

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Hospital Universitario "12 de Octubre"
Departamento de Anatomía Patológica

**HEPATITIS CRONICA: VALOR DE LA HISTOLOGIA Y DE LOS
MARCADORES VIRALES HISTICOS EN EL PRONOSTICO DE LA INFECCION
POR VIRUS B**

**TESIS DOCTORAL
M^a Paz Ortega Serrano**

DIRECTOR: Prof. Dr. Francisco José Martínez Tello

1.994

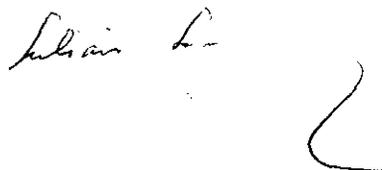
**D. JULIAN SANZ ESPONERA, CATEDRATICO DE ANATOMIA PATOLOGICA
Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID.**

INFORMA:

Que el trabajo "Hepatitis crónica: valor de la histología y de los marcadores virales
hísticos en el pronóstico de la infección por virus B" ha sido realizado por D^a María Paz
Ortega Serrano bajo la dirección del Prof. Dr. Francisco José Martínez Tello.

Este trabajo reúne las condiciones adecuadas para ser admitida su lectura con el fin
de obtener el grado de Doctor.

Lo que firmo en Madrid a 7 de Marzo de 1994.



Fdo.: Prof. Julián Sanz Esponera

**D. FRANCISCO JOSE MARTINEZ TELLO, PROFESOR TITULAR DE ANATOMIA
PATOLOGICA Y JEFE DE DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA DEL
HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE.**

CERTIFICA:

Que Dña. María Paz Ortega Serrano ha realizado en este Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario "12 de Octubre" el trabajo: "Hepatitis crónica: valor de la histología y de los marcadores virales hísticos en el pronóstico de la infección por virus B", bajo mi dirección, y que, a mi juicio, reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmo el presente en Madrid a 7 de Marzo de mil novecientos noventa y cuatro.


Fdo.: Prof. F.J. Martínez Tello

AGRADECIMIENTOS

- Al Prof. Dr. F.J. Martínez Tello, Jefe del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre, por haber dirigido esta tesis y por toda su colaboración y asesoramiento para que ésta pudiera llegar a su fin; así como por sus orientaciones durante los años de mi aprendizaje en Anatomía Patológica.

- Un agradecimiento muy especial al Dr. A. Martínez Martínez y al Dr. M.A. Martínez González por haberme dado siempre su ayuda, animándome y aconsejándome en todo momento, tanto en el desarrollo de este trabajo como en mi formación profesional.

- Gracias a todos los miembros del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre por sus enseñanzas y por el afecto que siempre me han dado; y en especial al Dr. F. Colina por sus ideas orientativas en el diseño de esta tesis, y al Dr. C. Ballestín por su ayuda inestimable en el estudio de inmunohistoquímica.

- Al Dr. J.A. Plaza y al Dr. A. Rábano, por su aportación en la elaboración de las gráficas y en la corrección final del manuscrito, respectivamente.

- Al Dr. A. Fuertes por su cooperación en el estudio serológico.

- Agradezco a D. A. Martos la realización de los cortes histológicos; a D. M. Garrido y a D. J.R. Sotelo su ayuda técnica en la Sección de Inmunohistoquímica; a D. F. Sánchez Margallo y a D. D. Sánchez Margallo por su colaboración en la documentación gráfica.

- También tengo que agradecer a D. A. León, D. J.M. Bernal y a D. J. Argenta su ayuda en la obtención de las historias clínicas.

- Al Profesor D. F. Pescador, del Departamento de Estadística de Somosaguas de la Universidad Complutense de Madrid, por la realización del estudio estadístico.

- A Dña. C. Sarabia Griera le agradezco el haber mecanografiado este trabajo.

- Finalmente, quisiera agradecer a mi familia por sus ánimos y estar siempre a mi lado, y especialmente a mis hermanos Joaquín y Alicia por su colaboración en la iconografía y en la búsqueda bibliográfica, respectivamente.

INDICE

INTRODUCCION	4
REVISION DE LA LITERATURA	10
A.- HEPATITIS CRONICA VIRAL.	10
A.1.- Estructura y mecanismos patogénicos del virus de la hepatitis B (VHB).	
A.2.- Estructura y mecanismos patogénicos del virus de la hepatitis delta (VHD).	
A.3.- Métodos de identificación del VHB.	
A.4.- Métodos de identificación del VHD.	
B.- HISTORIA NATURAL Y ESTUDIO HISTOLOGICO.	40
B.1.- Hepatitis B.	
B.2.- Grupos serológicos con características propias:	
B.2I.- Portadores o no de HBeAg (seroconversión AntiHBe).	
B.2II.- Portadores de virus de la hepatitis delta.	
C.- INMUNOHISTOQUIMICA.	53
C.1.- Hepatitis B.	
C.2.- Hepatitis Delta.	
OBJETIVOS	58
MATERIAL Y METODOS	60
1.- DESCRIPCION DE LA MUESTRA.	60
2.- INMUNOHISTOQUIMICA: ESTUDIO TISULAR DE MARCADORES VIRALES (VIRUS B Y AGENTE DELTA).	68
3.- MORFOMETRIA.	75
4.- ESTADISTICA.	76
RESULTADOS	85
1.- DESCRIPCION DE LA MUESTRA.	85
1.A.- Datos clínicos y epidemiológicos.	
1.B.- Laboratorio:	
1.BI.- Bioquímica: Resultados generales.	
1.BIII.- Marcadores virales séricos - Bioquímica.	
1.C.- Histología:	
1.CI.- Resultados generales.	
1.CIII.- Histología - Bioquímica.	
1.CIV.- Histología - Marcadores virales séricos.	
1.D.- Grupos serológicos con características propias:	
1.DI.- Portadores o no de HBeAg (seroconversión	

1.DII.- Portadores de virus de la hepatitis delta.

2.- INMUNOHISTOQUIMICA.	107
2.A.- Resultados generales.	
2.B.- Marcadores virales tisulares - Histología.	
2.C.- Marcadores virales tisulares - Marcadores virales séricos.	
2.D.- Marcadores virales tisulares - Grupos serológicos con características propias.	
2.E.- Estudio comparativo con el método histoquímico para la detección tisular del HBsAg.	
3.- MORFOMETRIA.	115
3.A.- Resultados generales.	
3.B.- Morfometría - Marcadores virales séricos.	
3.C.- Morfometría - Histología.	
TABLAS	117
GRAFICOS	137
DISCUSION	158
CONCLUSIONES	179
BIBLIOGRAFIA	181
FIGURAS	

INTRODUCCION

La hepatitis crónica es definida como enfermedad inflamatoria hepática de mas de 6 meses de evolución ⁽²⁵⁷⁾. Los rasgos que la caracterizan y que, además, podrían influir en su curso evolutivo quedan concretados, fundamentalmente, en dos aspectos:

1) ETIOLOGIA.

Las causas de la hepatitis crónica han sido una especulación durante años, aunque ya desde 1968 algunos casos eran atribuidos al virus de la hepatitis B (VHB) o a factores autoinmunes o a drogas ^(54,122,140,400,401). Estos agentes han ido con el tiempo afianzándose como factores etiológicos gracias a los conocimientos científicos desarrollados y en los que la biología molecular ha contribuido bastante; los datos nuevos aportados han permitido el ir definiendo criterios diagnósticos, así como la creación de métodos más precisos para su identificación ^(227,414).

Hoy en día, se considera que la etiología más frecuente es la hepatitis asociada a virus, a lo que ha contribuido, por una parte, la información cada vez mayor y más detallada sobre el VHB ^(61,166,170,209,226,297,463,464), y por otra la identificación de virus nuevos: virus delta, virus C y virus E ^(1,6,16,46,49,105,145,196,208,215 249,279,340,366,368,369,370,404).

Las otras causas aceptadas son: la hepatitis autoinmune ("lupoide"), la hepatitis colestásica,

la hepatitis asociada a medicamentos, y un grupo, cada vez menor, de etiología desconocida (criptogénica) ^(33,40,282,411,412,509).

2) MORFOLOGIA.

La hepatitis crónica era referida como diagnóstico de múltiples entidades clínicas con diferentes lesiones histológicas. Ante dicha complejidad, y con el fin de unificar criterios, un Grupo Internacional se reunió en 1968 y estableció una clasificación morfológica de la hepatitis crónica, subdividiéndola en dos tipos: hepatitis crónica persistente (HCP) y hepatitis crónica agresiva (HCAgr), siendo ambas consideradas como una misma enfermedad pero con evoluciones distintas, la primera se asociaba a un pronóstico favorable mientras que la HCAgr. la consideraban como una fase de inicio de cirrosis, sobre todo cuando la actividad inflamatoria era intensa ⁽¹²²⁾.

Otros tipos de hepatitis crónica fueron, posteriormente, propuestos: hepatitis crónica lobulillar (HCL) ⁽³⁴⁷⁾, enfermedad crónica activa del hígado ⁽²³⁾, y hepatitis crónica septal (HCS) ⁽¹⁷³⁾.

En 1976, la Asociación Internacional para el estudio del hígado y el Centro Fogarty propuso el concepto de hepatitis crónica que es el que, hoy en día, todavía se utiliza, y admitió los dos tipos establecidos en 1968 pero recomendó el uso del término de hepatitis crónica activa (HCA) en vez del de hepatitis crónica agresiva, aunque permitió que éste quedara como sinónimo; el concepto de "enfermedad hepática crónica activa del hígado" lo incluyeron dentro del contexto morfológico de HCA, y a la hepatitis crónica lobulillar la consideraron

como una hepatitis aguda persistente de más de 6 meses de evolución ⁽²⁵⁷⁾.

Actualmente, la clasificación de hepatitis crónica vigente sigue siendo la emitida en 1968 y posteriormente recomendada por la Asociación Internacional reunida en 1976, como acabamos de comentar; las categorías HCL y HCS son, también, admitidas.

Las lesiones histológicas que caracterizan a estos tipos de hepatitis crónica son la necrosis hepatocelular (necrosis erosiva y necrosis lobulillar) y la infiltración inflamatoria, así como la fibrosis que va a ser la que defina el estadio evolutivo de la enfermedad ^(26,37,92,93,235,400,402,405). La necrosis y el infiltrado inflamatorio suelen correlacionarse con los síntomas clínicos de insuficiencia hepática ("brote") y con la elevación sérica de las tasas de enzimas hepáticas ⁽⁴²⁶⁾.

Desde 1968 en que quedó establecida la primera clasificación morfológica, a la necrosis erosiva se le consideró como el factor "clave" para el diagnóstico de HCA y como signo premonitorio de progresión hacia cirrosis ("marcador pronóstico") a través de un proceso evolutivo caracterizado por: un aumento de la fibrosis focal (cicatriz portal o periportal), confluencia de zonas fibrosas con formación de septos (puentes) incompletos y completos, y finalmente de nódulos regenerativos ^(26,122).

Los estudios realizados en años sucesivos han servido para reconsiderar que la necrosis erosiva, como criterio evolutivo, no es la única que permite el desarrollo final de cirrosis, sino que también, la necrosis lobulillar (expresada como necrosis focal y necrosis confluyente, ³⁸⁾ es capaz de contribuir a una progresión de la hepatitis crónica independientemente de la

existencia o no de necrosis erosiva y, en especial, cuando afecta a áreas hepatocitarias amplias originándose, tras la necrosis del parénquima, un colapso del estroma con creación de "puentes" que unen entre sí espacios porta y/o zonas centrolobulillares ^(54,93,104,400), o cuando los episodios ("exacerbaciones") agudos de daño lobulillar se presentan con relativa frecuencia en la evolución de la enfermedad ^(23,267,334,346).

En base a estos trabajos de investigación y a los datos aportados por ellos se ha objetivado que en la hepatitis crónica las probabilidades de un pronóstico adverso con el desarrollo final de un patrón arquitectural nodular (cirrótico) tienden a aumentar cuando se objetiva la presencia simultánea de necrosis hepatocelular (en sus dos tipos: necrosis erosiva y necrosis lobulillar) y de infiltración inflamatoria, sobre todo, si ambas lesiones están presentes con un grado de actividad intenso ^(37,401,402); además, en la progresión evolutiva morfológica es importante no olvidar otros factores como el agente causal de la enfermedad, las características clínicas del paciente (edad, pertenencia a grupos de riesgo...) ⁽³³⁴⁾ y/o la cuantificación del número de episodios o exacerbaciones agudas y su duración ^(116,266,346,402,485).

Fundamentalmente, por tanto, en la historia natural de la hepatitis crónica cabe distinguir:

a) El agente etiológico.

De todos ellos, la hepatitis asociada a virus, sobre todo la hepatitis B, sería el más frecuente como hemos mencionado al principio de esta introducción.

Actualmente, y gracias a la ingeniería genética (técnicas de biología molecular) el conocimiento sobre la etiopatogenia viral va siendo cada vez mayor (estructura genómica,

mecanismos de replicación viral, superinfección...) ⁽⁸⁵⁾ y, consecuentemente, la información nueva obtenida va afianzando la importancia del agente viral en el curso de la hepatitis crónica. También se están realizando estudios que interrelacionan los índices numéricos usados desde el punto de vista morfológico con la presencia de marcadores del virus con el fin de llegar a conocer si realmente existe una correlación entre las lesiones histológicas y el factor etiológico, o si por el contrario actúan como parámetros independientes en la evolución de la enfermedad ^(253,270,277,394).

b) Las lesiones morfológicas (necrosis, inflamación, fibrosis).

Estas lesiones histológicas características de la hepatitis crónica y que, además, son las determinantes de la actividad inflamatoria y de su evolución, pueden estar presentes en la biopsia simultáneamente o no, y cada una de ellas podrá mostrar diferentes grados de intensidad, por ello para su valoración se han desarrollado índices numéricos ^(237,253,277,405); los cuales, también, en estudios biópsicos periódicos de un mismo enfermo servirían para controlar su mejoría o empeoramiento espontáneos o modificados por el tratamiento.

c) Las situaciones en las que se producen exacerbaciones agudas.

En el transcurso de la evolución de la hepatitis crónica y concretamente en la hepatitis crónica asociada al VHB, sería el caso de las relacionadas con la replicación vírica (tanto con la seroconversión como con la reactivación de marcadores virales) que suceden de forma espontánea ^(112,117,118,246 267,274,276,333,448) o en situaciones que conllevan una alteración del sistema inmune ^(124,210,484), o bien de las que reflejarían una infección nueva por otro agente viral

(sobreinfección por VHA, VHC, o virus delta) ^(112,267,274,368,373,397,421,448), y ello sin dejar de señalar las reactivaciones virales sin causa conocida ^(87,274).

REVISION DE LA LITERATURA

A.- HEPATITIS CRONICA VIRAL.

La hepatitis crónica asociada a virus, conceptualmente, se refiere a la enfermedad necroinflamatoria persistente del hígado originada por un virus hepatotrópo ⁽²⁰⁹⁾. Hay varios agentes que pueden causarla, siendo los más frecuentes: el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis delta (VHD), y el virus de la hepatitis C (no A no B) (VHC). La cronicidad no ha sido observada en la hepatitis viral por el virus A ^(40,290,356), aunque actualmente parece ponerse en duda su carácter autolimitado ⁽²⁹³⁾.

Este estudio se ha centrado en la hepatitis crónica por el virus de la hepatitis B, asociado o no al virus de la hepatitis delta:

A.1.- Estructura y mecanismos patogénicos del virus de la hepatitis B (VHB).

El antígeno Australia fue descubierto en el año 1963 por Blumberg et al ⁽⁴⁴⁾ en el transcurso de una investigación sistemática de los sueros de pacientes transfundidos usando el método de doble difusión en gel de agar (técnica de Ouchterlony), y le fue dado dicho nombre al ser encontrado en el suero de un individuo sano de origen australiano.

Este antígeno comenzó a aislarse, con relativa frecuencia, en sueros de enfermos con leucemia, con síndrome de Down, con hepatitis viral y en sujetos dializados ⁽⁴³⁾. De ahí que,

entre otras, se formulara la hipótesis de que tal antígeno era un virus. Los trabajos de investigación llevados a cabo lo confirmaron y actualmente el antígeno Australia está totalmente reconocido como el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

Este virus o partícula Dane ⁽¹¹⁵⁾ es un DNA virus, prototipo de la familia de los hepadnavirus ^(463,464). Su forma es esférica, mide 42 nm de diámetro y está constituido por una **envoltura externa** de 7 nm de espesor, formada a su vez por proteínas (como la proteína principal de revestimiento HBsAg), carbohidratos y lípidos ⁽⁴⁶³⁾; y por un **núcleo central o core** de 27 nm de diámetro ⁽¹⁴⁾ que contiene proteínas antigénicas (HBcAg y HBeAg), el genoma vírico o DNA viral, y dos actividades enzimáticas: la DNA polimerasa ^(232,379) y la proteínkinasa ⁽¹¹⁾. Su ciclo de replicación tiene lugar en el hígado del huésped donde origina una infección aguda o persistente, en la cual el virus queda en el suero durante años. EL huésped, en el caso del VHB, se trata del hombre y de los monos antropoideos ⁽²⁸⁷⁾.

