

4.1.6. DETECCIÓN DE VARIANTES EN LA REGIÓN DEL PRECORE DEL VHB.

La región del precore abarca desde el nucleótido 1814 hasta el 1900 del genoma del VHB. En este fragmento se encuentra el codon de inicio de la proteína del precore (nucleótidos 1814 a 1816), proteína precursora del HBeAg, así como la mayor parte de la señal de encapsulación (épsilon) (nucleótidos 1846 a 1908). En este estudio las variantes de la región del precore del VHB se analizarán de dos maneras, en primer lugar considerando toda la región de forma conjunta y posteriormente analizando de forma aislada aquellas posiciones de mayor interés.

4.1.6.1. Análisis global de la región del precore del VHB.

En esta región se consideraron variantes mutadas aquellas cuyas mutaciones impiden la expresión del HBeAg. La relación de estas variantes mutadas se muestra la Tabla 14.

De las 129 secuencias analizadas se encontraron cambios en 81 (63%) de los casos: 5 (17%) HBeAg positivo con ALT elevada, 48 (83%) HBeAg negativo con ALT elevada, 13 (72%) HBeAg negativo con ALT fluctuante y en 15 (65%) de los portadores asintomáticos. En los cinco casos de pacientes HBeAg positivo en los que se detectaron cambios en esta región se observó la presencia simultánea de la variante normal y mutada. Un 23% de los casos HBeAg negativo no presentaron ninguna mutación en el precore que impide la expresión del HBeAg. Si se consideran sólo estas 81 secuencias con cambios que impiden la expresión del HBeAg, las mutaciones más frecuentes se observaron en la posición 1896 (73%) y en las posiciones 1814-1817 (23%).

Al comparar la distribución de las variantes normal y mutada entre los grupos se observó que la proporción de cambios era menor en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada que en todos los demás grupos ($p < 0.001$); entre el grupo HBeAg negativo con ALT elevada y el grupo portadores asintomáticos las diferencias fueron cercanas a la significación ($p = 0.08$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante y los grupos HBeAg negativo con ALT elevada y portadores asintomáticos. Al comparar los cuatro grupos estudiados las diferencias eran significativas ($p < 0.001$), con una asociación lineal significativa ($p < 0.001$) en la que aumentaba la proporción de secuencias mutadas en el orden HBeAg positivo con ALT elevada (17%), portadores asintomáticos (65%), HBeAg negativo con ALT fluctuante (72%) HBeAg negativo con ALT elevada (83%) (Figura 43).

Tabla 14. Variantes en la región de precore del VHB que impiden la expresión del HBeAg.

variantes mutadas en la región del precore	Codon precore afectado	HBeAg (+) ALT elevada	HBeAg (-) ALT elevada	HBeAg (-) ALT fluctuante	Portadores asintomáticos	TOTAL
1897A	28 (TGG→TGA)		1			1
1896A	28 (TGG→TAG)		33	7	8	48
1817T-1896A	2 (CAA→TAA)- 28(TGG→TAG)		2			2
1816T-1896A	1 (ATG→ATT)- 28(TGG→TAG)		2			2
1896R	28 (TGG→TRG)	3	2			5
1896-INSERC A 1840*	28 (TGG→TAG)- 33(GAC→TGA)				1	1
1814C-1896A	1 (ATG→CTG)- 28(TGG→TAG)			1		1
DELEC 1825**	8 (CTA→TAA)				1	1
DELEC 1845†	71 (TTA→TAG)		2			2
INSERC A 1839*	33 (GAC→TGA)			1	1	2
INSERC T 1839*	33 (GAC→TGA)			1		1
1815C	1 (ATG→ACG)				3	3
1816K	1 (ATG→ATK)		1			1
1816T	1 (ATG→ATT)		2	1		3
1815Y	1 (ATG→AYG)	1				1

1814C	1 (ATG→CTG)		2			2
1814M	1 (ATG→MTG)	1				1
1814T	1 (ATG→TTG)			1		1
1817T	2 (CAA→TAA)			1		1
1817Y	2 (CAA→YAA)		1			1
1874W	21 (AAG→WAG)				1	1
Normal		25	10	5	8	48
TOTAL		30	58	18	23	129

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; INSERC=Inserción

*Cambio en la pauta de lectura a partir del codon 9 y aparición de “stop” en codon 33.

** Cambio en la pauta de lectura a partir del codon 5 y aparición de “stop” en codon 8.

† Cambio en la pauta de lectura a partir del codon 11 y aparición de “stop” en codon 71.

Las variantes se han identificado por la posición y el nucleótido alterado.

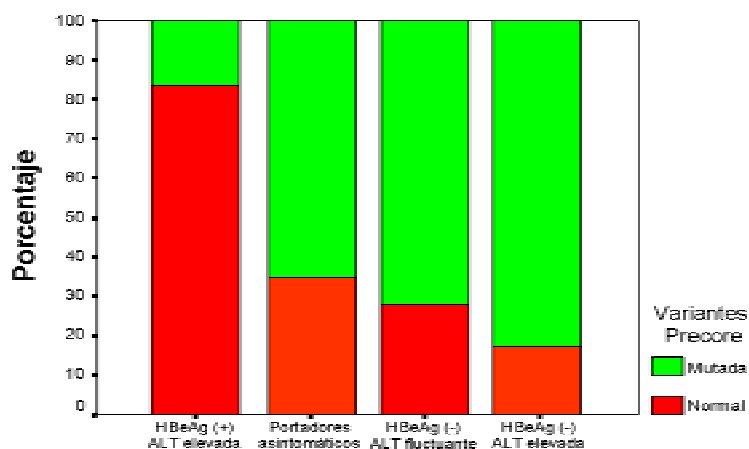


Figura 43. Distribución de las variantes en la región del precore del VHB.

Al tener en cuenta la distribución de genotipos entre los diferentes grupos de pacientes, en general se observó una clara relación entre la presencia de mutaciones en el precore y el genotipo viral, de manera que en el genotipo A se encontraron un 40 % de mutados mientras que en el genotipo D un 80% ($p < 0.001$) (Figura 44).

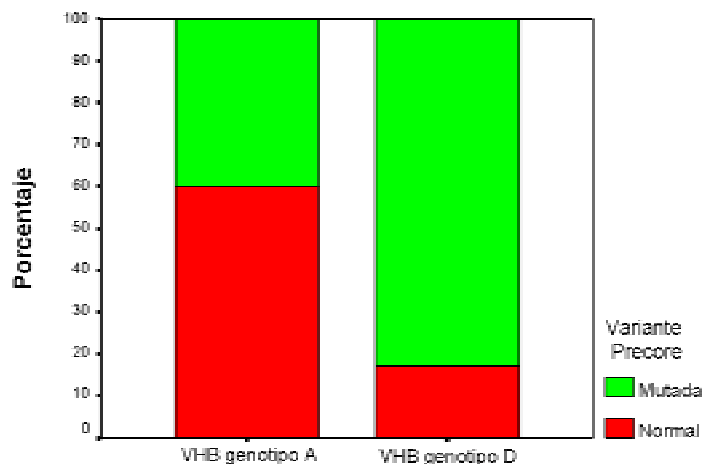


Figura 44. Relación entre las variantes del precore y los genotipos A y D.

4.1.6.1.1. Relación entre las mutaciones en la región precore 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 observó, tanto en el genotipo A como el D, que el grupo HBeAg positivo con ALT elevada presentaba menor proporción de mutaciones que los otros tres grupos, con diferencias significativas en todas las comparaciones, y que no había diferencias significativas en la proporción de mutaciones entre los grupos HBeAg negativo con ALT elevada, HBeAg negativo con ALT fluctuante y portadores asintomáticos. Al considerar los cuatro grupos se observaron diferencias significativas entre ellos ($p=0.02$ para el genotipo A y $p<0.001$ para el genotipo D) y también una asociación lineal significativa ($p=0.008$ para el genotipo A y $p<0.001$ para el genotipo D) en el sentido descrito en el apartado anterior (Tabla 15 y Figura 45).

Tabla 15. Variantes en la región del precore del VHB que impiden la expresión del HBeAg y genotipos virales.

	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
1897A				1										
1896A				6	1	1	24	1	2	5	2			6
1817T-1896A							2							
1816T-1896A							2							
1896R		2	1				2							
1896-INSERC A 1840														1
1814C-1896A										1				
DELEC 1825														1
DELEC 1845						1		1						
INSERC A 1839									1		1			
INSERC T 1839									1					
1815C												3		
1816K							1							
1816T							2			1				
1815Y	1													
1814C				2										
1814M	1													
1814T										1				
1817T										1				
1817Y				1										
1874W														1
Normal	16	8	1	7	1		2		5		5	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

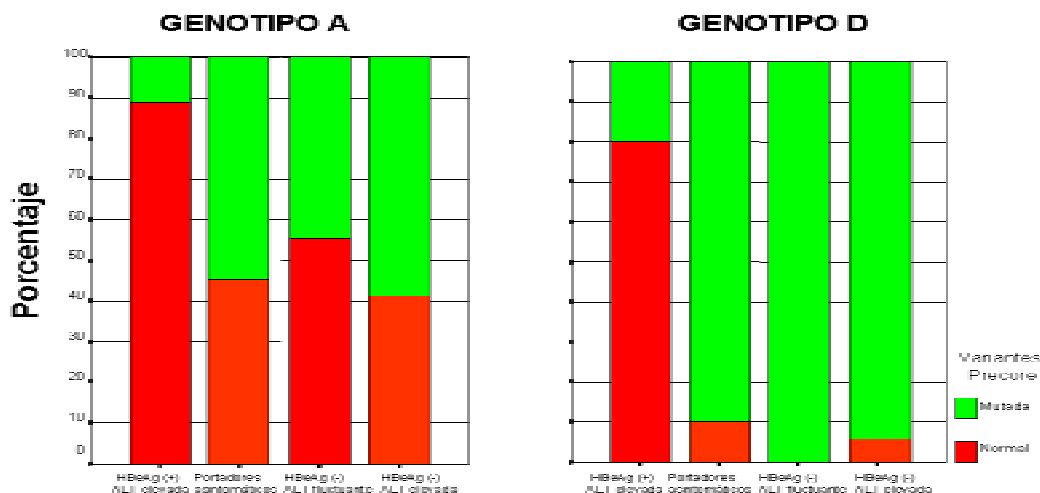


Figura 45. Variantes en la región precore del VHB y genotipos virales. Análisis estratificado por genotipos.

Al estratificar por grupos de pacientes se observó que en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada no había relación entre el genotipo y la presencia de variantes mutadas en la región del precore, a pesar de que se observó un 11% de variantes mutadas en el genotipo A frente a un 20% en el genotipo D. En el grupo de los HBeAg negativo con ALT elevada se observó un 59% de casos con variantes mutadas en el genotipo A frente a un 94% en el genotipo D ($p=0.002$). En los pacientes HBeAg negativo con ALT fluctuante se encontraron un 44% de casos con variantes mutadas en el de genotipo A frente a un 100% en el genotipo D ($p=0.03$). En los portadores asintomáticos se observó un 54% de casos con variantes mutadas en el genotipo A frente a un 90% en el genotipo D ($p=0.15$). Por tanto, en general los resultados parecen apuntar a que el genotipo D presentaría mutaciones en el precore en el doble de casos que el genotipo A, independientemente del grupo de pacientes. (Figura 46).

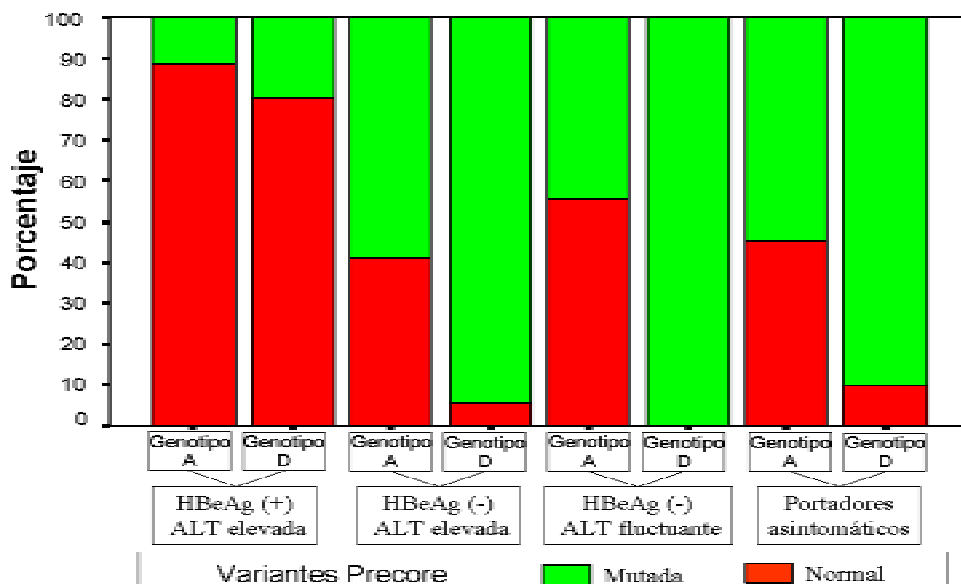


Figura 46. Variantes en la región del precore del VHB y genotipos virales A y D. Análisis estratificado por grupos.

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 el grupo HBeAg negativo con ALT elevada, HBeAg con ALT fluctuante y portadores asintomáticos presentaban

una proporción similar de variantes mutadas en el precore, proporción siempre superior a la observada en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada. Esta diferencia entre los grupos se percibía con mayor claridad al tener en cuenta el genotipo viral, observándose que dentro de cada grupo de pacientes, el genotipo D presentaba el doble de casos con variantes mutadas que el genotipo A.

4.1.6.1.2. Relación entre las variantes de la región precore del VHB con la concentración de HBeAg.

En el grupo HBeAg positivo con ALT elevada los casos con variantes mutadas en la región del precore presentaban mezcla de variantes que no expresan el HBeAg con variantes que sí expresan el HBeAg. Se observó que los pacientes que presentaban la variante normal (n=25) tenían una concentración de HBeAg (mediana=792 UPE/mL, 1.48-17600 UPE/mL) superior a la de los pacientes con variantes mutadas (n=5) (mediana=43 UPE/mL, 0.12-765 UPE/mL) (p=0.07). La estratificación por genotipo viral no se pudo realizar dado el pequeño número de secuencias mutadas para cada genotipo (2 de genotipo A y 2 de genotipo D).

4.1.6.1.3. Relación entre las variantes de la región precore del VHB con la concentración de ADN-VHB.

Al relacionar la distribución de variantes en la región precore con la concentración de ADN-VHB en cada uno de los grupos estudiados no se observaron diferencias significativas. En el grupo HBeAg positivo con ALT elevada se observó que había diferencias cercanas a la significación en la concentración de ADN-VHB entre las variantes mutada (mediana= 1.5×10^8 copias ADN-VHB/mL, 1.7×10^6 - 3.8×10^8) y no mutada (mediana= 5.3×10^8 copias ADN-VHB/mL, 2.5×10^6 - 1.5×10^9) (p=0.17), aunque se ha de tener en cuenta que sólo había 5 casos con variante mutada y siempre en poblaciones mixtas. En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada se observó que también había diferencias cercanas a la significación en la concentración de ADN-VHB entre las variantes mutada (n=48) (mediana= 1.2×10^7 copias ADN-VHB/mL, 6.4×10^3 - 3.2×10^9) y no mutada (n=10) (mediana= 1.6×10^6 copias ADN-VHB/mL, 2.5×10^4 - 2.4×10^8) (p=0.10). En los demás grupos no se observaron diferencias significativas (Figura 47).

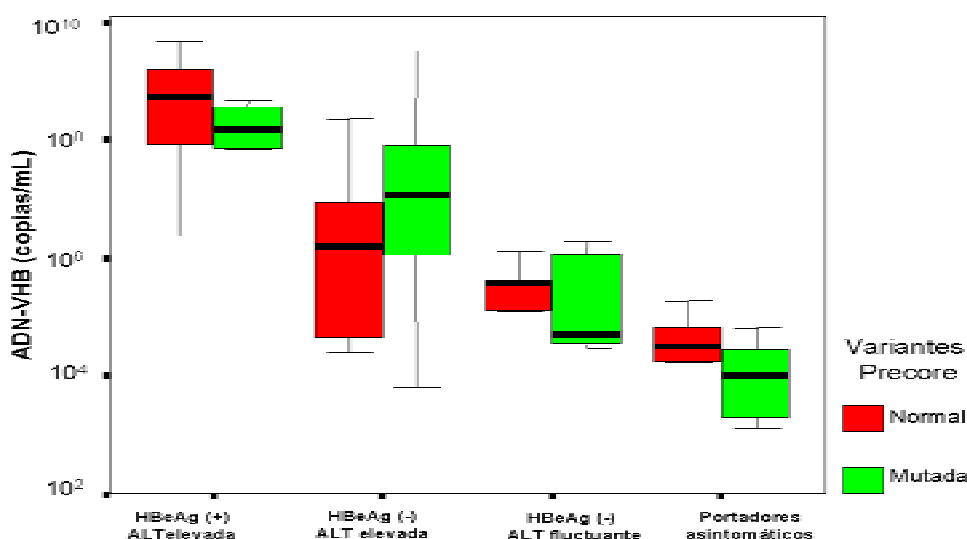


Figura 47. Relación entre las variantes normal y mutada del precore con la concentración de ADN-VHB.

Se comparó dentro de cada grupo y genotipo la concentración de ADN-VHB entre las variantes mutada y no mutada, comparación que no se pudo realizar con todos los grupos debido al pequeño tamaño de algunos de los grupos.

Se observó que en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada de genotipo A no había diferencia en la concentración de ADN-VHB entre las variantes mutada (n=10) y no mutada (n=7). Para el genotipo D la significación fue de 0.02 aunque sólo había 2 casos no mutados (mediana= 3.3×10^4 copias ADN-

VHB/mL, 2.5×10^4 - 4.5×10^4) frente a 32 mutados (mediana= 8.9×10^6 copias ADN-VHB/mL, 7.8×10^4 - 3.1×10^9). Por otro lado, dentro de los HBeAg negativo con ALT elevada con mutaciones en el precore no se observaron diferencias significativas en la concentración de ADN-VHB entre los genotipos A y D. Finalmente, en los HBeAg negativo con ALT elevada no mutados, la concentración de ADN-VHB en el genotipo A era mayor que en el genotipo D (mediana= 3.9×10^6 copias/mL ADN-VHB, 4.2×10^4 - 2.5×10^8 , vs mediana= 3.3×10^4 copias ADN-VHB/mL, 2.5×10^4 - 4.5×10^4) aunque el número de casos era pequeño (7 vs 2, respectivamente).

En el grupo HBeAg positivo con ALT elevada de genotipo A se observaron diferencias próximas a la significación en la concentración de ADN-VHB entre la variante no mutada (mediana= 4.7×10^8 copias ADN-VHB/mL, 8.3×10^6 - 5×10^9) y las variantes con mutaciones (mediana= 1.6×10^7 copias ADN-VHB/mL, 1.2×10^6 - 2.5×10^8) ($p=0.12$), aunque se ha de tener en cuenta el tamaño de los grupos, 16 y 2 casos respectivamente. En el genotipo D no se observaron diferencias en la concentración de ADN-VHB pero sólo había 2 mutados frente a 8 no mutados. Por otro lado, dentro del grupo HBeAg positivo con ALT elevada sin mutaciones en el precore no se encontraron diferencias significativas en la concentración de ADN-VHB entre los genotipo A y D. Finalmente, en los HBeAg positivo con ALT elevada con mutaciones en el precore sólo había dos casos de genotipo A (mediana= 1.6×10^7 copias ADN-VHB/mL, 1.2×10^6 - 2.5×10^8) y otros dos casos de genotipo D (mediana= 1.7×10^8 copias ADN-VHB/mL, 7.1×10^7 - 3.9×10^8).

