontraron diferencias significativas en la distribución de los genotipos entre los distintos grupos (p=0.048). Al comparar los grupos de pacientes entre sí se encontraron diferencias significativas entre los HBeAg positivo con ALT elevada y los HBeAg negativo con ALT elevada (p=0.007), (60% del genotipo A en los HBeAg positivo con ALT elevada vs 60% del genotipo D en los HBeAg negativo con ALT elevada). No se encontraron diferencias significativas en la distribución de los genotipos del VHB entre los pacientes HBeAg positivo con ALT elevada, ALT fluctuante o portadores asintomáticos.

En la Figura 15 se muestra la distribución de los genotipos del VHB en los grupos estudiados. Como puede observarse, el genotipo A es mayoritario en los pacientes HBeAg positivo con ALT elevada mientras que el genotipo D es mayoritario en los HBeAg negativo con ALT elevada. En los grupos de hepatitis crónica con ALT fluctuante y en los portadores asintomáticos la distribución de genotipos es similar, y próxima a la observada en el grupo de los HBeAg positivo con ALT elevada.

La diferente distribución de genotipos de VHB entre los 4 grupos estudiados indica la necesidad de tener en cuenta la variable genotipo del VHB en todos los estudios posteriores, por lo cual se estratificará por esta variable para evitar asociaciones erróneas. Los genotipos del VHB se estudiarán en relación con

la concentración del HBeAg, del ADN-VHB y la lesión histológica hepática; en estos estudios se incluirán únicamente los genotipos mayoritarios A y D.

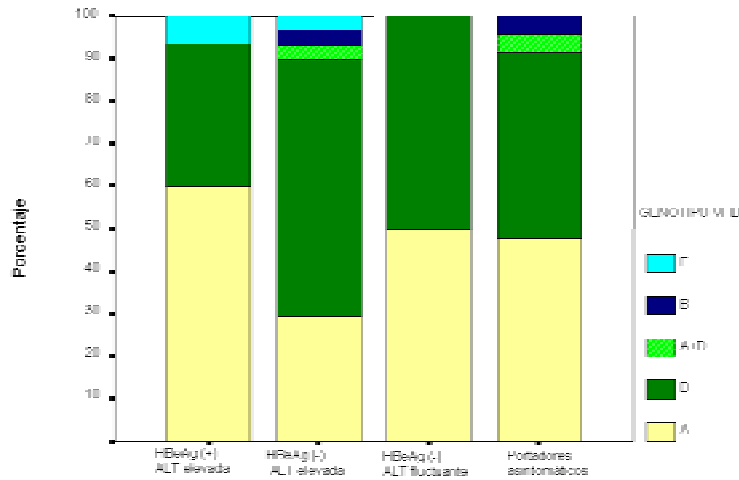


Figura 15. Distribución de los genotipos de VHB en los grupos estudiados.

#### 4.1.4.1. Relación entre los genotipos del VHB y el tiempo conocido de infección.

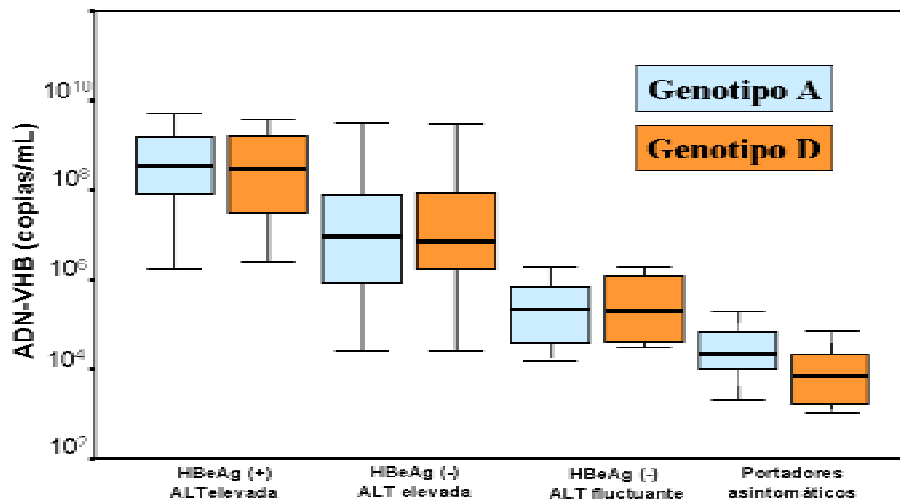
Al relacionar los genotipos virales con el tiempo conocido de infección, se observó que en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada los pacientes de genotipo A tenían un mayor tiempo de infección conocida (mediana= 8.7, 1.5-28 años) que los pacientes de genotipo D (mediana=5 años, 1.1-22 años) ( $p=0.032$ ). En los demás grupos no se encontraron diferencias significativas pero en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada los pacientes de genotipo A también tenían un mayor tiempo de infección conocida (mediana=7 años, 2-17 años) que los pacientes de genotipo D (mediana=1.9, 1.5-10 años) ( $p=0.18$ ).

#### 4.1.4.2. Relación entre los genotipos del VHB y la concentración de HBeAg en las hepatitis crónicas HBeAg positivo con ALT elevada.

Al relacionar el genotipo viral con la concentración del HBeAg se observó que para el genotipo A la mediana de HBeAg era de 544 UPE/mL (0.12-17600 UPE/mL) y para el genotipo D de 511 UPE/mL (1.6-8268). Las diferencias entre las dos distribuciones no fueron significativas.

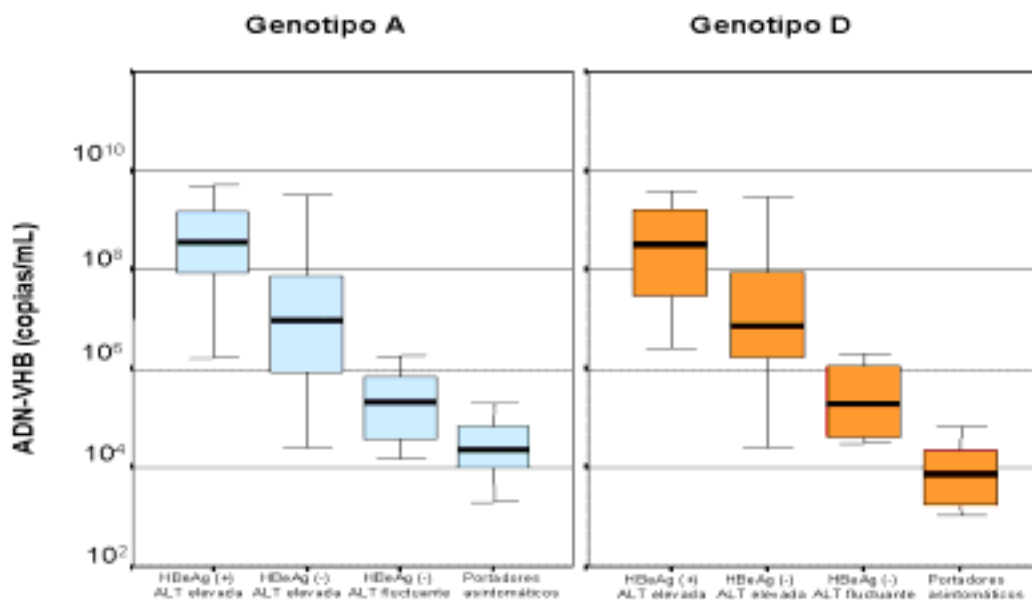
#### 4.1.4.3. Relación entre los genotipos del VHB y la concentración de ADN-VHB.

Al analizar la relación entre los genotipos mayoritarios (A y D) del VHB y la concentración de ADN-VHB en los cuatro grupos estudiados, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de ADN-VHB entre los genotipos (Figura 16).



**Figura 16. Relación entre los genotipos A y D del VHB y la concentración del ADN-VHB en cada uno de los grupos estudiados.**

Sin embargo, al estratificar los pacientes por genotipo del VHB se observó una tendencia lineal decreciente en la concentración del ADN-VHB igual a la observada al estudiar la concentración del ADN-VHB independientemente del genotipo (Figura 14). Esta tendencia decrecía en el sentido HBeAg positivo con ALT elevada, HBeAg negativo con ALT elevada, hepatitis crónica con ALT fluctuante y portador asintomático (tendencia lineal,  $p < 0.001$  tanto para el genotipo A como para el D; desviación de la linealidad,  $p = ns$  para el genotipo A y  $p = ns$  para el genotipo D). Al comparar el ADN-VHB de los grupos estratificados por genotipo, las diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los casos ( $p < 0.05$ ). En la Figura 17 se muestran los resultados de la concentración de ADN-VHB en los grupos estratificados por genotipo del VHB.



**Figura 17. Concentración del ADN-VHB en los genotipos A y D del VHB.**

#### 4.1.4.4. Relación entre los genotipos del VHB y la lesión histológica hepática.

La punción biopsia hepática se practicó en 56 pacientes con hepatitis crónica, 16 (53%) HBeAg positivo con ALT elevada (14 HCA y 2 CH), 34 (59%) HBeAg negativo con ALT elevada (24 HCA y 10 CH) y 6 (21%) hepatitis crónica con ALT fluctuante (6 HCA). No se observó relación significativa entre la lesión histológica y el genotipo viral.

Los resultados globales de la determinación de los genotipos del VHB y su relación con la concentración de HBeAg, ADN-VHB así como con la lesión histológica hepática se exponen en la Tabla 4.

**Tabla 4. Resultados globales de la determinación de los genotipos del VHB en los pacientes con hepatitis crónicas y en los portadores asintomáticos.**

		HBeAg (+) ALT elevada	HBeAg (-) ALT elevada	HBeAg (-) ALT fluctuante	Portadores asintomáticos
<b>Nº casos</b>		30	58	18	23
<b>Genotipo A</b>		18 (60%)	17 (30%)	9 (50%)	11 (48%)
<b>Genotipo D</b>		10 (33%)	35 (60%)	9 (50%)	10 (43%)
<b>Otros genotipos</b>		2 (7%)	6 (9%)	0	2 (8%)
<b>Examen histológico (HCA/CH)</b>	<b>Genotipo A</b>	7/2	7/4	1/0	
	<b>Genotipo D</b>	6/0	16/5	5/0	
<b>ADN-VHB copias/mL (mediana)</b>	<b>Genotipo A</b>	1.5x10 <sup>9</sup>	8.9x10 <sup>6</sup>	6.3x10 <sup>5</sup>	2.2x10 <sup>4</sup>
	<b>Genotipo D</b>	1.6x10 <sup>9</sup>	6.8x10 <sup>6</sup>	1.2x10 <sup>6</sup>	7.1x10 <sup>3</sup>

#### 4.1.5. DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LA ZONA DEL PROMOTOR BÁSICO DEL GEN PRECORE-CORE DEL VHB.

Como se ha comentado previamente, el PBC (nucleótidos 1742-1849) contiene elementos “cis-acting” que, de manera independiente, dirigen la transcripción del ARN<sub>precore</sub> y del ARN<sub>core</sub>. Estos elementos se solapan parcialmente aunque son genéticamente distintos. Los ARNs cuya transcripción es controlada por el PBC presentan puntos de iniciación diferentes: el ARN<sub>precore</sub> en los nucleótidos 1785 ó 1786, o entre los nucleótidos 1791-1797, y el ARN<sub>core</sub> entre los nucleótidos 1810-1820. Estas diferencias en los puntos de inicio de los ARNs son debidas a que en el PBC no existe una única caja “TATA-like” (regiones ricas en AT) en el sentido estricto (TATAAA). En su lugar el PBC presenta 3 cajas TATA-like que dirigen la transcripción del ARN<sub>precore</sub>: **TA1** 5’-AGATTA-3’ (nucleótidos 1750-1755), **TA2** 5’-TTAAA-3’ (nucleótidos 1758-1762) y **TA3** 5’-TATTA-3’ (nucleótidos 1771-1775), y una cuarta caja que dirige la transcripción del ARN<sub>core</sub> o ARN<sub>pregenómico</sub>: **TA4** 5’-CATAAATT-3’ (nucleótidos 1788-1795). Esta última caja presenta una doble función ya que contiene el elemento TATA-like para el

ARNcore o ARNpregenómico y también funciona como región de inicio (Inr) para algunos de los ARNprecore. El Inr del ARNprecore comprende los nucleótidos 1788-1791 (5'-CATA-3'), que se solapa con el extremo 5' de la caja TA4. El Inr del ARNcore o ARNpregenómico que comprende los nucleótidos 1817-1821 (5'-CAAT-3') se solapa con el sitio de inicio del ARNpregenómico. En este estudio, además de todos los elementos anteriormente citados, se han analizado dos nucleótidos del PBC, las posiciones 1762 (incluida en TA2) y 1764, ya que en estudios previos se ha observado que presentan una elevada frecuencia de mutaciones.

Se han analizado las mutaciones en la totalidad de la secuencia del PBC en las muestras de suero de los pacientes con hepatitis crónica y portadores asintomáticos ADN-VHB positivo cuyo producto amplificado tenía la suficiente intensidad como para ser secuenciado, de manera global y separadas por las diferentes regiones que constituyen el PBC: TA1, TA2 TA3 y TA4, regiones de inicio de la transcripción para el ARNprecore (ARNprecore Inr) y ARNpregenómico (ARNpregenómico Inr), regiones del extremo 5' del ARNprecore y del extremo 5' del ARNpregenómico, y también se ha incluido en este análisis la región DR1 (región de iniciación del proceso de replicación viral), cuya secuencia está incluida dentro de la secuencia del PBC. La distribución de estas mutaciones se ha relacionado con los genotipo del VHB, las concentraciones de ADN-VHB y HBeAg, y la lesión histológica hepática.