Las investigaciones referentes a la organización genética del virión han y siguen aportando datos que ayudan a ir comprendiendo cada vez más los mecanismos patogénicos en la historia natural de la hepatitis crónica por el VHB: el DNA o genoma viral, descrito en 1974 ⁽³⁷⁸⁾, es una molécula circular, doblemente trenzada, incompleta, de cerca de 1.6×10^6 daltons de peso molecular y constituida por una cadena o hélice larga L (-), de longitud fija (3200 nucleótidos o bases) y una cadena o hélice corta S (+) de longitud variable (representa sobre el 50 al 75% de la circunferencia, es decir entre 1700 y 2800 bases). Las técnicas de recombinación de DNA han permitido el clonaje del genoma vírico en bacterias y ser así estudiado su mapa genético y la secuencia de nucleótidos. Actualmente, se conocen 11 secuencias de nucleótidos completas que corresponden a genomas de diferentes subtipos ("a

y w", "a y r", "a d w", "a d r") del antígeno de superficie (HBsAg); el análisis comparativo de estas secuencias ha permitido deducir la estructura genética del virus B ⁽²⁹⁷⁾, y así se ha conocido que toda o casi toda la capacidad de codificación de las proteínas virales está localizada en la hélice larga L (-) ⁽⁴⁶⁴⁾, y dentro de ella en 4 regiones (región S, región C, región P, región X) que al encontrarse superpuestas permiten que la capacidad de codificación del virus B quede incrementada:

* - La composición proteica de la **envoltura viral**, la cual lleva asociada la antigenicidad del antígeno de superficie (HBsAg), es codificada por la **región S** y está compuesta por varias proteínas: la proteína principal o mayor (HBsAg) codificada por el gen S, de longitud constante (226 AA) y peso molecular de 25398 daltons ⁽⁴⁷³⁾; suele observarse en dos formas, según esté o no glucosilada P24 o PI y la P27 o PII respectivamente. La unión de dos moléculas de esta proteína mediante enlaces disulfuro representa la unidad estructural que contiene toda la antigenicidad e inmunogenicidad del antígeno de superficie (HBsAg) ⁽²⁹⁹⁾. La proteína intermedia codificada por el gen S y la región pre S2 es una glucoproteína que se presenta en dos formas, dependiendo de la extensión de la glucosilación (GP33/GP36); su longitud es de 281 AA ⁽⁴²⁹⁾ que corresponden a una secuencia de la proteína principal (P24) y a una secuencia adicional de 55 AA en la parte N terminal (codificada en la región pre S2). Este polipéptido de 55 AA es el que transporta los receptores frente a la albúmina humana polimerizada ⁽²⁸¹⁾, rasgo diferencial que podría explicar el carácter hepatotrópico del virus B ya que se ha especulado que la unión del virus B a los hepatocitos estaría facilitada por la albúmina humana a través de dichos receptores ^(248,461). Más actual ha sido el conocimiento de otra proteína, de longitud más larga, constituida por una forma no glucosilada (P39) y otra glucosilada (GP42) que contiene una secuencia de la proteína intermedia (GP33) y una

secuencia adicional de 119 AA en la parte N-terminal (codificada por la región pre S1); parte de esta secuencia está expuesta en la superficie de la envoltura viral y por ello se pensó que podría estar implicada en la unión del virus B al hepatocito, así como que indicaría un nivel de inmunogenicidad alto, es decir se trataría de un componente esencial de la envoltura de los viriones maduros ⁽²⁰⁵⁾. Recientemente, se ha demostrado la unión de esta proteína a las membranas plasmáticas derivadas de tejido hepático humano pero no a los hepatocitos humanos intactos, sugiriendo que la proteína larga estaría unida a la superficie interna de las membranas plasmáticas e incluso a las membranas intracelulares, y por tanto su función se encontraría más en relación con el ensamblaje, transporte y secreción de las partículas virales y subvirales ⁽²⁵⁶⁾. Cuantitativamente la síntesis de estos polipéptidos, también, difiere y ello se refleja en la composición de las partículas virales encontradas en los sueros de los pacientes con infección crónica por virus B ^(172,294,443,464).

* - **El core o nucleocápside** conlleva la antigenicidad de los antígenos core (HBcAg) y e (HBeAg), y la estructura polipeptídica de ambos es codificada por la **región C**: el polipéptido principal (P19) codificado por el gen C y formado por 183 a 185 AA, es el que constituye, predominantemente, el antígeno core. Los 40 AA de la región C-terminal son, en su mayoría, arginina y en menor proporción, serina y prolina, y su ordenación es muy similar a la protamina y a otras proteínas de unión al DNA viral, consecuentemente se piensa que la interacción con el genoma vírico se realizará en dicha zona ⁽⁴⁶³⁾. Polipéptidos precursores (P22) han sido caracterizados en el hígado, tanto en el núcleo ⁽⁶⁵⁾ como en el citoplasma ⁽³³⁵⁾. En 1972, Magnius y Espmark ⁽²⁸³⁾ descubrieron el antígeno "e" y desde entonces se sabe que es un antígeno soluble, constituido por una unidad polipeptídica monomérica de 15500 daltons (P15) y su demostración en suero se realiza sólo o asociado a la inmunoglobulina G ⁽⁴⁴²⁾. Este

polipéptido (P15) detectado a nivel sérico y el que está relacionado con la nucleocápside (P19) muestran una secuencia C-terminal similar por lo que se admite que el P15 es parte del P19 y por tanto el HBcAg y el HBeAg son expresiones de la misma secuencia polipeptídica ⁽⁴⁴⁴⁾.

La región pre-core no es requerida para la expresión de ambos antígenos, pero en cambio si está implicada en la unión del antígeno core a las membranas citoplasmáticas, con lo cual se facilitaría la liberación del HBeAg al suero (esto podría explicar que sea el HBeAg el único evidenciado en el suero durante la fase de multiplicación o replicación del virus B), y por otra parte favorecería la constitución de partículas virales maduras o viriones ⁽³²⁹⁾.

* - En otra de las regiones codificadoras de proteínas virales, la **región P**, la cual se superpone a la región del gen S, se piensa que es donde se codifica la enzima **DNA polimerasa**, dado que su producto de translación es una proteína básica, de 832 a 845 AA según los subtipos, rica en histidina y de un peso molecular de 90.000 daltons similar al de esta enzima. La estructura de la DNA polimerasa revela una cierta homología con la transcriptasa inversa de varios retrovirus oncogénicos ⁽⁴⁶⁵⁾, hecho sustentado por las investigaciones realizadas por Summers et al en otro de los miembros de la familia de los hepadnavirus ⁽⁴³⁶⁾, y su acción es completar la cadena única del DNA viral cuando el virus B comienza a replicarse ⁽²¹⁶⁾.

* - Un polipéptido de 145 a 154 AA dependiendo del subtipo y de un peso molecular de 16 a 17 kilodaltons ⁽¹⁵⁵⁾, se codifica en la **región X**, localizada entre la región S y la C. Este polipéptido ha quedado establecido como un verdadero antígeno viral codificado por el virus

B: **HBxAg**, como consecuencia de la presencia de anticuerpos x en sueros de enfermos con infección viral B y con hepatocarcinoma ^(233,310). La función de esta región no es bien conocida aunque se ha especulado que podría codificar la primera proteína implicada en la síntesis del DNA viral ⁽³⁸⁰⁾ e incluso se sugiere una relación con la replicación vírica ^(204,233) o con el proceso de carcinogénesis hepática ^(233,310).

--- **La función o mecanismo patogenético del virus de la hepatitis B** en la historia natural de la hepatitis crónica B no es todavía totalmente conocido aunque las investigaciones realizadas y las que se siguen llevando a cabo evidencian resultados y/o hechos que apoyan las premisas de que el VHB no es directamente citopático y que tanto la replicación viral como la respuesta inmune de huésped son dos factores implicados en la evolución de la hepatitis B ^(61,132,157,168,170,195,229,298,304,330,352,360,459).

*) Las características funcionales y rasgos morfológicos del proceso de síntesis y liberación del VHB en las células hepáticas van siendo cada vez menos desconocidas debido al desarrollo, a lo largo de éstos últimos años, de estudios dirigidos a la obtención de sistemas "in vitro" para el cultivo de hepatocitos con el fin de observar en ellos el mecanismo de replicación del virus B y poder extrapolar sus resultados a lo que ocurre en el hígado de los enfermos ^(226,285,289,504).

El virus B se replica según un modelo de retrotranscripción muy similar al de los retrovirus ^(166,381,407,435,436). Se desarrolla en dos fases, la primera tiene lugar en el núcleo hepatocitario donde el genoma viral, mediante la acción de la DNA polimerasa, se transforma en una molécula circular, superenrollada ("provirus") a partir de la cual se sintetizan RNA

mensajeros ("transcriptores") virales que van a colaborar en la síntesis de los diversos antígenos (HBsAg, antígeno core, antígeno e), así como del DNA viral (conociéndose el que está asociado con la replicación del genoma como RNA pregenómico) ^(433,506). La siguiente fase se desarrolla en el citoplasma de la célula hepatocitaria, consistente en el acoplamiento del RNA pregenómico en una nucleocápside transicional (o "inmadura") en donde se halla, también, la DNA polimerasa y la primera proteína para la síntesis del DNA viral. Se inicia, así, el proceso de transcripción inversa tras el cual se produce un nuevo genoma vírico y la maduración completa de un nuevo virus B (unión del DNA con las proteínas del core, y revestimiento de la nucleocápside por las proteínas de la envoltura viral). En cualquiera de estas fases existe liberación de partículas virales, de ahí que el análisis de los viriones a nivel sérico revele una composición del genoma diferente ^(381,387). El DNA viral sintetizado puede permanecer en forma libre con lo cual se continúa la replicación viral ("replicativa"), o puede integrarse en el genoma celular del huésped quedando las células depositarias de un DNA vírico capaz sólo de ser template de RNA mensajeros de pequeña longitud, como el del RNA asociado al HBsAg y consecuentemente la transcripción de esta forma integrada jugaría un papel en la persistencia de la infección por el VHB, así como en el fin de la replicación de genomas virales libres ("no replicativa") ^(58,408,469).

En base a estos rasgos diferenciales de la replicación del VHB se objetiva que la presencia del virus B no implica "por sí sola" daño hepatocelular ^(10,107,195,198,234). Ahora bien la localización de los antígenos virales (antígenos "diana") en las membranas hepatocitarias induciría su reconocimiento por el sistema inmune del huésped, iniciándose la destrucción de las células infectadas ^(139,141);

Inicialmente se pensó que el HBsAg era el antígeno diana ^(8,139,500) aunque las observaciones de otros estudios no mostraban respuesta inmune a este antígeno ^(133,158,203,296,305,313,480). Estas divergencias no parecían existir en relación con el HBcAg, la distribución tisular de este antígeno era considerada exclusivamente nuclear pero con la microscopía electrónica se evidenció también en el citoplasma y en la membrana hepatocitaria ^(194,501). Esta localización apoya que el antígeno core pueda ser el antígeno diana, y estudios posteriores en sangre periférica y en tejido hepático aportan conclusiones que lo confirman ^(108,146,158,161,295,303,305,313,314,468,474,480). Otro antígeno diana señalado ha sido el HBeAg, y ello resulta comprensible ya que se trata, como hemos expuesto al hablar de la estructura del virus B, de un antígeno relacionado con el HBcAg ^(295,338,502).

*) El sistema inmune del huésped reacciona contra estos antígenos virales "diana" siendo la inmunidad celular la que parece ejercer el papel principal en la inmunopatogénesis de la hepatitis crónica B, como queda constatado tanto en el análisis serológico (expresión fenotípica) de la población linfocitaria de estos enfermos, en donde existe un predominio de la naturaleza T de la misma y una alteración de la relación entre linfocitos T "helper" (T4) y linfocitos T "citotóxicos" (T8) debido al aumento de los linfocitos T8 y/o a una disminución de los linfocitos T4 (este hecho es objetivado especialmente en pacientes en fase de replicación viral activa HBeAg (+)) ^(86,114,286,292,305,313,458), como en el análisis inmunohistoquímico del componente celular inflamatorio de las muestras hepáticas, el cual revela la presencia de un "tejido linfoide asociado al hígado" constituido por linfocitos T (predominantemente T8), células killer y células natural killer. Estos dos últimos grupos celulares son importantes en la fase aguda de la hepatitis asociada al virus B ^(91,131,132,142,158,286,296,306,313,338,474). Entre dicha celularidad también hay células reticulares que realizan

funciones similares a las que desarrollan en órganos propiamente linfoides ^(28,35,472,475).

No sólo la inmunidad celular es la responsable de la respuesta inmune. El sistema antigénico HLA demostrado en los hepatocitos infectados (HLA-I) y en las membranas de los macrófagos asociados a los antígenos virales (HLA-II) ^(131,156,474) y el sistema de interferones también intervienen en ella: colaboran con la población linfocitaria T con el fin de eliminar al virus y/o a los hepatocitos infectados. Además, la inmunidad humoral modula la actividad lítica de los linfocitos T citotóxicos sensibilizados a los antígenos virales diana mediante la síntesis de anticuerpos o inmunoglobulinas por los linfocitos B tras la presentación de los antígenos víricos y los de la membrana hepatocitaria (LMA) por los linfocitos helper (T4) ^(89,156,313,492).

-- Por tanto, y según lo que acabamos de exponer, en la evolución de la lesión hepática influirán conjuntamente el sistema inmune del huésped, y el grado y extensión de la replicación viral en función del DNA vírico (episomal o libre, o integrado). No hay que olvidar tampoco la co y/o sobreinfección por otros agentes virales en el curso evolutivo de la hepatitis por el VHB.

La historia natural de la infección por virus B se podría establecer en 4 fases: aguda autolimitada, replicación viral alta, replicación viral de nivel bajo, y una fase no replicativa ^(10,22,40,107,220,413,460). A su vez, se aprecia una correlación con los tipos de reacción básicos de la hepatitis B propuestos por Gudat en el año 1975 en base al diagnóstico histológico, a la expresión tisular de los antígenos virales y a la respuesta inmune de los pacientes: tipo eliminación (hepatitis aguda autolimitada); predominio del HBcAg = HBcAg generalizado

(fase de replicación viral activa con infectividad alta); predominio del antígeno de superficie /ausencia del HBcAg (fase no replicativa en donde el DNA viral se encontrará mayoritariamente en forma integrada); y por último, la reacción caracterizada por la presencia focal del antígeno core (fase de replicación mínima, considerada como la transición entre las dos fases anteriores, y en la que hay infectividad sérica pero a títulos más bajos y el DNA vírico existe tanto en forma episomal como integrada) ⁽¹⁹⁵⁾.

A.2.- Estructura y mecanismos patogénicos del virus de la hepatitis delta (VHD).

En 1977 Rizzetto et al, estudiando en biopsias hepáticas la distribución tisular de los antígenos del VHB mediante test de inmunofluorescencia, observaron que en algunas muestras la fluorescencia nuclear hepatocitaria no mostraba correlación con las imágenes del antígeno core en los núcleos de estas células al examinarlas con microscopía electrónica. Llegaron a la conclusión de que se trataba de un nuevo sistema antigénico que denominaron "delta/antidelta" ⁽³⁷⁰⁾.

El virus de la hepatitis delta se ha visto que es un virus incapaz de ser infeccioso por sí sólo ya que requiere un componente de los hepadnavirus. Su caracterización se ha conseguido en muestras séricas y hepáticas tanto de chimpancés infectados experimentalmente como de humanos ^(49,372,374); para la detección en suero es necesario el tratamiento previo con detergentes (Nonidet P-40 al 0,1-0,5%).

Se trata de un virus defectuoso de 35-37 nm de diámetro y con un coeficiente de sedimentación entre las partículas Dane y las partículas HBsAg de 22 nm. Está constituido

por una **envoltura externa** formada por las proteínas de la envoltura del VHB en la siguiente proporción: 95 % de P24/P27, 5 % de GP33/GP36 y un 1 % de P39/P42; esta composición proteica es más similar a las partículas HBsAg de 22 nm que a la de la envoltura de las partículas Dane, y la mayor cantidad de proteína intermedia hace pensar que sea a este nivel donde se localicen los receptores de albúmina ⁽⁴⁸⁾; y por un **núcleo** compuesto por el antígeno delta y el genoma o RNA viral, los cuales no muestran ningún tipo de organización como ocurre con los constituyentes de la nucleocápside de las partículas Dane ⁽³⁷²⁾: el antígeno delta (HDAg) es de naturaleza proteica, de 68-70.000 daltons y su composición polipeptídica fue dada a conocer por Bergman y Gerin tras el desarrollo de un método de inmunoblot con el que encontraron dos polipéptidos de 24 y 27 kilodaltons y dos más pequeños, 20 y 23 kd, en muestras hepáticas ⁽³⁴⁾. Bonino et al ⁽⁴⁸⁾ en sueros de chimpancés infectados detectaron otros dos (P29 y P27). Para estos polipéptidos se han obtenido anticuerpos monoclonales que indican que todos ellos comparten determinantes antigénicos ⁽³³⁹⁾. El RNA viral o genoma vírico (RNA-VHD) es una molécula pequeña, circular, de banda única, de peso molecular $5'5 \times 10^5$ que no muestra ninguna homología ni con el DNA del virus B ni con el RNA ribosómico del huésped y está formado por una secuencia de 1700 bases ^(55,102,243,489); mediante su clonaje y análisis secuencial ha sido demostrada su capacidad de codificación para las proteínas antigénicas, así se ha conocido una región que abarca menos del 50% del RNA viral y cuyo antígeno codificado (sobre unos 25000 daltons) correspondería a uno de los polipéptidos específicos del HDAg ⁽⁴⁸⁹⁾.

--- **La función del VHD** parece diferir con respecto a la del virus B en cuanto que parece presentar un efecto citopático directo en los hepatocitos; aunque, también el sistema inmune del huésped juega un papel importante en la patogénesis de la infección por el virus de la

hepatitis delta:

*) Los avances en las técnicas de biología molecular (análisis de hibridación del RNA viral) han permitido conocer el modo de replicación del virus delta, éste presenta similitudes con el de ciertos virus de las plantas =viroides ^(102,259). Tiene lugar en el núcleo del hepatocito y consiste en un modelo conocido como "enrollamiento circular" que por autoclivaje y autoligación se producen moléculas de RNA circulares, de longitud única (RNA antigenómicos) que actuarían de templates para la síntesis de nuevos RNA del VHD. EL RNA viral se replica sin necesidad de otras proteínas, consecuentemente se piensa que puede pertenecer a la familia de RNA que actúan como enzimas (riboenzimas) ^(88,498). Estos hallazgos favorecen la idea de que el virus delta necesita al virus B no para su replicación sino para facilitarle su transmisión entre hepatocitos. Esta especulación se ha ido confirmando en estudios recientes, tanto experimentales ⁽²⁸⁹⁾ como en pacientes portadores de ambos virus ^(328,423).

Las especulaciones acerca de la pertenencia a las riboenzimas del RNA del virus delta ^(319,507) apoyan el rasgo diferencial de la citotoxicidad hepática de VHD, dado que su genoma podría originar modificaciones citopáticas directas en la bioquímica celular del hepatocito, por ejemplo, a nivel de las grasas o fosfolípidos, y cuya consecuencia sería la esteatosis microvesicular observada en las muestras hepáticas de algunos enfermos ^(66,258,349,482). Otro hecho que apoyaría el efecto citopático del VHD es que su inoculación a chimpancés siempre origina daño hepatocelular ^(181,317,343,344,371). Lo que no se conoce todavía es la identidad del posible antígeno que iniciaría el proceso de lisis hepatocitaria al ser reconocido por el sistema inmune del huésped, se especula con determinantes antigénicos del VHD localizados en la

membrana hepatocitaria ⁽²⁴⁰⁾, con neoantígenos inducidos por el virus delta, e incluso con proteínas de la membrana celular alteradas por la infección delta, y ello sin descartar que sean los antígenos virales del virus B dada la asociación entre ambos virus ^(66,110); aunque esta última posibilidad, especialmente en relación a las proteínas de la envoltura externa de dicho virus, parece poco probable en base a los hallazgos obtenidos en algunos de los estudios actuales ^(206,255).