Aunque se han de tomar con cautela estos resultados debido el pequeño tamaño de algunos grupos, apuntarían a que en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada la aparición de mutaciones en el precore se asociaría con un aumento en la concentración de ADN-VHB, aumento observable en el genotipo D (aunque tan sólo había dos pacientes de genotipo D no mutados) pero no en el A (7 no mutados frente a diez mutados). En los HBeAg positivo con ALT elevada la aparición de mutaciones en el precore se asociaría con una disminución en la concentración del ADN-VHB observable en el genotipo A pero no el genotipo D (Figura 48).

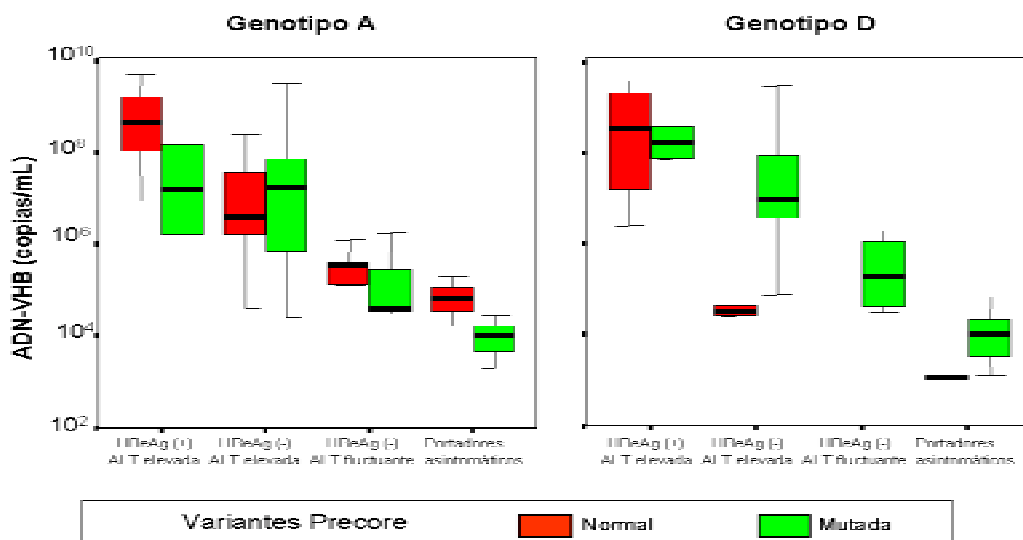


Figura 48. Relación entre las variantes normal y mutada de la región precore del VHB con la concentración de ADN-VHB en cada uno de los genotipos.

4.1.6.1.4. Relación entre las variantes de la región precore del VHB con el examen histológico.

No se observó relación entre las variantes normal y mutada de la región precore del VHB y la lesión histológica. De los pacientes con la variante normal, 13 (76%) casos presentaron HCA mientras que 8 (20%) casos con la variante mutada presentaron CH. Al estratificar por genotipo no se observó relación para el genotipo A, 8 de los pacientes con la variante normal presentaban HCA frente a 2 (22%) casos con la variante mutada que presentaron CH. Tampoco se observó relación en el genotipo D, 5 (100%) de los pacientes con la variante normal presentaron HCA frente a 5 (18%) de casos con la variante mutada que presentaron CH. 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 la región precore del VHB,

aunque en este grupo sólo había dos casos con CH, ambos con la variante normal. En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada tampoco se observó relación entre la lesión histológica y la presencia de mutaciones en la región precore del VHB. Al estratificar por grupo de pacientes y genotipo las diferencias no alcanzaron la significación en ningún caso. Tal vez lo único reseñable fue que cuando se estratificó por las variantes normal y mutada del precore del VHB, se observó que en aquellos pacientes que presentaron la variante normal, 4 (33%) de los 12 pacientes de genotipo A presentaron CH mientras que los 5 pacientes de genotipo D presentaron HCA. En aquellos pacientes con la variante mutada no se observó relación entre el genotipo viral y la lesión histológica. Estos resultados sugieren que no hay relación entre las variantes de la región del precore y la lesión histológica hepática, aunque la proporción de CH en aquellos pacientes con la variante normal de la región del precore era superior en los casos de genotipo A y que el 77% de los pacientes con HC presentaban variantes mutadas en la región del precore.

4.1.6.2. Análisis individual de las variantes de la región del precore del VHB.

En este apartado se estudiarán las posiciones de la secuencia del precore del VHB donde con mayor frecuencia se producen cambios que impiden la expresión del HBeAg: posiciones 1896 y región 1814-1817 (códones primero y segundo del precore). Las mutaciones en la posición 1896 se han descrito como el lugar donde con mayor frecuencia se producen cambios que impiden la expresión del HBeAg debido a la aparición de un codon “stop”. La posición 1896 se encuentra emparejada con la posición 1858 en la señal de encapsulación (estructura secundaria del ARN pregenómico). La variante del VHB mutada en la posición 1896 (1896G por 1896A) presenta un aumento en la estabilidad de la señal de encapsulación cuando en la posición 1858 hay una T (característica propia del genotipo D pero no del genotipo A, en el cual hay una C en esta posición). En una proporción considerable de casos, a la mutación en 1896 se le asocia un cambio en la posición 1899; este último no impide la expresión del HBeAg pero parece incrementar todavía más la estabilidad de la señal de encapsulación.

Las posiciones 1814-1816 corresponden al codon de inicio de la proteína precore cuya alteración impide el inicio de la transcripción. En las posiciones 1817-1819 se ha descrito la aparición de un codon “stop”.

4.1.6.2.1. Variantes de la posición 1896 del precore del VHB

En esta posición se consideró variante normal la que presentaba una G y como variante mutada cualquier cambio de la misma. En la totalidad de los cambios observados la sustitución fue de la G por una A dando lugar a un codon “stop”. Se detectaron secuencias mutadas en 59 (46%) de los casos: 3 (10%) HBeAg positivo con ALT elevada, 39 (67%) HBeAg negativo con ALT elevada, 8 (44%) HBeAg negativo con ALT fluctuante y 9 (39%) de los portadores asintomáticos. Se detectaron cambios en la posición 1896 en 59 (73%) de los 81 casos que presentaron cambios en la región del precore del VHB que impiden la expresión del HBeAg.

Al relacionar la presencia de mutaciones en esta posición 1896 con los genotipos virales mayoritarios (A y D), se observó que 10 (45%) de los 22 casos de genotipo A con mutaciones que impiden la expresión del HBeAg presentaban la variante mutada en la posición 1896 frente a 45 (85%) de 53 en el genotipo D ($p < 0.001$). La totalidad de los casos de genotipo A con mutaciones en la posición 1896 presentaban una T en la posición 1858 mientras los restantes casos de genotipo A con mutaciones en el precore que impiden la expresión del HBeAg distintas de las variantes de la posición 1896 presentaban una C en la posición 1858 ($p < 0.001$). En los pacientes con mutaciones en el precore que impiden la expresión de HBeAg, incluidos 5 pacientes HBeAg positivo con poblaciones mixtas, no se observó relación entre el grupo de pacientes y la proporción de mutantes en la posición 1896.

En el grupo HBeAg positivo con ALT elevada se encontraron 5 casos con poblaciones mixtas de las variantes normal y mutada. Tres de ellos presentaban mutaciones en la posición 1896. La relación entre la concentración de HBeAg y la presencia de mutaciones en la posición 1896 no se pudo realizar debido al pequeño número de casos.

Con el objetivo de estudiar el efecto diferencial de la variante mutada en la posición 1896 y la replicación viral respecto a las otras variantes en la región del precore que impiden la expresión del HBeAg, se relacionó la distribución de variantes en la posición 1896 con la concentración de ADN-VHB, en aquellos casos con mutaciones en el precore que impiden la expresión del HBeAg, en cada uno de los grupos estudiados. No se observó relación en ninguno de los grupos excepto en los portadores asintomáticos donde la presencia de mutaciones en la posición 1896 se asociaba con una mayor concentración de ADN-VHB (mediana = 1.3×10^4 copias ADN-VHB/mL, 1.9×10^3 - 6.8×10^4 , vs mediana = 1.9×10^3 copias ADN-VHB/mL, 1.2×10^3 - 5×10^3) ($p = 0.033$). En este último resultado se ha de tener en cuenta el bajo número de

casos (6 con la variante normal y 9 con la variante mutada). En este punto habría que tener en cuenta el escaso porcentaje de pacientes con mutaciones en la región precore diferentes de la posición 1896 que, tal vez, podría justificar la falta de asociación entre la presencia de la mutación en la posición 1896 y una mayor concentración de ADN-VHB, que era de esperar dada la capacidad estabilizadora de esta mutación sobre la señal de encapsulación. Cuando se consideraron todos los pacientes, sólo se observaron diferencias significativas en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada, en el que la variante mutada presentaba una mediana de 1.4×10^7 copias ADN-VHB/mL (6.3×10^3 - 3.2×10^9) frente a la no mutada que presentaba una mediana de 2.7×10^6 copias ADN-VHB/mL (2.5×10^4 - 2.5×10^9) ($p=0.04$). En este mismo grupo, al estratificar por genotipo se observó que en el genotipo A las diferencias se hacían no significativas mientras que en el genotipo D la significación todavía era mayor ($p=0.002$): la variante mutada presentaba una mediana de 1.3×10^7 copias ADN-VHB/mL (7.9×10^4 - 3.2×10^9) frente a la variante normal que presentaba una mediana de 7.9×10^4 copias ADN-VHB/mL (2.5×10^4 - 6.3×10^6). En el estudio de la relación entre las variantes de la posición 1896 del precore y la lesión histológica hepática no se observó relación estadísticamente significativa, ni al estratificar por genotipos ni al estratificar por grupo de pacientes. Hay que señalar que para el genotipo D se observó que 8 (100%) de los pacientes con la variante normal presentaban HCA frente a 5 (21%) de los casos con la variante mutada que presentaban CH ($p=0.16$); así mismo al estratificar por las variantes normal y mutada de la posición 1896 del precore, se observó que en aquellos pacientes que presentaban la variante normal 5 (29%) de los 17 pacientes de genotipo A tenían CH mientras que los 8 pacientes de genotipo D presentaban HCA ($p=0.14$). Estos resultados sugieren una posible relación entre las variantes de la posición 1896 y la lesión histológica hepática de forma que, en los pacientes de genotipo D la presencia de CH se asociaría con la variante mutada de la posición 1896. Este resultado no se observó en el genotipo A. Por otro lado, entre los pacientes con la variante normal para la posición 1896 la presencia de CH se asociaría con el genotipo A.

4.1.6.2.2. Variantes de las posiciones 1814-1819 de la región del precore del VHB.

Se encontraron secuencias mutadas en 19 (15%) de los 129 casos incluidos en el estudio: 2 (7%) de los pacientes HBeAg positivo con ALT elevada (ambos con presencia simultánea de las variantes normal y mutada), 10 (17%) de los HBeAg negativo con ALT elevada, 4 (22%) de los HBeAg negativo con ALT fluctuante y 3 (13%) de los portadores asintomáticos. Se detectaron cambios en las posiciones 1814-1817 en 19 (23%) de los 81 casos que presentaron cambios en la región del precore del VHB que impiden la expresión del HBeAg (Tabla 16).

Tabla 16. Variantes en la región 1814-1819 del precore del VHB que impiden la expresión del HBeAg y genotipos virales.

	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-1896A							2							
1816T-1896A							2							
1814C-1896A										1				
1815C											3			
1816K							1							
1816T							2			1				
1815Y	1													
1814C				2										
1814M	1													
1814T										1				
1817T										1				
1817Y					1									
Normal	16	10	2	14	2		28		9	5	8	1	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

Cuando se consideraron sólo los 81 casos con mutaciones en el precore que impiden la expresión del HBeAg no se observaron diferencias al comparar la distribución de las variantes normal y mutada entre los grupos. Cuando se consideró la totalidad de los casos, al comparar la distribución de las variantes normal y mutada entre los grupos no se observaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones. Tan solo se encontraron diferencias próximas la significación entre el grupo HBeAg positivo con ALT elevada (7% de casos con mutaciones) y el grupo HBeAg negativo con ALT elevada (17% de casos con mutaciones) ($p=0.17$) y HBeAg negativo con ALT fluctuante (22% de casos con mutaciones) ($p=0.12$). Al comparar los cuatro grupos estudiados no se encontraron diferencias significativas.

4.1.6.2.2.1. Relación entre las mutaciones en las posiciones 1814-1819 del precore del VHB y los genotipos virales.

En general, considerando los 129 casos, no se observó relación entre la presencia de mutaciones en las posiciones 1814-1819 del precore y el genotipo viral (15% de mutados en el genotipo A frente a un 17% en el genotipo D). Sin embargo, cuando se seleccionaron todos aquellos casos con mutaciones en el precore que impiden la expresión del HBeAg de los genotipo A o D (75 casos), se observó que en el genotipo A se detectaron 8 (36%) casos con mutaciones en la región 1814-1819 mientras que en el genotipo D se encontraron 11 (20%) casos que presentaban estas mutaciones ($p=0.16$).

Al estratificar por genotipo del VHB los 129 casos en los diferentes grupos y comparar la distribución de las variantes normal y mutada, se observó que en el genotipo A no había diferencia entre los grupos, mientras que en el genotipo D se observaron diferencias significativas entre el grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante (45% de secuencias con mutaciones) y los grupos HBeAg positivo con ALT elevada (ninguna secuencia con mutaciones) ($p=0.03$) y portadores asintomáticos (ninguna secuencia con mutaciones) ($p=0.03$). También en el genotipo D se observaron diferencias más alejadas de la significación entre el grupo HBeAg negativo con ALT elevada (20% de secuencias mutadas) y los demás grupos, HBeAg positivo con ALT elevada (ninguna secuencia mutada) ($p=0.12$), HBeAg negativo con ALT fluctuante (45% de secuencias con mutaciones) ($p=0.13$) y portadores asintomáticos (ninguna secuencia mutada) ($p=0.12$).

Cuando se consideraron los cuatro grupos no se observaron diferencias significativas entre ellos para el genotipo A pero sí para el genotipo D ($p=0.03$). En el genotipo D, en los grupos HBeAg positivo con ALT elevada y portadores asintomáticos no se observó ningún caso con mutaciones en esta región,

mientras que el grupo HBeAg negativo con ALT elevada presentaba un 20% de casos mutados y el grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante presentaba un 45%.

Al estratificar por grupos de pacientes, en el grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante se observó relación entre el genotipo y la presencia de mutaciones en esta región ($p=0.08$), observándose secuencias no mutadas en el 100% de los casos del genotipo A frente a un 55% del genotipo D. En los otros grupos no se observó relación.

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 en los pacientes de genotipo A no hay relación entre la presencia de estas mutaciones y el grupo de pacientes. En el genotipo D los grupos HBeAg positivo con ALT elevada y portadores asintomáticos no presentaban cambios en la región 1814-1819 frente a los grupos HBeAg negativo con ALT elevada (20% de secuencias mutadas) y HBeAg negativo con ALT fluctuante (45% de secuencias mutadas). El grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante de genotipo D presentaba una mayor proporción de mutaciones en las posiciones 1814-1819 que los pacientes de genotipo A del mismo grupo.

Con objeto de analizar el efecto diferencial de la presencia de mutaciones en las posiciones 1814-1819 respecto a las otras mutaciones en el precore que impiden la expresión del HBeAg, se repitió el estudio anterior pero tomando sólo los 81 pacientes con mutaciones en la región del precore que impiden la expresión del HBeAg. Al estratificar por genotipos los grupos quedan reducidos a un número pequeño de casos no observándose relación entre ellos y la presencia de mutaciones en las posiciones 1814-1819. Cuando se consideraron los cuatro grupos se observaron diferencias próximas a la significación entre ellos para el genotipo A ($p=0.09$) y para el genotipo D ($p=0.1$). Al estratificar por grupo de pacientes se observaron diferencias significativas en el grupo de portadores asintomáticos donde el 50% de los casos de genotipo A (3 casos) presentaron mutaciones en la región 1814-1819 del precore del VHB frente a ningún caso ($n=9$) en el genotipo D ($p=0.04$). En los demás grupos se observó una mayor proporción de mutaciones en el genotipo A que en el genotipo D pero el escaso número de pacientes en algunos de los grupos no permitió un análisis concluyente.

Un examen más detallado de esta región mostró que de los 8 casos de genotipo A con cambios en esta región, 7 mostraban cambios en las posiciones 1814 (3 casos) ó 1815 (4 casos), mientras que en el genotipo D de los 11 casos con cambios en esta región, 9 mostraban cambios en las posiciones 1816 (6 casos) ó 1817 (3 casos). La relación fue significativa ($p=0.005$).

4.1.6.2.2.2. Relación entre las mutaciones en las posiciones 1814-1819 del precore del VHB y la concentración de HBeAg.

Con relación a la concentración de HBeAg sólo había dos casos con estas mutaciones en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada los cuales presentaban una concentración de HBeAg de 0.12 UPE/mL y de 43 UPE/mL, mientras que el percentil 25 de los casos con la variante normal era de 34 UPE/mL y la mediana 653 UPE/mL.

4.1.6.2.2.3. Relación entre las mutaciones en las posiciones 1814-1819 del precore del VHB y la concentración de ADN-VHB.

Debido a la baja frecuencia de mutaciones en esta región, este análisis sólo se efectuó en el grupo de HBeAg negativo con ALT elevada en el que se encontraron 9 casos con mutaciones en la región 1814-1819 (6 casos de genotipo D y 3 de genotipo A) no encontrándose diferencias significativas.

4.1.6.2.2.4. Relación entre las mutaciones en las posiciones 1814-1819 del precore el VHB y la lesión histológica hepática.

No se observó relación estadísticamente significativa entre las variantes de las posiciones 1814-1819 de la región del precore del VHB y el examen histológico hepático, ni al estratificar por genotipos ni tampoco al estratificar por grupo de pacientes.

4.1.6.2.3. Variantes de la posición 1899 en la región del precore del VHB.

En los trabajos publicados las variantes descritas de esta posición no se han asociado con la aparición de un codon “stop” u otro tipo de alteraciones que impidan la expresión del HBeAg. Sin embargo, los cambios en esta posición son frecuentes y favorecen un aumento en la estabilidad de la señal de encapsulación. En esta posición se consideró como variante normal la que presentaba una G en la posición 1899; cualquier modificación se consideró variante mutada. La relación de las mutaciones observadas en esta posición se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Mutaciones en las posiciones 1899 del precore del VHB. Relación con el genotipo viral.