#### 4.1.5.1. Análisis global de las mutaciones en la secuencia del PBC.

Se estudiaron conjuntamente todas aquellas mutaciones que afectaban las zonas del PBC indicadas anteriormente, considerándose como variantes normales aquellas secuencias que no presentaban alteraciones respecto a la secuencia patrón del genotipo correspondiente y variantes mutadas las que sí presentaban alguna alteración. En las 129 secuencias analizadas se observaron cambios en 106 (82%): 19 (63%) HBeAg positivo con ALT elevada, 53 (91%) HBeAg negativo con ALT elevada, 17 (94%) HBeAg negativo con ALT fluctuante y 17 (74%) portadores asintomáticos. Al comparar la distribución de las variantes normal y mutada entre los grupos se observó que la proporción de mutaciones no era significativamente diferente entre los grupos HBeAg positivo con ALT elevada y portadores asintomáticos, y tampoco entre los grupos HBeAg negativo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT fluctuante. Se observaron diferencias en la proporción de mutaciones entre el grupo de HBeAg positivo con ALT elevada y los grupos HBeAg negativo con ALT elevada ( $p=0.001$ ) y HBeAg negativo con ALT fluctuante ( $p=0.016$ ). También se observaron diferencias en la proporción de mutaciones entre el grupo de portadores asintomáticos y los grupos HBeAg negativo con ALT elevada ( $p=0.039$ ), y HBeAg negativo con ALT fluctuante ( $p=0.07$ ). Al comparar globalmente los cuatro grupos se observaron diferencias entre ellos ( $p=0.004$ ) con una tendencia lineal significativa ( $p<0.001$ ), en la que aumentaba la proporción de secuencias mutadas en el orden HBeAg positivo con ALT elevada, portadores asintomáticos, HBeAg negativo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT fluctuante (Figura 18).

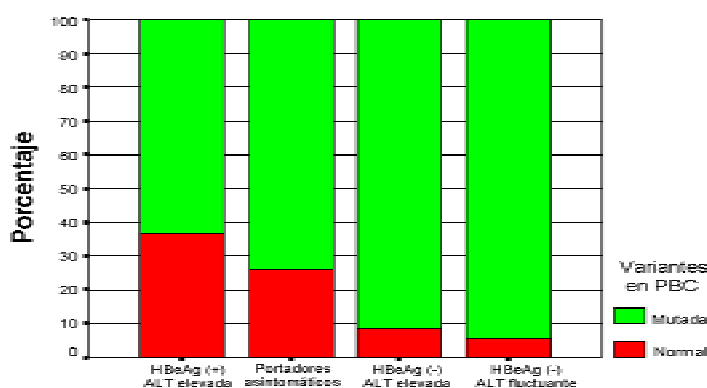


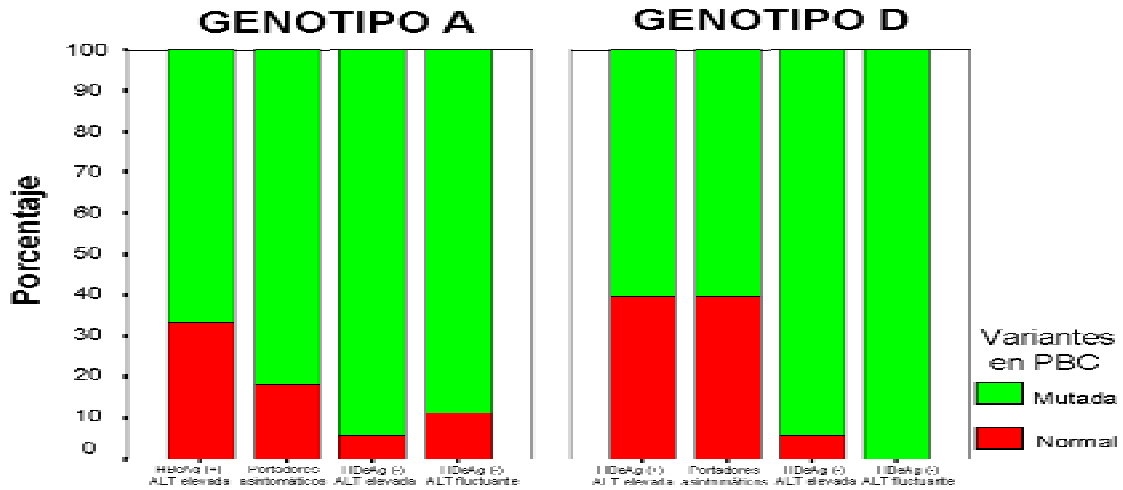
Figura 18. Análisis global de mutaciones en la secuencia del PBC del VHB. Distribución en los grupos estudiados.

##### 4.1.5.1.1. Relación entre las mutaciones en el PBC y los genotipos del VHB.

Al estratificar los diferentes grupos por genotipo del VHB y comparar la distribución de variantes normal y mutada, se observó que las diferencias anteriores se mantenían para el genotipo D. Sin embargo, para el genotipo A, las diferencias entre el grupo de portadores asintomáticos y los grupos HBeAg negativo con

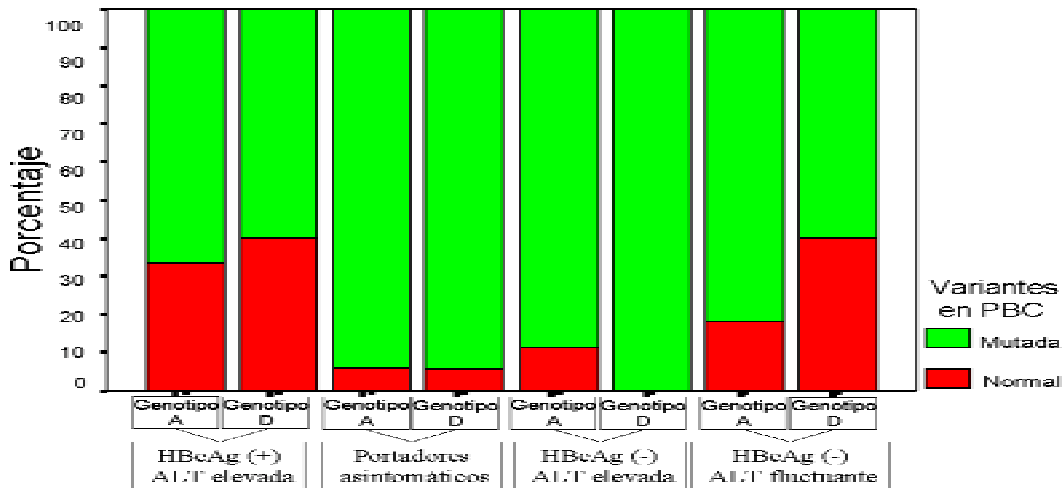


ALT elevada y HBeAg negativo con ALT fluctuante no se mantenían, debido probablemente al aumento en la proporción de mutaciones en el PBC en el grupo de portadores asintomáticos de genotipo A. Al considerar los cuatro grupos globalmente, las diferencias seguían siendo significativas para el genotipo D ( $p=0.004$ ) y se alejaban de la significación para el genotipo A ( $p=0.19$ ). La tendencia lineal seguía siendo significativa tanto para el genotipo A ( $p=0.005$ ) como para el D ( $p=0.001$ ) (Figura 19).



**Figura 19. Análisis global de mutaciones en la secuencia del PBC y genotipos virales A y D. Análisis estratificado por genotipos**

Al estratificar por grupo de pacientes y comparar la distribución de variantes normal y mutada, no se observaron diferencias en la proporción de mutaciones en el PBC del VHB entre el genotipo A y D dentro de cada uno de los grupos (Figura 20).



**Figura 20. Análisis global de mutaciones en la secuencia del PBC y genotipos virales A y D. Análisis estratificado por pacientes.**

Los análisis de la distribución de las variantes normales y mutadas en los diferentes grupos de pacientes efectuados anteriormente, al estratificar por genotipos, y por grupos de pacientes, indican que los grupos HBeAg positivo con ALT elevada y portadores asintomáticos presentan una menor proporción de mutaciones en la secuencia del PBC que los grupos HBeAg negativo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT fluctuante; así mismo, estas diferencias entre los grupos son independientes del genotipo viral, aunque en el grupo de portadores asintomáticos de genotipo A parece apuntarse un comportamiento

distinto al observarse una mayor proporción de mutaciones que no alcanza a ser diferente con ninguno de los restantes grupos.

#### ***4.1.5.1.2. Relación entre las variantes del PBC del VHB con la concentración de HBeAg.***

En el grupo de los HBeAg positivo con ALT elevada se observó que los pacientes que presentaban la variante normal tenían una concentración de HBeAg (mediana=800 UPE/mL, 3.3-14400 UPE/mL) superior a la de los pacientes con variantes mutadas (mediana=127 UPE/mL, 0.12-17600 UPE/mL), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Cuando se estratificó por genotipo viral las diferencias se mantuvieron para el genotipo A (mediana=2980 UPE/mL en lo no mutados vs 53 UPE/mL en los mutados,  $p=0.15$ ) pero no en el genotipo D (511 UPE/mL vs 510 UPE/mL). En la interpretación de este último resultado se ha de tener en cuenta el escaso número de pacientes ( $n=4$ ) que presentaban variantes mutadas y genotipo D.

#### ***4.1.5.1.3. Relación entre las variantes del PBC del VHB con la concentración de ADN-VHB.***

Al relacionar la distribución de variantes del PBC con la concentración de ADN-VHB en cada uno de los grupos estudiados no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las variantes normal y mutada. Al comparar dentro de cada grupo y genotipo la concentración de ADN-VHB entre las variantes normal y mutada, se observó que en el grupo HBeAg positivo de genotipo A (6 casos con variante normal y 12 con variante mutada) no se observaron diferencias en la concentración de ADN-VHB. Los demás grupos no se compararon dado el escaso número de pacientes.

#### ***4.1.5.1.4. Relación entre las variantes del PBC del VHB con el examen histológico.***

La punción biopsia hepática se practicó en 56 pacientes con hepatitis crónica: 16 (53%) HBeAg positivo con ALT elevada (14 HCA y 2 CH), 34 (57%) HBeAg negativo con ALT elevada (24 HCA y 10 CH) y 6 (33%) hepatitis crónica con ALT fluctuante (6 HCA). Al analizar globalmente los 56 casos no se observó relación entre la lesión histológica y la presencia de mutaciones en el PBC. Al estratificar tanto por grupos de pacientes como por genotipos tampoco se observó esta relación. Sin embargo, al cuantificar el número de regiones del PBC mutadas, en general se observó que los pacientes con HCA presentaban menos regiones mutadas (mediana=2, rango=0-4) que los pacientes con cirrosis (mediana=3, rango 0-4) ( $p=0.06$ ). Al estratificar por grupo de pacientes, esta comparación sólo se pudo realizar en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada, donde los casos con HCA presentaron menos regiones mutadas (mediana=2, 0-4) que los pacientes con CH (mediana=3, rango 0-4) ( $p=0.19$ ). Al estratificar por genotipo, en el genotipo A no se encontraron diferencias entre el número de regiones mutadas y el tipo de lesión histológica mientras que en el genotipo D los casos con HCA (mediana=2, rango 0-4) presentaron menos regiones mutadas que los casos con CH (mediana=3, rango 2-4) ( $p=0.05$ ). Estos resultados sugieren que los pacientes con CH presentan más regiones mutadas en la zona del PBC, aunque este hecho no parece observarse en el genotipo A.

### **4.1.5.2. Análisis de las mutaciones en las diferentes regiones del PBC.**

#### ***4.1.5.2.1. Mutaciones en los nucleótidos 1762 y 1764 del PBC.***

En los trabajos que se han publicado las mutaciones en las posiciones 1762 y 1764 son las que se han detectado con más frecuencia. Por esta razón en este trabajo se analizarán conjuntamente y por separado.

#### 4.1.5.2.1.1. Estudio conjunto de las mutaciones en los nucleótidos 1762 y 1764.

En estas posiciones se consideró como variante normal la que presentaba una A en la posición 1762 y una G en la posición 1764 (A G); cualquier modificación sobre esta secuencia se consideró variante mutada. Los cambios que se observaron con mayor frecuencia fueron de la A por una T en la posición 1762 y de la G por una A en la posición 1764 (TA). La relación de las mutaciones observadas en estas posiciones se muestra en la Tabla 5.

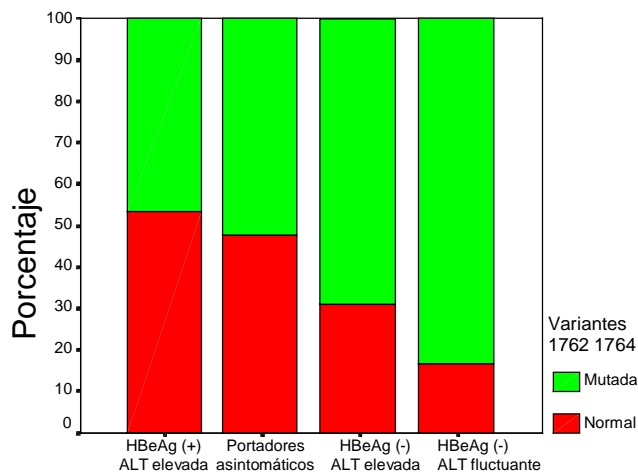
**Tabla 5. Mutaciones en las posiciones 1762 y 1764 del PBC. Relación con el genotipo viral.**

	HBeAg (+) ALT elevada			HBeAg (-) ALT elevada					HBeAg (-) ALT fluctuante		Portadores asintomáticos			
	Genotipo VHB			Genotipo VHB					Genotipo VHB		Genotipo VHB			
Posición 1762 1764	A	D	F	A	A+D	B	D	F	A	D	A	A+D	B	D
A A	1			1			2		1	2				1
A C							1							
A R														1
DELEC														1
T A	8	1		11			19		5	3	6			1
W A				1		1								
W M									1					
W R	1	3		1			3		1	2	1	1		
A G	8	6	2	3	2	1	10	2	1	2	4		1	6
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>17</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>35</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>10</b>

A=Adenina; C=Citosina; G=Guanina; T=Timina; Y=C/T; R=A/G; M=A/C; K=G/T; S=C/G; W=A/T; DELEC =Delección

Se detectaron secuencias mutadas en 81 (63%) de los casos: 14 (47%) HBeAg positivo con ALT elevada, 40 (69%) HBeAg negativo con ALT elevada, 15 (83%) HBeAg negativo con ALT fluctuante y 12 (52%) portadores asintomáticos. En un 88% de los casos, el cambio en la posición 1764 se acompañó de la variante mutada en la posición 1762.