*) El sistema inmune del huésped reacciona contra la infección delta, sobre todo la inmunidad celular y ello ha quedado corroborado al analizar la composición de las células mononucleadas en sangre periférica: hay aumento de los linfocitos T8 con disminución de la proporción T4/T8 ⁽¹⁴⁴⁾ y niveles bajos de interleucina-2 ⁽⁸⁹⁾. Lo mismo se aprecia en estudios de biopsias hepáticas: linfocitos T supresores/citotóxicos predominan en áreas periportales y perilobulillares, y los linfocitos T helper en los espacios porta ⁽¹¹⁰⁾. Otro hecho que apoya la respuesta inmune en la patogénesis de la infección delta es la presencia de autoanticuerpos séricos contra los componentes del citoesqueleto, filamentos intermedios (IgM) y microtúbulos (IgG) ⁽⁵⁰⁸⁾, y contra la capa basal del epitelio escamoso la cual comparte especificidad con las células epiteliales tímicas relacionadas con la diferenciación de la célula T helper con lo que podría haber interferencias con los mecanismos inmunes del huésped ^(284,508).

-- Con las observaciones conocidas hasta ahora se puede concluir que el virus de la hepatitis delta origina un daño hepatocitario tanto por mecanismos inmunopatogénicos como por citotoxicidad directa ^(46,253,316). Además, en la hepatitis delta, y en base a las manifestaciones clínicas, hay que tener en cuenta la posible existencia de factores moduladores de la

patogenicidad del virus como: la replicación del virus B ⁽⁴²³⁾, la simultaneidad de varias infecciones virales (VHB + HIV) ⁽⁷⁰⁾, variabilidad y/o mutaciones en las secuencias del genoma del VHB o en el del VHD ⁽³²⁴⁾, o simplemente alteraciones patológicas hepáticas (no necesariamente infecciones) del huésped.

A.3.- Métodos de identificación del VHB.

El virus de la hepatitis B se identifica mediante la detección de los marcadores virales en suero y en las células hepáticas.

La determinación de los tres sistemas antígeno-anticuerpo relacionados con el virus B, permitirá conocer la evolución natural de la infección por dicho virus ^(341,413).

*** Marcadores serológicos.**

- **HBsAg:** este antígeno es el primero en aparecer, antes incluso que se inicie la sintomatología, en un tiempo de 4 a 6 semanas. Alcanza sus niveles máximos en la fase aguda de la enfermedad y desaparece con la resolución del cuadro clínico.

Si la positividad sérica se mantiene más de diez semanas es probable la evolución a la cronicidad y si ésta permanece a los 6 meses, el sujeto infectado es considerado como "portador crónico".

A veces el HBsAg se hace indetectable al cabo de meses o incluso años, se trataría de una

situación transitoria de "portador crónico" y para dejar de ser considerado como tal es necesaria la aparición en suero de los anticuerpos AntiHBs. La proporción del aclaramiento anual del HBsAg se estima que oscila entre el 1 y el 2 % de los casos ^(17,137,271,272,309,390,391,487,490,499).

Actualmente, y como consecuencia de un conocimiento más amplio del genoma viral, se están realizando trabajos sobre la detección sérica de las proteínas de la envoltura externa del virus B, con los objetivos de valorar la importancia de las mismas a nivel pronóstico, y de conocer si se encuentran o no en relación con la replicación viral ^(64,165,199,222,250,336,455,511).

- **AntiHBs:** este anticuerpo comienza a elevarse cuando se inicia el periodo de convalecencia y ya no se detecta el HBsAg sérico. Posteriormente los niveles disminuyen pero quedan de manera persistente, a títulos bajos, indicando infección pasada y/o inmunidad frente a futuras infecciones por VHB.

Entre la negativización del HBsAg y la aparición del AntiHBs transcurre un tiempo conocido como "periodo ventana" (2 a 16 semanas), en el cual la infección por virus B se demuestra por la presencia sérica del AntiHBc y AntiHBc.

Hay casos en que se observa pérdida del AntiHBs reteniendo la positividad del AntiHBc. La frecuencia en algunos estudios varía, más o menos, entre un 2 y un 20% ^(207,311,510). No se conoce el motivo de esta negativización sérica. Se especula con la presencia de otra enfermedad hepática que por mecanismos desconocidos influiría en sus niveles séricos hasta hacerlos indetectables o podría estar en relación con la concentración de los anticuerpos

AntiHBs en suero.

En ocasiones, el único marcador sérico detectado es el AntiHBs, en estos casos es necesario saber los títulos para descartar un falso positivo o conocer si ha habido relación con factores de riesgo (transfusiones...), para así valorar si la manera de adquisición ha sido pasiva y no como consecuencia de una infección reciente o remota ⁽¹²⁸⁾. Es importante comprobar estos hechos para saber si la presencia única de AntiHBs confiere o no inmunidad ante el virus B.

- **Antígeno core:** este marcador viral no suele detectarse de forma aislada como el HBsAg debido a la existencia precoz de AntiHBc por lo que queda oculto en forma de inmunocomplejos circulante y únicamente puede demostrarse en muestras hepáticas. Su determinación sérica ha podido ser realizada, tras el desarrollo de métodos de RIA para testar antígeno core unido a partículas Dane o a AntiHBc (inmunocomplejos), en sueros con títulos altos para AntiHbc de enfermos en la fase inicial de la hepatitis aguda ^(302,342), o en los de portadores crónicos B ^(176,342,353,376). Antígeno core sérico positivo indica replicación viral y su persistencia en el curso de la hepatitis aguda refleja una tendencia a la cronicidad.

El HBcAg se ha detectado en sueros de pacientes con inmunodeficiencias sin necesidad de usar métodos específicos. Este hecho apoya la formación precoz de inmunocomplejos en el desarrollo de la hepatitis aguda ^(302,303).

- **AntiHBc:** este anticuerpo suele aparecer a los 2 ó 3 meses de la infección coincidiendo con los niveles más altos del HBsAg y con HBeAg y DNA polimerasa ⁽²¹²⁾. Como en toda infección aguda este anticuerpo es de tipo IgM y sus títulos más altos se aprecian en la fase

inicial y en la de convalecencia de la enfermedad aguda e indican replicación viral. En el curso evolutivo habitual el AntiHBc de tipo IgM suele persistir varios meses, a veces un año, y en este tiempo el HBsAg puede haber ya desaparecido en el suero; si la positividad del AntiHBc de tipo IgM se mantiene la posibilidad de una evolución a la cronicidad aumenta ^(25,125,241,413,420). Tras este tiempo el AntiHBc pasa a ser de naturaleza IgG y sus niveles séricos disminuyen pero quedan de forma persistente bien junto al AntiHBs representando infección pasada con inmunidad permanente, o bien con el HBsAg reflejando una evolución crónica de la infección por virus B (portador crónico).

El AntiHBc como único marcador viral sérico podría reflejar: el "periodo ventana" de la seroconversión del HBsAg en el curso de una infección viral aguda por VHB; o la existencia de unos niveles séricos de HBsAg demasiado bajos para ser detectados aunque el antígeno de superficie sí es demostrado a nivel tisular; o bien una infección por el virus B muy antigua en la que los títulos de AntiHBs a lo largo del tiempo hubieran ido disminuyendo tanto que no se detectaran con los métodos rutinarios; o también podría indicar un episodio agudo en el curso de la enfermedad hepática de un portador crónico de HBsAg; y todo ello sin descartar la posibilidad de un falso positivo ⁽³¹¹⁾.

Cuando únicamente hay demostración de AntiHBc sérico es importante, además, conocer sus títulos: si son altos expresan infectividad y dichos sueros son capaces de transmitir la enfermedad (sería la etiología de algunas hepatitis postransfusionales, ^{213,478}); y en casos de HCA o cirrosis de etiología desconocida indicarían que dichos cuadros podrían ser consecuencia de una infección remota por VHB ^(52,392), en éstos el AntiHBc indica que el virus de la hepatitis B puede replicarse en personas HBsAg seronegativo, siendo este hecho

probado al demostrarse positividad tisular para el antígeno core ^(241,427,483), o por la existencia de DNA viral en el suero y/o en el tejido hepático ⁽³⁹⁹⁾. En cambio, si los títulos son bajos denotan infección pasada y la ausencia de AntiHBs, como ya hemos comentado, podría ser debida a niveles de HBsAg séricos no detectables ("portador silente") ^(164,241,275), o a una disminución importante de sus títulos ^(311,510).

- **HBeAg:** este antígeno aparece durante el periodo de incubación de la hepatitis aguda, aproximadamente una semana después del HBsAg y antes de la elevación de las transaminasas, y se negativiza a las tres semanas antes del aclaramiento del HBsAg. Si persiste más de 8 ó 10 semanas desde el inicio de la clínica de la hepatitis aguda, supondría una replicación viral persistente, una infectividad sérica permanente y una tendencia a la cronicidad ⁽¹³⁾.

En la infección crónica B es uno de los marcadores de replicación viral y se asocia a DNA vírico y a la actividad DNA polimerasa ⁽⁷⁾. Su negatividad no siempre refleja el cese del proceso replicativo ya que los otros marcadores son más sensibles y específicos y se pueden hallar en sueros HBeAg negativos como es el caso del DNA vírico y del AntiHBc de tipo IgM, e incluso las muestras hepáticas pueden revelar la presencia de antígeno core ^(182,420); y su positividad, a veces, no expresa replicación viral especialmente si los otros marcadores son negativos ⁽⁹⁶⁾.

- **AntiHBe:** este anticuerpo se desarrolla a los pocos días o semanas después de la negativización del HBeAg y suele persistir 1 a 2 años. Su aparición es posterior a la del AntiHBc pero anterior a la del AntiHBs, por ello en una infección aguda en vías de

resolución se suele encontrar en la sangre junto al HBsAg ⁽⁴⁾.

Si la aparición de AntiHBe tiene lugar tardíamente, más de 6 semanas, podría ser también un indicador de cronicidad ⁽¹³⁾.

- **DNA viral:** actualmente se considera como otro marcador de infectividad sérica, y ello ha sido posible gracias al desarrollo de las técnicas de hibridación molecular ^(85,252,268,399), y a la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) ^(331,452). Estas han permitido su identificación no sólo en el suero y en el hígado, sino también en muestras relacionadas con la transmisión por vía sexual del virus B ⁽¹¹⁹⁾.

En la hepatitis aguda se determina en el periodo en que comienzan las manifestaciones clínicas, y su positividad sérica es corta, alrededor de una semana ⁽⁴⁹⁶⁾. Se ha sugerido que su persistencia más de 8 semanas desde el inicio de la sintomatología sería indicativo de un probable curso evolutivo crónico, aunque su aclaramiento dentro de ese tiempo no impide que la cronicidad se desarrolle ⁽²⁴⁵⁾.

Los estudios realizados han expresado que el DNA viral es el indicador más sensible y específico de la replicación viral: se demuestra, casi siempre, en sueros HBsAg, HBeAg y DNA polimerasa positivos, y en ocasiones en sueros HBsAg positivos y con negatividad para los otros dos marcadores ^(50,57,107,182,228,268,291,314,357,399,452).

Desde el punto de vista diagnóstico el poder detectar el DNA viral ha servido además, para atribuir al virus de la hepatitis B la responsabilidad como agente causal de lesiones hepatocelulares desarrolladas en pacientes con negatividad sérica para el HBsAg y con o sin

positividad para los anticuerpos antiantígenos del VHB ^(56,331,384,399), así como ha permitido demostrar la persistencia de replicación viral en enfermos con deterioro de su enfermedad hepática crónica y en cuyos sueros se encuentra presente el AntiHBe ^(50,107,119,151,182,268,291 357,399), e incluso ha ayudado en el conocimiento de porqué sueros negativos para todos los marcadores del virus B transmiten la infección ⁽⁴⁵⁶⁾, y también ha contribuido en poder implicar al VHB en la reactivación de la enfermedad hepática en pacientes con AntiHBe positivo ^(87,246) y en la patogénesis del hepatocarcinoma tanto en enfermos con HBsAg sérico como en aquellos que no son portadores de dicho antígeno y que serológicamente pueden o no tener positividad para los anticuerpos antiantígenos del virus B ^(56,159,331).

* Marcadores tisulares.

El virus B se identifica en diversos órganos: riñón, páncreas, hígado, aunque entre éstos la localización preferencial es a nivel hepático.

- **HBsAg:** el antígeno de superficie se reconoce fácilmente en cortes de hematoxilina eosina por el aspecto finamente granular, eosinófilo que confiere a los citoplasmas de los hepatocitos portadores del virus B (hepatocitos esmerilados "ground-glass") ^(174,198,495). Esta imagen hepatocitaria no es patognomónica del virus B ya que también se identifica en otras patologías ^(345,479,495), e incluso hay estudios en los que la muestra hepática presenta la coexistencia de hepatocitos esmerilados de causas diferentes ⁽¹⁵⁾.

El reconocimiento del virus B como el verdadero factor etiológico de los hepatocitos esmerilados en microscopía óptica, requiere técnicas específicas:

a) Métodos histoquímicos:

Shikata et al ⁽⁴¹⁶⁾, al realizar en secciones de parafina la técnica de Van Gieson para fibras elásticas, objetivaron que algunos hepatocitos mostraban una tinción diferente y éstos, a su vez, eran los que daban fluorescencia positiva. La razón de este hecho se basaba en la presencia de enlaces disulfuro en la estructura del antígeno de superficie, ya que los reactivos de esta técnica suelen actuar sobre dichos enlaces. Para intensificar la positividad desarrollaron la técnica de orceina modificada (técnica de Shikata).

Otros métodos, aunque menos utilizados son: aldehydofucsina de Gomori, la alhideo-tionina ^(51,169,174,416,495), y el tricrómico modificado que confiere una metacromasia verde a los hepatocitos infectados ^(79,193).

b) Técnicas de inmunohistoquímica:

Con la técnica de inmunofluorescencia los hepatocitos con antígeno de superficie revelan una fluorescencia citoplásmica. Esta técnica fue de las primeras usadas para la identificación de los marcadores hísticos ^(79,195,198,244,321,360), pero se vio que mostraba más inconvenientes que ventajas, de ahí que al comenzar a usar los métodos de inmunoperoxidasa haya empezado a ser sustituida cada vez más por los mismos, y éstos han pasado a ser considerados como métodos de rutina junto con las técnicas histoquímicas habituales ^(3,98,162,189,213,218,219,225,251,315,431,432,438,462,471,486), aunque como cualquier método puede presentar artefactos que den lugar a falsos positivos y falsos negativos, hecho que hay que conocer para evitar interpretaciones erróneas ^(177,326).

Las características utilizadas en la identificación de hepatocitos con antígeno de superficie se

discutirán más detalladamente en el apartado correspondiente a los estudios de inmunohistoquímica.

c) Microscopía electrónica (características ultraestructurales):

Los hepatocitos con presencia de HBsAg revelan en las secciones ultrafinas y concretamente a nivel del citoplasma inclusiones filamentosas o tubulares, situadas tanto dentro de las cisternas del retículo endoplásmico, (preferentemente en el retículo endoplásmico liso (REL), las cuales se encuentran aumentadas en número y tamaño) ^(169,195,225,415,428,446,495,501), como en el interior de los lisosomas y de forma libre sin relación con ninguna organela ⁽⁴¹⁵⁾.

- **HBcAg:** el antígeno core no suele reconocerse en los cortes de hematoxilina eosina. Únicamente cuando se produce en exceso confiere al núcleo de la célula hepatocitaria un aspecto arenoso ("sanded"), esta imagen ha sido evidenciada por Huang et al ⁽⁷²⁾ y por Bianchi y Gudat ⁽³⁹⁾.

Las técnicas que permiten identificarlo en las biopsias hepáticas son las siguientes:

a) Técnicas inmunohistoquímicas:

Con la técnica de inmunofluorescencia los hepatocitos con HBcAg suelen dar una fluorescencia nuclear ^(111,195,198,244,321), o citoplásmica, o mixta ^(111,360). Esta técnica está dejando de ser usada para detectar dicho antígeno siendo la inmunoperoxidasa el método que más se utiliza actualmente para su identificación ^(213,251,446).

La expresión morfológica del antígeno core en los hepatocitos se comentará con más detalle

en el apartado del estudio de inmunohistoquímica.

b) Microscopía electrónica (características ultraestructurales):

El antígeno core, en las secciones ultrafinas, se suele visualizar en los núcleos de las células hepáticas como partículas aproximadamente de 20 nm (20-25 nm) ^(169,195,223,225 446,501). En algunas series se comenta el reconocimiento de dichas partículas también en el citoplasma ^(195,387,501), y a veces en relación con el antígeno de superficie en el interior del retículo endoplásmico ^(225,382).

- **DNA viral:** Este marcador en el tejido hepático no se suele identificar con las técnicas habituales. Los avances en biología molecular han sido los que han permitido demostrarlo.

El método de hibridación molecular, al igual que ha conseguido detectarlo en el suero, también lo ha podido poner de manifiesto a nivel tisular ^(41,59,254,367,505).

El DNA-VHB hístico suele hallarse en pacientes portadores crónicos de HBsAg con DNA viral sérico ^(41,159,486). En ocasiones, este marcador no se demuestra en el suero, especialmente, cuando el DNA vírico se encuentra en forma integrada en los hepatocitos ^(57,160); e incluso el genoma del virus B se ha detectado en biopsias de enfermos sin ningún marcador del VHB ⁽³⁶⁷⁾.

A veces, el DNA-VHB tisular se objetiva en pacientes con anticuerpos antiantígenos del virus de la hepatitis B, y sus muestras hepáticas expresan un daño hepatocelular tipo hepatitis crónica o bien un hepatocarcinoma ^(42,56,58,159,160,367,445).

El DNA del virus B muestra, a nivel hepatocitario, dos patrones de expresión morfológica: la forma libre o episomal (DNA superenrollado, DNA replicativo intermedio), suele ir asociada a sueros HBeAg positivos, e indica infectividad alta y enfermedad hepática con actividad inflamatoria ^(29,41,58 67,159,160,254,295,327,408,505). En los casos en que la forma libre del DNA viral es representada por la de tipo DNA superenrollado, se ha observado que la presencia del HBeAg sérico puede ser negativa, siendo la replicación viral mínima y se correlacionaría con una enfermedad hepática quiescente. Este tipo de DNA vírico podría ser el factor iniciador de la recurrencia de la infección viral en pacientes con tratamiento antiviral, dado que su persistencia en el tejido hepático ha sido demostrada en biopsias hepáticas post-tratamiento ⁽⁵⁰⁵⁾.

La forma libre o episomal es evidenciada, predominantemente, en el citoplasma hepatocitario, se aprecia tanto en hepatitis crónica como en hepatocarcinomas ^(41,58,159,254,295,327,466,505), y suele estar relacionada con necrosis lobulillar intensa ^(295,332,486).

El otro patrón, en que se ha encontrado al DNA-VHB a nivel hepatocelular, es la forma integrada. Suele ir asociada a sueros AntiHBe positivos, y en una proporción pequeña se detecta en pacientes con presencia de HBeAg sérico ^(29,57 59,159,160,200,327,408,466).