	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
1899G	17	9	2	12	2	2	14	1	5	5	10	1	1	5
1899A	1			5			16		1	4	1			3
1899R		1					5	1	3					2
TOTAL	18	10	2	17	2	2	35	2	9	9	11	1	1	10

A=Adenina; C=Citosina; G=Guanina; T=Timina; R=A/G

Se detectaron secuencias mutadas en 43 (33%) de los 129 casos: 2 (6.7%) HBeAg positivo con ALT elevada, 27 (46%) HBeAg negativo con ALT elevada, 8 (44%) HBeAg negativo con ALT fluctuante y 6 (26%) portadores asintomáticos. Se detectaron cambios en la posición 1899 en 38 (46%) de los 81 casos que presentaron cambios en la región del precore del VHB que impiden la expresión del HBeAg.

Al comparar la distribución de variantes normal y mutada entre los grupos se observó una proporción significativamente menor de variantes mutadas en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada que en todos los demás grupos, es decir HBeAg negativo con ALT elevada ($p < 0.001$), HBeAg negativo con ALT fluctuante ($p = 0.002$) y portadores asintomáticos ($p = 0.005$). No se encontraron diferencias entre estos tres últimos grupos, HBeAg negativo con ALT elevada, HBeAg negativo con ALT fluctuante y portadores asintomáticos.

4.1.6.2.3.1. Relación entre las mutaciones de la posición 1899 del precore del VHB y los genotipos virales.

Al estratificar los diferentes grupos por genotipo y comparar la distribución de variantes normal y mutada, en el genotipo A se observaron diferencias significativas entre el grupo HBeAg positivo con ALT elevada, 1 caso mutado (6%), y los grupos HBeAg negativo con ALT elevada, 5 casos mutados (30%), ($p = 0.05$), HBeAg negativo con ALT fluctuante, 4 casos mutados (45%), ($p = 0.03$), pero no con el grupo de portadores asintomáticos, 1 caso mutado (9%). En el genotipo D se encontraron diferencias significativas entre el grupo HBeAg positivo con ALT elevada, 1 caso mutado (10%), y el grupo HBeAg negativo con ALT elevada, 21 casos mutados (60%), ($p = 0.005$) y diferencias más alejadas de la significación con los grupos HBeAg negativo con ALT fluctuante, 4 casos mutados (45%), ($p = 0.14$) y portadores asintomáticos, 5 casos mutados (50%) ($p = 0.14$). Tanto en el genotipo A como en el genotipo D no se observaron diferencias significativas entre los grupos HBeAg negativo con ALT elevada, HBeAg negativo con ALT fluctuante y portadores asintomáticos, aunque se observó en el genotipo A una diferencia más alejada de la significación entre el grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante y portadores asintomáticos ($p = 0.13$).

Al estratificar por grupo de pacientes, se observaron diferencias en la proporción de mutaciones en la posición 1899 entre el genotipo A y D en los grupos HBeAg negativo con ALT elevada ($p = 0.04$) y portadores asintomáticos ($p = 0.06$), no observándose diferencias en los demás grupos.

Los análisis de la distribución de las variantes normal y mutada 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 tiene una menor proporción de mutaciones que los grupos HBeAg negativo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT fluctuante, independientemente del genotipo viral. Se observó un comportamiento relacionado con el genotipo en los grupos HBeAg negativo con ALT elevada y portadores asintomáticos, donde la proporción de mutaciones era superior en el genotipo D que en el A, de manera que en el grupo de portadores asintomáticos de genotipo A la proporción de

mutaciones es comparable a la de HBeAg positivo con ALT elevada. No se observó relación con el genotipo en los grupos HBeAg positivo con ALT elevada ni HBeAg negativo con ALT fluctuante.

4.1.6.2.3.2. Relación entre las variantes de la posición 1899 del precore del VHB con la concentración de HBeAg.

En el grupo HBeAg positivo con ALT elevada sólo se encontraron dos casos con mutaciones en esta posición, los cuales presentaban una concentración de HBeAg de 3.75 UPE/mL y 8268 UPE/mL. Como se ha comentado previamente la variante mutada de esta posición no impide la expresión del HBeAg y, por tanto, no es de extrañar estos dos resultados tan dispares.

4.1.6.2.3.3. Relación entre las variantes en la posición 1899 y la concentración del ADN-VHB.

Al relacionar la distribución de variantes normal y mutada de la posición 1899 con la concentración de ADN-VHB en cada uno de los grupos estudiados se observó una relación significativa entre la presencia de la variante mutada y una mayor concentración de ADN-VHB en los grupos HBeAg negativo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT fluctuante. En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada los casos con la variante normal presentaban una mediana de 2.8×10^6 copias ADN-VHB/mL (6.5×10^3 - 2.5×10^9) mientras que los casos con la variante mutada presentaban una mediana de 3.98×10^7 copias ADN-VHB/mL (2.5×10^4 - 3.2×10^9) ($p=0.02$). En el grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante los casos con la variante normal presentaban una mediana de 5×10^4 copias ADN-VHB/mL (1.5×10^4 - 3.6×10^5) mientras que los casos con la variante mutada presentaban una mediana de 1.3×10^6 copias ADN-VHB/mL (3.2×10^4 - 3.6×10^6) ($p=0.05$). Al estratificar por genotipos, en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada de genotipo A no se encontraron diferencias entre los grupos, aunque la mediana de la variante normal fue de 3.3×10^6 copias ADN-VHB/mL y la mediana de la variante mutada fue de 7.4×10^7 copias ADN-VHB/mL; se ha de tener en cuenta que sólo hay cinco casos con la variante mutada. En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada de genotipo D se observaron diferencias próximas a la significación entre la variante normal (mediana= 3.3×10^6 copias ADN-VHB/mL, 2.5×10^4 - 2.3×10^9) y la variante mutada (mediana= 3.8×10^7 copias ADN-VHB/mL, 3.98×10^4 - 3.2×10^9) ($p=0.08$). El bajo número de casos en los demás grupos impidió hacer esta comparación.

4.1.6.2.3.4. Relación entre las variantes en la posición 1899 y la lesión histológica hepática.

Se observó una fuerte relación entre la distribución de las variantes normal y mutada de la posición 1899 de la región precore del VHB y la lesión histológica; de los pacientes con la variante normal, 2 (6%) casos presentaron CH frente a 10 (43%) casos con la variante mutada que presentaron CH ($p=0.001$). Al estratificar por los genotipos mayoritarios A y D se siguió observando la misma relación. En el genotipo A, 2 (13%) de los 15 pacientes con la variante normal presentaban CH frente a 4 (67%) de los 6 casos con la variante mutada que presentaron CH ($p=0.03$). En el genotipo D, ninguno de los 16 pacientes con la variante normal presentó CH frente a 5 (31%) de los 16 casos con la variante mutada que presentaron CH ($p=0.015$). Al estratificar por grupo de pacientes, en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada se observó una relación más alejada de la significación entre la presencia de mutaciones en la posición 1899 de la región precore del VHB y la lesión histológica, aunque en este grupo sólo hay dos casos con CH; de los 15 casos con la variante normal tan sólo uno presentó CH frente al único caso con la variante mutada que presentó CH ($p=0.12$). En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada se observó relación entre la presencia de mutaciones en la posición 1899 de la región precore del VHB y la lesión histológica, de los 15 casos con la variante normal, 1 (7%) presentó CH frente a 9 (47%) de los 15 casos con la variante mutada que presentaron CH ($p=0.01$). Al estratificar por grupo de pacientes y genotipo las diferencias no se alejaron de la significación tanto para el genotipo A como para el genotipo D, manteniéndose la relación entre la presencia de la variante mutada y CH. Estos resultados sugieren que independientemente del grupo de pacientes, tanto en el genotipo A como en el genotipo D la presencia de CH se asocia con la variante mutada de la posición 1899.

4.1.7. RELACIÓN ENTRE LAS VARIANTES DE LAS DIFERENTES REGIONES DEL PBC DEL VHB.

4.1.7.1. Relación entre las variantes de la región TA1 y TA2.

En el estudio conjunto de estas dos regiones se observaron 41(32%) pacientes sin cambios en ninguna de las dos regiones, 36 (28%) pacientes con cambios en TA2 pero no en TA1, 16 (12%) con cambios en TA1 pero no en TA2 y 35 (27%) con cambios en ambas regiones.

Al relacionar la presencia de cambios en la región TA1 con la presencia de cambios en la TA2 se observó una relación significativa ($p=0.015$) de manera que el 50% de los pacientes con mutaciones en la región TA2 también presentaban cambios en TA1 y un 72% de pacientes sin mutaciones en TA2 tampoco las tenían en TA1. Al tener en cuenta que la posición 1752 se asociaba con el genotipo D (apartado 4.1.5.3. de resultados), se consideró que los cambios en esta posición no eran variantes mutadas de la región TA1. Al no considerarse la posición 1752 se observó que la relación entre estas dos regiones aumentaba, de manera que el 46% de los pacientes con mutaciones en la región TA2 también presentaban cambios en la región TA1 mientras que un 82% de pacientes sin mutaciones en TA2 tampoco las tenían en TA1 ($p<0.001$). Al estratificar por genotipo esta relación se hizo más intensa para el genotipo A, de manera que el 53% de los pacientes con mutaciones en la región TA2 también presentaban cambios en TA1 y un 95% de pacientes sin mutaciones en TA2 tampoco las tenían en TA1 ($p<0.001$). Además, se observó que tan solo un caso presentaba mutaciones en TA1 pero no en TA2. Todo ello parece indicar que las mutaciones en la región TA1 ocurren cuando la región TA2 presenta mutaciones, es decir que las mutaciones en TA1 ocurren con posterioridad a las mutaciones en TA2.

En cuanto al genotipo D, esta relación desaparecía en un primer análisis en el que los cambios en la posición 1752 se tomaban como mutaciones. Al tener en cuenta que la posición 1752 se asoció con el genotipo D (apartado 4.1.5.3. de resultados), se consideró que los cambios en esta posición no eran variantes mutadas de la región TA1. Al repetir el análisis sin tener en cuenta esta posición se observó una relación igualmente significativa que para el genotipo A. No obstante, al considerar esta variación como característica del genotipo D, se observó que 11 de los 12 pacientes con cambios en esta posición no presentaban cambios en TA2 frente a 33 de los 52 pacientes sin cambios en la posición 1752 que sí presentaban cambios en la TA2 ($p=0.001$).

Todo ello parece indicar que si no se incluye la posición 1752 en los pacientes de genotipo D, las regiones TA1 y TA2 estarían relacionadas de manera que los cambios en la región TA1 se producirían posteriormente a los cambios en la región TA2, independientemente del genotipo viral. En cuanto a aquellos casos de genotipo D con la variante genotípica de la posición 1752 se relacionarían con la ausencia de cambios en la TA2.

En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada debido al mayor número de casos se estudió la relación entre la presencia de mutaciones en las regiones TA1 y TA2 y el tiempo conocido de infección por el VHB. Se observó que el tiempo transcurrido de infección para aquellos pacientes con mutación en la región TA2 pero no en TA1 (mediana=2.4 años, 1-27 años) era significativamente inferior ($p=0.009$) al tiempo conocido de infección para aquellos pacientes con mutaciones en ambas regiones (mediana=8.6 años, 1.8-22 años). Al estratificar por genotipos, en el genotipo A se observó que la mediana del tiempo transcurrido de infección para aquellos pacientes con mutación en TA2 pero no en TA1 (mediana=6.23 años, 1-19 años) era inferior ($p=0.17$) al tiempo transcurrido de infección para aquellos pacientes con mutaciones en ambas regiones (mediana=16 años, 4.7-22 años). En el genotipo D se observó que la mediana del tiempo transcurrido de infección para aquellos pacientes con mutación en TA2 pero no en TA1 (mediana=1.85 años, 1-14 años) era significativamente inferior ($p=0.01$) al tiempo transcurrido de infección para aquellos pacientes con mutaciones en ambas regiones (mediana=8 años, 1.8-22 años). Al relacionar la presencia de mutaciones en estas dos regiones con la concentración de HBeAg, se observó que en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada había diferencias próximas a la significación ($p=0.1$) entre los pacientes sin cambios en ninguna de las dos regiones (mediana=667 UPE/mL) y los pacientes con mutaciones en la región TA2 pero no en la región TA1 (mediana=7 UPE/mL). Los pacientes con mutaciones en ambas regiones presentaron una concentración de HBeAg (mediana=543 UPE/mL) superior a la de los pacientes con mutaciones en la región TA2 pero no en TA1 ($p=0.16$), aunque se ha de tener en cuenta que sólo se encontraron cuatro pacientes con mutaciones en estas dos regiones.

No se observó ninguna relación entre la presencia de variantes en las regiones TA1 y TA2 con la concentración de ADN del VHB.

4.1.7.2. Relación entre las variantes de la región TA1 y las variantes de las posiciones 1762 y 1764.

Cuando se consideró todo cambio respecto a una secuencia patrón como variante, la relación entre la región TA1 y las posiciones 1762 y 1764 es la misma que la observada entre la región TA1 y la posición 1764, tal y como se ha señalado en el apartado correspondiente (apartado 4.1.5.2.1.3. de resultados). Puesto que los cambios aparecen en la posición 1764 antes que en la 1762, y esta última forma parte de la región TA2, es de esperar que entre la región TA1 y la posición 1764 exista una relación similar a la encontrada entre las regiones TA1 y TA2. De la misma manera que en el apartado anterior, en el genotipo D los cambios en la posición 1752 no se han tenido en cuenta. Se observaron 41 (32%) secuencias sin cambios ni en la región TA1 ni en la posición 1764, 47 (36%) con cambios en la posición 1764 pero no en TA1, 7 con cambios en TA1 pero no en 1764 y 33 (25%) con mutaciones en ambas regiones ($p=0.002$). Esta es la misma relación observada en el apartado anterior pero, como era de esperar, con un mayor porcentaje de casos con la variante mutada en la posición 1764. La misma relación se mantuvo al estratificar por los genotipos A y D ($p=0.05$ y $p=0.03$, respectivamente).

En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada debido al mayor número de casos también se estudió la relación entre la presencia de mutaciones en la región TA1 y la posición 1764 con el tiempo conocido de infección por el VHB. Se observó que el tiempo transcurrido de infección para aquellos pacientes con mutación en 1764 pero no en TA1 (mediana=2.7 años, 1-19 años) era significativamente inferior ($p=0.004$) al tiempo transcurrido de infección para aquellos pacientes con mutaciones en ambas regiones (mediana=8.6 años, 1.8-22 años). Al estratificar por genotipos, en el genotipo A se observó que la mediana del tiempo transcurrido de infección para aquellos pacientes con mutación en 1764 pero no en TA1 (mediana=6.25 años, 1-19 años) era inferior ($p=0.2$) al tiempo transcurrido de infección para aquellos pacientes con mutaciones en ambas regiones (mediana=16 años, 5-22 años). En el genotipo D se observó que la mediana del tiempo transcurrido de infección para aquellos pacientes con mutación en 1764 pero no en TA1 (mediana=2.04 años, 1-14 años) era significativamente inferior ($p=0.01$) al tiempo transcurrido de infección para aquellos pacientes con mutaciones en ambas regiones (mediana=8.47 años, 1.8-22 años). Aunque era de esperar que los tiempos de infección fueran menores que para la relación entre TA1 y TA2, las diferencias no fueron significativas.

Al relacionar la presencia de mutaciones en estas dos regiones con la concentración de HBeAg se observó que en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada había diferencias significativas ($p=0.04$) entre los pacientes sin cambios en ninguna de las dos regiones (mediana=792 UPE/mL) y los pacientes con mutaciones en la posición 1764 pero no en la región TA1 (mediana=5.46 UPE/mL). Los pacientes con mutaciones en ambas regiones presentaron una concentración de HBeAg (mediana=543 UPE/mL) superior a la de los pacientes con mutaciones en 1764 pero no en TA1 ($p=0.14$), aunque se ha de tener en cuenta que sólo se encontraron cuatro pacientes con mutaciones en estas dos regiones. No se observó ninguna relación entre la presencia de variantes en las regiones TA1 y la posición 1764 con la concentración de ADN del VHB.

4.1.7.3. Relación entre las variantes de las regiones TA1, TA2, las variantes de la posición 1764 con las posiciones 1810-1813.

Debido a que los cambios en las posiciones 1810-1813 se han relacionado mayoritariamente con el genotipo A (ver apartado 4.1.5.9.5. de resultados), sólo se tendrán en cuenta en este análisis los pacientes con genotipo A. Se observaron 11 secuencias con cambios en las posiciones 1810-1813 y todas ellas presentaban también cambios en la región TA1 y/o TA2 ($p=0.017$) y TA1 y/o la posición 1764 ($p=0.03$). Es decir, todas las secuencias que no presentaron cambios en TA1, TA2 o 1764 tampoco presentaron cambios en las posiciones 1810-1813. No se encontró relación entre la presencia de cambios en las posiciones 1810-1813 y un mayor grado de mutación en TA1 relacionada con TA2 o con la posición 1764. Estos resultados sugieren que las mutaciones en las posiciones 1810-1813 aparecerían o bien después del cambio en la posición 1764, o bien simultáneamente, hecho bastante improbable. La relación con el tiempo de infección, la concentración de HBeAg o la concentración de ADN-VHB no se pudo realizar debido al escaso número de pacientes con cambios en las posiciones 1810-1813.

4.1.7.4. Relación entre las variantes de las posiciones 1810-1813 y las variantes de las posiciones 1814-1817.

Ninguno de los casos de genotipo A con cambios en las posiciones 1810-1813 presentaban cambios en las posiciones 1814-1817 ($p=0.12$). El estudio de la concentración de HBeAg y ADN-VHB no se realizó debido al pequeño número de casos en algunos de los grupos.

4.1.7.5. Relación entre las variantes de las regiones TA1, TA2 y las variante de las posiciones 1762 y 1764, con las variantes de las posiciones 1814-1817.

Las mutaciones en las posiciones 1814-1817 no parecen asociarse a las mutaciones en las regiones TA1, TA2 y posiciones 1762 y 1764 del PBC. Tan solo se observó que en el genotipo A, de los 8 casos con mutaciones en las posiciones 1814-1817, 4 (50%) también presentaban mutaciones en la posición 1764, mientras que de los 47 casos sin mutaciones en las posiciones 1814-1817, 35 (75%) tampoco presentaban mutaciones en las posiciones 1814-1817 ($p=0.16$). Por otro lado, la presencia de cambios en las posiciones 1814-1817 en casos sin mutaciones en la posición 1764 podría hacer pensar que los cambios en esta región ocurren antes que los cambios en el PBC pero el bajo número de casos con datos de tiempo de infección conocido y presencia de estas mutaciones no permitió comprobar esta hipótesis.

En relación a la concentración de HBeAg cabe decir que el único caso HBeAg positivo con ALT elevada con mutaciones en la posición 1764 y las posiciones 1814-1817 (siempre como población mixta) presentaba una concentración de HBeAg que se correspondía con el valor mínimo de la concentración de HBeAg (0.12 UPE/mL). Cuando se agruparon las mutaciones de las posiciones 1810-1813 con las de las posiciones 1814-1817 y se asociaron con la posición 1764, se observó que la concentración de HBeAg era inferior en aquellos casos en los que se observaron mutaciones en las posiciones 1810-1817 con mutaciones en la posición 1764 frente a aquellos casos que sólo tenían mutación en la posición 1764 o que no tenían mutaciones en ninguna de las regiones señaladas (Figura 49).