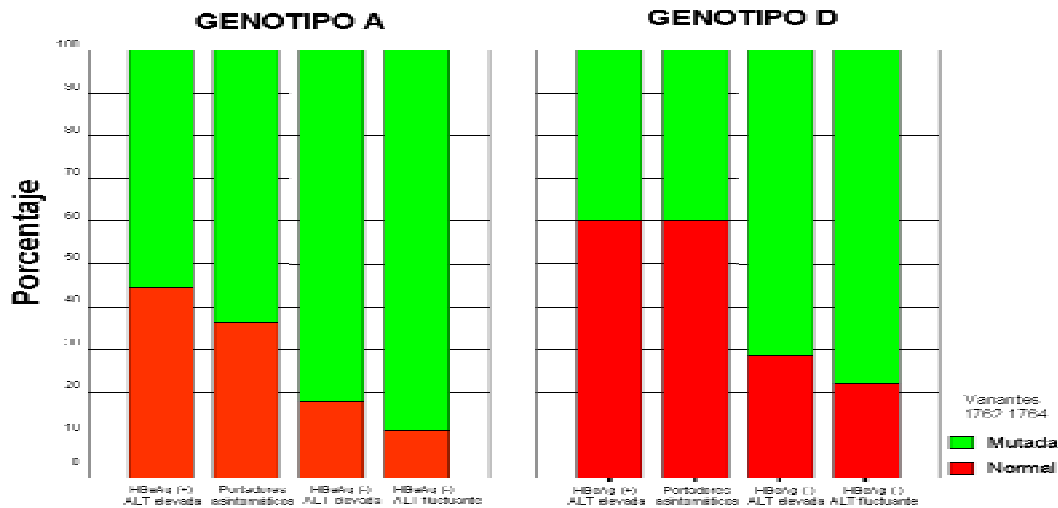
Al comparar la distribución de las variantes normal y mutada entre los grupos se observó que la proporción de mutaciones era diferente significativamente entre el grupo HBeAg positivo con ALT elevada y los grupos HBeAg negativo con ALT elevada ( $p=0.042$ ) y HBeAg negativo con ALT fluctuante ( $p=0.012$ ). También se observaron diferencias en la proporción de mutaciones entre el grupo de portadores asintomáticos y los grupos HBeAg negativo con ALT fluctuante ( $p=0.037$ ) y HBeAg negativo con ALT elevada ( $p=0.16$ ), aunque en este último caso la diferencia estadística estaría más alejada de la significación. No se observaron diferencias entre el grupo de HBeAg positivo de ALT elevada y el grupo de portadores asintomáticos, ni entre el grupo de HBeAg negativo de ALT elevada y el grupo de HBeAg negativo con ALT fluctuante. Si se utilizara la presencia de mutaciones en las posiciones 1762 y 1764 para distinguir entre pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativo (HBeAg negativo con ALT elevada y fluctuante) de los portadores asintomáticos se obtendría una sensibilidad del 83% y un valor predictivo negativo del 78%. Al comparar globalmente los cuatro grupos se observaron diferencias entre ellos ( $p=0.03$ ) con una tendencia lineal significativa ( $p=0.004$ ), en la que aumentaba la proporción de secuencias mutadas en el orden HBeAg positivo con ALT elevada, portadores asintomáticos, HBeAg negativo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT fluctuante (Figura 21).



**Figura 21. Distribución de las mutaciones en las posiciones 1762 y 1764 del PBC.**

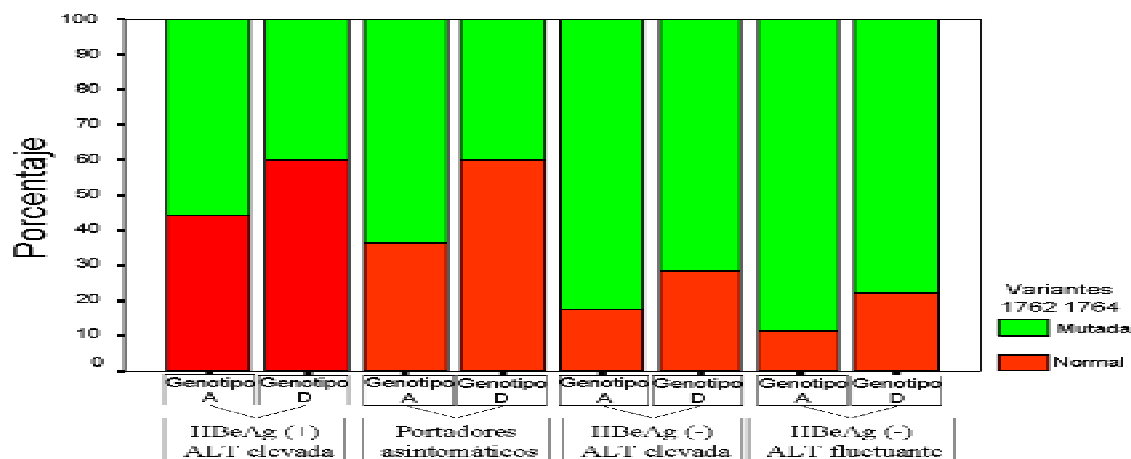
#### 4.1.5.2.1.1.1. Relación entre las mutaciones 1762 y 1764 del PBC y los genotipos virales.

Al estratificar los diferentes grupos por genotipo y comparar la distribución de variantes normal y mutada se observó que en general las diferencias anteriores se mantenían aunque sólo con proximidad a la significación. Al considerar los cuatro grupos globalmente, la significación ( $p=0.18$  para el genotipo A y  $p=0.09$  para el genotipo D) decrecía con respecto a la observada antes de la estratificación por genotipo. La tendencia lineal seguía siendo significativa tanto para el genotipo A ( $p=0.033$ ) como para el D ( $p=0.021$ ). (Figura 22).



**Figura 22. Mutaciones en las posiciones 1762 y 1764 del PBC y genotipos virales A y D. Análisis estratificado por genotipos**

Al estratificar por grupo de pacientes, no se observaron diferencias en la proporción de mutaciones en los nucleótidos 1762 y 1764 entre el genotipo A y D dentro de cada grupo (Figura 23).



**Figura 23. Mutaciones en las posiciones 1762 y 1764 del PBC y genotipos virales A y D. Análisis estratificado por pacientes.**

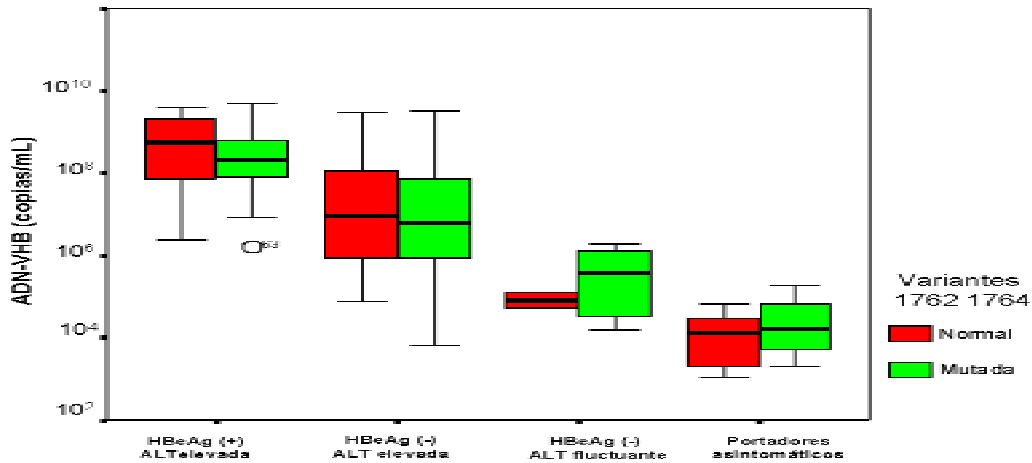
Los análisis de la distribución de las variantes normales y mutadas en los diferentes grupos de pacientes efectuados anteriormente, al estratificar por genotipos, y por grupos de pacientes, indican que los grupos HBeAg positivo con ALT elevada y portadores asintomáticos presentan una menor proporción de mutaciones en estas posiciones que los grupos HBeAg negativo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT fluctuante; así mismo, estas diferencias entre los grupos son independientes del genotipo viral, y dentro de cada grupo la proporción de mutaciones también es independiente del genotipo viral. Es interesante notar el hecho de que los HBeAg positivo con ALT elevada y los portadores asintomáticos presentaron una proporción similar de mutaciones en las posiciones 1762 y 1764.

#### *4.1.5.2.1.1.2. Relación entre las variantes de las posiciones 1762 y 1764 del PBC con la concentración de HBeAg.*

En el grupo de los HBeAg positivo con ALT elevada, se observó que los pacientes que presentaban la variante normal tenían una concentración de HBeAg (796 UPE/mL, 3.3-16000 UPE/mL) superior a la de los pacientes con variantes mutadas (53 UPE/mL, 0.12-17600) con diferencias estadísticas próximas a la significación ( $p=0.085$ ). Cuando se estratificó por genotipo viral las diferencias se mantuvieron para el genotipo A (2980 UPE/mL, 23-16000 UPE/mL, en los no mutados vs 53 UPE/mL, 0.12-17600 UPE/mL, en los mutados –  $p=0.076$ ) pero no en el genotipo D (511 UPE/mL, 3.3-800 UPE/mL vs 386 UPE/mL, 1.6-8268 UPE/mL). En la interpretación de este último resultado se ha de tener en cuenta el escaso número de pacientes ( $n=4$ ) que presentaban variantes mutadas y genotipo D.

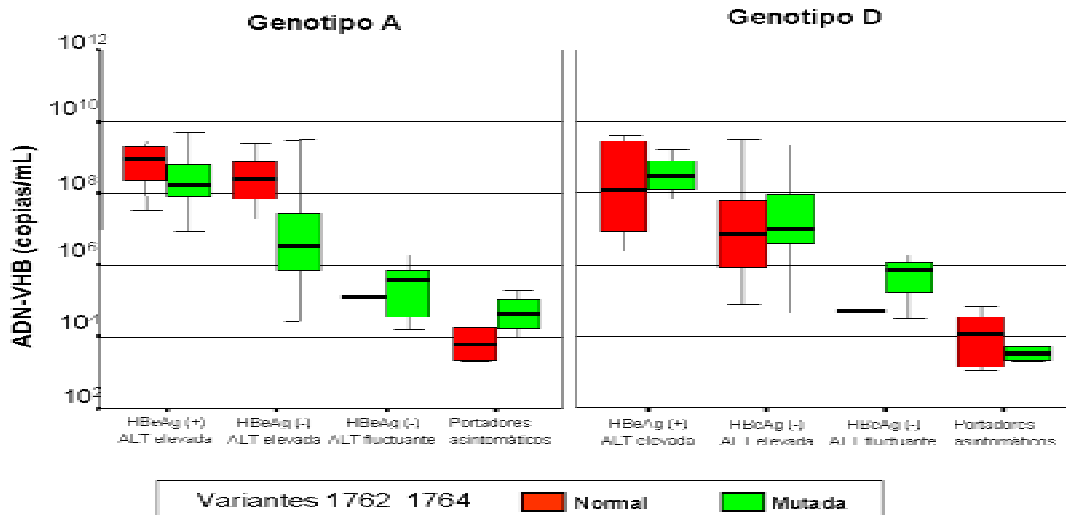
#### *4.1.5.2.1.1.3. Relación entre las variantes en las posiciones 1762 y 1764 del PBC y la concentración del ADN-VHB.*

Al relacionar la distribución de variantes normal y mutadas en las posiciones 1762 y 1764 con la concentración de ADN-VHB en cada uno de los grupos estudiados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 24).



**Figura 24.** Relación entre las variantes normal y mutada en las posiciones 1762 y 1764 del PBC con la concentración del ADN-VHB.

Al estratificar por genotipo y relacionar la concentración de ADN-VHB entre las variantes normal y mutada para las posiciones 1762 y 1764, se observó que en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada de genotipo A, la variante normal presentaba una mediana de  $7.9 \times 10^8$  copias ADN-VHB/mL ( $3.1 \times 10^7$ - $2.5 \times 10^9$ ) y la variante mutada  $1.5 \times 10^8$  copias ADN-VHB/mL ( $1.7 \times 10^6$ - $5 \times 10^9$ ) ( $p=0.18$ ). En el grupo de HBeAg negativo con ALT elevada de genotipo D, la variante normal presentaba una mediana de  $6.3 \times 10^6$  copias ADN-VHB/mL ( $7.7 \times 10^4$ - $3 \times 10^9$ ) y la variante mutada  $9.5 \times 10^6$  copias ADN-VHB/mL ( $2.5 \times 10^4$ - $2.3 \times 10^9$ ), sin observarse diferencia entre ellos. Los demás grupos no se compararon dado el escaso número de pacientes en algunos de ellos (Figura 25).



**Figura 25.** Relación entre las variantes normal y mutada en las posiciones 1762 y 1764 del PBC con la concentración de ADN-VHB en cada uno de los genotipos.

#### 4.1.5.2.1.1.4. Relación entre las variantes de las posiciones 1762 y 1764 del PBC y el examen histológico.

Se observó que 16 (94%) de los pacientes con la variante normal presentaban HCA mientras que 11 (28%) casos con la variante mutada presentaron CH ( $p=0.06$ ). Al estratificar por genotipo se mantuvo esta misma tendencia para ambos genotipos aunque con menor significación, es decir la variante normal

se asoció con HCA (100% en el genotipo A y 100% en el genotipo D) mientras que la variante mutada presentó una proporción de casos significativa con CH (35% en el genotipo A y 23% en el genotipo D) ( $p=0.16$  y  $p=0.1$ , respectivamente). Hay que señalar que todos los casos con CH presentaron la variante mutada en las posiciones 1762 y 1764. Al estratificar por grupo de pacientes, en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada no se observó relación entre la lesión histológica y la presencia de mutaciones en las posiciones 1762 y 1764, aunque en este grupo sólo había dos casos con CH, ambos con la variante mutada. En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada se observó que el 89% de los casos con la variante normal presentaban HCA frente a un 64% de casos con la variante mutada que presentaron HCA ( $p=0.16$ ). Al estratificar por grupo de pacientes y genotipo las diferencias no alcanzaron la significación en ningún caso, no obstante se observó que todos los pacientes con CH presentaron la variante mutada mientras que todos los pacientes con la variante normal presentaron HCA. En los 25 pacientes HBeAg negativo con ALT elevada y mutaciones en las posiciones 1762 y 1764 no se observó relación entre el genotipo viral A o D y la lesión histológica hepática. Estos resultados parecen indicar una asociación entre la presencia de CH y las variantes mutadas en la posición 1762 y 1764; aunque las diferencias son sólo cercanas a la significación, tal vez debido al pequeño número de casos.