El DNA vírico integrado ha sido demostrado en hepatocarcinomas (hallazgo que sugiere que el virus B puede ser un factor causal en el desarrollo de la neoformación), en hepatocitos no tumorales adyacentes a la lesión neoplásica, y en hepatitis crónica ^(58,59,159,160,466).

El DNA del virus B, cuando se detecta en biopsias hepáticas, casi siempre va unido a la

presencia de otros marcadores virales: HBsAg y HBcAg, predominantemente con éste último ya que ambos son indicadores de replicación viral ^(41,67,200,295,314,327).

A.4.- Métodos de identificación del VHD.

El virus delta, como el virus B, se reconoce por la determinación de los marcadores virales en suero y en las células hepáticas.

*** Marcadores serológicos.**

Serológicamente la infección delta puede ser difícil diagnosticarla debido a la duración breve de los marcadores virales en el suero y/o a la respuesta variable del sistema inmune del huésped. A esto se añade el uso, todavía, no muy generalizado de tests diagnósticos de mayor sensibilidad dado el coste elevado que supone su puesta en funcionamiento ^(130,208).

La detección de los marcadores séricos también difiere en función de si el virus delta se ha adquirido simultáneamente con el virus B (coinfección), o en cambio afecta a portadores crónicos B (sobreinfección):

- **HDAg:** este antígeno en la forma clínica de coinfección se suele hallar en la fase inicial de la infección aguda y persiste 1 ó 2 semanas. El método de enzimoimmunoanálisis (ELISA) usando anticuerpos Antidelta obtenidos de sueros humanos es el que revela mayor sensibilidad ⁽⁹⁷⁾.

Su demostración sérica cuando el virus delta actúa como sobreinfección viral, es más infrecuente ya que se suele encontrar en forma de inmunocomplejos. Por dicho motivo se emplea la técnica de inmunoblot, cuya sensibilidad y utilidad es similar al método de hibridación molecular para la identificación del RNA-delta ^(34,74).

- **RNA-VHD:** en la coinfección el genoma viral se detecta en el estadio inicial (primera semana). Su demostración es transitoria y paralela a la del antígeno delta.

Su presencia en muestras séricas obtenidas a partir del segundo mes de la enfermedad es indicativo de cronicidad. Su negatividad no implica siempre resolución de la infección, hay casos de progresión a hepatitis crónica con RNA delta sérico negativo ⁽⁷⁶⁾.

En los casos de sobreinfección, el RNA-VHD se sigue detectando tras la fase aguda de la infección, siendo la expresión de la presencia tisular del antígeno delta ^(72,183,422).

La técnica de hibridación molecular (spot hibridación) es la utilizada para la detección sérica del RNA delta, es un método de gran sensibilidad: en un 80% de casos hay una estrecha correlación con el antígeno delta hístico ^(126,197,359,422).

-- Estos marcadores, HDAg y RNA-VHD, son representativos de la fase activa de la infección delta, pero todavía hay limitaciones para ser usados como únicos parámetros serológicos de la presencia del virus delta. Por ello el diagnóstico sérico se realiza en base a la determinación de los anticuerpos Antidelta:

- **Ac Antidelta:** en la forma clínica de coinfección, su identificación en el suero suele depender del tiempo que permanezca el HDAg en la sangre, y en función de éste el Ac Antidelta se detectará a los 10 ó 15 días, siempre de forma transitoria, del tipo Antidelta totales, y con títulos bajos que persistirán unas pocas semanas tras la negativización del HBsAg sérico y del fin de las manifestaciones clínicas de la hepatitis aguda ^(375,409). El anticuerpo Antidelta tipo IgM siempre revela niveles bajos (media 1/200), y raramente se evidencian del tipo IgG, y cuando se objetivan su positividad no dura mas allá de 1 ó 2 años tras la resolución de la hepatitis aguda, a diferencia de los AntiHBs de la hepatitis B.

La evolución variable, de los marcadores séricos de VHD hace imprescindible la realización de análisis séricos seriados desde el inicio de la infección aguda hasta algunas semanas posteriores a la resolución de la misma, con el objetivo de no identificar al virus B como único agente etiológico de la hepatitis aguda ^(20,424).

Si clínicamente se trata de una sobreinfección, el diagnóstico sérico es menos problemático, el Ac Antidelta total y del tipo IgM muestran títulos altos y mantenidos, indicando una actividad inflamatoria intensa ^(21,147,375). Posteriormente el anticuerpo será de tipo IgG, alcanzará niveles altos y reflejará cronicidad ^(71,97,147).

Si sólo hay Ac Antidelta tipo IgG en el suero y a títulos bajos, representará infección delta resuelta o inactiva, y si la lesión hepatocelular siguiera siendo activa habría que pensar en otra etiología ⁽¹⁴⁷⁾.

* - En términos generales el diagnóstico serológico es importante para identificar al virus de

la hepatitis delta y sus marcadores deben ser testados en enfermos con hepatitis B, especialmente en las infecciones agudas con un curso bifásico de las alteraciones bioquímicas, en áreas donde el virus delta es endémico ⁽¹⁴⁸⁾, en casos de portadores crónicos B pertenecientes a grupos de riesgo ⁽³⁰⁰⁾, o en portadores B asintomáticos con pruebas hepáticas alteradas ⁽²¹⁾, y siempre que la evolución de la infección B, aguda o crónica, conlleva un curso rápidamente progresivo y/o fulminante ⁽³⁹⁸⁾.

--- El virus delta se ha observado que afecta a los marcadores serológicos del VHB: unas veces inhibiendo parcialmente la replicación vírica B, otras disminuyendo los títulos del HBsAg o provocando aclaramientos temporales de dicho antígeno ^(109,148 163,247,278), que en casos de coinfección si el efecto de inhibición es intenso puede provocar un aclaramiento precoz del HBsAg y la hepatitis aguda viral no ser filiada de etiología B, sobre todo si los análisis séricos no determinan el AntiHBc de tipo IgM ni el anticuerpo Antidelta ^(82,120).

En cambio la infección delta raramente termina con el estado de portador crónico B, e incluso en estos pacientes se ha documentado la coexistencia de los marcadores serológicos e hísticos de ambos virus (no sólo los que identifican su presencia como el HBsAg, el Ac Antidelta y el HDAg tisular, sino también los que implican replicación viral como HBeAg, DNA-VHB, RNA-VHD y HBcAg tisular) ^(30,62,78,81,146,240,454), así como la falta de inhibición de la síntesis de los polipéptidos relacionados con la envoltura externa del virus B ^(206,255,453). Aunque, también, hay resultados de otras series que sí sugieren que exista una cierta acción supresora del virus delta sobre la replicación viral B, o bien que haya una asociación con infección viral B en fase no replicativa o en fase de replicación mínima del VHB (infección B inactiva) ya que expresan una mayor frecuencia de infección delta en enfermos portadores

de HBsAg con anticuerpos AntiHBe (+) que en aquellos con HBeAg (+) sérico (31,75,83,100,148,149,201,247 271,312,337,377,385,421); e incluso en el transcurso de la infección delta puede realizarse una seroconversión completa del sistema antigénico "e" (HBeAg → AntiHBe) en un tiempo relativamente corto ⁽³⁹⁸⁾, así como producirse una pérdida, a veces transitoria, del DNA vírico ^(167,247,253) o del HBsAg con desarrollo posterior de su anticuerpo AntiHBs ^(163,300), o bien apreciarse positividad escasa o una ausencia del DNA-VHB y del antígeno core en muestras hepáticas que son, a su vez, positivas para el HDAg hístico ^(75,136,231,255,337,398,486,503).

* Marcadores tisulares.

La demostración directa de infección delta se realiza con la identificación del antígeno delta y del RNA-VHD en biopsias hepáticas.

El antígeno delta no se suele reconocer en los hepatocitos teñidos con las técnicas de tinción habituales, aunque Moreno et al visualizaron en las muestras hepáticas de dos enfermos inmunodeprimidos y concretamente en los núcleos hepatocitarios una imagen similar a la evidenciada en los núcleos con antígeno core, denominada "núcleo arenoso" ("sanded") y confirmaron que al realizar técnicas de inmunohistoquímica y de microscopía electrónica correspondía al HDAg y no al HBcAg del virus de la hepatitis B. Opinan que este rasgo óptico se debe a una replicación viral elevada y consecuentemente a un exceso del antígeno delta ⁽³⁰⁸⁾.

Las siguientes técnicas especiales facilitan la detección del virus delta en el tejido hepático:

a) Métodos inmunohistoquímicos:

Entre éstos tenemos la técnica de inmunofluorescencia. Esta puso de manifiesto la existencia del sistema antigénico delta/antidelta ⁽³⁷⁰⁾. Pero el uso de las técnicas de inmunoperoxidasa ha motivado que sea cada vez menos utilizada, ya que en comparación con ellas ofrece más inconvenientes que ventajas ^(187,430).

La utilización de técnicas de doble ^(240,503) y de triple inmunotinción ⁽¹⁴⁶⁾ han incluso revelado la coexistencia de marcadores del VHB (HBsAg y HBcAg) y del VHD en la misma muestra tisular, aunque la presencia simultánea en un mismo hepatocito es poco frecuente correspondiendo la tinción nuclear al antígeno delta y la positividad citoplásmica al HBcAg o al HBsAg.

Otra técnica, la hibridación molecular, ha permitido detectar el RNA del virus de la hepatitis delta no solamente a nivel sérico (como ya hemos comentado) sino también en el tejido hepático ^(197,318).

b) Microscopía electrónica (características ultraestructurales):

Las células hepatocitarias con antígeno delta revelan, en las secciones ultrafinas, la existencia a nivel del núcleo de estructuras granulares irregulares de 20-30 nm de diámetro y en disposición difusa o en grupos ^(80,239), así como de cuerpos de inclusión compuestos de una sustancia amorfa y estructuras microtubulares de 10-20 nm de diámetro ⁽⁵⁰³⁾ asociadas estrechamente con los gránulos irregulares antígeno delta positivos. Este hallazgo es más específico de infección delta ya que los gránulos irregulares se han hallado en estudios hepáticos de enfermos con hepatitis crónica HBsAg negativo ⁽⁸⁰⁾ y en núcleos de hepatocitos

antígeno delta negativo ⁽²³⁹⁾.

En el citoplasma a veces se detectan las estructuras granulares y se suelen encontrar libres o en relación con ribosomas ⁽²⁴⁰⁾.

En trabajos experimentales en chimpancés portadores del virus B e infectados con el agente delta se han identificado otros rasgos en el citoplasma como: proliferación de retículo endoplásmico, estructuras tubulares y/o agregados microtubulares ^(181,230,417). Estas características son inespecíficas ya que también se aprecian en hepatitis no A no B ("C").

B.- HISTORIA NATURAL Y ESTUDIO HISTOLOGICO.

B.1.- Hepatitis B.

El virus de la hepatitis B, como ya hemos reseñado, puede causar una hepatitis aguda que en la mayoría de los casos muestra un aclaramiento del HBsAg al resolverse la enfermedad; pero en un porcentaje bajo puede existir una evolución a la cronicidad con persistencia del virus (portador de antígeno de superficie sérico (+)) ⁽²³⁸⁾.

Entre los factores que predisponen a la cronicidad se encuentran la edad, el sexo y el estado inmunológico: se ha observado que la probabilidad de ser portador crónico de HBsAg es mayor cuanto menor sea la edad que se tenga al adquirir la infección ⁽²³⁸⁾ y, también se ha objetivado que el estado de portador se asocia con más frecuencia a pacientes varones que a mujeres, así como a individuos con un sistema inmune deprimido como los enfermos

oncológicos, dializados, con síndrome de Down etc..^(18,140,154,209,236,413).

Numerosos estudios existen sobre la infección por el virus de la hepatitis B y, en ellos, a los portadores de HBsAg se les suele considerar de dos maneras: o asintomáticos o con enfermedad hepática crónica, dependiendo de sus características clínico-bioquímicas, del estado de replicación viral y de las lesiones hepáticas. Se ha observado que no hay límites netos de separación entre ambas categorías y se ha sugerido que podrían tratarse de formas evolutivas en la historia natural de la infección persistente por dicho virus ⁽²¹⁴⁾:

I) Portador asintomático o sano de HBsAg.

Se trata de personas supuestamente sanas que son identificadas como portadores de HBsAg en estudios rutinarios o por donaciones de sangre.

Esta población se caracteriza por presentar una clínica y bioquímica normal. Inmunológicamente estos individuos son HBeAg, DNA viral y DNA polimerasa negativos a nivel sérico, y en ellos sólo se detecta el anticuerpo AntiHBe ⁽¹³⁾; también se ha demostrado la existencia de cantidades pequeñas de DNA viral integrado en el genoma de los hepatocitos ^(57,408). A veces suelen mostrar una sintomatología mínima e inespecífica (astenia o debilidad), la cual puede ser debida a otros motivos y no necesariamente a la infección por VHB, así como pruebas de función hepáticas alteradas y presencia de HBeAg sérico o de marcadores históricos de replicación viral ⁽²¹⁴⁾.

Los estudios histológicos hepáticos, en la mayoría de los individuos con bioquímica normal

muestran ausencia de lesiones o cambios mínimos, aunque sobre un 2% de los casos las alteraciones hepatocelulares son más importantes ^(121,137,138 154,191,242,265,365,390,419,497). Esta proporción se eleva a un 19% cuando los portadores tienen pruebas de función hepáticas alteradas con lesiones del tipo hepatitis crónica (sobre todo HCP), cirrosis y a veces hepatocarcinoma ^(17,121,137,138,154,242,265,348 365,388,390,419,490,497). Otro rasgo hallado con relativa frecuencia es la presencia de hepatocitos esmerilados especialmente, aunque no siempre, en biopsias hepáticas normales ^(121,138,198,242,437).

De los estudios de seguimiento de pacientes y en los que a su vez se ha realizado control biopsico se puede extraer la conclusión de que la histología, en general, no suele variar con respecto a la inicialmente observada, aunque en ocasiones se aprecia un empeoramiento del daño hepático e incluso con desarrollo final de hepatocarcinoma ^(121,137,138,154,242,419,447).

--- Ante este grupo de portadores de HBsAg la actitud a seguir es la realización de controles clínico-bioquímicos (incluida la detección de alfafetoproteína) y determinaciones séricas de los marcadores virales, con una periodicidad semestral o anual (o incluso bianual); y reservar la indicación de la biopsia hepática para cuando exista alguno o varios de los criterios siguientes: pruebas de función hepática alteradas persistentemente (siendo la hipertransaminasemia la más importante, seguida de la prueba de retención de BSP), hepatomegalia, estigmas hepáticos, y presencia sérica de anticuerpos Antidelta ^(21,138,236,242,418,437,490,497).

El sistema antigénico "e" sérico en los portadores de HBsAg asintomáticos es difícil considerarlo como indicador real de hepatitis crónica o como marcador pronóstico dado que

la negatividad del HBeAg o la positividad del AntiHBe en el suero no siempre implica ausencia de enfermedad hepática crónica ^(121,137,138,490).

II) Portador de HBsAg con enfermedad hepática crónica.

Este grupo de pacientes se caracteriza clínicamente por presentar una sintomatología mínima e inespecífica como fatigabilidad, anorexia o dolor abdominal, e incluso pueden estar totalmente asintomáticos. Algo similar ocurre con los signos físicos, no hay presencia de ellos y si existen son hepatomegalia (asociada o no a esplenomegalia), o ascitis entre otros. En general se trata de una enfermedad clínicamente inaparente en la mayoría de los casos ⁽²⁰⁹⁾.

Las pruebas bioquímicas ponen de relieve la existencia de niveles alterados de transaminasas, siendo los de la GPT más elevados que los de la GOT y la razón entre ellas (GOT/GPT) es < 1.0 y estos valores son cada vez más altos a medida que el daño hepatocelular es más importante ^(140,209,494). Las cifras de otras enzimas hepáticas son usualmente normales excepto en los casos de cirrosis o de hepatitis crónica de actividad inflamatoria intensa.

Los marcadores virales séricos que suelen existir en estos pacientes son los relacionados con la replicación viral: HBeAg/AntiHBe, DNA viral y actividad DNA polimerasa.

Estos portadores no tienen todos la misma lesión hepática, para un diagnóstico preciso de las alteraciones morfológicas se requiere la realización de una biopsia, la cual nos permite obtener un diagnóstico cuali y cuantitativo, así como etiológico ^(46,403,406,425,487,493). Para que

el diagnóstico sea aceptable es necesario que la toma biopsica tenga un tamaño adecuado, se estima como válida, una longitud mínima de 1.5 cm como mínimo ⁽⁴⁰⁶⁾, o bien que se observen, al menos tres espacios porta ⁽⁹⁹⁾; estas medidas es necesario tenerlas en cuenta para evitar que pueda producirse un error de muestra, ya que las alteraciones histológicas de la hepatitis crónica se caracterizan por la irregularidad de su distribución en el tejido hepático.

A continuación se comentará el diagnóstico histológico cuali y cuantitativo y, el análisis etiológico se discutirá en el apartado correspondiente al estudio inmunohistoquímico:

a) Diagnóstico cualitativo.

Se basa en la clasificación morfológica de la hepatitis crónica admitida por la Clasificación Internacional y por la Asociación Internacional para el estudio del Hígado y el Centro de Fogarty ^(122,257) y que, como ya hemos citado, se subdivide en dos tipos:

1.- Hepatitis crónica persistente (HCP).

Su histología viene caracterizada por: a) una arquitectura tisular intacta; b) un infiltrado inflamatorio portal con c) conservación de la limitante; y d) una presencia de necrosis focales intralobulillares. A veces puede haber fibrosis portal mínima ⁽¹²²⁾. En la Clasificación Internacional ⁽¹²²⁾ se incluyó en el concepto de HCP una "necrosis erosiva leve". Actualmente, estos casos se tienden a encuadrar como hepatitis crónica con actividad inflamatoria leve o como hepatitis crónica con necrosis erosiva leve (HCP/HCA "borderline")

^(40,425), ya que además su pronóstico es incierto y probablemente menos favorable que una HCP sin ningún grado de necrosis erosiva. Los fenómenos anteriormente citados (a, b, c y d) son los que se valoran para conocer la actividad inflamatoria y la distorsión arquitectural, pero resultan difícilmente medibles en un corte histológico. Por ello se recurre a métodos de valoración semicuantitativa. Esto se comentará más ampliamente en el apartado correspondiente al diagnóstico histológico cuantitativo.