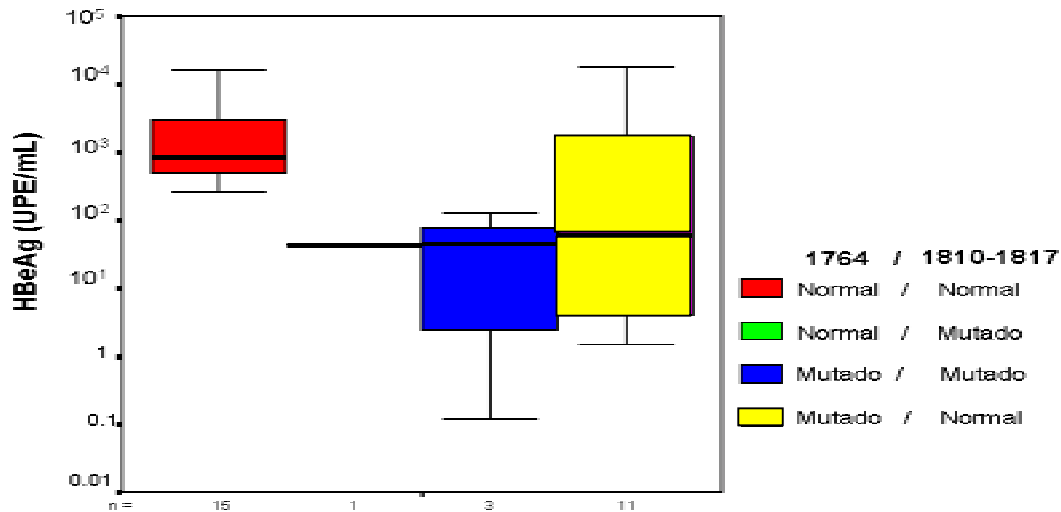


Figura 49. Relación entre la concentración de HBeAg y las variantes normal y mutada de las posiciones 1764 y 1810-1817 del PBC del HBeAg.

En relación a la concentración de ADN-VHB, se estudió la relación entre ésta y la presencia de mutaciones en las posiciones 1814-1817 conjuntamente con la posición 1764. Debido al escaso número de pacientes en algunos de los grupos sólo se pudieron comparar las concentraciones de ADN-VHB entre los pacientes sin cambios en las posiciones 1764 y 1814-1817 y los pacientes con cambios en 1764 pero no en 1814-1817. No se observaron diferencias en ninguno de los grupos (Figura 50).

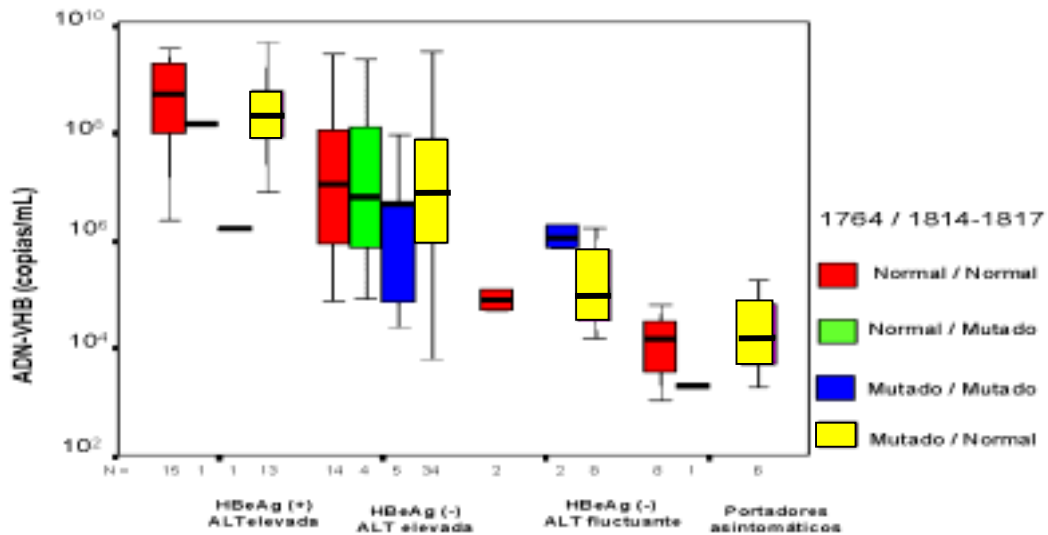


Figura 50. Relación entre la concentración de ADN-VHB con las variantes de las posiciones 1764 y 1814-1817 del PBC.

Al estratificar por genotipo sólo se pudieron comparar, dado el escaso número de pacientes, las concentraciones de ADN-VHB entre los pacientes sin cambios en las posiciones 1764 y 1814-1817 y los pacientes con cambios en 1764 pero no en las posiciones 1814-1817 en los grupos HBeAg positivo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT elevada. No se observaron diferencias en ninguno de los casos. Para el estudio de la concentración de ADN-VHB en el genotipo A se incluyeron los cambios en las posiciones 1810-1813 con los cambios en las posiciones 1814-1817 y se asociaron a los cambios en la posición 1764. En los HBeAg positivo de ALT elevada se observó una mayor concentración de ADN-VHB en los casos sin mutaciones (mediana= 1.3×10^9 copias ADN-VHB/mL, 3.4×10^7 - 2.8×10^9) que en aquellos con cambios en la posición 1764 pero no en 1810-1817 (mediana= 1.3×10^8 copias ADN-VHB/mL, 8.3×10^6 - 6.4×10^8) ($p=0.05$) (Figura 51).

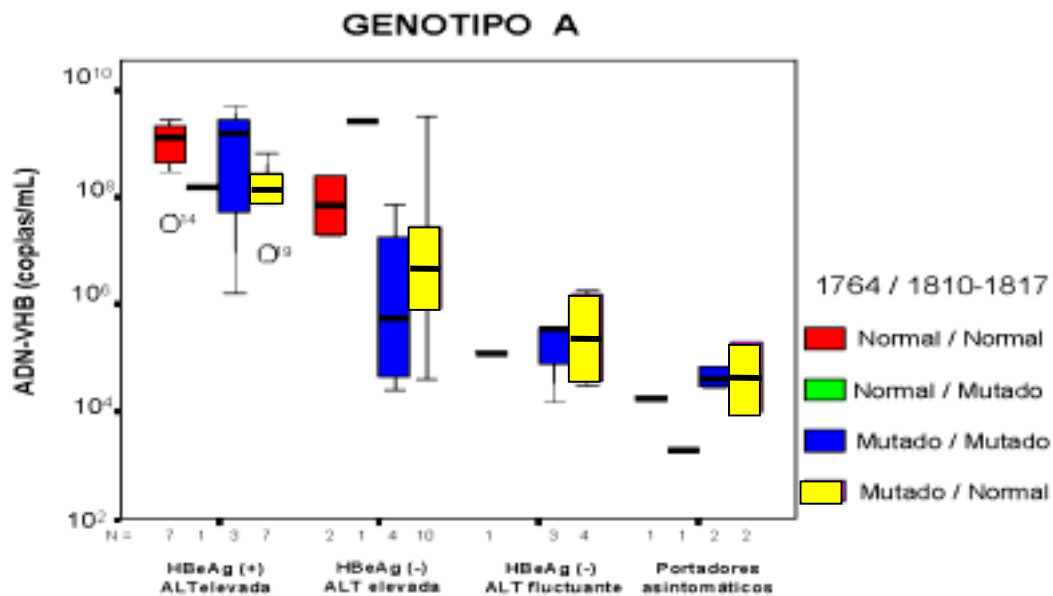


Figura 51. Relación entre la concentración de ADN-VHB con las variantes de la posiciones 1764 y 1810-1817 del PBC, en el genotipo A.

4.1.8. RELACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS VARIANTES DE LA REGIÓN DEL PRECORE DEL VHB.

4.1.8.1. Relación entre las variantes de las posiciones 1896 y 1899 en la región del precore del VHB.

Como se ha comentado en los apartados correspondientes, la variante normal para la posición 1896 presenta una G y la variante normal para la posición 1899 también presenta una G. Considerando los 129 casos se observó una fuerte asociación entre estas dos posiciones, 60 (70%) casos con la variante normal para la posición 1896 también presentaban la variante normal en la posición 1899 frente a 33 casos (76%) con variantes mutadas en ambas posiciones ($p < 0.001$). Esta misma asociación se mantenía tanto para el genotipo A, 39 (84%) casos con la variante normal en ambas posiciones frente a 5 (45%) casos con mutaciones en ambas posiciones ($p = 0.009$), como para el genotipo D, 15 (45%) casos con la variante normal en ambas posiciones frente a 27 (87%) casos con mutaciones para ambas posiciones ($p = 0.004$) (Tabla 18).

Tabla 18. Relación entre las variantes de las posiciones 1896 y 1899 en la región del precore del VHB y los genotipos virales.

		Posición 1899		
GENOTIPO VHB	Posición 1896	A	G	R
Genotipo A	A	3	5	2
	G	5	39	1
Genotipo D	A	20	18	6
	G	3	15	1
	R			1

A=Adenina; G=Guanina; R=A/G

No se observó relación entre la presencia de mutaciones en ambas posiciones y la concentración de HBeAg, mediana=541 UPE/mL (0.12-17600 UPE/mL) en los pacientes HBeAg positivo con ALT elevada con la variante normal en ambas posiciones frente a 495 UPE/mL (1.6-8268 UPE/mL) en los pacientes HBeAg positivo con ALT elevada con variantes distintas de la normal.

Cuando se comparó la concentración de ADN-VHB entre los casos con la variante normal y variantes distintas de la normal, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos. Al comparar la variante normal con la variante con ambas posiciones mutadas por adenina, en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada no se pudo realizar la comparación debido a la falta de casos con la variante mutada en las posiciones 1896 y 1899. En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada se observó una mayor concentración de ADN-VHB en el grupo con la variante mutada (mediana= 6.3×10^7 copias ADN-VHB/mL, 3.1×10^6 - 3.2×10^9) que en el grupo con la variante normal (mediana= 2.7×10^6 copias ADN-VHB/mL, 2.5×10^4 - 2.5×10^9) ($p = 0.006$). Al estratificar por genotipos dentro de este grupo, en el genotipo A se observó que los pacientes que presentaban la variante no mutada ($n = 8$) presentaban una menor concentración de ADN-VHB (mediana= 3.2×10^6 copias ADN-VHB/mL, 4.17×10^4 - 2.5×10^9) que aquellos casos que presentaban la variante mutada, aunque con esta variante sólo se encontraron dos pacientes que presentaban una concentración de ADN-VHB de 7.58×10^7 y 3.2×10^9 copias ADN-VHB/mL ($p = 0.18$). En el genotipo D se encontraron cuatro casos con la variante normal (mediana= 7.4×10^5 copias ADN-VHB/mL, 2.5×10^4 - 6.3×10^6) y 14 con la variante mutada (mediana= 4.3×10^7 copias ADN-VHB/mL, 3.1×10^6 - 3.1×10^9) ($p = 0.1$). En el grupo HBeAg negativo con ALT fluctuante sólo había un caso con estas mutaciones (2.5×10^6 copias ADN-VHB/mL) y cinco con la variante normal (mediana= 1.2×10^5 copias ADN-VHB/mL, 1.5×10^6 - 3.6×10^5). En el grupo de portadores asintomáticos se encontraron cuatro casos con mutaciones en adenina en ambas posiciones (mediana= 7.4×10^3 copias ADN-VHB/mL, 1.2×10^3 - 2.8×10^4) y 8 casos con la variante normal (mediana= 9.1×10^3 copias ADN-VHB/mL, 1.1×10^3 - 1.9×10^5).

4.1.8.2. Relación entre las variantes de las posiciones 1896 y 1814-1817 en la región del precore del VHB.

Globalmente, al relacionar las variantes de la posición 1896 con las de las posiciones 1814-1817 se observó que de los 19 casos con mutaciones en las posiciones 1814-1817, 14 (74%) presentaron la variante normal en la posición 1896; mientras que de los 110 pacientes sin cambios en las posiciones 1814-1817, 54 (49%) presentaron la variante mutada en la posición 1896 ($p=0.06$). Al seleccionar aquellos casos que presentaban variantes de la región del precore que impiden la expresión del HBeAg ($n=81$), se observó que de los 62 casos con la variante normal en las posiciones 1814-1817, 54 (87%) presentaban la variante mutada en la posición 1896 mientras que de los 19 casos con la variante mutada en la región 1814-1817, 14 (74%) presentaban la variante normal en la posición 1896 ($p<0.001$). Para comparar el efecto del genotipo viral con la aparición de mutaciones en el precore que impiden la expresión del HBeAg se tomaron en primer lugar aquellos casos con mutaciones en las posiciones 1814-1817 y se observó que en el genotipo A todos los casos ($n=8$) presentaron la variante normal en la posición 1896 mientras que en el genotipo D 6 (55%) de los 11 casos presentaron la variante normal en la posición 1896 ($p=0.04$); además, los 8 casos del genotipo A presentaban en la posición 1858 una citosina mientras que los de genotipo D presentaban una timina ($p<0.001$). En segundo lugar se tomaron aquellos casos con la variante normal en las posiciones 1814-1817 y se observó que en el genotipo A, 37 (78%) de 47 casos presentaban la variante normal en la posición 1896 mientras que en el genotipo D sólo 13 (30%) de 43 casos presentaban la variante normal en la posición 1896 ($p<0.001$); además, los diez casos del genotipo A con la variante mutada en la posición 1896 presentaban en la posición 1858 una timina (en los restantes 37 casos, 34 presentaba citosina y 3 timina) mientras que en el genotipo D presentaban timina ($p<0.001$). Si en este análisis se toman sólo los pacientes HBeAg negativo, para aquellos casos con mutaciones en las posiciones 1814-1817 los resultados eran prácticamente los mismos y para aquellos casos con la variante normal en las posiciones 1814-1817 en el genotipo A un 67% de los casos presentaban la variante normal en la posición 1896 y para el genotipo D tan solo un 11% ($p<0.001$). Se detectó la variante con una T en la posición 1858 en un 82% de los 81 casos que presentaron cambios en la región del precore del VHB que impiden la expresión del HBeAg. Además, el 100% de los casos con una A en la posición 1896 presentaron una T en la posición 1858.

Estos resultados parecen indicar que en el genotipo A la aparición de la variante mutada en la posición 1896 viene determinada por la presencia en la posición 1858 de una timina, mientras que la aparición de las variantes mutadas de las posiciones 1814-1817 ocurriría cuando en la posición 1858 no se encuentra una timina (el genotipo A en su secuencia consenso presenta citosina en la posición 1858). En el genotipo D, en la posición 1858 se encuentra una timina y, aun así, se da la aparición de variantes mutadas en las posiciones 1814-1817 en aproximadamente un 20% de los casos, de los cuales la mitad también presentan la variante mutada en la posición 1896. Con un comportamiento análogo al del genotipo A, en el genotipo D sería de esperar que el número de casos con mutaciones en las posiciones 1814-1817 fuera mucho menos frecuente, sin embargo la presencia de este 20% indicaría la posible intervención de algún otro factor que hasta ahora no se ha tenido en cuenta. Así pues, se observó una relación entre las posiciones 1814-1817 y la posición 1896 dependiente del genotipo viral.

Al relacionar la presencia de estas mutaciones con la concentración de HBeAg se encontraron dos casos con la variante mutada en las posiciones 1814-1817 y la variante normal en la posición 1896 (dos casos de genotipo A) que presentaron unas concentraciones de HBeAg de 0.12 y 43 UPE/mL; dos casos con la variante normal para las posiciones 1814-1817 y con la variante mutada para la posición 1896 (dos casos de genotipo D) que presentaron una concentración de HBeAg de 1.6 y 765 UPE/mL. Los 26 casos restantes, con la variante normal para ambas posiciones, presentaban una mediana de 666 UPE/mL (1.48-17600 UPE/mL). Se ha de señalar que las variantes mutadas tanto de las posiciones 1814-1817 como de la posición 1896 siempre se encontraron en poblaciones mixtas junto con la variante normal.

No se encontró relación entre la presencia de las variantes de las posiciones 1814-1817 relacionadas con la posición 1896 del precore y la concentración de ADN-VHB. Este estudio sólo se pudo realizar en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada dado el número de casos. Pareció observarse una menor concentración de ADN-VHB en aquellos casos con la variante mutada en las posiciones 1814-1817 y normal en la posición 1896, pero el bajo número de casos ($n=6$) no permitió establecerlo con seguridad. (Figura 52).

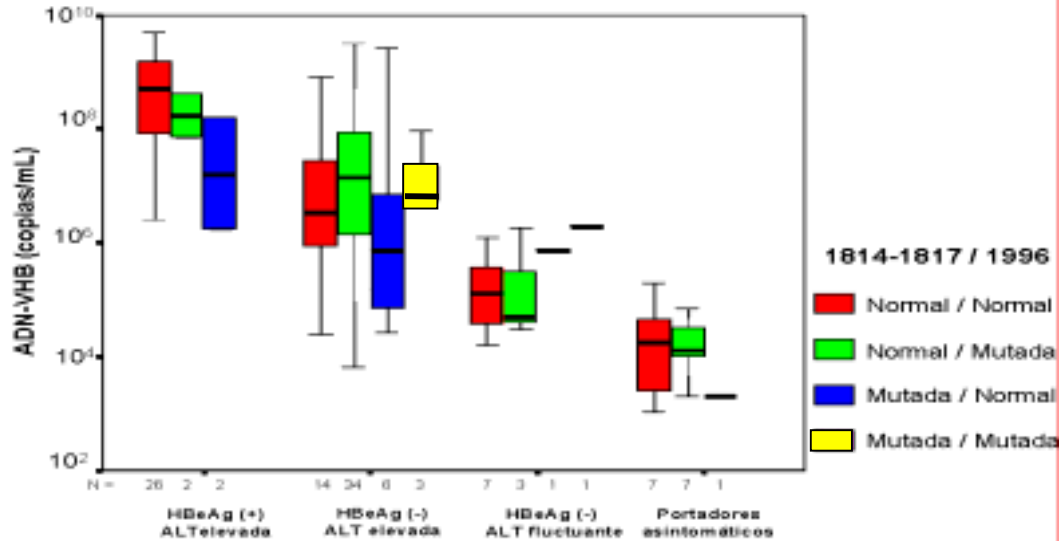


Figura 52. Relación entre las concentraciones de ADN-VHB con las variantes de las posiciones 1814-1817 del PBC y 1996 del precore del VHB.

Al estratificar por genotipos, además de observarse la tendencia señalada anteriormente, también parece observarse que en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada los casos con la variante normal para las posiciones 1814-1817 y 1896 presentaron menor concentración de ADN-VHB pero, de nuevo, el pequeño número de casos (n=3) no permitió asegurarlos (Figura 53).