#### 4.1.5.2.1.2. Mutaciones en el nucleótido 1762 del PBC.

En esta posición se consideró como variante normal la que presentaba una A en la posición 1762; cualquier modificación se consideró variante mutada. El cambio que se observó con mayor frecuencia fue de la A por una T en la posición 1762. La relación de las mutaciones observadas en esta posición se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6. Mutaciones en la posición 1762 del PBC. Relación con el genotipo viral.**

	HBeAg (+) ALT elevada			HBeAg (-) ALT elevada					HBeAg (-) ALT fluctuante		Portadores asintomáticos			
	Genotipo VHB			Genotipo VHB					Genotipo VHB		Genotipo VHB			
Posición 1762	A	D	F	A	A+D	B	D	F	A	D	A	A+D	B	D
A	9	6	2	4	2	1	13	2	2	4	4		1	8
DELEC														1
T	8	1		11			19		5	3	6			1
W	1	3		2		1	3		2	2	1	1		
Total	18	10	2	17	2	2	35	2	9	9	11	1	1	10

A=Adenina; C=Citosina; G=Guanina; T=Timina; Y=C/T; R=A/G; M=A/C; K=G/T; S=C/G; W=A/T; DELEC =Delección

Se detectaron secuencias mutadas en 71 (55%) de los casos: 13 (43%) HBeAg positivo con ALT elevada, 36 (62%) HBeAg negativo con ALT elevada, 12 (67%) HBeAg negativo con ALT fluctuante y 10 (43%) portadores asintomáticos.

Al comparar la distribución de las variantes normal y mutada entre los grupos no se observó que la proporción de mutaciones fuera diferente significativamente entre ninguno de los grupos, aunque se observaron diferencias próximas a la significación entre el grupo HBeAg positivo con ALT elevada y los grupos HBeAg negativo con ALT elevada ( $p=0.09$ ) y HBeAg negativo con ALT fluctuante ( $p=0.12$ ). También se observaron diferencias próximas a la significación en la proporción de mutaciones entre el grupo de portadores asintomáticos y los grupos HBeAg negativo con ALT fluctuante ( $p=0.14$ ) y HBeAg negativo con ALT elevada ( $p=0.13$ ). No se observaron diferencias entre el grupo de HBeAg positivo de ALT elevada y el grupo de portadores asintomáticos, ni entre el grupo de HBeAg negativo de ALT elevada y el grupo de HBeAg negativo con ALT fluctuante. Al comparar globalmente los cuatro grupos no se observaron diferencias entre ellos pero sí una tendencia lineal significativa ( $p=0.05$ ), en la que aumentaba la proporción de secuencias mutadas en el orden: portadores asintomáticos, HBeAg positivo con ALT elevada, HBeAg negativo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT fluctuante (Figura 26).

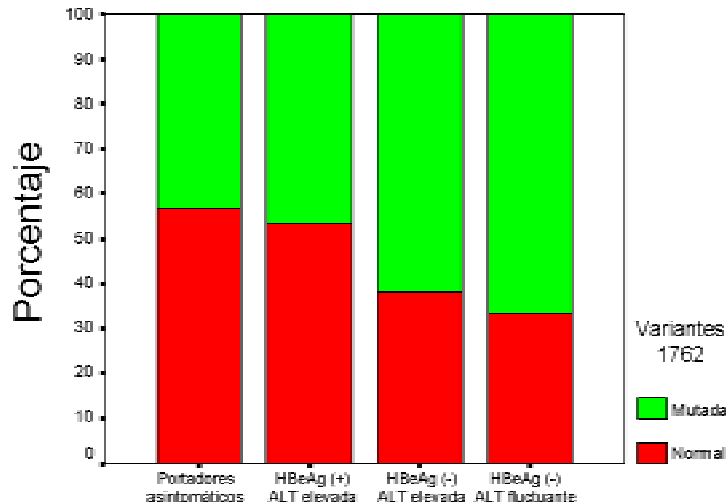


Figura 26. Distribución de las mutaciones en la posición 1762 del PBC.

#### 4.1.5.2.1.2.1. Relación entre las mutaciones 1762 del PBC y los genotipos virales.

Al estratificar los diferentes grupos por genotipo y comparar la distribución de variantes normal y mutada (Figura 27), en el genotipo A se observaron diferencias próximas a la significación entre el grupo HBeAg positivo con ALT elevada y el grupo HBeAg negativo con ALT elevada ( $p=0.1$ ), no observándose diferencias entre los demás grupos. En el genotipo D se encontraron diferencias significativas entre el grupo HBeAg negativo con ALT elevada y el grupo de portadores asintomáticos ( $p=0.017$ ), diferencias próximas a la significación entre el grupo HBeAg positivo con ALT elevada y el grupo HBeAg negativo con ALT elevada ( $p=0.15$ ) así como entre el grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante y el grupo de portadores asintomáticos ( $p=0.17$ ), no observándose diferencias en las demás comparaciones. Al considerar los cuatro grupos globalmente, para el genotipo A no se observaron diferencias entre ellos y la tendencia lineal apuntada anteriormente no era significativa. Para el genotipo D se observaron diferencias entre los grupos ( $p=0.09$ ) y la tendencia lineal apuntada anteriormente era significativa ( $p=0.03$ ).

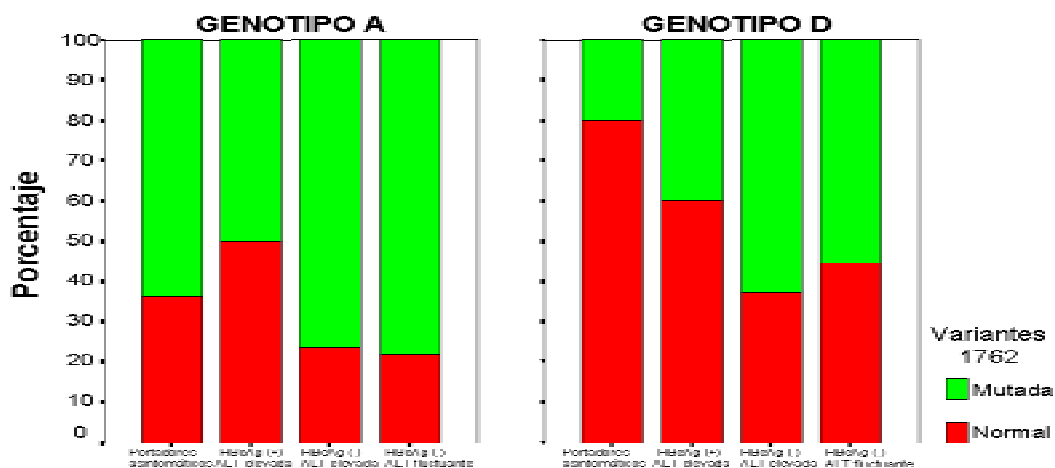
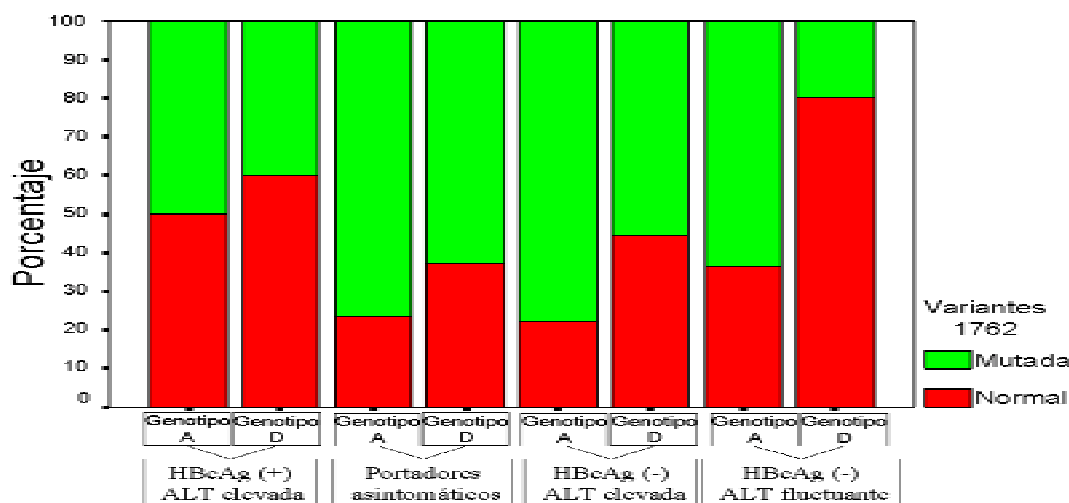


Figura 27. Mutaciones en la posición 1762 del PBC y genotipos virales A y D. Análisis estratificado por genotipos



Al estratificar por grupo de pacientes, se observaron diferencias en la proporción de mutaciones en el nucleótido 1762 entre el genotipo A y D en el grupo de portadores asintomáticos, no observándose diferencias en los demás grupos (Figura 28).



**Figura 28. Mutaciones en las posiciones 1762 del PBC y genotipos virales A y D. Análisis estratificado por pacientes.**

Los análisis de la distribución de las variantes normales y mutadas en los diferentes grupos de pacientes efectuados anteriormente, al estratificar por genotipos, y por grupos de pacientes, indican que el grupo HBeAg positivo con ALT elevada presenta una menor proporción de mutaciones en estas posiciones que el grupo HBeAg negativo con ALT elevada, independientemente del genotipo viral. En el genotipo D los portadores asintomáticos presentaron menor proporción de mutaciones que los grupos HBeAg negativo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT fluctuante. Por último, en el grupo de portadores asintomáticos se observó un comportamiento relacionado con el genotipo de manera que los de genotipo A presentaban mayor proporción de mutaciones.

#### 4.1.5.2.1.2.2. Relación entre las variantes de la posición 1762 del PBC con la concentración de HBeAg.

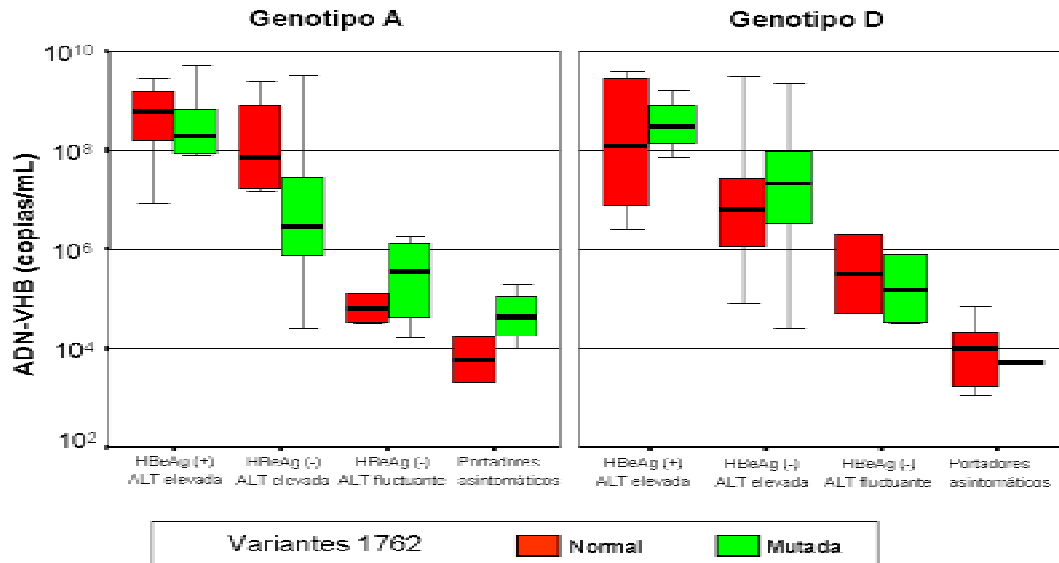
En el grupo de los HBeAg positivo con ALT elevada, se observó que los pacientes que presentaban la variante normal tenían una concentración de HBeAg (mediana=666 UPE/mL, 3.3-16000 UPE/mL) superior a la de los pacientes con variantes mutadas (mediana=93 UPE/mL, 0.12-17600 UPE/mL) pero la diferencia no era significativa. Cuando se estratificó por genotipo viral no se observaron diferencias significativas ni para el genotipo A (2760 UPE/mL, 3.85-16000 UPE/mL, en lo no mutados vs 60 UPE/mL, 0.12-17600 UPE/mL, en los mutados) ni para el genotipo D (510 UPE/mL, 3.3-800 UPE/mL, vs 386 UPE/mL, 1.6-8268). En la interpretación de este último resultado se ha de tener en cuenta el escaso número de pacientes (n=4) que presentaban variantes mutadas y genotipo D.

#### 4.1.5.2.1.2.3. Relación entre las variantes en la posición 1762 del PBC y la concentración del ADN-VHB.

Al relacionar la distribución de variantes mutada y no mutada en la posición 1762 con la concentración de ADN-VHB en cada uno de los grupos estudiados no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Al estratificar por genotipo y comparar la concentración de ADN-VHB entre las variantes normal y mutada para la posición 1762 se observó que en el grupo de HBeAg negativo con ALT elevada de genotipo A, la variante normal (n=4) presentaba una mediana de  $6.8 \times 10^7$  copias ADN-VHB/mL ( $1.48 \times 10^7$ – $2.5 \times 10^9$  copias ADN-VHB/mL) y la variante mutada (n=13)  $2.75 \times 10^6$  copias ADN-VHB/mL ( $2.6 \times 10^4$ – $9.51 \times 10^9$  copias ADN-VHB/mL) (p=0.05). En los grupos HBeAg negativo con ALT elevada de

genotipo D y HBeAg positivo de genotipo A no se encontraron diferencias significativas en la concentración de ADN-VHB entre las variantes mutada y no mutada. En los demás grupos no se llevó a cabo la comparación dado el escaso número de pacientes (Figura 29).



**Figura 29.** Relación entre las variantes normal y mutada en la posición 1762 del PBC con la concentración de ADN-VHB en cada uno de los genotipos.