La imagen histológica de la HCP es inespecífica: hay otras entidades que pueden simularla como una hepatitis aguda residual, una infiltración por un proceso linfoproliferativo, o la cirrosis biliar primaria en sus estadios iniciales, por ello hay que tener cuidado al emitir dicho diagnóstico. También, es importante valorar el error de muestra si la toma biopsica obtenida es pequeña, así como conocer si ha habido un tratamiento previo con inmunosupresores ya que HCA tratadas pueden mostrar mejoría histológica y ser informadas erróneamente como HCP ^(23,403,425).

El pronóstico de este cuadro microscópico es el de no progresión hacia hepatopatías más desestructurantes y graves (cirrosis) ^(99,122,134,301,322,396,488). A veces se ha objetivado una progresión a HCA y a cirrosis, estimándose alrededor de un 10-15% el porcentaje de casos con dicha evolución ^(12,23,54,99,129,134 140,152,301,322,396,477); se ha sugerido que esta forma evolutiva más agresiva se podría justificar en ocasiones por el error de muestra, en otras porque realmente no se trataran de HCP sino que fueran HCA tratadas, y otra opinión dada es la referida a que estas biopsias corresponderían a las diagnosticadas como hepatitis crónica "borderline" y como ya hemos citado su pronóstico es incierto y para conocerlo es necesario un seguimiento clínico y la realización de biopsias en el momento en que se detectara alguna

alteración clínico-bioquímica ^(54,322 411,425).

En general, la HCP tiene un buen pronóstico: Weissberg et al realizaron un estudio en un grupo de 379 pacientes con hepatitis crónica B con el objetivo de conocer las curvas de supervivencia de los mismos en base a su patología hepática, y observaron que para enfermos con HCP la supervivencia media a los 5 años era del 97% ⁽⁴⁹³⁾.

La evolución ocasional hacia formas más activas (HCA o cirrosis) aconseja que estos pacientes tengan un seguimiento clínico-bioquímico.

2.- Hepatitis crónica activa (HCA).

Los rasgos diferenciales de este tipo de hepatitis observados en el tejido hepático son: a) una variable distorsión arquitectural con fibrosis periportal o septal; b) un infiltrado inflamatorio portal y periportal; c) una permanente necrosis en la interfase (necrosis erosiva de la limitante); y d) un grado variable de necrosis intralobulillar. La HCA presenta una actividad inflamatoria desigual, y por ello se habla de tres subcategorías que cumplen los requisitos de HCA dados por De Groote et al ⁽¹²²⁾, y Bianchi et al ⁽³⁷⁾: leve, moderada e intensa. El objetivo de esta clasificación es conocer mejor su pronóstico, y, especialmente, facilitar la selección de los pacientes y, de esta forma, poder instaurar en cada grupo de enfermos las pautas terapéuticas más adecuadas. Las características ópticas citadas (a, b, c, d), como ya hemos referido en la HCP, se valoran de forma semicuantitativa lo que se comentará con más detalle al hablar del diagnóstico histológico cuantitativo.

La evolución más aceptada de este tipo de hepatitis crónica es una progresión lenta hacia la cirrosis y a veces con el desarrollo de hepatocarcinoma ^(123,135,140,151,301,351,477,487), y esta posibilidad evolutiva es más frecuente cuando existe una actividad inflamatoria intensa y/o presencia de puentes de necrosis ^(152,266,323). A veces, una regresión espontánea o provocada por el tratamiento de la HCA todavía es posible ^(135 151,154,323,487).

En el trabajo de Weissberg et al, referido al comentar la HCP, se expone que la supervivencia a los 5 años para la HCA se estima en un 86 % ⁽⁴⁹³⁾.

b) Diagnóstico cuantitativo.

Para valorar con mayor precisión las lesiones morfológicas (necrosis, inflamación, fibrosis) de la hepatitis crónica se han desarrollado tests diagnósticos semicuantitativos con la finalidad de apreciar con más exactitud el grado de daño hepatocelular existente en un estudio biopsico y los cambios histológicos que se puedan dar en controles posteriores, así como para valorar la eficacia de los ensayos clínicos con diversos agentes terapéuticos.

En 1981, Knodell et al, como ya hemos citado, crearon un índice de actividad histológica (IAH)⁽²³⁷⁾, y su uso se generalizó, realizándose simultáneamente con el diagnóstico histológico cualitativo convencional ⁽¹²²⁾, obteniéndose así una información diagnóstica más objetiva y reproducible.

El IAH de Knodell et al cuantifica conjuntamente la categoría de fibrosis con los otros parámetros, esto es, la necrosis y la inflamación, y ello puede causar confusión, dado que

especímenes hepáticos con distorsión arquitectural importante con o sin cirrosis muestran valores del índice total bajos si la actividad inflamatoria es leve ⁽²⁷⁰⁾.

Para evitar estos posibles errores diagnósticos, Scheuer, en 1991, desarrolló un índice semicuantitativo de valoración de las lesiones histológicas en dos categorías: los factores de necrosis erosiva e inflamación portal dentro del concepto de "actividad portal/periportal", y la necrosis e inflamación en el lobulillo como "actividad lobulillar" e incluye dentro de ésta la lesión de puentes de necrosis, parámetro morfológico que era tenido en cuenta en la evaluación de la necrosis erosiva dentro del IAH de Knodell et al ⁽²³⁷⁾. Un índice de características similares ya había sido utilizado en la valoración de la histología de la hepatitis delta ⁽²⁷⁷⁾, pero éste no cuantificaba la fibrosis, parámetro que Scheuer sí estudia, si bien como categoría separada y valorada con independencia de las otras dos. De esta manera, en el diagnóstico definitivo se precisa, de una forma más clara, la actividad necroinflamatoria y los efectos de dicha actividad, es decir la fibrosis, la distorsión arquitectural y el desarrollo de cirrosis ⁽⁴⁰⁵⁾.

Lau et al, en trabajos recientes realizados sobre la infección crónica por el virus de la hepatitis delta, han usado para determinar la actividad histológica un índice derivado de la valoración de tres parámetros: inflamación lobulillar, inflamación de espacios porta, y necrosis erosiva. El factor fibrosis, al igual que en el índice de Scheuer, es evaluado independientemente, dado que lo consideran como la consecuencia de un daño inflamatorio previo más que un indicador de lesión activa hepatocelular actual ^(253,255).

B.2.- Grupos serológicos con características propias:

B.2I.- Portadores o no de HBeAg (seroconversión AntiHBe).

En las infecciones crónicas B, el sistema "e" es importante: el HBeAg al ser un marcador de replicación viral refleja una mayor infectividad sérica, una actividad inflamatoria a nivel hepatocelular más intensa, y a su vez unos valores de transaminasas altos (fase "replicativa"). Su desaparición (seroconversión AntiHBe, fase "no replicativa") se acompaña de una pérdida de infectividad sérica, de una disminución de la bioquímica hepática, y en general de una evolución quiescente; lo que no se ha podido apreciar es una implicación pronóstica en relación a la lesión hepática ^(211,271,320,363);

Existen situaciones en las que a pesar de la presencia de AntiHBe en el suero sigue persistiendo el daño hepático, y en éstas se ha evidenciado DNA viral sérico y/o HBcAg tisular indicando la existencia de un nivel bajo de replicación viral (fase de "replicación mínima") ^(36,50,63,107,200,291); gracias a los avances de la biología molecular se han objetivado variaciones genéticas en el genoma viral (mutaciones en la región pre core) implicadas en la formación y liberación del HBcAg, siendo este hecho una posible explicación de los casos que se encontrarían en fase de "replicación mínima" ^(5,47,84).

El "periodo ventana" entre la pérdida de HBeAg y la aparición del AntiHBe suele exceder en más de un mes, a veces años y en general siempre es más largo que el objetivado en una hepatitis aguda ^(262,263).

La seroconversión va precedida de cambios histológicos y de un alza en los valores de transaminasas (exacerbaciones) sobre todo cuando es un aclaramiento espontáneo ^(262,264,410,432).

La tasa anual de aclaramiento del HBeAg en portadores crónicos se encuentra, aproximadamente entre un 10 y un 25 % ^(17,153,211 263,271,432).

B.2II.- Portadores de virus de la hepatitis delta.

La hepatitis por virus de la hepatitis delta se caracteriza por presentar una clínica y una expresión morfológica variada como consecuencia de que siempre tiene que ir unida a la infección por el virus de la hepatitis B, y dependiendo de las condiciones en que se realice dicha asociación la patología hepática desarrollada será diferente ^(27,68,94,368,369).

De los distintos estudios de investigación de nacionalidades diversas se ha objetivado que los especímenes hepáticos de los enfermos con hepatitis por VHD no revelan ningún rasgo microscópico característico a diferencia de otras hepatitis virales ^(69,94,179,180,231,240,398,482). Se suele definir por: a) ampliación portal debido a la presencia de infiltrados inflamatorios linfoplasmocitarios con macrófagos y ocasionales leucocitos polimorfonucleares neutrófilos; b) grados variables de necrosis e inflamación lobulillar; y c) fenómenos de emperipolesis (linfocitos y hepatocitos con antígeno delta especialmente ²⁴⁰).

En algunas series de hepatitis delta se han descrito algunos hallazgos ópticos peculiares pero inespecíficos: en las muestras biópsicas de la hepatitis fulminante epidémica de Venezuela se encontró esteatosis microvesicular con necrosis importante ⁽³⁴⁹⁾; y Rizzetto et al describieron un cambio degenerativo eosinófilo en los hepatocitos no relacionados con la celularidad inflamatoria ⁽³⁷⁷⁾. Estas características son comentadas en diversos trabajos morfológicos ^(66,181,231 240,258,316,318,385,398,482).

En los estudios revisados se aprecia que la infección delta suele ir asociada, con más frecuencia, a un deterioro hepático importante. Los casos aportados en que la hepatitis delta cumple los requisitos de HCP o cambios mínimos suelen ser escasos ^(69,95,186,370,377,385,430,482).

--- Tras estos comentarios generales, hablaremos a continuación de la morfología de la infección por el virus delta en función de los dos patrones clínicos de la misma:

I) Coinfección B y D (Adquisición simultánea de ambos virus).

Su evolución habitual (alrededor del 90% de los casos) es el restablecimiento completo con el aclaramiento de los dos virus, siendo su histología la típica de una hepatitis viral aguda ^(83,94,167,202,278,421).

Tampoco es infrecuente el desarrollo de una hepatitis fulminante que, a veces, llega a ser mortal ^(83,94,167,178,179,375,424).

El curso evolutivo más raro, en estos individuos, es la progresión a una hepatitis crónica B y delta. Se estima entre un 5 y un 10% los que quedan como portadores crónicos de ambos virus. ^(75,167,300,398).

II) Sobreinfección (Hepatitis delta aguda/crónica en portador crónico B).

En estos enfermos lo más frecuente es que experimenten una infección hepática crónica B y delta, de evolución impredecible y no necesariamente uniforme o rápida, y se convertirían,

a su vez, en reservorios de los dos virus. Histológicamente la mayoría de los pacientes presentan HCA y/o cirrosis, y en menor grado, otros tipos de hepatitis crónica (HCP, HCL)^(30,31,62,76,94,148,186,231,247,269,271,277,337,377,385,393).

A veces, la progresión del daño hepático se desarrolla con rapidez, no es raro encontrar estudios biópsicos que tras la infección con el agente delta se evidencia, en un tiempo no muy largo, una evolución hacia una HCA y/o cirrosis e incluso un desenlace mortal ^(77,78,149,180,253,316,337,377,386,398). En ocasiones esto ocurre en pacientes con muestras hepáticas que, previamente al contacto con el VHD, presentan una lesión morfológica del tipo HCP o hepatitis crónica con actividad inflamatoria leve, y cuyo curso evolutivo se ha mantenido estacionario durante periodos de tiempo, a veces relativamente prolongados ^(90,180 316,337,355,377,386).

En algunos casos, el virus delta origina un daño tisular tan intenso que es difícil precisar si previamente existía ya una patología hepática y su presencia sólo serviría para acelerar la evolución de la misma ^(258,398). En otros, la lesión hepatocelular, con o sin desarrollo de cirrosis, representaría la progresión a la cronicidad, en un plazo corto, de la infección delta aguda ^(83,185,482).

Otro curso evolutivo de la hepatitis delta en la infección crónica por el VHB es una hepatitis fulminante (se aprecia entre un 7 y un 20% de los casos, según las series) y su rasgo microscópico será una necrosis hepática submasiva indistinguible histológicamente de una hepatitis fulminante de etiología B o de una no A no B ^(83,94,178,179,424,449).

Otra situación que puede originar, aunque muy ocasionalmente, la infección asociada al virus de la hepatitis delta es una exacerbación clínica transitoria en el curso de la enfermedad hepática de los portadores crónicos B ^(106,260,300,421,450).

Un hallazgo, poco frecuente, en la historia natural de la infección delta es encontrar al VHD como agente causal de una infección sobreañadida en pacientes con hepatocarcinoma de etiología B ^(90,95,103,184,354).

C.- INMUNOHISTOQUIMICA.

C.1.- Hepatitis B.

Como se ha señalado anteriormente, los marcadores tisulares del virus B se identifican mediante métodos histo e inmunohistoquímicos, y por microscopía electrónica. Las características que presentan las biopsias de los pacientes con infección por el virus de la hepatitis B, y que configuran la base para el diagnóstico etiológico del daño hepatocelular existente son referidas a continuación:

- **HBsAg:** la expresión morfológica del antígeno de superficie es a nivel del citoplasma (predominantemente) y de la membrana de los hepatocitos.

En las primeras series, el patrón de tinción citoplásmica se ha definido de diferentes maneras: difuso y homogéneo ^(3,79,225,244 321,361,389,415,416), perinuclear ^(79,244,321,415,416), marginal o en la periferia citoplásmica o borde sinusoidal ^(3,79,225,244,315,361 389,415,416), grumos ^(3,361,462) y cuerpos

de inclusión ^(79,315,389,415,416).

En 1979, Borchard y Gussmann establecen una clasificación de la morfología citoplásmica del HBsAg tisular, la cual incluye las conocidas hasta entonces: marginal (Tipo I), difusa (Tipo II), globular (Tipo III), focal o "spotty" (Tipo IV). Comentan también un Tipo V caracterizado por un patrón globular junto con la presencia de esteatosis hepatocitaria ⁽⁵¹⁾.

En los trabajos posteriores, hay autores que siguen describiendo las expresiones celulares típicas ⁽⁴⁷¹⁾, mientras que otros prefieren la clasificación de Borchard y Gussmann ^(217,219,431,432).

La expresión histológica de los hepatocitos con HBsAg muestra, además, variabilidad en el grado de intensidad de la tinción positiva. En algunos estudios se menciona que puede deberse a la cantidad de material antigénico intracitoplásmico ^(3,446,471).

Alberti et al (en 1975) observaron, en suspensiones de hepatocitos procedentes de casos de hepatitis aguda B, positividad en la membrana hepatocitaria; pero no la encontraron cuando las células hepatocitarias eran obtenidas de casos de hepatitis crónica ⁽⁹⁾. La ausencia de positividad de la membrana en algunas series puede ser la consecuencia del método utilizado para su detección: la identificación del patrón de membrana es más fácil con técnicas inmunohistoquímicas (inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa) que con inmunohistoquímicas ^(3,108,189,219,225,307,325,360,471,501). Con respecto al material biopsico (fijado e incluido en parafina o en congelación), para obtener mejores resultados en la expresión de membrana hepatocitaria del HBsAg, hay divergencia de opiniones según las series.

Otra característica útil para el análisis etiológico es la distribución de los hepatocitos portadores de HBsAg en los especímenes hepáticos. En general, suele ser bastante irregular: las células hepatocitarias positivas se evidencian, o bien en todos los lobulillos, o sólo en algunos; y dentro de éstos no revelan relación con ninguna estructura (venas centrolobulillares o espacios porta) ^(79,315,321,434,446).

Hay estudios que definen dos patrones de distribución lobulillar: uno se trataría de hepatocitos con HBsAg próximos entre sí, a veces con tendencia a formar grupos; y otro, en que se localizarían de forma aislada ^(79,127,198,219,225,251,315,351,361,389,415,416,431,446).

- **HBcAg**: la expresión morfológica del antígeno core es objetivada tanto en el núcleo como en el citoplasma y la membrana celular de los hepatocitos; y, a veces, en ambas localizaciones.

El patrón de tinción nuclear, según las series, se describe como homogéneo o difuso ^(223,225,321), o como granular y de intensidad variable ^(195,198,223,321,360).

Al igual que ocurre con el antígeno de superficie, la positividad tisular del HBcAg puede ser más o menos intensa, y ello parece depender de la presencia mayor o menor de antígeno core en los hepatocitos ⁽²²⁵⁾.

También, la distribución tisular del HBcAg es una característica en el diagnóstico etiológico, y es referida en la literatura como positividad hepatocitaria (nuclear y/o citoplásmica) en gran número de células o únicamente en algunas, y siempre sin relación con ninguna estructura

de la biopsia (similar a la distribución del HBsAg tisular) ^(10,50 190,220,225,325,360,470).

C.2.- Hepatitis Delta.

Los marcadores virales del virus delta son identificados, como ya nos hemos referido previamente, por métodos histo e inmunohistoquímicos, y por microscopía electrónica. Al igual que los del virus B, éstos también presentan unas características que ayudan en la realización del diagnóstico, las cuales son:

- **HDAg**: la expresión morfológica del antígeno delta se ha visualizado, no sólo en el núcleo ^(66,80,90,181,231,239,240 308,349,364,377,482,503), sino también en el citoplasma (aunque de manera más ocasional) ^(90,146,187,240,377,430,482,503), y a veces en ambas localizaciones. En cambio, no se ha conseguido una positividad en relación con la membrana plasmática del hepatocito ⁽²⁴⁰⁾; Stocklin et al identificaron algunos gránulos fluorescentes cerca de la cara interna de la membrana hepatocitaria ⁽⁴³⁰⁾.

El patrón de tinción nuclear puede ser de dos tipos: difuso ^(80,430,503), o finamente granular (a veces limitado a una área pequeña del núcleo) ^(80,90,370,430). Otra observación referida en algunos trabajos es la falta de tinción del nucléolo ^(80,90,187 370,430).

Como en los antígenos del virus de la hepatitis B, la positividad del antígeno delta en la biopsia hepática puede ser evidenciada con una distribución parecida: varios hepatocitos con HDAg dentro de los lobulillos, o apreciarse sólo en alguna célula hepatocitaria ^(187,370,386,430).

- **RNA-VHD:** la determinación tisular de este marcador ha sido realizada más recientemente, por lo que no hay muchos datos sobre las características de su presencia a nivel hepatocitario.

Su expresión morfológica es, predominantemente, nuclear ⁽³¹⁸⁾.

El RNA viral suele detectarse, casi siempre, en muestras hepáticas que, a su vez, expresan positividad intranuclear para el HDAg ^(197,318).