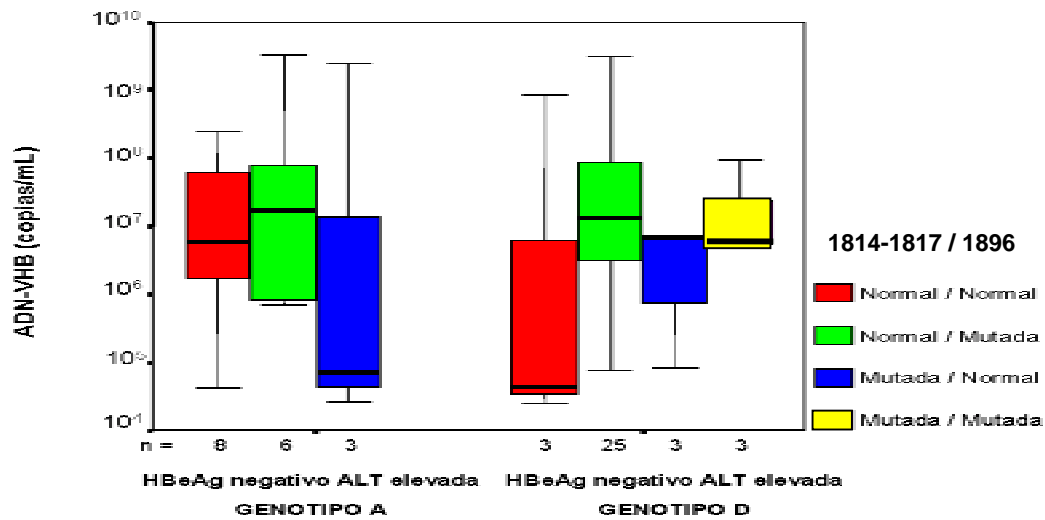


Figura 53. Relación entre la concentración de ADN-VHB con las variantes de las posiciones 1814-1817 del PBC y 1896 del precore del VHB en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada, estratificado por genotipos

No se observó relación entre las variantes de las posiciones 1814-1817 asociada con la posición 1896 y la lesión histológica hepática.

4.1.8.3. Relación entre las variantes de las posiciones 1814-1817 y las variantes de la posición 1899.

No se observó relación entre las variantes de las posiciones 1814-1817 y las variantes de la posición 1899. Es importante señalar que al seleccionar aquellos pacientes con mutaciones que impiden la expresión del HBeAg en el precore, en los casos de genotipo A, 7 de los 15 pacientes con la variante

1899G presentaban la variante mutada de las posiciones 1814-1817 mientras que 6 de los 7 pacientes con la variante mutada en la posición 1899 presentaban la variante normal en las posiciones 1814-1817 ($p=0.2$). La relación no llegó a ser significativa pero de estos 6 últimos casos, 5 presentaban la variante mutada en la posición 1896, observándose la relación descrita al estudiar las posiciones 1896 y 1899 (apartado 4.1.8.1. de resultados). Es decir, la posición 1899 no se relacionaría con las posiciones 1814-1817 sino con la posición 1896 la cual, a su vez se relacionaría con las posiciones 1814-1817.

4.1.8.4. Relación entre las variantes de las posiciones 1810-1813 y las variantes de las posiciones 1814-1817.

En el apartado 4.1.7.4. ya se estudió esta relación puesto que todas estas posiciones forman parte de la secuencia del PBC, y se observó que ninguno de los casos de genotipo A con cambios en las posiciones 1810-1813 presentaban cambios en las posiciones 1814-1817 ($p=0.12$), y que el estudio de la concentración de HBeAg y ADN-VHB no se realizó debido al pequeño número de casos en algunos de los grupos. Al tener en cuenta que variantes en las posiciones 1810-1813 podrían dificultar el reconocimiento del codón de inicio ATG (1814-1816) y, por tanto, disminuir la capacidad de traducción para el HBeAg, estas posiciones 1810-1813 también podrían considerarse integrantes funcionales de la región precore. Las variantes de estas posiciones se asociaron al genotipo A (apartado 4.1.2.9. de resultados) por lo que se estudiarán sólo los casos de este genotipo. Se observó que, al igual que en las posiciones 1814-1817, la presencia de la variante mutada para las posiciones 1810-1813 se da en aquellos casos con citosina en la posición 1858. Este comportamiento se encontró en 8 de los 11 casos que presentaban estas variantes. En los 3 casos restantes se observó una timina en la posición 1858 y también la variante mutada en la posición 1896, 2 de los cuales presentaban la variante mutada en la posición 1899. Puesto que las variantes mutadas en las posiciones 1810-1813 se dan en aquellos casos con la variante normal en las posiciones 1814-1817 el posible efecto conjunto sobre la concentración de HBeAg o de ADN-VHB no se puede estudiar.

4.1.9. RELACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS VARIANTES DEL PBC Y LAS VARIANTES DEL PRECORE DEL VHB.

En el grupo de pacientes HBeAg positivo con ALT elevada se detectaron mutaciones en el PBC y/o precore en el 54% de los casos: 37% sólo en el PBC, 7% únicamente en el precore y 10% en ambas regiones. En el grupo de pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativo (HBeAg negativo con ALT elevada y con ALT fluctuante) se detectaron mutaciones en el PBC y/o precore en el 96% de los casos: el 16% sólo en el PBC, 24% únicamente en el precore y 56% en ambas regiones. En este mismo grupo de hepatitis crónica HBeAg negativo, al estratificar por genotipo del VHB se observó que el 82% de pacientes infectados con VHB de genotipo A presentaban mutaciones en el PBC y/o precore: 38% sólo en el PBC, 8% únicamente en el precore y 46% en ambas regiones. En los pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativo infectados con VHB de genotipo D se observó que todos (100%) presentaban mutaciones en el PBC y/o precore: 5% sólo en el PBC, 27% únicamente en el precore y 68% en ambas regiones. En este análisis se consideró la posición 1764 del PBC para valorar la presencia de mutaciones en esta región.

4.1.9.1. Relación de las variantes de la región precore más frecuentes que impiden la expresión del HBeAg (posición 1896 y posiciones 1814-1817) con las variantes del PBC: regiones TA1, TA2 y posiciones 1810-1813, 1814-1817, y 1764 del VHB.

Como se ha comentado previamente, las posiciones 1814-1817 son el inicio de la región del precore y también forman parte del PBC. Las variantes mutadas de estas posiciones impiden la expresión del HBeAg bien por la alteración del codón de inicio ATG (posiciones 1814-1816), o bien por la aparición de un codón “stop” en el segundo triplete. Por tanto, las posiciones 1814-1817 serán consideradas en relación con la expresión del HBeAg.

Al analizar la distribución de las variantes normal y mutadas entre las posiciones 1896 y 1810-1813, no se observaron diferencias significativas. Se observó asociación entre la presencia de cambios en la región TA1 y la posición 1896 ($p=0.02$), en la que se encontraron 30 (50%) de los 59 casos con la variante mutada en la posición 1896 que también presentaban la variante mutada en la región TA1 frente a 21 (30%) de los 69 casos con la variante normal en la posición 1896 que presentaban la variante mutada en la región TA1. Esta relación se mantuvo al estratificar por genotipo ($p=0.01$ en el genotipo A y $p=0.06$ en el genotipo D). En el genotipo D no se observó relación entre la variante genotípica de la posición 1752 y las variantes de la posición 1896.

Se observó asociación entre la presencia de mutaciones en la región TA2 y la posición 1896 ($p=0.15$), 37 (62%) de los 59 casos con cambios en ambas regiones frente a 35 (50%) de los 70 casos con la variante normal para la posición 1896 y la variante mutada para la región TA2. Al estratificar por genotipo la relación desaparecía para el genotipo A pero no para el genotipo D ($p=0.02$).

Así mismo se observó asociación entre la presencia de mutaciones en la posición 1764 y la posición 1896 ($p=0.03$), encontrándose 43 (72%) de los 59 casos con cambios en ambas regiones frente a 32 (45%) de los 70 casos con la variante normal en la posición 1896 y la variante mutada en la posición 1764. Al estratificar por genotipo la relación se mantenía para el genotipo A ($p=0.15$) y para el genotipo D ($p=0.006$).

No se observó asociación entre las variantes de las posiciones 1814-1817 y las regiones TA1 y TA2 ni la posición 1764 del PBC. Al estratificar por genotipos tampoco se observó relación alguna. Cuando se seleccionaron aquellos casos que presentaban variantes que impiden la expresión del HBeAg, incluidas las posiciones 1810-1813, se observó una relación próxima a la significación entre las posiciones 1814-1817 y la región TA2 del PBC en la que 46 (66%) de los 70 casos con la variante normal en las posiciones 1814-1817 presentaron la variante mutada en la región TA2 frente a 11 (57%) de los 19 casos con la variante mutada en las posiciones 1814-1817 que presentaron la variante normal en la región TA2 ($p=0.06$). Al estratificar por genotipo esta relación se mantuvo para el genotipo A en el que, además, se observó relación entre las variantes de las posiciones 1814-1817 y la posición 1764 de manera que 21 (95%) de los 22 casos con la variante normal en las posiciones 1814-1817 presentaban la variante mutada de la posición 1764, mientras que 4 (50%) de los 8 casos con la variante mutada de las posiciones 1814-

1817 presentaban la variante normal de la posición 1764 ($p=0.01$). En el genotipo D la relación con TA2 disminuía aunque se observó que 26 (62%) de los 42 casos con la variante normal de las posiciones 1814-1817 presentaban la variante mutada en la región TA2 frente a 7 (63%) de los 11 casos con la variante mutada en las posiciones 1814-1817 que presentaban la variante normal en la región TA2 ($p=0.17$). En el genotipo D no se observó relación entre las variantes de las posiciones 1814-1817 y la posición 1764. Estos resultados parecen señalar a que en aquellos casos con variantes que impiden la expresión del HBeAg, los que presentan las variantes mutadas en las posiciones 1814-1817 mutarían con mayor dificultad en la región TA2. En el genotipo A, además, esta misma situación se daría con la posición 1764. Al analizar la relación de las distintas regiones del PBC se observó que las variantes mutadas en la posición 1764 serían las primeras en aparecer. Este mismo razonamiento nos llevaría a pensar que la aparición de mutaciones en las posiciones 1814-1817 podría ser anterior a la aparición de variantes mutadas en la posición 1764 y, además, por alguna razón, las dificultarían. Cuando se asociaron las mutaciones en TA1 y TA2 o TA1 y la posición 1764 y se relacionaron con los cambios en la posición 1896, se observaron asociaciones significativas. Esta asociación también se observó cuando se estratificó por genotipos. En el genotipo A no se encontró ningún caso con cambios en la posición 1896 que no tuviera cambios en la región TA1, TA2 o 1764, por lo que en este genotipo se podría pensar que las mutaciones en la posición 1896 son posteriores a la aparición de mutaciones en el PBC. En el genotipo D, si no se considera la posición 1752, de los 21 casos sin cambios en el PBC 10 tenían cambios en la posición 1896; mientras que al considerar la posición 1752, de los 15 casos sin cambios en el PBC, 5 presentan cambios en la posición 1896. Por tanto, estos resultados parecen indicar que, al contrario que en el genotipo A, parece que en el genotipo D los cambios en la posición 1896 podrían ocurrir antes que los cambios en el PBC.

4.1.10. RELACIÓN ENTRE LAS VARIANTES DE LAS REGIONES DEL PBC Y DEL PRECORE DEL VHB CON LA CONCENTRACIÓN DE ADN-VHB.

En el estudio de las relaciones entre las variantes genómicas del PBC y precore con la concentración de ADN-VHB, el pequeño tamaño de algunos de los grupos obtenidos no ha permitido realizar todas las comparaciones debido al elevado número de variables que se tienen en cuenta.

4.1.10.1. Relación entre las variantes de las regiones del PBC TA1, TA2 y 1764 con la concentración de ADN-VHB.

Debido al escaso número de pacientes en algunos de estos grupos este análisis se pudo efectuar en el grupo de los HBeAg positivo con ALT elevada y en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada. En el primero de ellos el análisis se realizó entre aquellos casos que no presentaban ningún cambio en estas tres regiones y los que presentaban cambios en la región TA2 y la posición 1764, no observándose diferencias ($p=0.3$). En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada se comparó el grupo sin cambios en ninguna de estas tres regiones con el grupo con cambios en la región TA2 y la posición 1764 y con el grupo con cambios en las tres regiones; no se observaron diferencias en la concentración de ADN-VHB en ninguno de los casos (Figura 54).

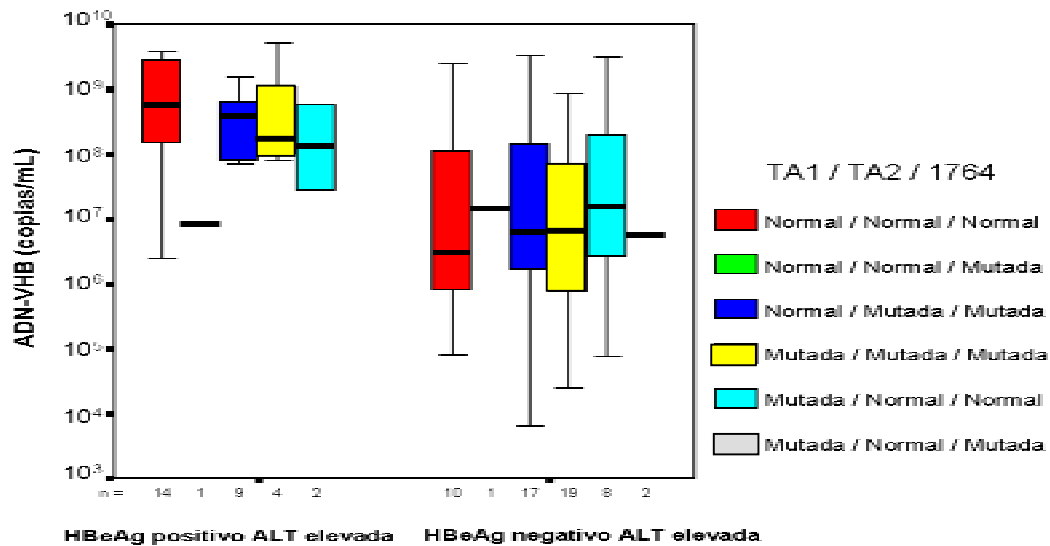


Figura 54. Relación de la concentración de ADN-VHB con las variantes de las regiones TA1, TA2 y posición 1764 del PBC en los grupos HBeAg positivo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT elevada

4.1.10.2. Relación entre las variantes de la posición 1896 del precore del VHB y las variantes de la región TA1 del PBC del VHB con la concentración de ADN-VHB.

En el grupo HBeAg positivo con ALT elevada no se observó diferencia en la concentración de ADN-VHB entre el grupo sin cambios en ninguna de las dos posiciones y el grupo con cambios en la región TA1. En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada se observó que los grupos con la variante mutada en la posición 1896 (grupo TA1 no mutado – mediana= 8.3×10^6 copias ADN-VHB/mL y grupo TA1 mutado – mediana= 2.39×10^7 copias ADN-VHB/mL) presentaban concentraciones de ADN-VHB significativamente superiores al grupo con la variante normal en la posición 1896 con la variante mutada en la región TA1 (mediana= 9.3×10^5 copias ADN-VHB/mL) ($p=0.06$ y $p=0.009$, respectivamente). Estos resultados parecen indicar que las variantes en la región TA1 con relación a la posición 1896 no influyen en la concentración de ADN-VHB (Figura 55) Al estratificar por genotipo estas comparaciones no se pudieron realizar por el escaso número de pacientes en cada grupo.

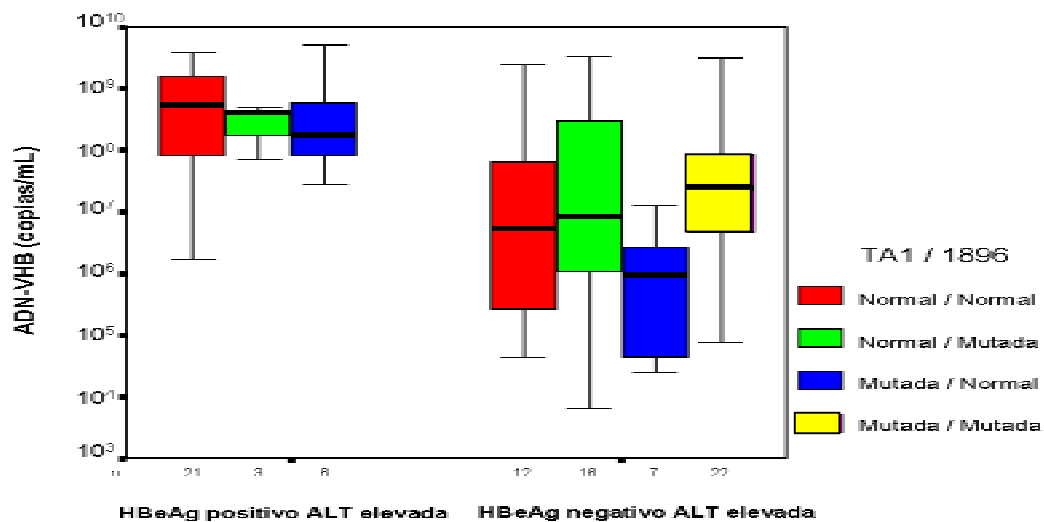


Figura 55. Relación de la concentración de ADN-VHB con las variantes de la región TA1 del PBC y la posición 1896 del precore en los grupos HBeAg positivo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT elevada

4.1.10.3. Relación de la concentración de ADN-VHB con las variantes de la posición 1896 del precore del VHB relacionada con las variantes de la región TA2 del PBC del VHB.

En el grupo HBeAg positivo con ALT elevada no se observaron diferencias en la concentración ADN-VHB entre el grupo sin cambios en ninguna de las dos posiciones y el grupo con cambios en TA2. En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada se observó que los grupos con la variante mutada en la posición 1896 (grupo TA2 no mutado – mediana= 1.2×10^7 copias ADN-VHB/mL- y grupo TA2 mutado – mediana= 3×10^7 copias ADN-VHB/mL) presentaban concentraciones de ADN-VHB significativamente superiores al grupo con cambios en TA2 pero no en 1896 (mediana = 9.3×10^5 copias ADN-VHB/mL) ($p=0.04$ y $p=0.01$, respectivamente). Se observaron diferencias cercanas a la significación entre el grupo HBeAg negativo con ALT elevada y sin cambios en TA2 ni en 1896 (mediana= 6.9×10^6 copias ADN-VHB/mL) y el grupo HBeAg negativo con ALT elevada con sólo cambios en TA2 ($p=0.11$) (Figura 56) Al estratificar por genotipo estas comparaciones no se pudieron realizar por el escaso número de pacientes en cada grupo.