#### 4.1.5.2.1.2.4. Relación entre las variantes de la posición 1762 del PBC y el examen histológico.

En este estudio se observó la misma relación que la obtenida al analizar la relación entre las variantes de las posiciones 1762 y 1764 del PBC del VHB con la lesión histológica hepática (ver apartado 4.1.5.2.1.1.4.), pero además las diferencias estadísticas resultaban más significativas en todas las comparaciones. Estos resultados sugieren que la presencia de CH se asocia con la variante mutada en la posición 1762.

#### 4.1.5.2.1.3. Mutaciones en el nucleótido 1764 del PBC.

En esta posición se consideró como variante normal la que presentaba una G en la posición 1764 (G); cualquier modificación se consideró variante mutada. El cambio que se observó con mayor frecuencia fue de una G por una A. La relación de las mutaciones observadas en esta posición se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Mutaciones en la posición 1764 del PBC. Relación con el genotipo viral.

	HBeAg (+) ALT elevada			HBeAg (-) ALT elevada					HBeAg (-) ALT fluctuante		Portadores asintomáticos			
	Genotipo VHB			Genotipo VHB					Genotipo VHB		Genotipo VHB			
Posición 1764	A	D	F	A	A+D	B	D	F	A	D	A	A+D	B	D
A	9	1		13		1	21		6	5	6			2



1754C			1											
1754G							1							
1754K									1					
Normal	15	8	1	10	2	1	14	1	3	7	7	1	7	
Total	18	10	2	17	2	2	35	2	9	9	11	1	10	

A=Adenina; C=Citosina; G=Guanina; T=Timina; Y=C/T; R=A/G; M=A/C; K=G/T; S=C/G; W=A/T; DELEC =Delección

Se detectaron secuencias mutadas en 52 (40%) de los casos: 6 (20%) HBeAg positivo con ALT elevada, 30 (52%) HBeAg negativo con ALT elevada, 8 (44%) HBeAg negativo con ALT fluctuante y 8 (35%) de los portadores asintomáticos. Al seleccionar los casos con mutaciones en el PBC, se encontró la variante mutada en la región TA1 en el 49% de los casos.

Al comparar la distribución de las variantes normal y mutada entre los grupos se observó que la proporción de mutaciones era diferente significativamente entre el grupo HBeAg positivo con ALT elevada y los grupos HBeAg negativo con ALT elevada ( $p=0.004$ ) y HBeAg negativo con ALT fluctuante ( $p=0.05$ ). También se observaron diferencias en la proporción de mutaciones entre el grupo HBeAg negativo con ALT elevada y portadores asintomáticos ( $p=0.17$ ), aunque en este caso la diferencia estadística estaría más alejada de la significación. No se observaron diferencias entre el grupo HBeAg positivo con ALT elevada y el grupo de portadores asintomáticos, ni entre el grupo de HBeAg negativo con ALT elevada y el grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante, ni tampoco entre HBeAg negativo con ALT fluctuante y portadores asintomáticos. Al comparar globalmente los cuatro grupos se observaron diferencias entre ellos ( $p=0.034$ ) con una tendencia lineal significativa ( $p=0.004$ ), en la que aumentaba la proporción de secuencias mutadas en el orden HBeAg positivo con ALT elevada (20%), portadores asintomáticos (35%), HBeAg negativo con ALT fluctuante (44%), HBeAg negativo con ALT elevada (52%). Esta distribución se representa en la Figura 30.

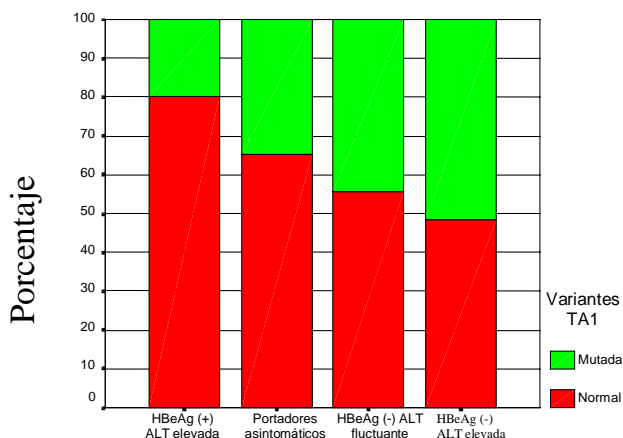


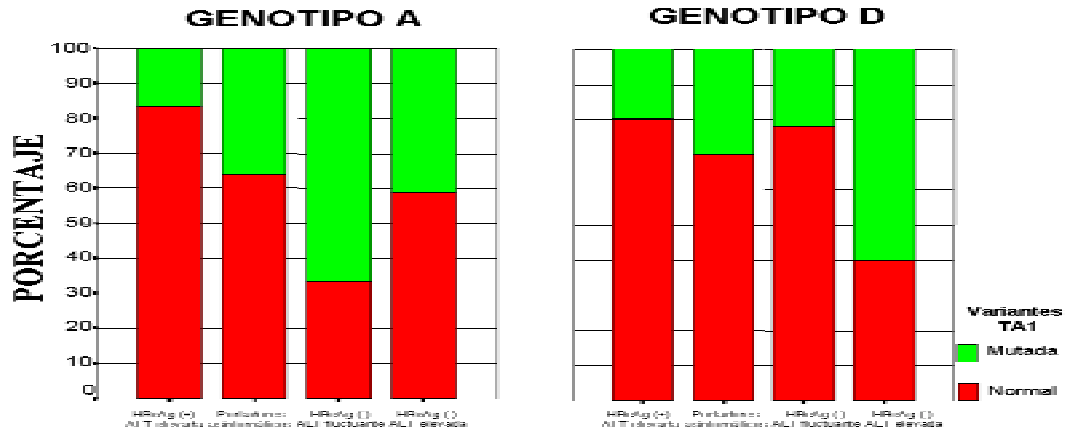
Figura 30. Distribución de las mutaciones en la región TA1 (posiciones 1750-1755) del PBC del VHB.

#### 4.1.5.2.2.1. Relación entre las mutaciones en la región TA1 del PBC del VHB y los genotipos virales.

Al estratificar los diferentes grupos por genotipo del VHB y comparar la distribución de variantes normal y mutada, se mantenían las diferencias para el genotipo A en todas las comparaciones es decir, sólo se observaron diferencias entre los HBeAg positivo con ALT elevada y los HBeAg negativo con ALT elevada, con pérdida en la significación ( $p=0.1$ ), o los HBeAg con ALT fluctuante ( $p=0.009$ ).

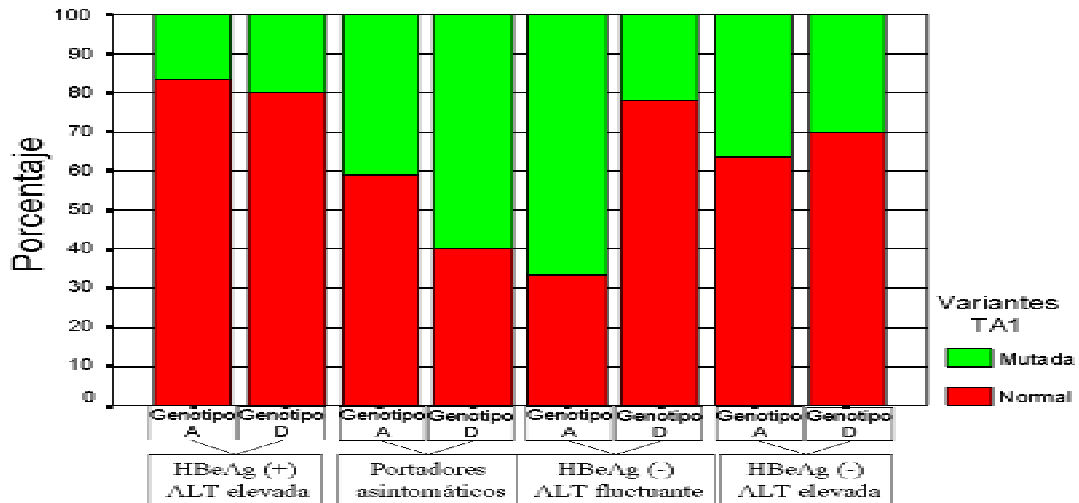
Para el genotipo D se observaron diferencias entre HBeAg positivo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT elevada ( $p=0.03$ ). Las diferencias fueron cercanas a la significación entre el grupo HBeAg negativo con ALT elevada y los grupos HBeAg negativo con ALT fluctuante ( $p=0.07$ ) o portadores asintomáticos ( $p=0.09$ ). También en el genotipo D, no se observaron diferencias entre HBeAg positivo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT fluctuante.

No se observaron diferencias entre HBeAg positivo con ALT elevada y portadores asintomáticos para ambos genotipos, ni entre HBeAg negativo con ALT fluctuante y portadores asintomáticos. Hay que tener en cuenta en este último resultado el escaso número de pacientes que entran en la comparación (Figura 31).



**Figura 31. Mutaciones en las posiciones 1750-1755 (TA1) del PBC y genotipos virales A y D. Análisis estratificado por genotipos.**

Al estratificar por grupo de pacientes, no se observaron diferencias en la proporción de mutaciones en la TA1 entre el genotipo A y D dentro de cada grupo aunque en el grupo HBeAg con ALT fluctuante se observó un 66% de mutados en el genotipo A frente a un 22% en el genotipo D ( $p=0.15$ ) (Figura 32).



**Figura 32. Mutaciones en las posiciones 1750-1755 (TA1) y genotipos virales A y D. Análisis estratificado por pacientes.**

Los análisis de la distribución de las variantes normales y mutadas en los diferentes grupos de pacientes efectuados anteriormente, al estratificar por genotipos, y por grupos de pacientes, indican que el grupo HBeAg positivo con ALT elevada presentaba una menor proporción de mutaciones en esta zona que el grupo HBeAg negativo con ALT elevada o el grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante. Estas diferencias eran independientes del genotipo viral tanto entre grupos como dentro de cada grupo. Sin embargo, se observó que en el genotipo D las diferencias se hacían no significativas entre los grupos HBeAg positivo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT fluctuante. Este resultado posiblemente esté relacionado con un bajo número de casos, pero no se debería descartar un comportamiento diferente entre los genotipos A y D en el grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante.

#### 4.1.5.2.2.2. Relación entre las variantes de la región TA1 del PBC del VHB con la concentración de HBeAg.

En contraste con lo observado en el estudio de las posiciones 1762 y 1764, en el análisis de la región TA1 no se observó relación entre la presencia de mutaciones y la concentración del HBeAg (488 UPE/mL, 0.12-17600 UPE/mL, en la variante normal y 876 UPE/mL, 60-8268 UPE/mL, en la variante mutada) en los HBeAg positivo con ALT elevada. No se pudo llevar a cabo la estratificación por genotipo debido al bajo número de casos con la variante mutada (3 en el genotipo A y 2 en el genotipo D).

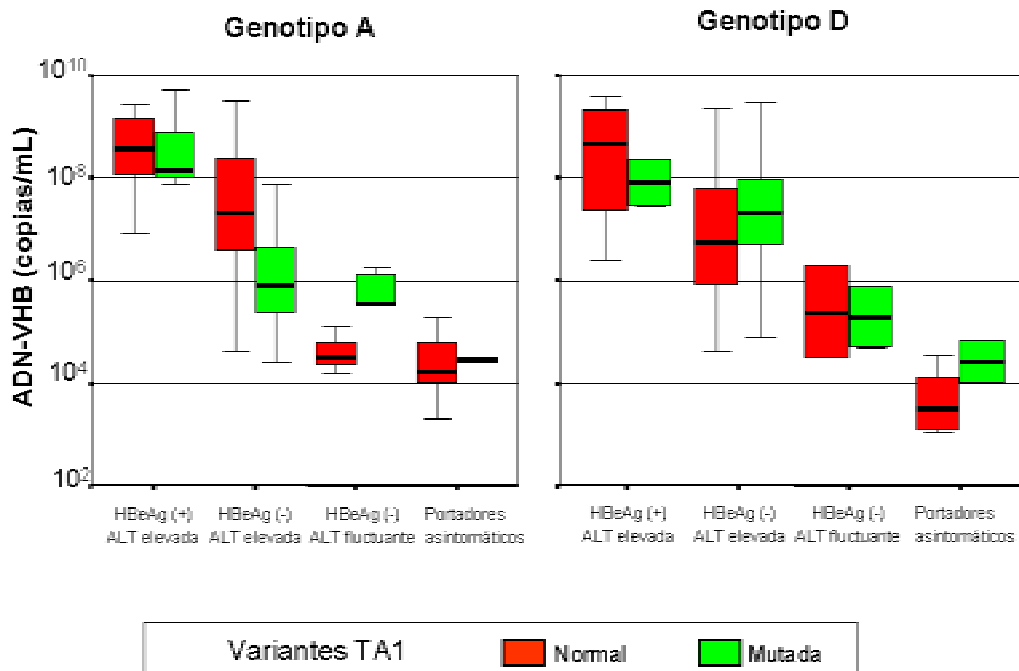
#### 4.1.5.2.2.3. Relación entre las variantes de la región TA1 del PBC del VHB y la concentración del ADN-VHB.

Al relacionar la distribución de variantes en la TA1 con la concentración de ADN-VHB en cada uno de los grupos estudiados no se observaron diferencias estadísticamente significativas. En el grupo de los HBeAg negativo con ALT fluctuante los pacientes con mutaciones tenían una mediana de  $3.2 \times 10^5$  copias ADN-VHB/mL frente a los no mutados de  $3.2 \times 10^4$  copias ADN-VHB/mL ( $p=0.16$ ).

Se comparó dentro de cada grupo y genotipo la concentración de ADN-VHB entre las variantes normal y mutada de la región TA1. Se observó que en el grupo de HBeAg negativo con ALT elevada de genotipo A del VHB, la variante normal presentaba una mediana de  $2 \times 10^7$  copias ADN-VHB/mL ( $3.9 \times 10^4 - 3.2 \times 10^9$ ) y la variante mutada  $7.9 \times 10^5$  copias ADN-VHB/mL ( $2.5 \times 10^4 - 6.3 \times 10^7$ ) ( $p=0.05$ ). En el grupo de HBeAg negativo con ALT elevada de genotipo D del VHB, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de ADN-VHB de la variante normal y la variante mutada. Los restantes grupos no se compararon dado el escaso número de pacientes en algunos de ellos (Figura 33).