OBJETIVOS

La hepatitis crónica muestra diversas etiologías, siendo la más frecuente como ya hemos mencionado, la hepatitis asociada a virus que es, hoy en día, una de las enfermedades que más afectan a la salud pública y limitándonos a la hepatitis B se ha objetivado que, aunque se trata de una enfermedad autolimitada con aclaramiento de antígenos virales y desarrollo de inmunidad para reinfecciones, entre un 5 y un 10% de individuos con hepatitis aguda clínicamente reconocida evolucionan a la cronicidad ⁽¹⁸⁾ y se estima que más de 300 millones de personas en todo el mundo son portadores crónicos de VHB ⁽⁵⁰⁴⁾. En España el número de portadores se encuentra alrededor del 1% . La hepatitis crónica B revela una asociación con el hepatocarcinoma, hecho que se pudo comprobar por un estudio llevado a cabo en Taiwan que evidenció que en portadores del VHB el riesgo de desarrollarlo a largo plazo es de 223 veces mayor que en personas no portadoras ⁽³²⁾.

Dada la importancia de la hepatitis crónica viral, y especialmente de la hepatitis por virus B se ha planteado realizar un estudio con los siguientes objetivos:

- 1) Analizar las características epidemiológicas y clínico-analíticas de la muestra cuyos estudios biopsicos han sido seleccionados.
- 2) Conocer si la práctica de tomar biopsias hepáticas aporta hallazgos importantes desde el punto de vista histológico (cualitativa y cuantitativamente), y a su vez, si éstos podrían servir como parámetros necesarios junto a los criterios diagnósticos clínico-bioquímicos y

serológicos en el seguimiento prolongado de estos enfermos.

3) Identificar a nivel tisular los marcadores séricos, antígeno de superficie (HBsAg) y antígeno core (HBcAg), del virus de la hepatitis B (VHB) en material de parafina con la utilización de técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas y determinar correlaciones con parámetros histológicos y serológicos.

4) Realizar un estudio morfométrico de los hepatocitos con positividad tisular para el HBsAg con el fin de :

a) Valorar los rasgos que pueden diferenciarlos del resto de la población hepatocitaria.

b) Observar si su presencia influye en la lesión histológica de las biopsias periódicas de un mismo enfermo.

5) Determinar la incidencia del agente delta en nuestros pacientes y realizar su detección tisular en las biopsias hepáticas, dado que la asociación de este agente con el virus de la hepatitis B suele conllevar una evolución clínico-morfológica peor.

MATERIAL Y METODOS

Para realizar este estudio hemos distribuido la presentación de material y métodos en cuatro apartados:

- 1) Descripción de la muestra.
- 2) Inmunohistoquímica: estudio tisular de marcadores virales (virus B y agente delta).
- 3) Morfometría.
- 4) Estadística.

1.- DESCRIPCION DE LA MUESTRA.

1.A.- MATERIAL.

Tras una revisión de los estudios biópsicos con diagnóstico de hepatitis crónica realizados en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital "12 de Octubre" desde Octubre de 1974 hasta finales de Diciembre de 1986 se seleccionaron 130 casos que cumplían los requisitos siguientes:

- a) Parámetros clínico-bioquímicos de hepatitis crónica.
- b) Positividad sérica para algún marcador del virus B.
- c) Un mínimo de dos biopsias correspondientes a un mismo paciente.

Los 130 estudios biopsicos (54 biopsias de diagnóstico inicial y 76 biopsias de control) corresponden a 54 enfermos: 43 varones y 11 mujeres, con edades comprendidas entre los 2 y 66 años (media 21.8 años, DE 15.7 años).

1.B.- METODOS.

- a) Parámetros clínico-bioquímicos.

- Para facilitar la recogida de datos se elaboró una hoja de trabajo individual idéntica para todos los pacientes. Este protocolo (Tabla 1) incluye además de los datos de filiación personal, rasgos epidemiológicos y una relación de síntomas y signos tanto generales como específicamente hepáticos. En él también figuran los parámetros hematológicos y enzimáticos, electroforesis, marcadores del virus de la hepatitis B y del agente delta y los anticuerpos no órgano-específicos. Por último añade el tratamiento realizado y la evolución (juicio clínico).

Toda esta información se consiguió a partir de sus historias clínicas y corresponde

cronológicamente a los momentos de las tomas biópsicas, independientemente de que en este momento estuviera dentro del rango de la normalidad. También se recogió la de los diferentes controles de seguimiento así como la de la última revisión realizada.

- Los parámetros bioquímicos fueron procesados por métodos rutinarios automáticos de laboratorio (Technicon 12/60 Autoanalyzer).

Los anticuerpos no órgano-específicos (antinucleares, antimitocondriales y antimúsculo liso) se detectaron con técnicas de inmunofluorescencia indirecta.

Las proteínas séricas se determinan mediante electroforesis en acetato de celulosa. Son expresadas en gr/dl.

b) Marcadores serológicos del virus de la hepatitis B y del agente delta.

La técnica empleada en la detección de antígenos y anticuerpos, en el suero o plasma de estos pacientes fué un inmunoensayo enzimático (ELISA) comercial de Sorin Biomédica (Saluggia, Italia) para antígeno e (HBeAg) y su anticuerpo (AntiHBe) ETI-EBK, para el anticuerpo antiantígeno de superficie (AntiHBs) ETI-AB-AUK, para el antígeno delta (HDAg) ETI-DELTAK y sus anticuerpos específicos (Antidelta de tipo IgM, Antidelta de tipo IgG) ETI-AB-DELTAK, ETI-DELTA-IgMK; y de Abbott Laboratories (North Chicago, Ill) para antígeno de superficie (HBsAg) con AUSZYME MONOCLONAL, y anticuerpos antiantígeno core (AntiHBc de tipo IgM, AntiHBc de tipo IgG) CORZYME-M y CORZYME.

La determinación cualitativa para HBsAg, HBeAg y HDAg fue una prueba directa y no competitiva tipo "sandwich", como también lo era la del AntiHBs y AntiHBc de tipo IgM. Para AntiHBe, AntiHBc de tipo IgG y AntiHD de tipo IgG fue un ELISA competitivo basado en la captura previa a la fase sólida de HBeAg, HBcAg y de HDAg respectivamente. La detección cualitativa de IgM AntiHD fue un ensayo inmunométrico basado en la técnica de ELISA de "captura" del anticuerpo.

El DNA viral fue testado en los sueros de los enfermos con anticuerpos Antidelta positivos y se realizó utilizando el método de hibridación molecular descrito por Scotto et al ⁽³⁹⁹⁾.

-- Los marcadores víricos séricos fueron correlacionados con varios de los parámetros bioquímicos.

-- Los enfermos portadores o no de HBeAg (seroconversión AntiHBe) han sido estudiados por separado con respecto a los otros pacientes en base a que el sistema antigénico HBeAg/AntiHBe refleja replicación viral y presenta implicaciones pronósticas en la evolución clinicopatológica.

-- Los pacientes con virus de la hepatitis delta han sido analizados solos, con el fin de apreciar mejor sus rasgos clínicos e histológicos y a su vez compararlos con el resto del grupo seleccionado para este trabajo.

c) Estudio histológico.

El presente apartado se basa en el análisis de las 130 biopsias hepáticas obtenidas de los 54 enfermos seleccionados:

(c1) Obtención y procesamiento de las muestras.

Todos los pacientes fueron explorados laparoscópicamente, utilizando para ello un fotolaparoscopio Richard Wolf, y obteniendo la biopsia hepática con aguja de Vim Silverman y en algunos casos con aguja de Menghini. Los cilindros tisulares estudiados eran iguales o superiores a 1.5 cm. de longitud.

Las muestras se procesaron de forma rutinaria: fijación en formol tamponado al 4% e incluidas en parafina y posteriormente cortadas a 4 micras.

Los cortes se tiñeron con técnicas estándar de microscopía óptica en materiales histológicos ⁽²⁴⁾: hematoxilina eosina, tricrómico de Masson, Wilder para reticulina, Pas previa digestión con diastasa, Azul Prusia de Perls para demostración de pigmentos férricos, y orceina de Shikata para detección tisular del antígeno de superficie del virus B (HBsAg).

(c2) Metodología del diagnóstico histológico.

Todos los casos seleccionados fueron revisados en función de la siguiente metodología:

(c2I) Lesiones morfológicas:

Las lesiones elementales microscópicas recogidas al "leer" las preparaciones y cuyo conjunto componen el "complejo lesional" característico, y concretamente en nuestro estudio el de la hepatitis crónica, son las siguientes:

NECROSIS:

- focal/parcheada.
- confluyente: - en puentes
 - multilobulillar
- erosiva ("piecemeal necrosis")

INFLAMACION:

- Portal - aguda - de estructuras
- Lobulillar - crónica
- granulomatosa

FIBROSIS:

- portal
- periportal
- en puentes/septos (completos-incompletos)
- en nódulos

DEGENERACIONES-DEPOSITOS-PIGMENTOS:

- esteatosis

- siderosis
- colestasis
- otros...

La valoración de estos datos y más en concreto de los tres primeros ha sido realizada siguiendo el método desarrollado por Knodell et al, IAH ⁽²³⁷⁾, que consiste en la suma de una puntuación dada a la intensidad de cada uno de los parámetros histológicos que acabamos de citar (Tabla 2).

(c2II) Diagnóstico histológico:

Fue establecido siguiendo los criterios histológicos convencionales:

Hepatitis crónica:

La existencia de una alteración de la función hepática de más de seis meses de duración es preceptiva en una definición de hepatopatía crónica. Con este antecedente la alteración histológica debe poderse encuadrar en cualquiera de los tipos de hepatitis crónica admitidos por la Clasificación Internacional más aceptada ^(37,122):

- Hepatitis crónica persistente (HCP).
- Hepatitis crónica activa (HCA).
- Hepatitis crónica lobulillar (HCL).

La diferencia morfológica viene marcada por la presencia de necrosis erosiva en la HCA, ausencia en la HCP y con respecto a la HCL si es observada se comportará evolutivamente como una HCA, y si por el contrario la limitante es neta y sin erosión o interrupción su tendencia será a la no progresión.

Cirrosis:

Se realizó este diagnóstico cuando la hepatopatía crónica se manifiesta anatómicamente por las tres características que se incluyen en la definición de la OMS ⁽¹⁹⁾: lesión difusa, nodular y fibrosante del hígado. Es decir, existencia de parénquima hepático desestructurado con formación de nódulos regenerativos que sustituyen al lobulillo y se encuentran rodeados por septos o tabiques de tejido conectivo.

(c3) Seguimiento histológico.

Nuestros pacientes tenían de 2 a 4 biopsias repetitivas sobre un periodo de 9 a 93 meses (media 33.98 meses, DE: 17.22 meses).

(c4) Correlaciones con los datos de laboratorio.

(c4I) El estudio histológico ha sido estudiado en relación a los parámetros bioquímicos (transaminasas séricas: GOT y GPT, fosfatasa alcalina (FA) y gammaglobulina) con dos finalidades:

1) Observar si los parámetros bioquímicos muestran o no diferencias en el grupo de hepatitis

crónica de menor actividad inflamatoria (hepatitis crónica persistente, cambios mínimos) con respecto al de mayor actividad inflamatoria (hepatitis crónica activa, cirrosis).

2) Objetivar si los cambios en la bioquímica están o no en correlación con la evolución histológica.

Para el estudio estadístico de esta relación no se han tenido en cuenta los diagnósticos morfológicos que tras la valoración de la actividad histológica de la enfermedad de acuerdo con el Índice desarrollado por Knodell et al ⁽²³⁷⁾, fueron dados de hepatitis crónica "borderline".

(c4II) Una relación similar a la construída con los valores enzimáticos ha sido establecida entre el estudio morfológico y los marcadores víricos séricos.

2.- INMUNOHISTOQUIMICA: ESTUDIO TISULAR DE MARCADORES VIRALES (VIRUS B Y AGENTE DELTA).

2.A.- MATERIAL.

Del material en parafina se hicieron cortes histológicos para el estudio tisular de dos de los marcadores del virus B: HBsAg y HBcAg, y para el agente delta.

La identificación del HBsAg se hizo en:

- 39 biopsias de diagnóstico inicial.
- 58 biopsias de control.

La presencia del HBcAg se determinó en:

- 46 biopsias de diagnóstico inicial.
- 67 biopsias de control.

La detección del agente delta se realizó en:

- 44 biopsias de diagnóstico inicial.
- 61 biopsias de control.

2.B.- METODOS.

Se utilizaron tres técnicas de inmunohistoquímica sobre biopsias hepáticas fijadas en formol tamponado al 4% e incluidas en parafina de la forma habitual (aparato procesador automático (Technicon)):

1.- Inmunoperoxidasa con avidina -biotina- complex.

Se realizó para la identificación tisular del antígeno de superficie (HBsAg).

En todos los casos se usó la técnica de HSU ⁽²²¹⁾, utilizando el anticuerpo policlonal AntiHBs (producido en cabra) a una dilución de 1/500, de la casa comercial DAKOPATTS. El suero

anticabra biotinizado de conejo y el complejo ABC fueron adquiridos de la casa comercial Vector Laboratories Incorporated (Burlingame) California (USA), usándose después a una dilución de 1/200.

La metódica de la técnica fue la siguiente:

- a) Desparafinización en xilol, 2 x 10 mn.
- b) Hidratación: alcohol etílico absoluto, 2 x 5 mn.
alcohol etílico de 96°, 2 X 5 mn.
alcohol etílico de 70°, 2 x 5 mn.
- c) Inhibición de la peroxidasa endógena con 0.5% de H₂O₂ en metanol absoluto, 10 mn. a temperatura ambiente.
- d) Lavado en agua destilada 10 mn.
- e) Lavado en tampón (buffer) TRIS-salino (0.05M), pH 7.4, 3 x 5 mn.
- f) Incubación con suero normal de conejo a dilución 1/20 - 20 mn.
- g) Incubación con antiHBsAg, 30 mn.
- h) Lavado en TRIS-salino, 3 x 5 mn.
- i) Incubación con inmunoglobulina de conejo anticabra, 30 mn.
- j) Lavado en TRIS-salino, 3 x 5 mn.
- k) Incubación con complejo ABC, 45 mn.
- l) Lavado en TRIS-salino, 3 x 5 mn.
- m) Reacción con diaminobencidina (D.A.B.)/H₂O₂, 10 mn.
- n) Lavado con agua destilada.
- o) Tinción de contraste con hematoxilina de Harris, 2 mn.
- p) Lavado en H₂O corriente.
- q) Deshidratación: alcohol etílico de 70°, 5 mn.

alcohol etílico de 96°, 5 mn.
alcohol etílico absoluto, 5 mn.

- r) Aclaramiento con xilol, 5 mn.
- s) Montaje con bálsamo sintético (DPX).

2.- Sistema peroxidasa-antiperoxidasa (PAP).

Esta técnica se realizó para determinar la presencia tisular del antígeno core.

Se utilizó el protocolo de Sternberger modificado por Taylor ⁽⁴⁵¹⁾, usándose el anticuerpo policlonal AntiHBc (producido en conejo) de la casa comercial DAKOPATTS a una dilución de 1/200 realizada en tampón (buffer) TRIS-salino, a pH 7.4 (0.05 M) y con un tiempo de incubación de 30 mn. Las inmunoglobulinas de cerdo anticonejo y el complejo PAP de conejo fueron adquiridos a la casa DAKOPATTS y se emplearon a una dilución de 1/200, durante 30 mn. de tiempo de incubación.

El método PAP es similar al sistema avidina-biotina-complex hasta el paso f, en donde la incubación es con suero normal de cerdo, 20 mn., a 1/20 dilución. Los pasos siguientes son:

- g) Incubación con antiHBcAg, 30 mn.
- h) Lavado en TRIS-salino, 3 x 5 mn.
- i) Incubación con inmunoglobulinas de cerdo anticonejo, 30 mn.
- j) Lavado en TRIS-salino, 3 x 5 mn.
- k) Incubación con complejo PAP de conejo, 30 mn.
- l) Lavado en TRIS-salino, 3 x 5 mn.

El resto, hasta el paso s, fueron similares a los de la metódica avidina-biotina-complex.

Con el fin de aumentar la capacidad de detección del HBcAg y tal como se ha aconsejado en la literatura, previo al paso de la desparafinización se pasó brevemente la sección sobre llama de mechero Bunsen ⁽⁴⁶⁷⁾.

-- En ambas técnicas (1 y 2) las reacciones se realizan a temperatura ambiente y en cámara húmeda (evitando el desecado de las preparaciones) y se usó como cromógeno diaminobencidina cuya preparación es:

- DAB (SIGMA) 10 mgr.
- *TRIS-CIH (0.05 M) pH 7.6 20 ml.
- H₂O₂ (1%) 0.2 ml.

* Su composición es:

Tris (0.2 M) a 24.22 gr/litro 12 ml.

CIH (0.1 M) 19 ml.

H₂O destilada 19 ml.

Controlar el pH. Ajustar a pH 7.6 final .

-- En toda la tanda de inmunohistoquímica se tuvieron como controles positivos casos con

reconocida positividad tisular a ambos antígenos y como controles negativos se sustituyó la incubación del anticuerpo primario por un suero no inmune de conejo o cabra.

3.- Inmunofluorescencia indirecta.

Esta técnica fue empleada para la identificación del agente delta.

Se trabajó según el siguiente protocolo:

- Desparafinización en xilol, 2 x 10 mn.
- Lavado en PBS (pH 7.4), 3 x 5 mn.
- Incubar con 100 microlitros de solución de pronasa, a 37^a C durante 1 hora.
- Lavado con tres cambios de PBS, 20 mn. a temperatura ambiente.
- Antisuero Antidelta-FITC, reconstituido en 2 ml de agua destilada, no necesita ulterior dilución (RAMON CORNET DIAGNOSTICS), 1 hora a temperatura ambiente.
- Montaje en glicerina-glicina.

-- Una vez realizadas las técnicas de inmunohistoquímica se siguió la siguiente metodología:

*) Antígeno de superficie (HBsAg). Se determinó:

a) Patrón de expresión morfológica según la clasificación de Borchard y Gussman ⁽⁵¹⁾.

b) Tipo de distribución: - aislados/grupos (hepatocitos).

- algunos/todos (lobulillos).

c) Cuantificación: 0, +, ++ ó +/+++, +++.

*) Antígeno core (HBcAg). Se valoró:

a) Patrón de expresión morfológica: núcleo/ citoplasma/ ambos.

b) Tipo de distribución: algunos/todos (lobulillos).

c) Cuantificación 0, +, ++ ó +/+++, +++

*) Antígeno delta (HDAg). Únicamente se hizo identificar su existencia:

a) Positivo

b) Negativo

-- La identificación de los marcadores víricos se ha realizado en todas las biopsias especificadas al hablar del material del estudio inmunohistoquímico pero la evaluación de éste, y como ya quedará comentado al tratar de la estadística de este trabajo, solo se ha hecho con los datos obtenidos en la biopsia de diagnóstico inicial y con los correspondientes a la última de control histológico (44 para el HBsAg, 49 para el core tisular, y 46 para el antígeno delta).