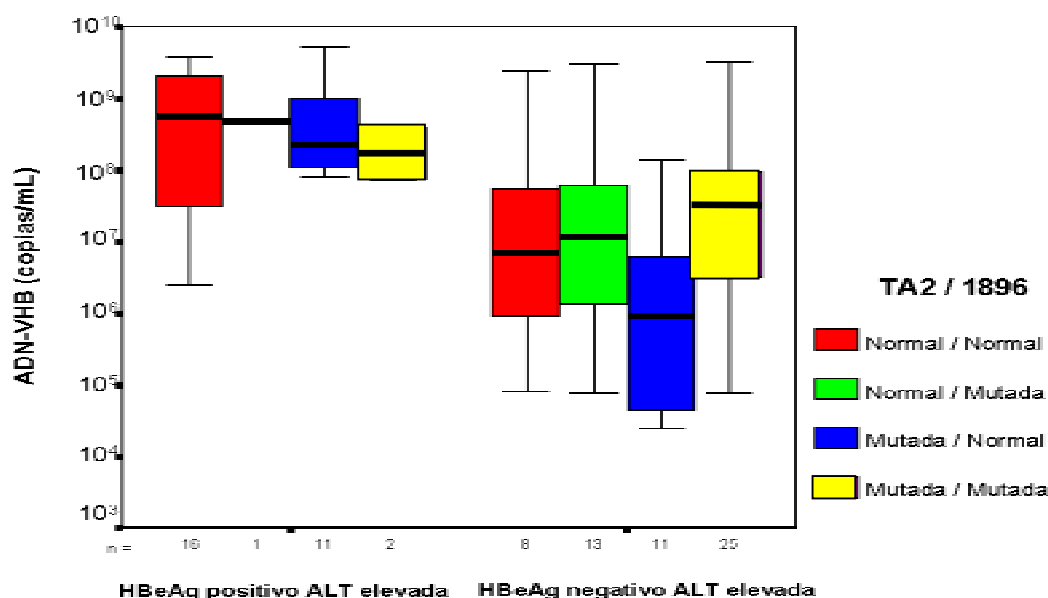


Figura 56. Relación de la concentración de ADN-VHB con las variantes de la región TA2 del PBC y la posición 1896 del precore del VHB en los grupos HBeAg positivo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT elevada

4.1.10.4. Relación entre las variantes de la posición 1896 del precore y la posición 1764 del PBC del VHB con la concentración de ADN-VHB.

En el grupo HBeAg positivo con ALT elevada no se observaron diferencias entre el grupo sin cambios en ninguna de las dos posiciones y el grupo con cambios en 1764. En el grupo HBeAg negativo con ALT elevada se observó que los grupos con la variante mutada en la posición 1896 (grupo 1764 no mutado – mediana= 1.5×10^7 copias ADN-VHB/mL- y grupo 1764 mutado – mediana= 1.3×10^7 copias ADN-VHB/mL) presentaban concentraciones de ADN-VHB significativamente superiores al grupo con la variante mutada en la posición 1764 pero no en 1896 (mediana = 1.6×10^6 copias ADN-VHB/mL) ($p=0.08$ y $p=0.02$, respectivamente). Se observaron diferencias cercanas a la significación entre el grupo HBeAg negativo con ALT elevada y la variante normal en 1764 y en 1896 (mediana= 6.9×10^6 copias ADN-

VHB/mL) y el grupo HBeAg negativo con ALT elevada con sólo la variante mutada en la posición 1764 (p=0.19) (Figura 57) Al estratificar por genotipo estas comparaciones no se pudieron realizar por el escaso número de casos en cada grupo.

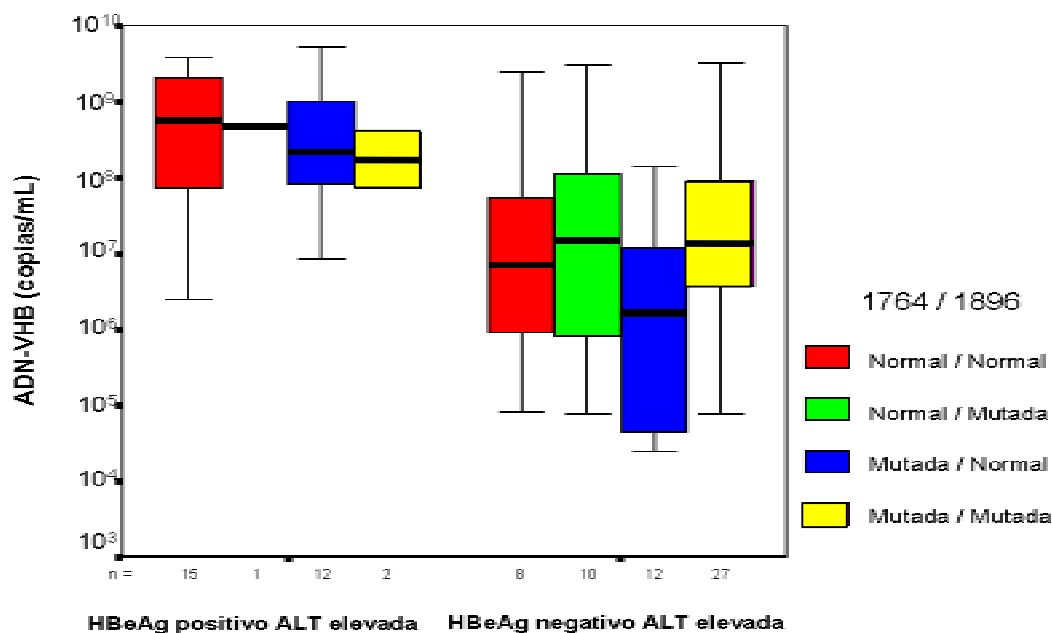


Figura 57. Relación de la concentración de ADN-VHB con las variantes de las posiciones 1764 del PBC y 1896 del precore del VHB en los grupos HBeAg positivo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT elevada.

Por tanto, parece que en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada la concentración de ADN-VHB es menor en los pacientes que presentan variantes mutadas en el PBC sin variantes mutadas en la posición 1896.

4.1.10.5. Relación entre las variantes de las posiciones 1896 y 1899 del precore y las variantes de las regiones 1810-1813, 1814-1817 del PBC del VHB con la concentración de ADN-VHB.

En el grupo de los HBeAg negativos con ALT elevada se observó una menor concentración de ADN-VHB en aquellos casos con tan sólo la mutación en la posición 1896 (mediana=1.6x10⁶ copias ADN-VHB/mL) que en aquellos con cambios en las posiciones 1896 y 1899 conjuntamente (mediana=4.7x10⁷ copias ADN-VHB/mL) (p=0.043) (Figura 58).

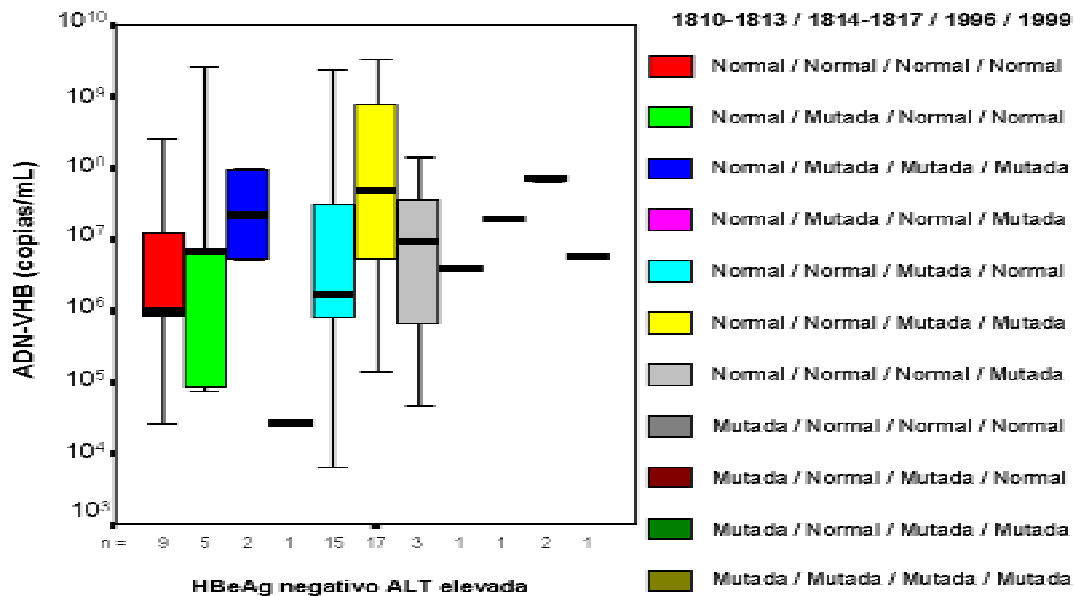


Figura 58. Relación de la concentración de ADN-VHB con las variantes de las posiciones 1810-1813, 1814-1817 del PBC y 1896 y 1899 del precore del VHB en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada.

4.1.11. RELACIÓN ENTRE LA REGIÓN TA2 DEL PBC, LA POSICIÓN 1899 DEL PRECORE DEL VHB Y LA LESIÓN HISTOLÓGICA HEPÁTICA.

Se escogieron estas dos variantes de la zona del genoma estudiado del VHB dada su mayor relación con la lesión histológica. Se observó una relación significativa entre la presencia de variantes mutadas en la región TA2 y la posición 1899 con la CH ($p=0.007$) de manera que todos los casos con CH presentaban la variante mutada de la región TA2 y/o la posición 1899. Los 16 casos con la variante normal en la región TA2 y posición 1899 presentaban HC; de los 2 casos con la variante normal en la región TA2 y la variante mutada en la posición 1899, uno presentaba HC y otro CH; de los 17 casos con la variante mutada en la región TA2 y la variante normal en la posición 1899, 15 presentaban HC y 2 CH; y de los 21 casos con variantes mutadas en las dos zonas, 12 presentaban HC y 9 CH. Entre aquellos pacientes con la variante normal en ambas zonas y los pacientes con sólo mutaciones en TA2 la relación con la lesión histológica no alcanzó la significación estadística ($p=0.16$). Sí se observaron diferencias significativas entre los pacientes con mutaciones para ambas zonas y los pacientes con sólo mutaciones en TA2 ($p=0.036$) y los pacientes con la variante normal en ambas zonas ($p=0.003$).

Al relacionar la lesión histológica con el tiempo de infección conocido se observó que los pacientes con CH presentaban mayor tiempo de infección conocido (mediana=6.8, 1.15-22 años) que los pacientes con HC (1-27 años) ($p=0.11$). Con un tiempo de infección conocido menor de 7.5 años se observó que 4 (33%) de los 12 pacientes de genotipo A presentaban CH frente a 2 (11%) de 18 de genotipo D ($p=0.18$). Se escogió este valor para poder incluir la mitad de los casos con biopsia. No se encontraron diferencias en el tiempo conocido de infección en los casos con CH entre los pacientes de los genotipos A y D a pesar de que el valor de la mediana para el genotipo A era de 6.8 años y para el genotipo D de 9.2 años.

4.2. VALORACIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL VHB Y VHC EN LA COINFECCIÓN POR EL VHB, VHC Y/O VHD. RELACIÓN CON LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LAS REGIONES DEL PROMOTOR DEL PRECORE Y DEL PRECORE DEL VHB.

Se incluyeron en este estudio muestras de suero de 65 pacientes con hepatitis crónica HBsAg positivo con coinfección por el VHB, el VHC y/o el VHD. Veinte cinco (38%) presentaban una coinfección por el VHB y el VHC, 18 (28%) una coinfección por los VHB y VHD, y 22 (34%) una coinfección por los tres virus. Además se incluyeron 110 pacientes como grupo control, 55 estaban afectados de una hepatitis crónica por el VHB y los otros 55 por una hepatitis crónica por el VHC.

La determinación cualitativa de ADN-VHB se realizó en todos los pacientes HBsAg positivo. La determinación cualitativa de ARN-VHC se realizó en todos los casos que presentaban anticuerpos anti-VHC. En los casos ADN-VHB positivo se determinó la concentración de ADN-VHB y se estudiaron las mutaciones en las regiones del PBC y del precore del VHB, así como los genotipos virales. En los casos ARN-VHC positivo se determinó la concentración de ARN-VHC y los genotipos del VHC. En los pacientes anti-HD positivo se determinó cualitativamente el ARN-VHD, y en los casos ARN-VHD positivo se identificaron los genotipos virales del VHD.

Las características demográficas y serológicas de los pacientes estudiados se muestran en la Tabla 19. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de hombres y mujeres entre los 5 grupos de pacientes estudiados. La edad fue significativamente mayor en los pacientes con coinfección por el VHB y el VHC (mediana=51, 23-56 años) que en los pacientes con coinfección por el VHB y VHD (mediana=38, 18-50 años) ($p=0.015$), pacientes con triple coinfección (mediana=40, 26-53 años) ($p=0.023$) y con infección crónica aislada por el VHC (mediana=34, 18-54 años) ($p=0.021$); no se observaron diferencias significativas en cuanto a la edad entre los otros grupos estudiados.

Al evaluar el tiempo transcurrido desde que se conocía la infección se observó que era significativamente mayor en el grupo con triple coinfección (mediana=13, 1-23 años) que en el grupo con infección por el VHB (mediana=9.8, 1-37 años) ($p=0.008$), coinfección por el VHB y el VHD (mediana=7, 1-17 años) ($p=0.04$) y grupo con infección por el VHC (mediana=5.3, 1-23 años) ($p<0.001$). También se observó que el tiempo transcurrido desde que se conocía la infección fue significativamente menor en el grupo de pacientes con infección crónica por VHC que en los otros grupos ($p<0.05$). No se observaron diferencias significativas entre los restantes grupos.

Serológicamente, 27 (15 %) de los 175 pacientes con hepatitis crónica eran positivo para el HBeAg: 7 (28%) de los casos con coinfección VHB y VHC, 1 (6%) de las coinfecciones por el VHB y VHD, 3 (14%) de las coinfecciones por VHB, VHC y VHD, y 16 (30%) de las hepatitis crónica VHB. Los anticuerpos anti-VIH se detectaron en 17 (9.7 %) de los casos: 2 (8%) de las coinfecciones por el VHB y VHC, 2 (12 %) de las coinfecciones por el VHB y VHD, 12 (55 %) de los casos con infección triple y 1 (2%) de los casos con hepatitis crónica por el VHC. Ninguno de los pacientes anti-VIH positivo presentaba evidencia de enfermedad. Cada paciente con infección múltiple se apareó por sexo, edad y duración de la infección con un paciente del grupo control.

El valor de la ALT era significativamente más elevado en pacientes con triple coinfección que en los pacientes con coinfección por el VHB y el VHD ($p=0.027$) y que en la infección crónica aislada por el VHC ($p=0.006$); así mismo el valor de la ALT era superior en la infección aislada por el VHB que en la infección crónica aislada por el VHC ($p<0.001$) y que en la coinfección por el VHB y el VHD ($p=0.04$).

Tabla 19. Características epidemiológicas, bioquímicas y virológicas de los pacientes incluidos en el estudio.

	Hepatitis crónica VHB ^a	Hepatitis crónica VHB/VHC ^b	Hepatitis crónica VHB/VHD ^c	Hepatitis crónica VHB/VHC/VHD ^d	Hepatitis crónica VHC ^e
Nº	55	25	18	22	55
Edad (años)	45 (20-60)	51 (23-56)	38 (18-50)	40 (26-53)	34 (18-54)

Hombre/mujer	30/25	15/10	11/7	13/9	29/26
Duración de la infección	9,8 (1-37)	8,2 (2-36)	7 (1-17)	13 (1-23)	5,3 (1-23)
ALT (UI/L)	85 (32-397)	79 (19-220)	57 (25-250)	89 (21-178)	79 (11-241)
HBeAg (+)	16 (30 %)	7 (28 %)	1 (6 %)	3 (14 %)	0
Anti-VIH (+)	0	2 (8 %)	2 (12 %)	12 (55 %)	1 (2 %)
Factores de riesgo					
Transfusión	4 (7 %)	8 (32 %)	1 (6 %)	1 (5%)	17 (31 %)
ADVP	0	5 (20 %)	3 (17 %)	14 (64%)	4 (7 %)
Antecedentes familiares	15 (27 %)	4 (16 %)	4 (22 %)	3 (14%)	5 (9 %)
Otros	19 (35 %)	3 (12 %)	3 (17 %)	1 (5%)	9 (16 %)
Desconocido	17 (31 %)	5 (20 %)	7 (39 %)	3 (14%)	0

Edad: b vs c, d, e; $p < 0.05$

Duración de la infección: e vs a, $p = 0.001$; e vs b, $p = 0.004$; e vs c, $p = 0.041$; e vs d; $p < 0.001$; d vs a, $p = 0.008$; d vs c, $p = 0.04$

4.2.1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DEL ADN-VHB, ARN-VHC Y ARN-VHD EN LA COINFECCIÓN Y EN HEPATITIS CRÓNICA AISLADA POR EL VHB O POR EL VHC.

4.2.1.1. Determinación cualitativa de ADN-VHB.

La determinación cualitativa de ADN-VHB se realizó en todos los casos HBsAg positivo mediante la técnica de doble PCR. El ADN-VHB fue positivo en 22 (88 %) de los 25 pacientes con coinfección por el VHB y VHC, en 13 (72%) de los 18 casos con coinfección por el VHB y VHD, y en 14 (64%) de los 22 pacientes con coinfección triple por el VHB, VHC y VHD. En el grupo control con hepatitis crónica por el VHB el ADN-VHB fue positivo en 53 (96 %) de los 55 casos (Figura 59). 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: infección crónica por el VHB, coinfección por el VHB y VHC, y coinfección por el VHB, VHC y VHD ($p < 0.001$). Al comparar los diferentes grupos entre sí se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con infección crónica por el VHB y los grupos con coinfección por el VHB y VHD ($p = 0.008$), y coinfección triple ($p < 0.001$), pero no así entre cada uno de los grupos con coinfección, aunque las diferencias entre el grupo con coinfección por el VHB y VHC y el grupo con coinfección por el VHB, VHC y VHD fueron próximas a la significación ($p = 0.08$).

4.2.1.2. Determinación cualitativa del ARN-VHC.

La determinación del ARN-VHC se realizó en todos los casos anti-VHC positivo mediante la técnica de RT-PCR. El ARN-VHC fue positivo en 20 (80%) de los 25 pacientes con coinfección por el VHB y VHC, y en 15 (68 %) de los 22 pacientes con coinfección por el VHB, VHC y VHD. En el grupo control de hepatitis crónica por el VHC el ARN-VHC fue positivo en 47 (85%) de los 55 casos (Figura 59). Mediante la prueba de tendencia lineal de Mantel-Haenszel se observó que la proporción de pacientes con ARN-VHC positivo decrecía de forma lineal siguiendo el orden: infección crónica por el VHC, coinfección por el VHB y VHC, y coinfección por el VHB, VHC y VHD ($p = 0.08$). Al comparar los diferentes grupos entre sí se observaron diferencias próximas a la significación estadística únicamente entre el grupo con infección crónica por el VHC y el grupo con coinfección por el VHB, VHC y VHD ($p = 0.1$).

4.2.1.3. Determinación cualitativa del ARN-VHD.

La determinación cualitativa de ARN-VHD se realizó en todos los casos anti-HD positivo mediante la técnica de RT-PCR. El ARN-VHD fue positivo en 37 (93%) de los 40 pacientes que presentaban anticuerpos anti-HD. En 16 (89%) de los 18 pacientes con coinfección por los VHB y VHD, y en 21 (95 %) de los 22 pacientes con coinfección triple (Figura 59). Al comparar estos dos grupos no se observaron diferencias significativas.