**Figura 33. Relación entre las variantes normal y mutada de la región TA1 del PBC del VHB con la concentración de ADN-VHB en cada uno de los genotipos.**

#### 4.1.5.2.2.4. Relación entre las variantes de la región TA1 del PBC del VHB y el examen histológico.



No se observó relación entre las variantes normal y mutada de la región TA1 del PBC y la lesión histológica. De los pacientes con la variante normal 28 (82%) casos presentaron HCA mientras que 6 (27%) casos con la variante mutada presentaron CH. Al estratificar por genotipo no se observó relación para el genotipo A en el que 10 (71%) de los pacientes con la variante normal presentaban HCA frente a 2 (28%) casos con la variante mutada que presentaron CH. En cambio, en el genotipo D, 16 (94%) de los pacientes con la variante normal presentaron HCA frente a 4 (27%) de casos con la variante mutada que presentaron CH ( $p=0.1$ ). Al realizar el análisis sin tener en cuenta la posición 1752 se observó que en el genotipo D, 20 (95%) de los pacientes con la variante normal presentaron HCA frente a 4 (36%) de casos con la variante mutada que presentaron CH ( $p=0.02$ ). Al estratificar por genotipo y/o grupo de pacientes no se observó relación entre la presencia de variantes en la región TA1 y la lesión histológica hepática, excepto en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada de genotipo D que, al no considerar como variante mutada la posición 1752, se encontraron 10 (91%) pacientes con la variante normal y HCA frente a 4 (40%) casos con la variante mutada y CH ( $p=0.15$ ). Estos resultados sugieren una falta de relación entre las variantes de la región TA1 y la lesión histológica en el genotipo A, mientras que en el genotipo D se observó una asociación entre la presencia de CH y la variante mutada de la región TA1.

#### 4.1.5.2.2.5. Mutaciones en el nucleótido 1752 de la TA1 del PBC.

Como se ha comentado anteriormente (apartado 4.1.5.2.2. de resultados) las posiciones de la región TA1 que presentaron cambios fueron los nucleótidos 1752, 1753 y 1754. Al analizar estas tres posiciones se observó que la presencia de cambios en la posición 1752 se relacionaba con el genotipo D, puesto que de 55 casos de genotipo A sólo 1 (2%) presentaba cambios en esta posición 1752, mientras que de 67 casos de genotipo D, 12 (19%) los presentaban ( $p=0.003$ ). Dentro del genotipo D no se observaron diferencias significativas entre los grupos, aunque el mayor porcentaje de mutaciones correspondía al grupo HBeAg negativo con ALT elevada (23%), portadores asintomáticos (20%), HBeAg negativo con ALT fluctuante (11%) y HBeAg positivo con ALT elevada (10%). Al estratificar por grupo de pacientes la mayor proporción de secuencias mutadas en el genotipo D que en el A sólo se mantuvo en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada ( $p=0.03$ ). Así pues, parece que la aparición de cambios en la posición 1752 sería una característica del genotipo D. Sería interesante la posibilidad de que la presencia de mutaciones en esta posición se relacionara, dentro del genotipo D, con el grupo HBeAg negativo con ALT elevada, pero el tamaño de nuestros grupos no permite obtener un resultado concluyente. En el grupo HBeAg positivo con ALT elevada sólo hay un caso con la variante 1752 mutada y su concentración de HBeAg (792 UPE/mL) se encuentra próxima a la mediana del grupo (495 UPE/mL). En el grupo de los HBeAg negativo con ALT elevada de genotipo D no se observó relación entre la presencia de mutaciones en la posición 1752 y la concentración de ADN-VHB. En los demás grupos de pacientes de genotipo D esta comparación no se pudo realizar dado el escaso número de pacientes con mutaciones en la posición 1752. En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada de genotipo D no se observó relación entre la presencia de mutaciones en la posición 1752 y la lesión histológica hepática, donde los 3 casos con la variante mutada presentaron HCA.

#### 4.1.5.2.3. Mutaciones en la región TA2 (1758-TTAAA-1762) del PBC del VHB.

En estas posiciones se consideró como variante normal la que presentaba la secuencia TTAAA; cualquier modificación sobre esta secuencia se consideró variante mutada. La relación de las mutaciones observadas en estas posiciones se muestra en la Tabla 9.

**Tabla 9. Mutaciones en las posiciones 1758-1762 (TA2) del PBC del VHB. Relación con el genotipo viral.**

Variantes 1758-TTAAA-1762	HBeAg (+) ALT elevada			HBeAg (-) ALT elevada					HBeAg (-) ALT fluctuante		Portadores asintomáticos			
	Genotipo VHB			Genotipo VHB					Genotipo VHB		Genotipo VHB			
	A	D	F	A	A+D	B	D	F	A	D	A	A+D	B	D
1758Y, 1762T											1			
1761C										1				
1761M, 1762W										2				

1762T	8	1		11			19		5	3	5			1
1762W	1	3		2		1	3		2		1	1		
DELEC														1
Normal	9	6	2	4	2	1	13	2	2	3	4		1	8
TOTAL	18	10	2	17	2	2	35	2	9	9	11	1	1	10

A=Adenina; C=Citosina; G=Guanina; T=Timina; Y=C/T; R=A/G; M=A/C; K=G/T; S=C/G; W=A/T; DELEC =Delección

Se detectaron secuencias mutadas en 72 (56%) de los casos: 13 (43%) HBeAg positivo con ALT elevada, 36 (62%) HBeAg negativo con ALT elevada, 13 (72%) HBeAg negativo con ALT fluctuante y 10 (43%) de los portadores asintomáticos. Al seleccionar los casos con mutaciones en el PBC, se encontró la variante mutada en la región TA2 en el 68% de los casos. Dado que en los pacientes con variantes mutadas en la región TA2 sólo se observó un caso que no presentaba mutación en la posición 1762 (el 99% de las secuencias con mutaciones en la región TA2 presentaron la variante mutada en la posición 1762), los resultados obtenidos en los análisis de la distribución de las variantes normal y mutada en los diferentes grupos de pacientes, al estratificar por genotipos, y por grupos de pacientes, la relación entre la concentración de HBeAg y ADN-VHB con la presencia de mutaciones en la región TA2, así como la relación con la lesión histológica, coinciden con los obtenidos al estudiar la posición 1762 (apartado 4.1.5.2.1.2.).

#### ***4.1.5.2.4. Mutaciones en la región TA3 (1771-TATTA-1775) del PBC del VHB.***

En estas posiciones se consideró como variante normal la que presentaba la secuencia TATTA; cualquier modificación sobre esta secuencia se consideró variante mutada. La relación de las mutaciones observadas en estas posiciones se muestra en la Tabla 10. Como puede observarse todas las secuencias con sustituciones presentan cambios en la posición 1773, y en tres casos éstas se acompañaban de cambios en la posición 1772. Las demás posiciones se mantenían conservadas.



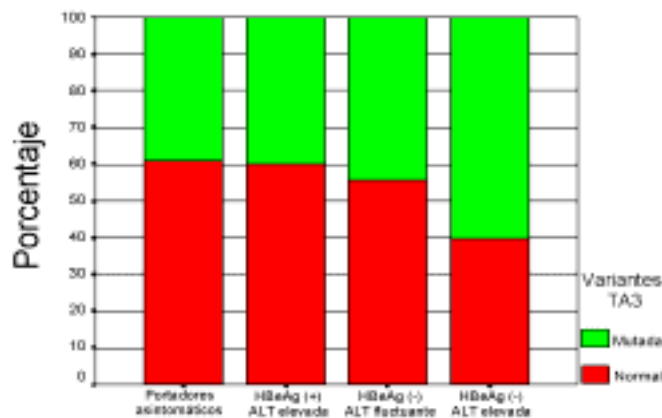
**Tabla 10. Mutaciones en la región TA3 (1771-TATTA-1775) del PBC del VHB. Relación con el genotipo viral.**

Posición 1771-TATTA-1775	HBeAg (+) ALT elevada			HBeAg (-) ALT elevada					HBeAg (-) ALT fluctuante		Portadores asintomáticos			
	Genotipo VHB			Genotipo VHB					Genotipo VHB		Genotipo VHB			
	A	D	F	A	A+D	B	D	F	A	D	A	A+D	B	D
1772C, 1773C							1							
1772M, 1773Y							1							
1772T, 1773C							1							
1773C	1	10	1		1		28			7				9
1773W									1					
1773Y				1			2							
Normal	17		1	16	1	2	2	2	8	2	11	1	1	1
TOTAL	18	10	2	17	2	2	35	2	9	9	11	1	1	10

A=Adenina; C=Citosina; G=Guanina; T=Timina; Y=C/T; R=A/G; M=A/C; K=G/T; S=C/G; W=A/T; DELEC =Delección

Se detectaron secuencias mutadas en 64 (49.6%) de los casos: 12 (40%) HBeAg positivo con ALT elevada, 35 (60%) HBeAg negativo con ALT elevada, 8 (44.4%) HBeAg negativo con ALT fluctuante y 9 (39%) de los portadores asintomáticos.

Al comparar la distribución de las variantes normal y mutada entre los grupos se observó que la proporción de mutaciones sólo presentaba diferencias próximas a la significación entre el grupo HBeAg negativo con ALT elevada y los grupos HBeAg positivo con ALT elevada ( $p=0.07$ ) y los portadores asintomáticos ( $p=0.08$ ). Al comparar los cuatro grupos no se alcanzaron diferencias significativas ( $p=0.17$ ) pero se observó una asociación lineal ( $p=0.04$ ) en la que aumentaba la proporción de secuencias mutadas en el orden portadores asintomáticos (39%), HBeAg positivo con ALT elevada (40%), HBeAg negativo con ALT fluctuante (44.4%) y HBeAg negativo con ALT elevada (60%). (Figura 34).



**Figura 34. Distribución de las mutaciones en la región TA3 del PBC del VHB.**

#### 4.1.5.2.4.1. Relación entre las mutaciones en la región TA3 del PBC del VHB y los genotipos virales.

Al estratificar los diferentes grupos por genotipo del VHB y comparar la distribución de variantes normal y mutada no se observó ninguna diferencia entre los grupos. Tan solo en el genotipo D parecía diferenciarse el grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante (78% de secuencias mutadas) de los grupos HBeAg positivo con ALT elevada (90% de secuencias mutadas) ( $p=0.2$ ) y de los HBeAg negativo con ALT elevada (94% de secuencias mutadas) ( $p=0.15$ ). Cuando se consideraron los cuatro grupos no se observó relación ni asociación lineal en el sentido descrito anteriormente (Figura 35).

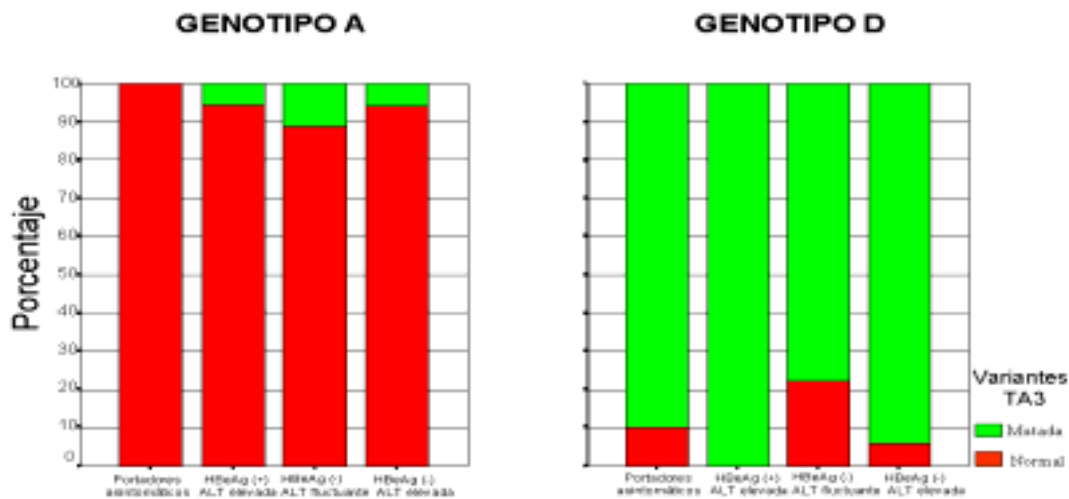


Figura 35. Mutaciones en la región TA3 del PBC del VHB y genotipos virales A y D. Análisis estratificado por genotipos.

Al estratificar por grupo de pacientes se observaron diferencias claramente significativas en la proporción de mutaciones en la región TA3 entre los genotipos A y D dentro de cada grupo (Figura 36).

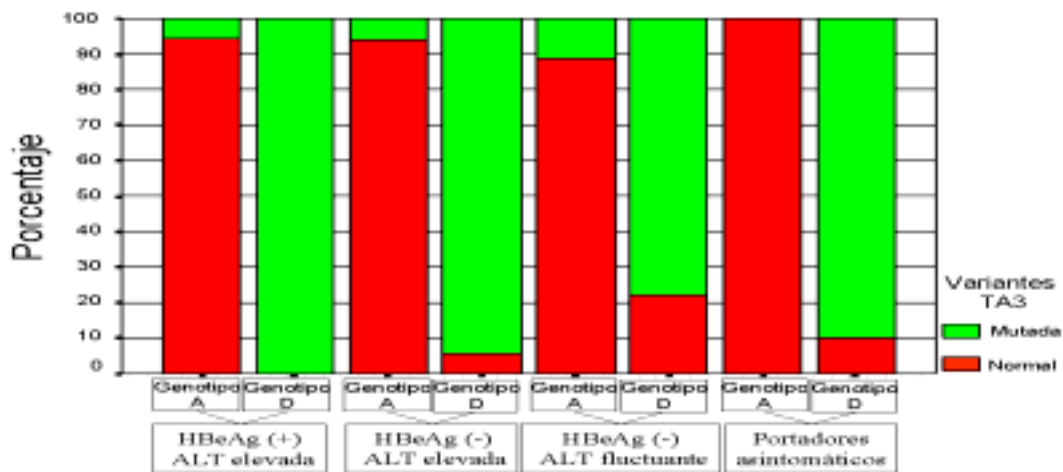


Figura 36. Mutaciones en la región TA3 del PBC del VHB y genotipos virales A y D. Análisis estratificado por grupos

Los análisis de la distribución de las variantes normales y mutadas en los diferentes grupos de pacientes efectuados anteriormente, al estratificar por genotipos, y por grupos de pacientes, indican que la sustitución observada en la posición 1773 es característica del genotipo D. Los pocos casos de mutaciones en otras posiciones de la región TA3 junto con el resultado anterior indican que esta región está altamente conservada. Como

consecuencia no se pudieron llevar a cabo los estudios de variantes de esta región y las concentraciones de ADN-VHB, concentración de HBeAg y examen histológico.