-- También han sido estudiados en los especímenes correspondientes a los enfermos de los grupos serológicos con características propias: portadores o no de HBeAg (seroconversión

AntiHBe) y portadores del virus de la hepatitis delta.

-- Los marcadores virales tisulares han sido correlacionados con los resultados del estudio histológico y con los marcadores virales séricos.

3.- MORFOMETRIA.

3.A.- MATERIAL.

Morfométricamente se estudiaron 34 biopsias diagnósticas iniciales y sus respectivas biopsias de control. Se hicieron varios grupos:

- I: Estudios biópsicos que muestran positividad tisular para HBsAg tanto en la biopsia diagnóstica inicial como en la de control: 14 biopsias.

Todos estos estudios corresponden a enfermos con serología positiva para HBsAg.

- II: Estudios biópsicos que no revelan positividad tisular para HBsAg: 13 biopsias.

Once de estas 13 pertenecen a enfermos con serología negativa para el antígeno de superficie.

- III: Estudios biópsicos con detección hepatocitaria del HBsAg en alguna de las biopsias: 7 biopsias.

De éstas, 6 son de enfermos con serología positiva para HBsAg.

3.B.- METODOS.

La determinación cuantitativa de los cambios morfológicos asociados a hepatocitos infectados con virus de la hepatitis B se estableció mediante morfometría de todos los hepatocitos con tinción positiva para el HBsAg, siendo 20 células hepatocitarias el número máximo para la medición. Como control se midieron 20 hepatocitos, no teñidos, elegidos al azar dentro del mismo cilindro.

En los casos sin positividad tisular se midieron 20 hepatocitos.

En las células hepatocitarias medidas se estudió la razón núcleo/citoplasma (N/C) basándose en la superficie (área) del núcleo y del citoplasma; y éstos datos se han correlacionado con los marcadores virales séricos y con las alteraciones histológicas.

Esta metodología fue aplicada a los tres grupos y se contó con la ayuda de un autoanalizador de imágenes modelo MOP-VIDEOPLAN (KONTRON) en el que se aplicó el programa STANDARD SOFTWARE VER 5.41 MLINE 82A.

4.- ESTADISTICA.

La evaluación objetiva de la evolución de la hepatopatía se ha determinado por un estudio comparativo de los parámetros antes citados (bioquímica, serología viral, histología y

marcadores tisulares víricos) obtenidos en el momento del primer estudio biopsico, en el último control histológico y en la última revisión clínica realizada.

Los datos se han expresado en porcentajes o media \pm desviación estándar. Comparaciones entre las medias se realizó aplicando el test de la T de Student mediante el procedimiento de Swinscow^(439,440). La significación de las relaciones entre variables cualitativas se calculó con la aplicación de la prueba de Chi² (Tablas de contingencia 2 x 2) y en algunos casos se hizo esta misma prueba pero con la corrección de Yates⁽⁴⁴⁾.

Para el análisis estadístico, se ha utilizado el paquete de programas estadísticos "Biomedical computer programs BMDP" usándose, dadas las características de las variables, fundamentalmente tablas cruzadas y test de diferencias de muestras.

El papel pronóstico (riesgo de desarrollar cirrosis, mayor actividad inflamatoria y seroconversion AntiHBe) de las variables clínicas (edad), histológicas (IAH de Knodell et al, como los parámetros que lo forman) e inmunohistoquímicas (presencia en el tejido hepático del HBsAg o del antígeno core), ha sido evaluado por el modelo de regresión múltiple de Cox. (Programa PRESTA - Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social - FISS).

Curvas de incidencia de desarrollo de cirrosis o de un mayor daño morfológico sin llegar al estado de cirrosis, fueron realizadas mediante la prueba de Kaplan-Meier.

TABLAS

TABLA 1

N.HISTORIA: N.BIOPSIA (FECHA):

NOMBRE: EDAD:

EPIDEMIOLOGIA.

- TRANSFUSIONES:
- FARMACOS HEPATOTOXICOS:
- OPERACIONES QUIRURGICAS:
- FAMILIARES:
- DESCONOCIDA:

CLINICA.

SINTOMATOLOGIA-SIGNOS.

I.- GENERALES II.- ESPECIFICOS

- | | | |
|-------------|--------------|----------------|
| - Fatiga: | - Ictericia: | I.Hepat: |
| - Astenia: | - HT portal: | Encefalopatía: |
| - Anorexia: | . Varices | Alt.vasculares |
| - Fiebre: | . Ascitis | - spiders |
| | . Esplen. | - telangiec. |
| | | - rubeosis |

BIOQUIMICA.

Citolisis	Colestasis	I.hepática
GOT:	Br.total:	P.totales:
GPT:	F.A.:	Alb.:
Fe:	LAP:	Gamma-globulina:
	LDH:	Protb.:
	GammaGT:	

Leucocitos

Anticuerpos no órgano-específicos (antimitoc. antims.liso):

ETIOLOGIA. Marcadores virales.

HBsAg	AntiHBs	Ag Delta
HBeAg	AntiHBe	Anti-Delta
HBcAg	AntiHBc	

TRATAMIENTO

Medicamentos (Pautas y dosis)

JUICIO CLINICO

TABLA 2**INDICE DE ACTIVIDAD HISTOLOGICA (IAH)****I.- NECROSIS EROSIVA +/- CONFLUYENTE**

A. Ninguna.....0

B. Necrosis erosiva leve.....1

C. Necrosis erosiva moderada (afecta a menos del 50% de la
circunferencia de la mayoría de los espacios porta)...3D. Necrosis erosiva intensa (afecta a mas del 50% de la
circunferencia de la mayoría de los espacios porta)...4

E. Necrosis erosiva moderada más necrosis en puentes.....5

F. Necrosis erosiva intensa más necrosis en puentes
(dos o más).....6

G. Necrosis multilobulillar.....10

II. NECROSIS FOCAL Y DEGENERATIVA INTRALOBULILLAR.

A. Ninguna.....0

B. Leve (cuerpos acidófilos, degeneración balonizante
y/o focos dispersos de necrosis hepatocelular en
< 1/3 de lobulillos o nódulos.....1

C. Moderada (cuerpos acidófilos, degeneración balonizante
y/o focos dispersos de necrosis hepatocelular en < 1/3 -
2/3 de lobulillos o nódulos.....3

D. Intensa (cuerpos acidófilos, degeneración balonizante
y/o focos dispersos de necrosis hepatocelular en 2/3
de lobulillos o nodulos.....4

III. INFLAMACION PORTAL.

A. Ausencia de inflamación portal.....0

B. Leve (algunas células inflamatorias en 1/3 de los
espacios porta).....1

C. Moderada (mayor infiltrado inflamatorio en 1/3 - 2/3
de los espacios porta).....3

D. Intenso (denso infiltrado inflamatorio en 2/3 de los
espacios porta).....4

IV. FIBROSIS.

- A. Ausencia de fibrosis.....0
- B. Ampliación fibrosa portal.....1
- C. Puentes de fibrosis (porto-portales o porto-centrales).3
- D. Cirrosis.....4

NOTA:

El índice de actividad histológica (IAH) es la suma de los 4 parámetros:

IAH \leq 7 HCP

IAH = 8-9 HC "borderline"

IAH > 9 HCA.

RESULTADOS

1.- DESCRIPCION DE LA MUESTRA.

1.A.- Datos clínicos y epidemiológicos.

Se han estudiado 54 enfermos. En todos se disponía de un mínimo de 2 biopsias hepáticas. Los pacientes tenían una edad de presentación con un rango entre 2 años y 66 años, siendo la media de 21.8 años (DE: 15.7 años). Con respecto al sexo, se evidencia un predominio de varones, siendo la relación varón:mujer de 43:11 (4/1).

Una vez revisadas las historias clínicas de estos pacientes, se observó que no había ningún antecedente epidemiológico significativo en 13. Dos enfermos presentaban retraso psicomotor: Síndrome de Down y Síndrome de Rubinstein-Taybi. Varios enfermos mostraban alguno que permitía el poder incluirlos en los grupos de riesgo de hepatitis crónica tipo B: drogadicción intravenosa (9 pacientes) e historia de cirugía y/o transfusiones (12 pacientes). En lo que se refiere a enfermedades asociadas se han encontrado un caso de talasemia beta menor, dos casos de tuberculosis, un caso de diabetes, dos casos de glomerulonefritis membranosa, un caso de acrodermatitis papulosa, y un caso de linfoma más panarteritis nodosa.

Un cuadro clínico previo de hepatitis aguda se registró en 30 casos, mientras que en los restantes o bien no la habían tenido o no la recordaban o bien era un dato no incluido en la

historia clínica.

De los 54 pacientes, 41 no han presentado ninguna sintomatología durante todo el tiempo en que han sido examinados; únicamente 13 enfermos manifestaron tener astenia, anorexia o dolor en hipocondrio derecho, sintomatología inespecífica que en el transcurso de revisiones posteriores ha ido desapareciendo y quedando asintomáticos como la mayoría. Sólo ha habido una excepción, un enfermo que presentó astenia y dolor en hipocondrio derecho, síntoma que no había remitido en las últimas revisiones.

La exploración física fue normal en el 43% de los casos. En el resto el hallazgo más frecuente fue la hepatomegalia (57%), signo constante en todas las revisiones posteriores. Otros cambios exploratorios que se encontraron, en menor proporción, eran: esplenomegalia, arañas vasculares y telangiectasias; éstos fueron observados en enfermos que presentaban un mayor deterioro histológico (hepatitis crónica activa y cirrosis).

1.B.- Laboratorio:

1.BI.- Bioquímica: Resultados generales.

* La determinación sérica de las transaminasas reveló los siguientes datos:

- La valoración de la aspartato-aminotransferasa (GOT=ASAT) ha mostrado niveles superiores con respecto al valor normal (media: 132.8 U/L, DE: 93.4 U/L) (el límite superior de la normalidad, en nuestro laboratorio, es 40 U/L) en 47 pacientes de los 54 en

que se determinó inicialmente y cifras normales en los 7 restantes. Niveles que oscilaron en los análisis realizados en revisiones posteriores; en concreto, coincidiendo con la última toma biopsica GOT ascendida fué encontrada en 39 casos (media: 94.13 U/L, DE:57.02 U/L) (en 35 enfermos estuvo elevada durante todas las revisiones y en los 4 restantes se hizo patológica) y cifras normales en 15 (normalidad mantenida en 3 y en los 12 restantes se alcanzó durante los controles posteriores).

- La alanín-aminotransferasa (GPT=ALAT) apareció ascendida en 48 de los 52 enfermos en que se determinó (media: 234.02 U/L, DE: 163.11 U/L) y los niveles fueron normales en 4 casos (el límite superior de la normalidad, en nuestro laboratorio, es 37 U/L). En un control posterior coincidente con la rebiopsia última se objetivó con respecto a los 48 pacientes, elevaciones mantenidas en 42 pacientes y normalización en 6 casos. En los 4 enfermos cuya cifras se encontraban dentro de la normalidad, hubo elevación en tres. Los dos enfermos en los que no se hizo valoración en el momento de la biopsia diagnóstica presentaban cifras elevadas en controles posteriores (47 individuos con GPT alta, media: 194.13 U/L, DE: 170.79 U/L)

* La fosfatasa alcalina (FA) en suero (los valores normales en nuestro laboratorio son 22-110 U/L para adultos y 140-420 U/L para niños: 2 a 12 años) se determinó en 53 pacientes y fue patológica en 11 (media: 329.73 U/L, DE: 163.33 U/L). En la revisión que coincidía con la última biopsia practicada, la cifra de FA estaba elevada en 6 de los 53 determinados (en 5 las tasas se habían mantenido elevadas y en otro se elevaron) (media 213.17 U/L, DE: 122.20 U/L), y se había normalizado en 5 de los 10 casos con valores alterados inicialmente.

* Otras pruebas de función hepática realizadas han sido las tasas de leucín-aminopeptidasa (LAP), gammaglutamiltranspeptidasa (GGT) y gammaglobulina. Estas pruebas no se encuentran determinadas en todos los pacientes por ello sólo haremos referencia a los enfermos que las presentan en los dos momentos indicados (biopsia inicial- último control biopsico):

- La LAP sérica (rango normal 0-54 U/L). Sus tasas fueron normales en 12 de los 14 en que se hizo la determinación. Posteriormente los valores fueron normales en 11 y patológicos en 3 (1 fue mantenido y otros dos se hicieron elevados).

- GGT sérica (rango normal hasta 50 U/L). Estaba elevada en 11 pacientes de los 39 en quienes se determinó (media: 100.18 U/L, DE: 55.93 U/L). Posteriormente se objetivaron niveles superiores al valor normal en 8 (5 mostraban elevaciones mantenidas y en 3 se hicieron patológicas) (media: 105.5 U/L, DE: 72.93 U/L) y en 31 casos las tasas se encontraban dentro de la normalidad (en 25 fue mantenida y en 6 las cifras se normalizaron).

- Gammaglobulina sérica (rango normal: 0.8-1.6 gr/dl). Este parámetro se estudió en 32 pacientes y se encontró aumentado en 28 (media: 2.37, DE: 0.62 gr/dl). Posteriormente se detectaron niveles superiores en 25 (media: 2.17, DE: 0.53 gr/dl) (de ellos, en 24 eran estables y en uno se elevaron) y dentro de la normalidad en 7 (en 4 se había alcanzado y en 3 se mantenía).

1.BII.- Marcadores virales: Resultados generales.

* Todos los pacientes presentaban algún marcador sérico del virus de la hepatitis B (VHB) (Tabla 3). Inicialmente las determinaciones se hicieron en 52 pacientes, de los cuales 33 eran portadores del HBsAg (Grupo A), y 19 sólo tenían positividad para anticuerpos frente al VHB (Grupo B). En los dos pacientes en que en un primer momento no se realizó la valoración de los marcadores virales, se objetivó positividad para el HBsAg en revisiones posteriores (formarían parte del Grupo A).

Los antecedentes epidemiológicos y las manifestaciones clínicas de ambos grupos se especifican en la Tabla 4.

* El HBeAg fue determinado en 31 pacientes, 19 fueron positivos y 12 negativos. De los 19 enfermos positivos, 18 eran a su vez HBsAg positivo. En el grupo HBeAg negativo: el AntiHBe fue positivo en 6 y negativo en los restantes; y el HBsAg era positivo en 2 de los enfermos HBeAg negativo / AntiHBe positivo y en uno de los enfermos HBeAg negativo / AntiHBe negativo. Los dos enfermos que en una revisión posterior se determinó su positividad para HBsAg, mostraban HBeAg negativo y AntiHBe positivo.

En 2 pacientes existía positividad a la vez para HBeAg y AntiHBe en el momento de la realización de la primera toma biopsica: en uno de ellos la doble positividad no se ha podido interpretar porque en controles posteriores la determinación sérica del HBeAg no fue realizada, aunque en un examen anterior al primer estudio biopsico la valoración del HBeAg fue negativa, por este motivo podría pensarse en un falso positivo. En el otro, un control hecho a los dos meses siguientes y en los realizados con posterioridad, el HBeAg fue siempre negativo, por tanto la doble positividad podría ser entendida como fase anterior a una

seroconversión ya iniciada.

* El sistema antigénico delta/antidelta ha sido valorado en las muestras séricas correspondientes a las revisiones posteriores de estos enfermos dado que el virus de la hepatitis delta (VHD) ha sido conocido más recientemente. Se estudió en 25 de los 54 pacientes, siendo el anticuerpo Antidelta positivo en 6 (dos de ellos presentaban la positividad sérica en el momento en que se realizó la biopsia de control de su patología hepática).

1.BIII.- Marcadores virales séricos - Bioquímica (Gráficos 1, 2, 3 y 4).

Los dos grupos serológicos en que hemos encuadrado a los enfermos de nuestro estudio han revelado alteraciones en los valores bioquímicos (preferentemente a nivel de las transaminasas) tanto en los análisis cuya realización coincidía aproximadamente con la primera toma biopsica (portadores de HBsAg: GOT media 111.31, DE: 101.58, GPT media 187.59, DE: 138.02; grupo con Antiantígenos de VHB+: GOT media 131.68, DE: 81.60, GPT media: 276.22, DE: 200.61) como con los del último control histológico, aunque en éstos los valores siguieron elevados pero en menor proporción (portadores de HBsAg: GOT media 78.53, DE: 66.70, GPT media 181.41, DE: 198.45; grupo con Antiantígenos de VHB+: GOT media 69.75, DE: 37.48, GPT media 154.6, DE: 107.50).

En tres de los parámetros bioquímicos estudiados, no se registraron diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes. Únicamente, se alcanzó la significación estadística en el parámetro FA (los enfermos HBsAg positivo, al ser más jóvenes, revelan cifras de FA altas pero dentro de la normalidad).

1.C.- Histología:

1.CI.- Resultados generales (Gráfico 5).

Las primeras biopsias hepáticas mostraban 16 casos de hepatitis crónica con actividad inflamatoria mínima o moderada ("borderline") $IAH \leq 9$ (3: cambios mínimos, 7:HCP, y 6: hepatitis crónica "borderline"), y 38 casos de HCA con diferentes grados de actividad inflamatoria $IAH > 9$. Inicialmente no hubo ningún diagnóstico histológico de cirrosis.

Con respecto a las características epidemiológicas y clínicas (expresadas en la Tabla 5), se evidencia que el grupo de pacientes con hepatitis crónica con actividad inflamatoria mínima o moderada presenta, en comparación con el otro grupo, los siguientes rasgos diferenciales: edad más joven; menor número de pacientes que por sus datos estarían dentro de los grupos de riesgo; y entre los rasgos clínicos se observa, como diferencia más llamativa, una exploración física normal ya que la hepatomegalia como cambio exploratorio se objetivó en casos aislados y de manera transitoria.

Todos los pacientes han tenido control biopsico durante un intervalo de tiempo entre 9 y 93 meses (33.98 ± 17.22), y éste ha revelado 17 casos de hepatitis crónica con actividad inflamatoria mínima o moderada, 30 casos de HCA, y 7 casos de cirrosis.

Existe una variación en los tipos histológicos registrados inicialmente y en los de seguimiento, los cambios que se evidencian son los siguientes:

* En el grupo de hepatitis crónica con actividad inflamatoria mínima o moderada no hay cambios o tan sólo una variación discreta en la lesión histológica (Gráfico 6) (Figs. 1, 2, 3 y 4). Únicamente hay 3 casos de HCA, los cuales se han desarrollado a partir de una hepatitis crónica "borderline" (IAH 8 ó 9) (Figs. 5 y 6).