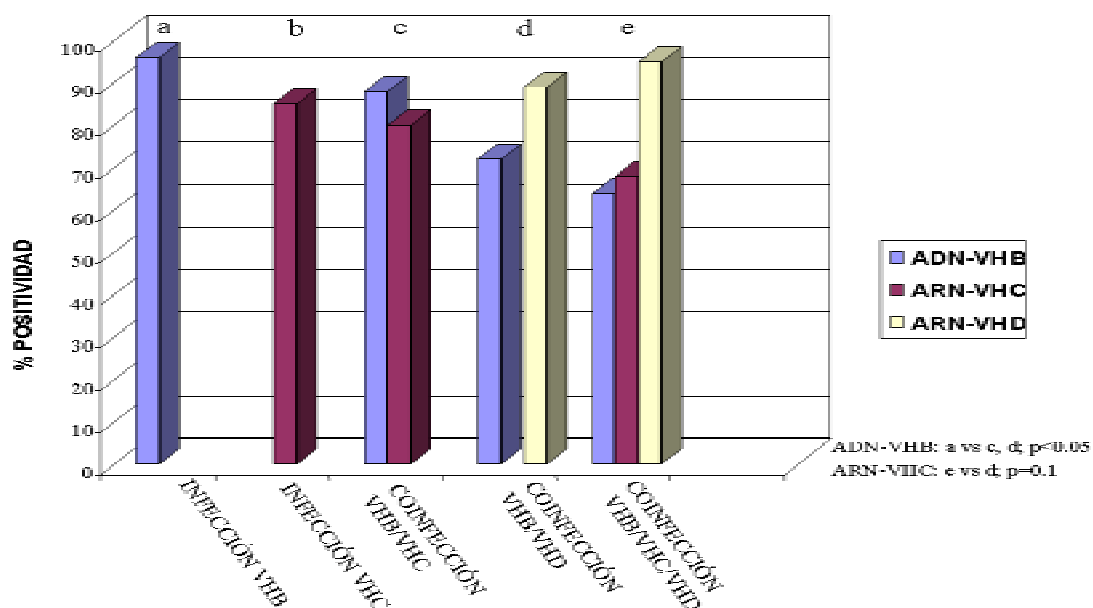


Figura 59. Detección cualitativa de ADN-VHB, ARN-VHC y ARN-VHD en cada uno de los grupos estudiados.

4.2.2. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL ADN-VHB Y ARN-VHC.

4.2.2.1. Determinación cuantitativa de 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 con coinfección por el VHB y VHC era de 8.2×10^4 copias ADN-VHB/mL (9.5×10^3 - 1.7×10^9), en el grupo con coinfección por el VHB y VHD era de 2.5×10^4 copias ADN-VHB/mL (3.1×10^3 - 5×10^6) y en el grupo con coinfección por el VHB, VHC y VHD era de 1.2×10^5 copias ADN-VHB/mL (3×10^3 - 1.3×10^9). En el grupo control con infección crónica por el VHB la mediana de la concentración de ADN-VHB fue de 1.2×10^7 copias ADN-VHB/mL (2.5×10^4 - 3.9×10^9). Al comparar las concentraciones de ADN-VHB obtenidos en los 4 grupos estudiados se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con infección crónica por el VHB y cada uno de los grupos con coinfección, pero no así entre los grupos de pacientes con coinfección (Figura 60). Al relacionar la concentración de ADN-VHB con la detección de HBeAg dentro de cada grupo, se observó que la mediana de la concentración era mayor en los pacientes HBeAg positivo que en los HBeAg negativo tanto para el grupo control de infección por el VHB ($p=0.002$) como para el grupo con coinfección por el VHB y VHC ($p<0.001$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al comparar la concentración de ADN-VHB entre los pacientes HBeAg positivo del grupo con infección crónica aislada por el VHB y los HBeAg positivo del grupo con coinfección por el VHB y VHC. El escaso número de pacientes HBeAg positivo de los 2 grupos restantes no permitió realizar esta comparación (Figura 61). Al comparar la concentración de ADN-VHB entre los pacientes anti-VIH positivo y negativo no se encontraron diferencias significativas.

4.2.2.2. Determinación cuantitativa de ARN-VHC.

La determinación cuantitativa de ARN-VHC se realizó en todos los pacientes ARN-VHC positivo. Se observó que la mediana de la concentración de ARN-VHC en el grupo con coinfección por el VHB y VHC era de 7×10^5 copias ARN-VHC/mL (1×10^3 - 2.1×10^6), y en el grupo con coinfección por el VHB, VHC y VHD era de 1.9×10^5 copias ARN-VHC/mL (1.3×10^3 - 2.6×10^6). En el grupo control con infección crónica por el VHC la mediana de la concentración de ARN-VHC era de 1.7×10^6 copias ARN-VHC/mL (2.8×10^3 - 1.4×10^7) (Figura 60). Al comparar las concentraciones de ARN-VHC obtenidos en los 3 grupos estudiados se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con infección crónica por VHC y cada uno de los grupos con coinfección, pero no así entre los grupos de pacientes con coinfección. No se encontró relación entre la detección de HBeAg y las concentraciones de ARN-VHC.

Al comparar la concentración de ARN-VHC entre los pacientes anti-VIH positivo y negativo no se encontraron diferencias significativas.

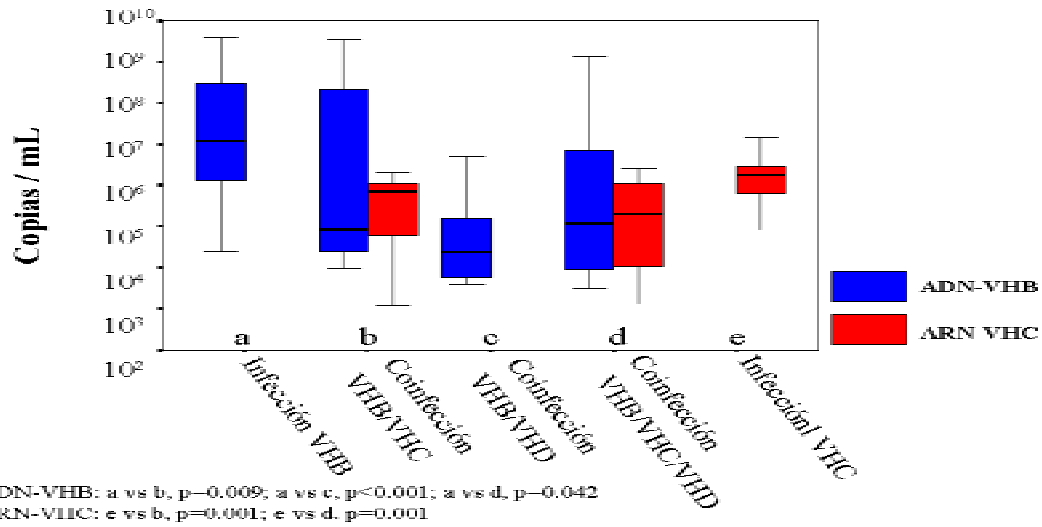


Figura 60. Determinación de las concentraciones de ADN-VHB y ARN-VHC en cada uno de los grupos estudiados.

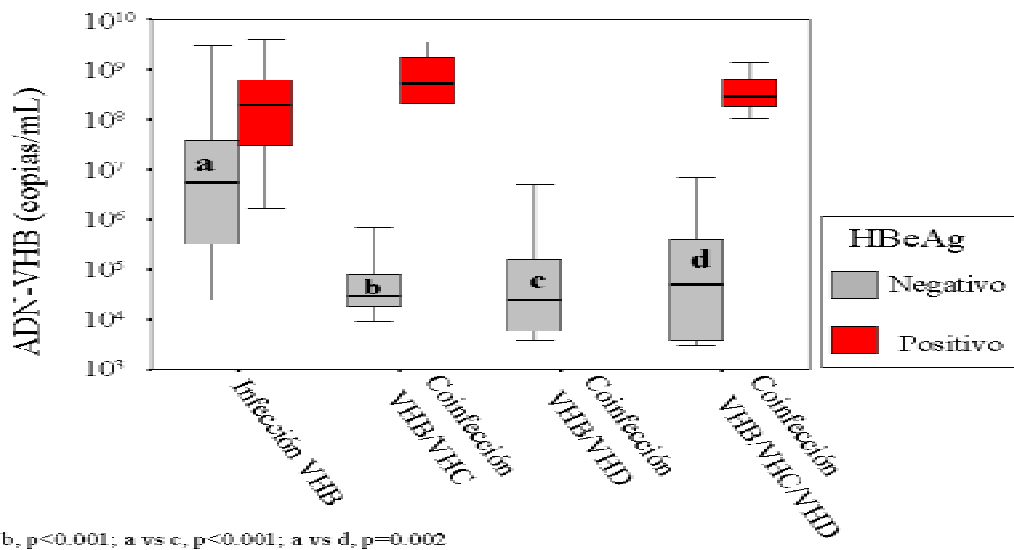


Figura 61. Relación entre las concentraciones de ADN-VHB y la detección de HBeAg en los diferentes grupos estudiados.

4.2.3. VALORACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA REPLICACIÓN DEL VHB Y EL VHC EN LAS COINFECCIONES DUAL Y TRIPLE.

Para evaluar la interacción entre el VHB y el VHC en la coinfección por estos dos virus en cuanto al efecto inhibitorio mutuo en su capacidad para replicarse, se calculó para cada paciente la *mediana relativa* de copias de cada virus (cociente de la concentración de ADN-VHB o ARN-VHC de cada paciente y del paciente del grupo control apareado con él). De esta manera se estableció para cada paciente las veces que se multiplica el VHB o el VHC con respecto a su correspondiente paciente apareado. Se utilizó la *mediana relativa* para poder hacer comparables los valores de viremia de ambos

virus ya que los pacientes con infección por VHB muestran, generalmente, mayores concentraciones que los pacientes con infección por VHC. El valor de la *mediana relativa* de la concentración de ADN-VHB era de 9.8×10^{-3} , mientras que en el VHC era de 4.3×10^{-1} ; lo que significaría que el VHB presentaría un valor medio de copias unas mil veces inferior al grupo control, mientras que en el caso del VHC el valor medio de copias sería diez veces inferior. Estos resultados apuntarían a una inhibición de la replicación del VHC sobre el VHB. La comparación de estas dos distribuciones era significativa ($p=0.04$). Esta diferencia se hacía más notable si sólo se consideraban los pacientes HBeAg negativos ($p=0.03$). Así mismo, para determinar la posible inhibición recíproca entre el VHB y VHC, los pacientes con dual y triple coinfección fueron agrupados en seis categorías de acuerdo con la concentración de ADN-VHB y ARN-VHC ($<10^3$, $10^3-<10^4$, $10^4-<10^5$, $10^5-<10^6$, $10^6-<10^7$ y $>10^7$ copias/mL). Tanto en la coinfección dual como en la triple se detectó una relación inversa entre la concentración de ADN-VHB y ARN-VHC ($p=0.002$ y $p=0.05$) en la que se observó que a medida que aumentaba el valor de la concentración de ARN-VHC disminuía la proporción de casos con valores elevados de concentración de ADN-VHB. Esta relación también se observó en el sentido inverso, es decir a medida que aumentaba el valor de la concentración de ADN-VHB disminuía la proporción de casos con valores elevados de concentración de ARN-VHC. Estos resultados sugieren la existencia de una inhibición recíproca entre la replicación del VHB y del VHC. Esta relación inversa de concentraciones de ADN-VHB y ARN-VHC era más evidente en el caso de la coinfección triple, en la que mediante la prueba de tendencia lineal de Mantel-Haenszel se observó una relación lineal entre ambas variables ($p=0.02$). En las coinfecciones por el VHB y el VHC la tendencia lineal de la prueba estadística utilizada anteriormente no fue significativa, sin embargo se pudo observar que cuando la concentración de ARN-VHC era superior a 10^5 copias ARN-VHC/mL, la concentración de ADN-VHB no supera en ningún caso las 10^5 copias ADN-VHB/mL.

4.2.4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA INFECCIÓN POR VHD EN LA REPLICACIÓN DE LOS VHB Y VHC EN LA COINFECCIÓN TRIPLE.

Para evaluar el efecto que la infección del VHD tiene en la replicación del VHB y VHC en la triple infección se calculó para cada paciente el porcentaje de copias de genoma de VHB y VHC con respecto al total de copias de estos dos virus (VHB más VHC) en esta infección. Este porcentaje se calculó también en las coinfecciones por VHB y VHC, comparándose posteriormente los resultados. Puesto que la infección dual por VHC y VHD no existe, se seleccionó este método por considerarlo el más apropiado para valorar la interacción entre el VHD y el VHC. Se observó que la proporción de genomas para el VHB era del 83% en la infección triple y del 17% en la dual, mientras que para el VHC era de 17% y 83% respectivamente. Estos resultados sugieren que en la infección triple el VHD inhibe en un mayor grado la infección por el VHC (Figura 62).

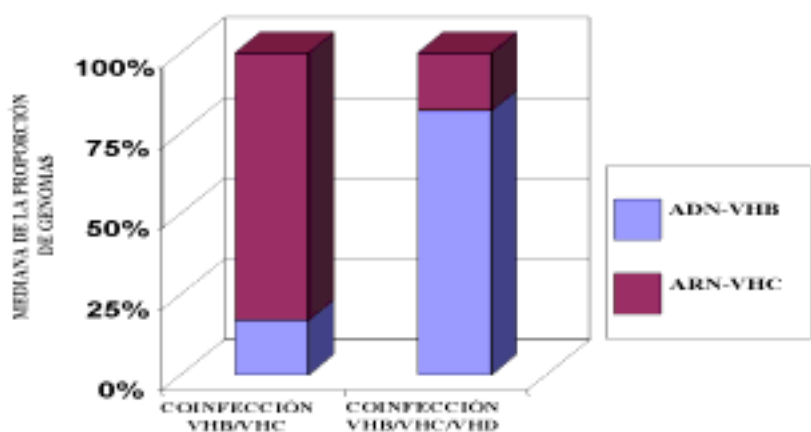


Figura 62. Efecto de la infección por el VHD en la replicación del VHB y VHC en la coinfección triple.

4.2.5. DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN LAS REGIONES DEL PBC Y PRECORE DEL VHB EN LA INFECCIÓN AISLADA POR EL VHB Y EN LAS COINFECCIONES. RELACIÓN CON LA DETECCIÓN DEL HBeAg Y LOS NIVELES DE ADN-VHB Y ARN-VHC.

En todos los casos ADN-VHB positivo por la técnica de doble PCR se procedió a la secuenciación del fragmento amplificado para el estudio de las mutaciones en las regiones del PBC y precore del VHB, así como para la determinación del genotipo del VHB.

4.2.5.1. Pacientes con infección por el VHB.

Entre los pacientes con infección aislada por el VHB, ADN-VHB positivo, las mutaciones en la región del precore que impiden la expresión del HBeAg se detectaron únicamente en los pacientes HBeAg negativos, en 28 (76%) de los 37 casos. Las mutaciones en la región del PBC se identificaron en 9 (56%) de los pacientes HBeAg positivos y en 23 (62%) de los HBeAg negativo (Tabla 20). Al estudiar la presencia de mutaciones en relación con la concentración de ADN-VHB, se observó que globalmente no había una relación significativa entre la presencia de mutaciones en el PBC y la concentración de ADN-VHB. Sin embargo, al relacionar la detección de mutaciones con la detección del HBeAg y la concentración de ADN-VHB, se observó que en los pacientes HBeAg negativo los casos con mutaciones en la región del precore presentaban mayor concentración de ADN-VHB (mediana= 6.3×10^6 , 5×10^4 - 3.1×10^9 copias ADN-VHB/mL) que los casos con la variante normal (mediana= 1.6×10^5 , 2.5×10^4 - 2.4×10^8 copias ADN-VHB/mL) ($p=0.02$). Así mismo, se observó que los pacientes que presentaban mutaciones en ambas regiones (PBC y precore) tenían las mayores concentraciones de ADN-VHB (mediana= 1.2×10^7 copias ADN-VHB/mL), aunque no había diferencias significativas con los pacientes que sólo presentaban mutaciones en el precore (Figura 63).

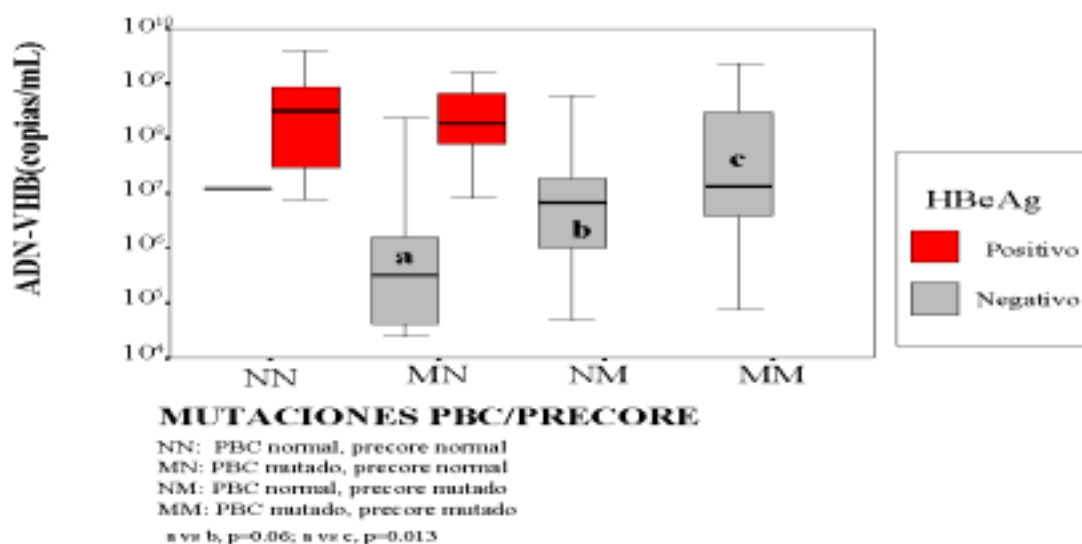


Figura 63. Mutaciones en las regiones del PBC y precore en pacientes con infección aislada por el VHB. Relación entre la concentración de ADN-VHB y la detección de HBeAg.

4.2.5.2. Pacientes con coinfección dual o triple.

Al determinar las mutaciones en la región del precore en los pacientes con coinfección dual y triple observamos que, en la coinfección por el VHB y VHC y en la triple coinfección, la proporción de estas mutaciones fue menor que la detectada en el grupo control con infección aislada por el VHB ($p=0.01$ y $p=0.02$, respectivamente). Este menor porcentaje de mutaciones se acompañaba de un predominio de la variante normal sobre la mutada. Sin embargo, al comparar la prevalencia de mutaciones en el precore

entre los pacientes con coinfección por el VHB y VHD y los pacientes con infección aislada por el VHB, no se observaron diferencias significativas (Tabla 20) (Figura 64).