***4.1.5.2.5. Mutaciones en la región del extremo 5'ARN-Precore (1782-TGTAG-1786) del PBC del VHB.***

De todos los pacientes estudiados sólo un caso del grupo HBeAg negativo con ALT elevada presentaba un cambio en la posición en 1785 (mezcla de nucleótidos A y G). Por esta razón se puede considerar que esta región está altamente conservada.

#### ***4.1.5.2.6. Mutaciones en la región Precore Inr (1788-CATA-1791) y región TA4 (1788-CATAAATT-1795) del PBC del VHB.***

Estas regiones se estudiaron conjuntamente dado el solapamiento de posiciones. El análisis mostró una escasa presencia de mutaciones en ambas regiones: dos pacientes HBeAg positivo con ALT elevada presentaban sustituciones en las posiciones 1788 y 1790, respectivamente, y un paciente portador asintomático presentaba una sustitución en la posición 1794. Esta baja frecuencia de mutaciones indica que estas regiones están altamente conservadas.

#### ***4.1.5.2.7. Mutaciones en la región del extremo 5' ARN-Precore (1791-AAATTG-1796) del PBC del VHB.***

De todos los pacientes estudiados sólo un portador asintomático presentó un cambio en esta zona, una A en lugar de la T en la posición 1794, lo que indicaría que se trata de una región altamente conservada.

#### ***4.1.5.2.8. Mutaciones en la región del extremo 5'ARN-Pregenómico (1810-CACCATGCAAC-1820) del PBC del VHB.***

Esta región se solapa con el inicio del gen Precore (1814-ATGCAAG-1820), por lo que en primer lugar se realizará un estudio global de la región y en segundo lugar se analizará únicamente la región 1810-1813. En estas posiciones se consideró como variante normal la que presentaba la secuencia CACCATGCAAC; cualquier modificación sobre esta secuencia se consideró variante mutada. La relación de las mutaciones observadas en estas posiciones se muestra en la Tabla 11.

**Tabla 11. Mutaciones en la región del extremo 5' ARNpregenómico (1810-CACCATGCAAC-1820) del PBC del VHB. Relación con el genotipo viral.**

Posición 1810- CACCATGCAAC- 1820	HBeAg (+) ALT elevada			HBeAg (-) ALT elevada					HBeAg (-) ALT fluctuante		Portadores asintomáticos			
	Genotipo VHB			Genotipo VHB					Genotipo VHB		Genotipo VHB			
	A	D	F	A	A+D	B	D	F	A	D	A	A+D	B	D
1810A 1811C 1812 T									1					
1810T											1			
1810T, 1811T, 1817T							1							
1810Y				1			1							
1810Y 1811C 1812T											1			
1810Y, 1811M				1										
1810Y, 1812T				1										
1811C									1					
1811C 1812T									1					
1811C, 1812T	1													
1811T 1812G											1			
1812T	1													
1814C				2						1				
1814M	1													
1814T										1				
1815C											3			
1815Y	1													
1816K							1							
1816T							4			1				
1817T							1			1				
1817Y				1										
1818M													1	
1819M														1
1819T							1							
Normal	14	10	2	11	2	2	26	2	6	5	5	1		9
TOTAL	18	10	2	17	2	2	35	2	9	9	11	1	1	10

A=Adenina; C=Citosina; G=Guanina; T=Timina; Y=C/T; R=A/G; M=A/C; K=G/T; S=C/G; W=A/T; DELEC =Delección

En la Tabla 11 se puede observar como las posiciones 1810, 1811 y 1812 presentaban variantes que sólo en un caso se asocian con cambios en las posiciones 1814 a 1820. Se encontraron secuencias mutadas en 34 (26.4%) de los casos: 4 (13.3%) HBeAg positivo con ALT elevada, 15 (25.9%) HBeAg negativo con ALT elevada, 7 (39%) HBeAg negativo con ALT fluctuante y 8 (35%) de los portadores asintomáticos. Al comparar la distribución de las variantes normal y mutada entre los grupos se observó que la proporción de mutaciones era menor en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada que en todos los demás grupos, con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante ( $p=0.04$ ), cercanas a la significación respecto al grupo de portadores asintomáticos ( $p=0.06$ ) y no significativas respecto al grupo de HBeAg negativo con ALT elevada ( $p=0.17$ ). Al comparar los cuatro grupos estudiados las diferencias no fueron significativas ( $p=0.17$ ) pero sí se observó una asociación lineal significativa ( $p=0.05$ ) en la que aumentaba la proporción de secuencias mutadas en el orden HBeAg positivo con ALT elevada (13.3%), HBeAg negativo con ALT elevada (26%), portadores asintomáticos (35%), HBeAg negativo con ALT fluctuante (39%) (Figura 37).

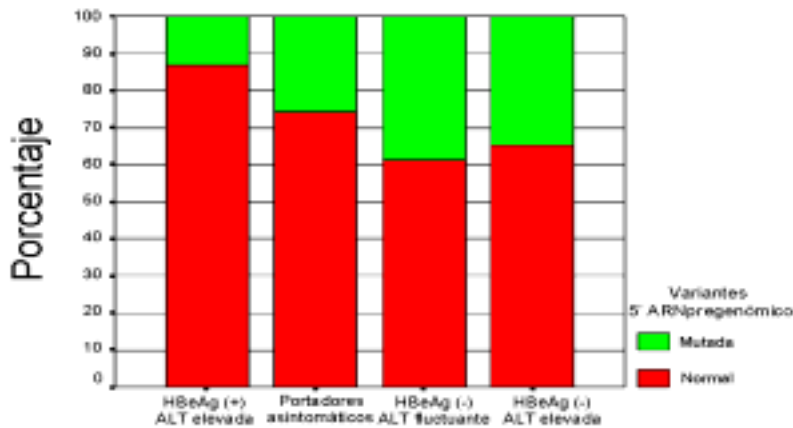


Figura 37. Distribución de las mutaciones en la zona del extremo 5'ARNpregenómico (posiciones 1810-CACCATGCAAC-1820) del PBC del VHB.

#### 4.1.5.2.8.1. Relación entre las mutaciones en la región del extremo 5' ARN-pregenómico del PBC del VHB y los genotipos virales.

Se estratificaron los diferentes grupos por genotipo del VHB y se comparó la distribución de variantes normal y mutada para cada genotipo. En el genotipo D se observaron diferencias próximas a la significación entre el grupo HBeAg positivo con ALT elevada, ninguna secuencia mutada, y los grupos HBeAg negativo con ALT elevada, 26% de secuencias mutadas ( $p=0.07$ ) o HBeAg negativo con ALT fluctuante, 44% de secuencias mutadas ( $p=0.03$ ). No se observaron diferencias entre el grupo de los HBeAg positivo con ALT elevada y los portadores asintomáticos. Cuando se consideraron los 4 grupos globalmente se observaron diferencias cercanas a la significación ( $p=0.08$ ) perdiéndose la relación lineal. Este resultado, diferente al encontrado antes de la estratificación, podría deberse a un menor porcentaje de mutaciones en los portadores asintomáticos.

En el genotipo A tan sólo se observaron diferencias próximas a la significación, entre los portadores asintomáticos, 55% de secuencias mutadas, y los HBeAg positivo con ALT elevada, 22% de secuencias mutadas ( $p=0.1$ ). Al estudiar los cuatro grupos globalmente no se observaron diferencias, no obstante la asociación lineal descrita anteriormente se mantuvo cercana a la significación ( $p=0.1$ ) (Figura 38)

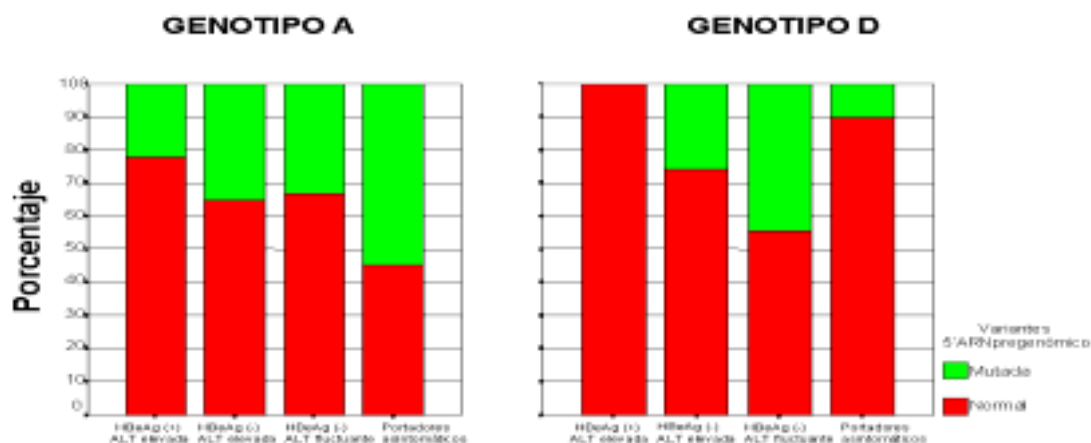
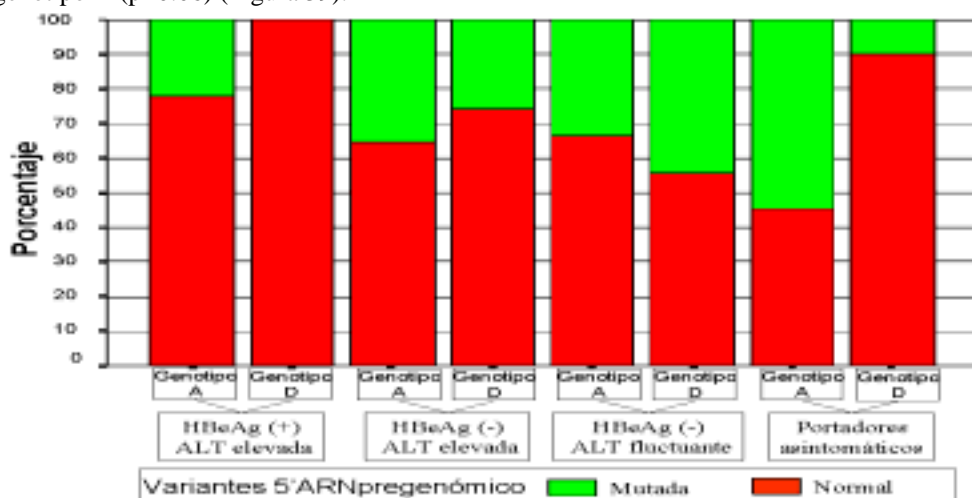


Figura 38. Mutaciones en la región del extremo 5'ARN-pregenómico (posiciones 1810-CACCATGCAAC-1820) del PBC del VHB y genotipos virales. Análisis estratificado por genotipos.

Al estratificar por grupo de pacientes no se observaron diferencias claramente significativas en la proporción de mutaciones en la región del extremo 5'ARN-pregenómico entre los genotipos A y D dentro de cada grupo. Sí se observaron diferencias cercanas a la significación en el grupo de portadores asintomáticos, donde se encontró un 55% de secuencias mutadas en el genotipo A frente a un 10% en el genotipo D ( $p=0.06$ ) (Figura 39).



**Figura 39. Mutaciones en la región del extremo 5'ARN-pregenómico (posiciones 1810-CACCATGCAAC-1820) del PBC del VHB y genotipos virales A y D. Análisis estratificado por grupos**

Los análisis de la distribución de las variantes normales y mutadas en los diferentes grupos de pacientes efectuados anteriormente, al estratificar por genotipos, y por grupos de pacientes, indican que la proporción de mutaciones es menor en los HBeAg positivo con ALT elevada que en los HBeAg negativo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT fluctuante, tendencia que se observa con claridad en el genotipo D pero no en el genotipo A. Es de destacar que en el grupo de portadores asintomáticos parece observarse un comportamiento diferente dependiente del genotipo, donde los de genotipo A presentaron una proporción de mutaciones superior a la del grupo HBeAg positivo con ALT elevada (55% vs 22%), mientras que en los de genotipo D la proporción de mutaciones se aproxima a la observada en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada (10% vs 0%). Si se tiene en cuenta por un lado, que esta región contiene el codon de inicio del precore, que es un lugar donde con cierta frecuencia y en asociación al carácter HBeAg negativo se observan mutaciones que impiden la expresión del HBeAg; y por otro lado que el genotipo D tiene una mayor tendencia por razones termodinámicas que el genotipo A para mutar en otras posiciones, se podría entender la menor proporción de secuencias mutadas en esta zona en los pacientes HBeAg negativo de genotipo D. Este hecho sólo se observó en el grupo de portadores asintomáticos. En el análisis de la región precore se analizarán en mayor profundidad estos cambios.