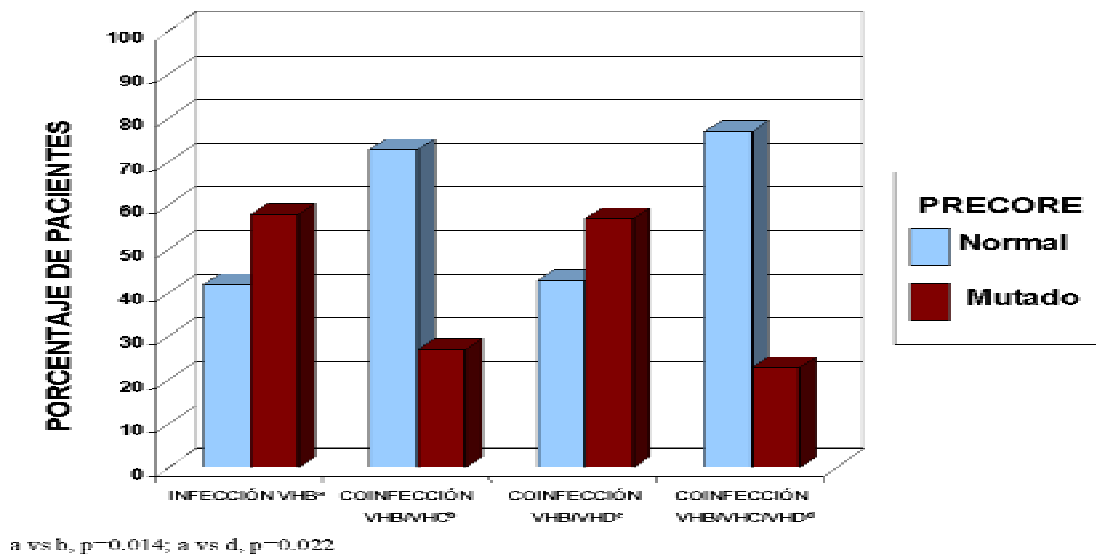


Figura 64. Distribución de las mutaciones en el precore en los distintos grupos estudiados.

En relación con la detección de mutaciones en la región del PBC, globalmente, la distribución de mutaciones era similar entre los pacientes con coinfección y el grupo con infección aislada por el VHB (Figura 65).

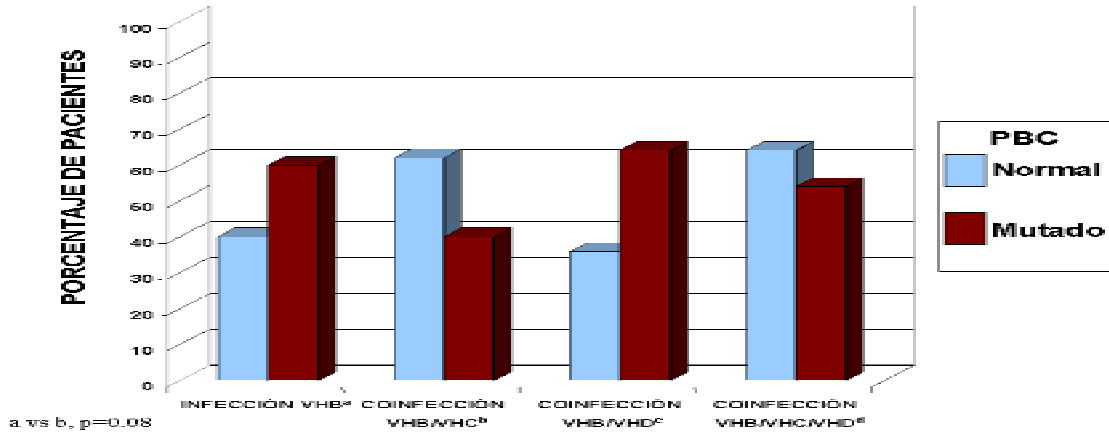


Figura 65. Distribución de las mutaciones en el PBC entre los distintos grupos estudiados.

Sin embargo, al analizar la detección de mutaciones en relación con la detección de HBeAg, se observó que en los pacientes HBeAg negativo coinfectados por el VHB de genotipo A, la prevalencia de mutaciones en la región del PBC fue menor que la observada en pacientes con infección aislada por el VHB (p=0.05), siendo la diferencia significativa en la coinfección por el VHB y VHC (p=0.01) pero no así en la coinfección por el VHB y VHD, ni en la triple coinfección. Hay que hacer notar que en la interpretación de estos resultados se ha de tener en cuenta el escaso número de pacientes, sobre todo en la triple coinfección (n=4) (Figura 66).

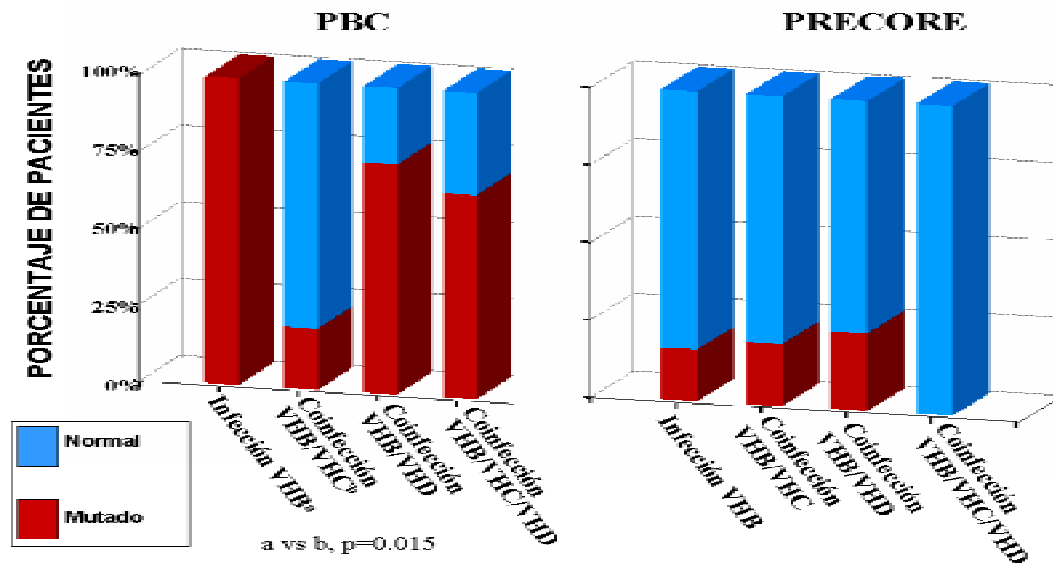


Figura 66. Distribución de las mutaciones del PBC y del precore en los pacientes HBeAg negativo con genotipo A del VHB.

Finalmente, aunque la media de las concentraciones de ADN-VHB fue superior en los pacientes HBeAg negativo con mutaciones en las regiones del PBC y del precore que en los pacientes que no las presentaban, y a diferencia de lo observado en los pacientes con infección aislada por el VHB, las diferencias en las concentraciones de ADN-VHB entre los grupos estudiados no fueron significativas. La distribución de las mutaciones en la región del PBC y del precore en los pacientes con coinfección se presenta en la Tabla 20. Al relacionar la presencia de mutaciones en el PBC y precore con la concentración de ARN-VHC no se encontró asociación significativa.

Tabla 20. Distribución de los genotipos del VHB y mutaciones en las regiones del PBC y precore en los grupos de pacientes estudiados estratificados por el carácter HBeAg.

		Infección VHB ^a	Coinfección VHB/VHC ^b	Coinfección VHB/VHD ^c	Coinfección VHB/VHC/VHD ^d
n		55	25	18	22
HBeAg (+)		16 (30%)	7 (28 %)	1 (6%)	3 (14%)
ADN-VHB (+)		16 (100 %)	7 (100 %)	1 (100 %)	3 (100 %)
VHB genotipo A		9 (56 %)	3 (43 %)	nd	1 (33 %)
VHB genotipo D		6 (37 %)	4 (57 %)	nd	2 (67 %)
VHB genotipo F		1 (6 %)	0	nd	0
Región precore	Normal	16 (100 %)	7 (100 %)	nd	3 (100 %)
	Mutado	0	0	nd	0
	Mixto	0	0	nd	0
Región PBC	Normal	7 (44 %)	5 (71 %)	nd	2 (67 %)
	Mutado	6 (38 %)	2 (29 %)	nd	1 (33 %)
	Mixto	3 (19 %)	0	nd	0
HBeAg (-)		39 (71%)	18 (72 %)	17 (94 %)	19 (86 %)
ADN-VHB (+)		37 (95 %)	15 (83 %)	13 (76 %)	11 (57 %)
VHB genotipo A		6 (16 %)	5 (36 %)	4 (31 %)	4 (36 %)
VHB genotipo D		29 (78 %)	10 (67 %)	9 (69 %)	7 (64 %)
VHB genotipo F		2 (5 %)	0	0	0
Región precore	Normal	9 (24 %)	9 (60 %)	5 (69 %)	7 (64 %)
	Mutado	25 (68 %)	5 (33 %)	6 (46 %)	4 (36 %)
	Mixto	3 (8 %)	1 (7 %)	2 (15 %)	0
Región PBC	Normal	14 (38 %)	8 (57 %)	5 (38 %)	4 (36 %)
	Mutado	21 (57 %)	6 (40 %)	5 (38 %)	5 (46 %)
	Mixto	2 (5 %)	1 (7 %)	3 (23 %)	2 (18 %)

Para el cálculo estadístico los casos que presentaban una mezcla de las variantes normal y mutada (mixtos) se consideraron mutados.

4.2.6. GENOTIPOS DEL VHB, VHC Y VHD. RELACIÓN CON LAS MUTACIONES EN LAS REGIONES DEL PBC Y PRECORE Y CON LAS CONCENTRACIONES DE ADN-VHB Y ARN-VHC.

4.2.6.1. Relación entre el genotipo del VHB con las mutaciones en las regiones del PBC y precore y con las concentraciones de ADN-VHB y ARN-VHC.

Los genotipos del VHB se determinaron en todos los casos ADN-VHB positivo mediante la técnica de PCR, secuenciación del producto amplificado y comparación de la secuencia obtenida con secuencias patrón de los distintos genotipos obtenidas del Genbank. En el grupo con infección aislada por VHB, de los pacientes HBeAg positivo, 9 casos (56%) eran del genotipo A, mientras que de los pacientes HBeAg negativo 29 (78%) eran del genotipo D ($p=0.002$). El estudio de las variantes normal y mutada de las regiones del PBC y del precore del VHB en el grupo de pacientes con infección aislada por el VHB mostró que los cambios en el PBC eran más frecuentes en pacientes infectados con el genotipo A, ya que 12 (80%) pacientes de genotipo A presentaban la variante mutada del PBC frente a 20 (57%) en el genotipo D, aunque las diferencias no fueron significativas ($p=0.12$). En el grupo de los HBeAg negativo, los 6 casos de genotipo A presentaron la variante mutada del PBC mientras que en el genotipo D presentaron esta variante 17 (58%) ($p=0.05$). En el grupo HBeAg positivo no se observó relación entre la presencia de mutaciones en la región del PBC y el genotipo del VHB, aunque tal vez el número de casos fuera insuficiente dado que 6 (67%) de los casos de genotipo A presentaban la variante mutada del PBC frente a 3 casos (50%) del genotipo D. Los cambios en la región del precore fueron más frecuentes en pacientes infectados con el genotipo D, ya que 2 (13%) pacientes de genotipo A presentaban la variante mutada del precore frente a 28 (80%) del genotipo D ($p=0.01$). En la Tabla 20 se muestra la relación entre el carácter HBeAg con el genotipo del VHB y la presencia de mutaciones en las regiones del PBC y del precore en los distintos grupos de pacientes estudiados.

Al relacionar el genotipo del VHB con las concentraciones de ADN-VHB y ARN-VHC no se observaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones efectuadas.

En ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de genotipos del VHB entre los distintos grupos de pacientes estudiados (Figura 67)

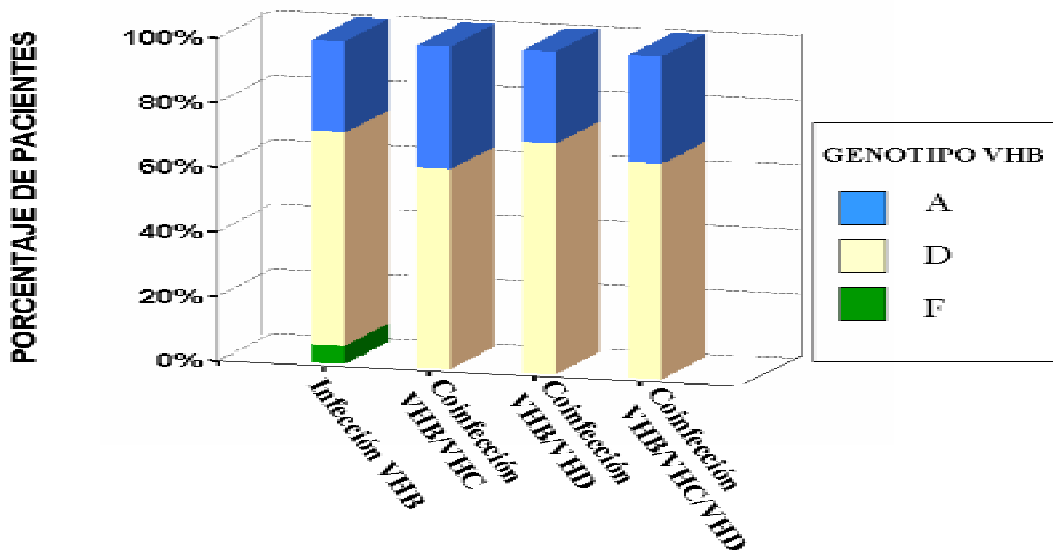


Figura 67. Distribución de los genotipos del VHB en los grupos estudiados.

4.2.6.2. Relación entre el genotipo del VHC con las mutaciones en las regiones del PBC y precore y con las concentraciones de ADN-VHB y ARN-VHC.

En el grupo con infección aislada por el VHC y en la coinfección por VHB y VHC, el genotipo de VHC más frecuente fue el 1b, detectándose en 27 (57%) casos en el grupo con infección aislada por VHC y en

15 (75%) casos en el grupo con coinfección por el VHB y VHC. No se encontraron diferencias en la proporción de los genotipos virales del VHC entre estos dos grupos. Sin embargo, se observó que en la triple infección el genotipo de VHC más frecuentemente detectado fue el genotipo 3, encontrándose en 7 (46%) de los casos (Figura 68). Para estudiar la distribución de los genotipos del VHC entre los distintos grupos, los pacientes se agruparon como genotipo 1 y genotipo distinto de 1. De esta manera se observaron diferencias significativas entre el grupo con infección aislada por el VHC y los grupos con triple infección ($p < 0.001$) y con coinfección por el VHB y el VHC ($p = 0.001$). No se observaron diferencias significativas entre el grupo con infección aislada por el VHC y el grupo con coinfección por el VHB y el VHC.

En el estudio de la relación entre las variantes de la región del PBC y el precore del VHB con los genotipos virales del VHC no se observó relación entre el genotipo del VHC y las variantes normal y mutada de las regiones del PBC y del precore. Al realizar esta comparación teniendo en cuenta el tipo de coinfección se observó que en la coinfección por el VHB y VHC, de los 17 pacientes sólo había tres con genotipo del VHC distinto del 1, mientras que de los 8 casos con infección triple se encontraron 2 de genotipo 1. No se observaron diferencias significativas en ningún caso, aunque este hecho podría ser debido al bajo número de pacientes. No se encontró relación entre el genotipo del VHC y las concentraciones de ADN-VHB o ARN-VHC, pero este último resultado podría estar relacionado con el bajo número de casos en los que se pudo realizar esta comparación (Tabla 21).

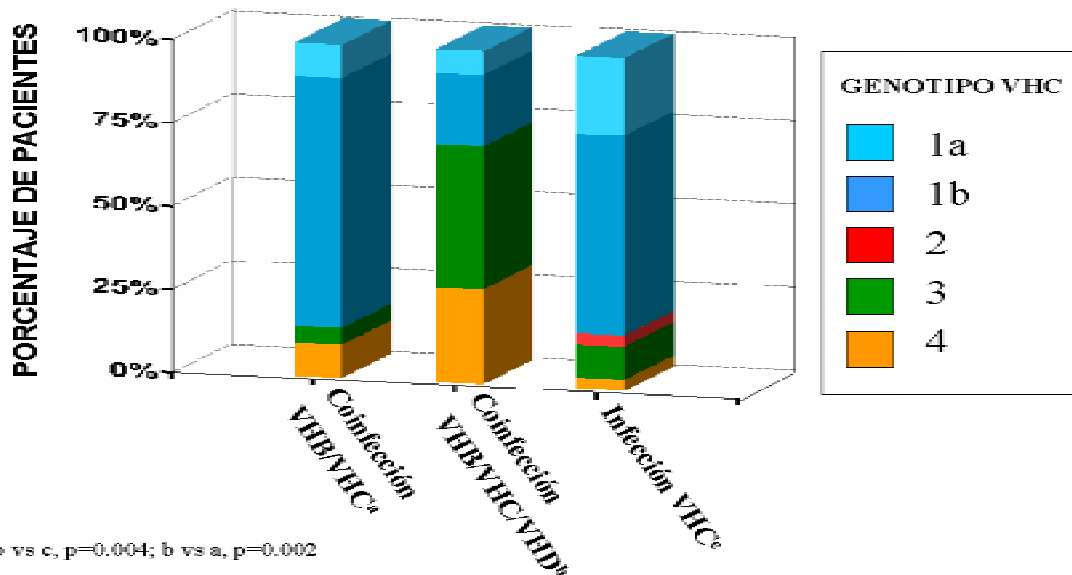


Figura 68. Distribución de los genotipos del VHC en los grupos estudiados.

4.2.6.3. Genotipos del VHD.

El estudio del genotipo del VHD en los 37 pacientes ARN-VHD positivo mostró que todos pertenecían al genotipo 1, resultado que era de esperar ya que es el genotipo prevalente en nuestra área geográfica (Tabla 21)

4.2.7. PACIENTES ANTI-VIH POSITIVO.

Entre los pacientes anti-VIH positivos y los negativos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en las concentraciones de ADN-VHB, ni en las de ARN-VHC, ni en la detección del ARN-VHD.

Tabla 21. Resultados de la determinación de ADN-VHB, ARN-VHC, ARN-VHD, genotipos del VHC y genotipos del VHD en los grupos de pacientes estudiados.

	Infección VHB^a	Coinfección VHB/VHC^b	Coinfección VHB/VHD^c	Coinfección VHB/VHC/VHD^d	Infección VHC^e
n	55	25	18	22	55
ADN-VHB (+)	53 (96%)	22 (88%)	13 (72%)	14 (64%)	nd
ADN-VHB copias/mL (mediana)	1.2x10 ⁷	8.2x10 ⁴	2.5x10 ⁴	1.2x10 ⁵	nd
ARN-VHC (+)	nd	20 (80%)	nd	15 (68%)	47 (85%)
ARN-VHC copias/mL (mediana)	nd	7x10 ⁵	nd	1.9x10 ⁵	1.7x10 ⁶
GENOTIPO VHC					
1a	nd	2 (10%)	nd	1 (7%)	9 (19%)
1b	nd	15 (75%)	nd	3 (20%)	27 (57%)
2	nd	0	nd	0	2 (4%)
3	nd	1 (5%)	nd	7 (46%)	5 (11%)
4	nd	2 (10%)	nd	4 (27%)	4 (9%)
ARN-VHD (+)	nd	nd	16 (89%)	21 (95%)	nd
GENOTIPO VHD					
1	nd	nd	16 (100%)	21 (100%)	nd

ADN-VHB (+): a vs c, d; p<0.05

ADN-VHB (copias /mL): a vs b, c, d; p<0.05

ARN-VHC (+): e vs d; p<0.05

ARN-VHC (copias ARN-VHC/mL): e vs b,d; p<0.05

VHC genotipo 1b: d vs e, b; p<0.05

VHC genotipo 3: d vs e, b; p<0.05