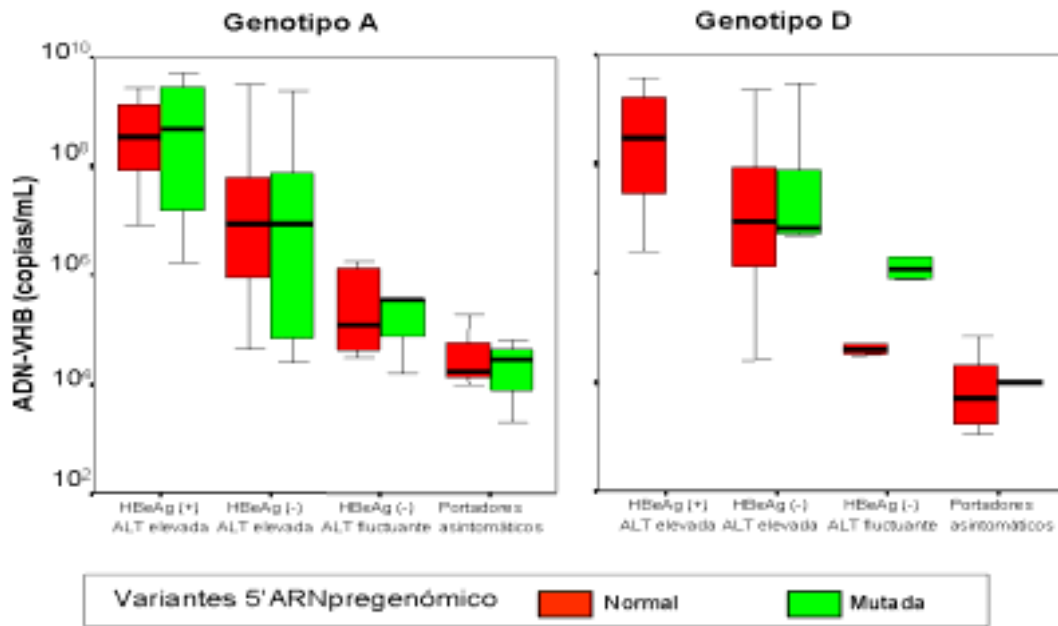
#### 4.1.5.2.8.2. Relación entre las variantes de la región 5'ARN pregenómico del PBC del VHB con la concentración de HBeAg.

La comparación de la concentración de HBeAg entre pacientes con mutaciones (mediana=44 UPE/mL, 0.12-127 UPE/mL) y sin mutaciones (mediana = 779 UPE/mL, 1.48-17600 UPE/mL) presentaba diferencias próximas a la significación ( $p=0.07$ ). Cuando se estratificó por genotipo se observó que en el genotipo A los pacientes con mutaciones presentaban una mediana de concentración de HBeAg de 44 UPE/mL, 0.12-127 UPE/mL, y los pacientes sin mutaciones presentaban una mediana de concentración de HBeAg de 1999 UPE/mL, 1.48-17600 UPE/mL, ( $p=0.13$ ). En el genotipo D no se encontraron secuencias con mutaciones.

#### 4.1.5.2.8.3. Relación entre las variantes de la región 5'ARN pregenómico del PBC del VHB con la concentración de ADN-VHB.

Al relacionar la distribución de variantes en la región 5'ARN pregenómico con la concentración de ADN-VHB en cada uno de los grupos estudiados no se observaron diferencias estadísticamente significativas, ni tampoco cuando dentro de cada grupo se compararon los pacientes con y sin mutaciones

dentro del mismo genotipo. Se obtuvieron los mismos resultados cuando se categorizó la variable para incluir los no cuantificables (Figura 40).



**Figura 40. Relación entre las variantes normal y mutada de la región 5'ARN pregenómico del PBC del VHB con la concentración de ADN-VHB en cada uno de los genotipos.**

#### 4.1.5.2.8.4. Relación entre las variantes de la región 5'ARN pregenómico del PBC del VHB y el examen histológico.

No se observó ninguna relación entre las variantes de la región 5'ARN pregenómico del PBC y el examen histológico hepático, ni cuando se estratificó por genotipos ni tampoco cuando se estratificó por grupo de pacientes

#### 4.1.5.2.9. Estudio de las posiciones 1810-1813.

En estas posiciones se consideró como variante normal la que presentaba la secuencia CACC; cualquier modificación sobre esta secuencia se consideró variante mutada. La relación de las mutaciones observadas en estas posiciones se muestra en la Tabla 12.



**Tabla 12. Mutaciones en la región del extremo 5' ARN Pregenómico (1810-CACC-1813) del PBC del VHB. Relación con el genotipo viral.**

Posición 1810-CACC-1813	HBeAg (+) ALT elevada			HBeAg (-) ALT elevada				HBeAg (-) ALT fluctuante		Portadores asintomáticos				
	Genotipo VHB			Genotipo VHB				Genotipo VHB		Genotipo VHB				
	A	D	F	A	A+D	B	D	F	A	D	A	A+D	B	D
1810A 1811C 1812 T									1					
1810T											1			
1810T, 1811T							1							
1810Y				1			1							
1810Y 1811C 1812T											1			
1810Y, 1811M				1										
1810Y, 1812T				1										
1811C									1					
1811C 1812T									1					
1811C, 1812T	1													
1811T 1812G											1			
1812T	1													
Normal	16	10	2	14	2	2	33	2	7	9	8	1		10
TOTAL	18	10	2	17	2	2	35	2	9	9	11	1	1	10

A=Adenina; C=Citosina; G=Guanina; T=Timina; Y=C/T; R=A/G; M=A/C; K=G/T; S=C/G; W=A/T; DELEC =Delección

Se encontraron secuencias mutadas en 13 (10%) de los casos: 2 (6.7%) HBeAg positivo con ALT elevada, 5(8.6%) HBeAg negativo con ALT elevada, 3 (17%) HBeAg negativo con ALT fluctuante y 3 (13%) de los portadores asintomáticos. Al seleccionar los casos con mutaciones en el PBC, se encontró la variante mutada en las posiciones 1810-1813 en el 32% de los casos. La posición 1813 se encontraba conservada en todas las secuencias.

Al comparar la distribución de las variantes normal y mutada entre los grupos no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos. Al comparar los cuatro grupos estudiados las diferencias no fueron significativas.

#### 4.1.5.2.9.1. Relación entre las mutaciones en la región del extremo 5'ARN-pregenómico (1810-1813) del PBC del VHB y los genotipos virales.

Al estratificar los diferentes grupos por genotipo del VHB y comparar la distribución de variantes normal y mutada para cada genotipo no se observaron diferencias significativas ni para el genotipo A ni para el genotipo D ni tampoco se observaron diferencias cuando se consideraron los 4 grupos globalmente. Al estratificar por grupo de pacientes no se observaron diferencias significativas en la proporción de mutaciones en la región del extremo 5'ARN pregenómico entre los genotipos A y D dentro de cada grupo. Por último se consideraron conjuntamente todos los casos y se comparó la distribución de las mutaciones en esta región en los genotipos A y D observándose que había un 20% de secuencias con mutaciones en el genotipo A frente a un 3% en el genotipo D (p=0.003).

Los análisis de la distribución de las variantes normales y mutadas en los diferentes grupos de pacientes efectuados anteriormente, al estratificar por genotipos, y por grupos de pacientes, y al considerar conjuntamente todos los casos, indican que las mutaciones en esta zona se relacionan con el genotipo A, independientemente del grupo de pacientes.

#### 4.1.5.2.9.2. Relación entre las mutaciones en la región del extremo 5'ARN-pregenómico (1810-1813) del PBC del VHB y la concentración de HBeAg.

Este estudio no se pudo realizar porque en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada sólo había dos casos con mutaciones en estas posiciones. Es de señalar que estos dos casos presentaban una

concentración de HBeAg de 65 y 127 UPE/mL, respectivamente, cuando la mediana para el genotipo A de los demás casos fue de 1099 UPE/mL.

#### 4.1.5.2.9.3. Relación entre las mutaciones en la región del extremo 5'ARN-pregenómico (1810-1813) del PBC del VHB y la concentración de ADN-VHB.

A pesar de que el número de casos con variantes en las posiciones 1810-1813 dentro de cada grupo es escaso, cabe señalar que en todos los grupos el percentil 25 de los casos con mutaciones en estas posiciones estaban en el rango de la mediana de los casos sin mutaciones, o incluso lo superaban. (Figura 41).

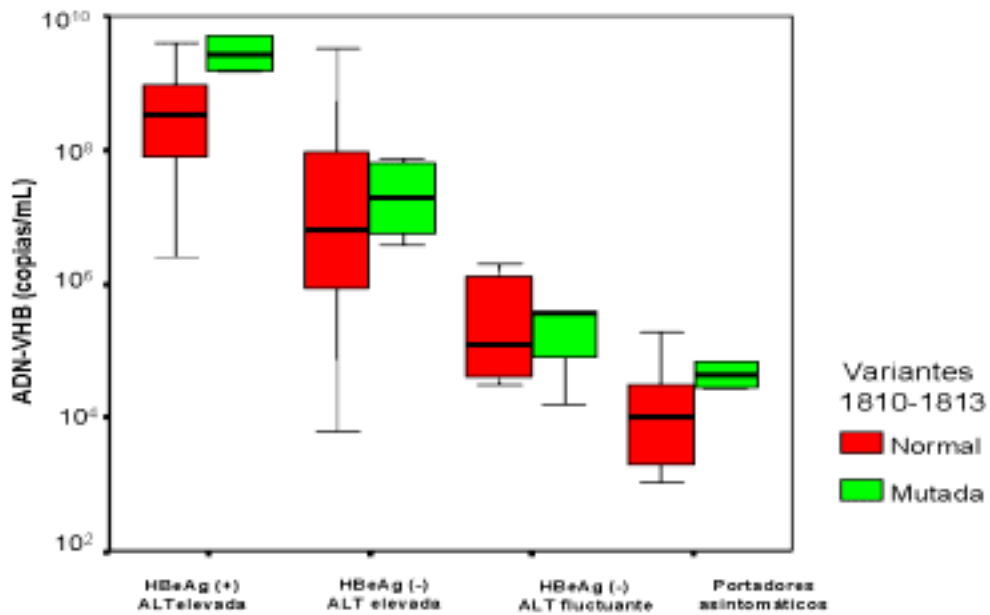


Figura 41. Relación entre las variantes normal y mutada de la región 1810-1813 del PBC del VHB con la concentración de ADN-VHB

Cuando sólo se consideró el genotipo A se siguió observando esta misma tendencia (Figura 42).

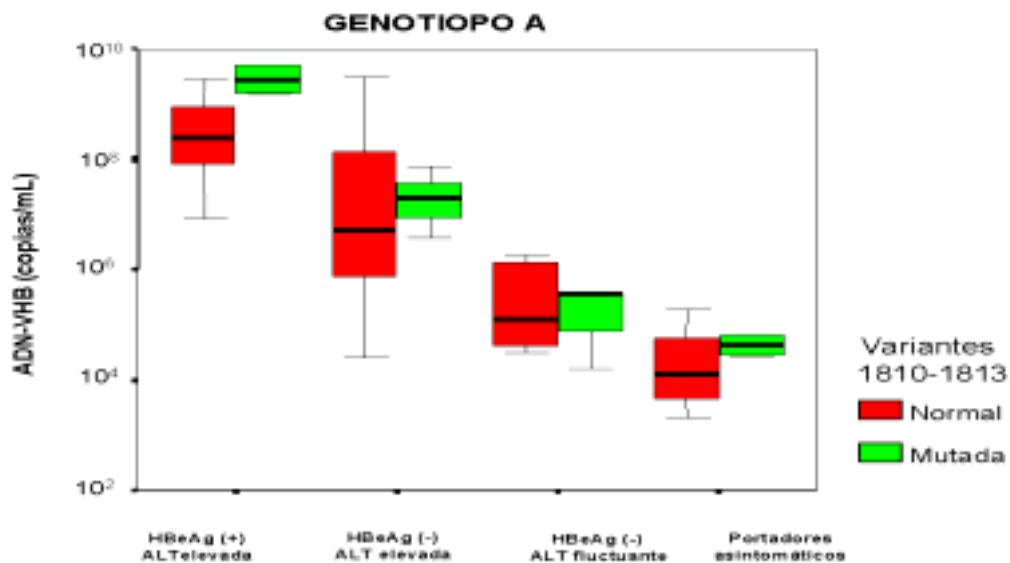


Figura 42. Relación entre las variantes normal y mutada de la región 1810-1813 del PBC del VHB con la concentración de ADN-VHB en el genotipo A.

#### 4.1.5.2.9.4. Relación entre las mutaciones en la región 1810-1813 del PBC del VHB y la lesión histológica hepática.

No se observó ninguna relación entre las variantes de la región 1810-1813 del PBC y el examen histológico hepático, ni cuando se estratificó por genotipos ni tampoco cuando se estratificó por grupo de pacientes.

#### ***4.1.5.2.10. Estudio de las posiciones 1814-1817.***

Dado que todas las variantes en esta zona impiden la expresión del HBeAg, se estudiarán en el apartado 4.1.6. de resultados.

#### ***4.1.5.2.11. Estudio de las posiciones 1818-1820.***

Las variantes de esta zona se solapan con la región ARN-Pregenómico Inr (1817-CAACT-1821), motivo por el cual se estudiarán en el apartado correspondiente a dicha región (apartado 4.1.5.12. de resultados).

#### ***4.1.5.2.12. Mutaciones en la región ARN-Pregenómico Inr (1817-CAACT-1821) del PBC del VHB.***

En estas posiciones se consideró como variante normal la que presentaba la secuencia CAACT; cualquier modificación sobre esta secuencia se consideró variante mutada. La relación de las mutaciones observadas en estas posiciones se muestra en la Tabla 13.

**Tabla 13. Mutaciones en la región ARN pregenómico Inr (1817-CAACT-1821) del PBC del VHB. Relación con el genotipo viral.**

Variantes 1817- CAACT-1821	HBeAg (+) ALT elevada			HBeAg (-) ALT elevada					HBeAg (-) ALT fluctuante		Portadores asintomáticos			
	Genotipo VHB			Genotipo VHB					Genotipo VHB		Genotipo VHB			
	A	D	F	A	A+D	B	D	F	A	D	A	A+D	B	D
1817T							2			1				
1817Y				1										
1818M													1	
1819M														1
1819T							1							
1821C											1			
Normal	18	10	2	16	2	2	32	2	9	8	10	1		9
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>17</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>35</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>10</b>

A=Adenina; C=Citosina; G=Guanina; T=Timina; Y=C/T; R=A/G; M=A/C; K=G/T; S=C/G; W=A/T; DELEC =Delección

Dado el escaso número de cambios en esta zona no se ha profundizado más en su estudio y se consideró como una zona conservada.

#### **4.1.5.2.13. Mutaciones en la región DR-1 (1824-1829) TTCACC.**

Esta región se ha considerado también una zona conservada ya que únicamente un paciente portador asintomático tenía deleccionado un nucleótido entre las posiciones el 1821 y 1825 (TTTTT). A pesar de esta delección se seguía conservando la secuencia de la región DR 1.