El tiempo de seguimiento entre la realización de las biopsias ha sido algo menor en aquellos pacientes con hepatitis crónica "borderline".

* En el grupo de los pacientes con HCA se observa una evolución más importante del daño hepático (Gráfico 7). De 16 enfermos con HCA (necrosis erosiva), uno progresó a una HCA con puentes de necrosis y 5 a una HCA con puentes de fibrosis; de 4 enfermos con HCA (puentes de necrosis), 2 presentaron cirrosis; y de los 18 pacientes con HCA (puentes de fibrosis), uno ha revelado una actividad inflamatoria más intensa y 5 un cuadro histológico de cirrosis (Figs. 7 y 8). En los enfermos que no hubo empeoramiento histológico se apreció una estabilidad de sus lesiones en 14 y mejoría del daño hepatocitario en 10 (Figs. 9 y 10).

El intervalo de tiempo entre las dos tomas biópsicas ha sido menor en los pacientes con HCA (necrosis erosiva).

--- Con respecto a las lesiones morfológicas valoradas según el Índice de actividad histológica desarrollado por Knodell et al, se han objetivado los siguientes datos:

* Hay diferencia estadística ($p < 0.0001$ - C. Yates) entre el grupo de pacientes con biopsias cuyo IAH es ≤ 9 (indicativo de un menor daño hepatocitario) y el que sus estudios

histológicos revelan un IAH >9 , en relación a su evolución morfológica: se ha observado que IAH inicialmente altos tienden a presentar una mayor lesión en controles biópsicos posteriores (Tabla 6). Hecho también observado al realizar pruebas de supervivencia (Kaplan-Meier), $p=0.03$.

* Biopsias hepáticas con IAH >9 presentan una tendencia evolutiva más rápida a cirrosis (pruebas de Kaplan-Meier) en relación con aquellas que tienen IAH ≤ 9 ($p=0.04$).

* El análisis individual de componentes del IAH ha mostrado que tanto la necrosis erosiva como la necrosis lobulillar cuyos valores han sido de: <3 en la primera biopsia es indicativo de una evolución más favorable del daño hepatocelular con respecto a la fibrosis (otra de las lesiones valoradas), en comparación a valores iniciales de: ≥ 3 ($p < 0.01$ y $p = 0.017$ respectivamente) (Tabla 7).

1.CII.- Grupo de pacientes con 3 y 4 biopsias hepáticas.

Catorce enfermos presentan un seguimiento histológico de 3 biopsias y 4 pacientes de 4. El estudio morfológico de seguimiento al año o a los dos años se observa que es similar al primero. Cambios evolutivos se empiezan a evidenciar a partir del tercer año.

1.CIII.- Histología - Bioquímica (Gráficos 8, 9, 10, 11, 12 y 13).

Los resultados que se objetivan en esta relación, realizada tal como se ha comentado en la

metodología, son los siguientes:

a) Las tasas medias, a excepción del parámetro FA, han sido inferiores (dentro de que todas están elevadas) en los cuadros histológicos de cambios mínimos / HCP con respecto a las de HCA y/o cirrosis (las diferencias observadas presentan significación estadística ($p < 0.05$) y ,únicamente, no se alcanzó con el parámetro GOT). En los cuadros de hepatitis crónica "borderline" se obtuvieron valores intermedios.

b) Las tasas medias de todos los parámetros muestran valores superiores en todos aquellos casos que han evolucionado a un mayor deterioro hepático, tanto si inicialmente su histología era cambios mínimos o HCP como si presentaban una patología más avanzada (HCA).

1.CIV.- Histología - Marcadores virales séricos (Gráficos 14, 15, 16 y 17).

En la relación de estos parámetros se han obtenido los resultados siguientes:

a) Desde el punto de vista morfológico se ha evidenciado un predominio de hepatitis crónica activa en los dos grupos serológicos (dependiendo de la presencia o no de HBsAg) en que hemos encuadrado a los enfermos.

En los estudios correspondientes a la biopsia de control , existe significación estadística entre las alteraciones histológicas y los marcadores virales serológicos ($p=0.02$ - C.Yates).

b) No se ha encontrado ninguna correlación entre los valores serológicos y la evolución de

la lesión histológica: la positividad o negatividad de los marcadores serológicos no influye en la alteración hepática inicial para que ésta evolucione hacia una regresión o exista un empeoramiento o quede estacionaria.

1.D.- Grupos serológicos con características propias:

1.DI.- Portadores o no de HBeAg (seroconversión AntiHBe).

En los estudios analíticos realizados en el momento de la primera biopsia hepática, se observa la determinación del HBeAg sérico en 31 pacientes (19 positivos y 12 negativos), y el AntiHBe sérico en 34 (10 positivos y 24 negativos). Para definir con más precisión los rasgos de este grupo, se han escogido aquellos enfermos con determinaciones periódicas en todos los parámetros elegidos para este estudio, por tanto el total de los pacientes es de 30.

Inicialmente, desde el punto de vista serológico, se clasifican en tres grupos:

Grupo 1: HBeAg positivo / AntiHBe negativo : 17 pacientes.

Grupo 2: HBeAg negativo / AntiHBe negativo : 6 pacientes.

Grupo 3: HBeAg negativo / AntiHBe positivo : 7 pacientes.

Dentro de las características generales (Tabla 8 y Gráfico 18) se observa un predominio de los varones en los tres grupos; y una edad con una media inferior en el grupo 1 (7.94 años)

con respecto a los otros (31.5 años y 25.86 años respectivamente), existe una diferencia significativa entre ellos $p < 0.001$. El porcentaje de hepatitis aguda en los tres es similar como también lo es la epidemiología (predomina la fuente desconocida y hay una proporción ligeramente mayor del antecedente de drogadicción en el tercer grupo).

Serológicamente en cuanto a la bioquímica (GPT, prueba de función hepática que se ha elegido por ser una de las más sensibles para el daño hepatocelular) se aprecia una media mayor en el grupo 3 y la más baja en el grupo 2, existiendo una diferencia estadística entre el grupo 1 y los grupos 2 y 3 ($p = 0.05$).

Respecto a otros marcadores virales se evidencia positividad del HBsAg en todos los pacientes del grupo 1, en uno del grupo 2 y en 3 del grupo 3. En el grupo 2 en el momento de la última biopsia la valoración sérica de uno de los pacientes muestra seroconversión completa: HBsAg negativo /AntiHBs negativo ---> HBsAg negativo /AntiHBs positivo; lo que también ocurre en un enfermo del grupo 3 y a su vez en este grupo, un paciente HBsAg positivo presenta seroconversión HBsAg negativo ---> AntiHBs positivo. El anticuerpo Antidelta es positivo en tres enfermos (dos del grupo 1 y uno del tercero).

El diagnóstico histológico revela un predominio de los tipos de hepatitis crónica de actividad inflamatoria mínima o moderada en el grupo 1 (12 casos: 3 cambios mínimos, 4 HCP, 5 HC "borderline"), mientras que en los otros dos es mayor el número de HCA con diferentes grados de actividad (4 casos: 2 necrosis erosiva, 2 puentes de fibrosis; y 7 casos: 5 necrosis erosiva, uno puente de fibrosis y uno puente de necrosis, respectivamente). Existe una diferencia significativa entre el grupo 1 y el grupo 2 y 3 ($0.01 > p > 0.001$ - C.Yates).

Cronología HBeAg / AntiHBe: como ya hemos indicado anteriormente los pacientes HBeAg positivo son más jóvenes que los que son AntiHBe positivo, y también se evidencia un mayor número de casos de HCA en el grupo AntiHBe positivo. Si correlacionamos los tres parámetros edad-serología e histología se observa que los casos HBeAg positivo con hepatitis crónica de actividad inflamatoria mínima o moderada (cambios mínimos, HCP) se encuentran dentro de la primera década (entre los 3 y los 9 años), así como la mayoría de los de mayor actividad (HCA) (4, 5, 8, y 9 años); únicamente hay 4 casos en la 2ª década, caracterizada histológicamente por tener una HC "borderline" (11, 11, y 12 años) y HCA (19 años). Lo contrario ocurre con los casos AntiHBe positivo, éstos están casi todos dentro de la 2ª década (16, 18, 19, 20, y 20 años) e incluso alguno la sobrepasa (22 y 66 años); y todos muestran HCA, siendo los más jóvenes los que presentan una HCA con una mayor actividad (16 años: HCA con puentes de necrosis, y 19 años: HCA con puentes de fibrosis).

Estos pacientes han sido todos seguidos durante un periodo de tiempo que oscila entre los 2 y 5 años en el grupo 1 y 3 y entre los 2 y 6 años en el grupo 2:

*) Resultados del seguimiento del grupo 1 (Tablas 9A, 9B, 10A, 10B y 10C).

De los 17 pacientes inicialmente HBeAg positivo, únicamente quedan con HBeAg positivo 9 casos.

Los restantes presentan el siguiente perfil serológico: pérdida de la reactividad del HBeAg en 2 y seroconversión en 6 (3 la alcanzaron en el periodo comprendido entre la realización de las biopsias hepáticas, y los otros en el intervalo entre la última biopsia y la última

revisión clínica).

Los resultados finales son similares a los que existían al principio del estudio entre el grupo 1 y el grupo 3:

* Los 9 enfermos con HBeAg positivo persistente muestran los siguientes rasgos diferenciales: unos valores medios de la GPT que oscilan entre los diferentes momentos en que se determinan pero siempre son valores por encima de la normalidad (únicamente hay dos casos que los valores disminuyen de manera más significativa : 368-779-42 y 415-183-No revisión; ninguno de los dos fue tratado y el enfermo sin revisión posterior a la realización de la última biopsia presenta serológicamente positividad para anticuerpos Antidelta). Las biopsias realizadas para caracterizar la lesión hepática no revelan predominio de ningún tipo histológico: hay 5 casos de hepatitis crónica de actividad inflamatoria mínima o moderada (2 cambios mínimos, uno HCP, 2 HC "borderline"), y 4 de HCA con diferentes grados de actividad (2 necrosis erosiva, y 2 con puentes de fibrosis); en las biopsias hechas para observar la evolución de la hepatopatía se observa un empeoramiento en 4 casos (cambios mínimos → HCP, HC "borderline" → HCA puentes de fibrosis, HCA → HCA puentes de necrosis y HCA → HCA puentes de fibrosis), estabilidad en otros 4 (cambios mínimos → cambios mínimos, HCP → HCP, y los dos casos con HCA puentes de fibrosis) y una mejoría histológica en uno (HC "borderline" → HCP).

Sólo 2 de los 9 pacientes fueron tratados con corticoides, uno en el tiempo existente entre la realización de las biopsias (este enfermo presentó estabilidad histológica: HCA puentes de fibrosis, y disminución de los valores de la GPT: 259-109); y el otro en el tiempo

comprendido entre la última biopsia y la última revisión (por ser mínimo ,3 meses, no se puede valorar si influye en alguno de los parámetros).

* Los 2 enfermos con pérdida de la reactividad del HBeAg y en los cuales no ha habido, todavía, seroconversión (fase de ventana e) presentan, con respecto al parámetro bioquímico GPT: uno de ellos normalización y el otro casi normalización; y en cuanto al patrón histológico muestran estabilidad (cambios mínimos → cambios mínimos) y mejoría del daño hepatocelular (HCA → HCP), respectivamente.

Estos dos pacientes no han tenido ningún tipo de tratamiento.

Su periodo de seguimiento, durante el cual el HBeAg se ha negativizado, ha sido respectivamente de 57 y 37 meses.

* Los 6 pacientes con seroconversión se encuentran entre aquellos enfermos con periodo de seguimiento largo.

Se caracterizan por tener unos valores medios de la GPT más pequeños en comparación con los casos HBeAg positivo persistente y además hay una tendencia a la normalización (únicamente hay un caso en que las cifras se mantienen altas sin prácticamente sufrir variaciones, 134-108-144; este enfermo no tiene tratamiento). Desde el punto de vista histológico se evidencia que la seroconversión ha tenido lugar en los pacientes cuya hepatitis crónica es de actividad inflamatoria mínima o moderada (2 HCP y uno HC "borderline"), y una histología inicial similar presentan los que desarrollaran seroconversión AntiHBe entre

la realización del último estudio biópsico y el último control clínico (1 HCP y 2 HC "borderline"); en el seguimiento 3 casos mantienen el mismo tipo de hepatitis crónica, uno presenta mejoría (HC "borderline" → cambios mínimos), y los dos restantes empeoran (HCP → HC "borderline" y HC "borderline" → HCA con puentes de fibrosis), correspondiendo los que revelan una histología similar y uno de los que empeoran (HC "borderline" → HCA con puentes de fibrosis) a los que la positividad para AntiHBe será posterior al control biópsico último. No hay diferencias significativas en cuanto a la histología entre los pacientes con HBeAg positivo persistente y los que hicieron seroconversión.

Dos de los 6 pacientes fueron tratados con corticoides en el periodo existente entre la realización de las biopsias; uno de ellos realizó la seroconversión en este tiempo (tanto su bioquímica como su histología presentan mejoría), y el otro posteriormente (el valor de la GPT es inferior con respecto al que coincide con la última biopsia y su histología ha evolucionado a peor HC "borderline" → HCA con puentes de fibrosis. Este enfermo tiene anticuerpos Antidelta positivo).

--- Con respecto al estudio histológico de los 17 enfermos (habiendo sido excluidos los que durante el seguimiento dieron positividad sérica para anticuerpos Antidelta) y en concreto a las lesiones morfológicas valoradas de acuerdo al IAH de Knodell et al, se ha objetivado:

1) Las biopsias hepáticas realizadas en los 5 pacientes con pérdida del HBeAg y en periodo de seroconversión o éste está ya establecido (AntiHBe+) muestran unos datos de necrosis erosiva e inflamación portal más bajos en relación a los que revelaban en sus biopsias iniciales cuando todavía eran HBeAg (+) (valores, éstos últimos, similares a los que han

presentado los estudios histológicos iniciales y de control de los 10 pacientes HBeAg persistente). Estos parámetros muestran significación estadística ($p=0.04$).

Los valores de necrosis lobulillar y fibrosis han sido similares a los que se han encontrado en los estudios biópsicos cuando existía presencia sérica de HBeAg.

2) La cuantificación global de las lesiones, es decir el IAH, también es menor en las biopsias de los enfermos con seroconversión iniciada o ya hecha ($p=0.045$).

-- Los casos con tratamiento son pocos, tanto en el grupo que el HBeAg ha quedado positivo como en el que ha habido seroconversión, para poder decir si éste repercute o no en la evolución clínico-patológica; de todas maneras, en nuestra pequeña casuística (4 casos) se aprecia en general una respuesta favorable.

*) Resultados del seguimiento del grupo 2 (Tablas 11A, 11B y 12).

De los 6 pacientes inicialmente HBeAg-/AntiHBe-, se observa posteriormente seroconversión en tres (dos fueron AntiHBe positivo en el tiempo transcurrido entre la realización de las biopsias hepáticas y el otro en el transcurso de las revisiones clínicas posteriores a la del momento de la última biopsia). La seroconversión, al igual que ocurre en el grupo 1, tiene lugar a medida que es más largo el periodo de seguimiento.

En los que el perfil serológico sigue siendo el mismo, los valores bioquímicos, con respecto a la GPT, presentan oscilaciones pero siempre las cifras son por encima de la normalidad;

en cambio en aquellos en que se ha realizado la seroconversión los valores de la GPT son inferiores, pero también por encima de la normalidad. Hay una tendencia a la normalización en el momento en que el AntiHBe se hace positivo, aunque en uno de ellos no ocurre así ya que el valor es más alto y tiende a aumentar en revisiones posteriores (28-72-141). Otro de los pacientes muestra también un aumento en los siguientes controles (92-59-84). En el seguimiento clínico último de los pacientes del grupo 2 no se evidencia diferencia estadística en el parámetro bioquímico entre los que quedan HBeAg-/AntiHBe- y los que seroconvierten. En cambio si la hay en el momento del seguimiento que coincide con la realización de la última toma biopsica (HBeAg-/AntiHBe-: n=4, HBeAg-/AntiHBe+: n=2, $0.02 > p > 0.01$).

El estudio histológico revela que la persistencia del rasgo serológico (HBeAg-/AntiHBe-) se encuentra en relación con una 1ª biopsia hepática de HCA (2 necrosis erosiva, y uno puentes de fibrosis), mientras que en los casos en que el AntiHBe se ha hecho (+) el tipo histológico que se observa inicialmente es el de hepatitis crónica de actividad inflamatoria mínima o moderada (uno HCP, uno HC "borderline"), y sólo uno de los casos es una HCA (corresponde al que realiza seroconversión posterior al estudio biopsico de control); en las biopsias de seguimiento se aprecia, con respecto al grupo con igual serología, empeoramiento en un caso (HCA → HCA con puentes de fibrosis) y estabilidad en los otros dos; y en el grupo con cambio serológico (AntiHBe +), hay estabilidad en dos (uno de ellos es el que seroconvierte después del estudio histológico de control) y empeoramiento en el otro (HC "borderline" → HCA). En el seguimiento histológico de los pacientes HBeAg-/AntiHBe- no se obtiene significación estadística con respecto a los que dentro de este grupo muestran AntiHBe+ en controles posteriores.

Dos de los 6 enfermos de este grupo habían sido tratados, ninguno de los dos presentó AntiHBe+. El tratamiento consistía en inmunosupresores más corticoides. Uno de ellos sólo los recibió hasta el momento en que se realizó la última biopsia de control (tanto la histología como la bioquímica presentaban empeoramiento, la bioquímica mejoró tras la retirada del tratamiento), y el otro lo recibió durante todo el periodo de seguimiento (la bioquímica oscilaba pero siempre con cifras altas 274-154-199, y la histología permaneció sin cambios - HCA con puentes de fibrosis).

-- En este grupo como en el anterior tampoco se pueden sacar conclusiones sobre si el tratamiento puede o no influir en la conducta evolutiva de estos pacientes, aunque la respuesta no parece tan favorable como en el grupo 1.

*) Resultados del seguimiento del grupo 3 (Tabla 13).

Los enfermos de este grupo se caracterizan por ser los de mayor edad.

Desde el punto de vista bioquímico revelan unas cifras iniciales de la GPT por encima de la normalidad pero con tendencia a disminuir e incluso a la normalización en las revisiones posteriores. Entre los valores iniciales de la GPT y los de la última revisión se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Histológicamente, todos inicialmente muestran un cuadro de HCA con predominio de la que se diagnostica en base a la necrosis erosiva. En el seguimiento se evidencia mejoría en dos (HCA → HC "borderline", HCA con puentes de fibrosis → HCP), estabilidad en tres (HCA

→ HCA con puentes de fibrosis), y empeoramiento en dos (HCA → HCA con puentes de fibrosis).

De los 7 pacientes de este grupo, 4 han tenido tratamiento (tres durante el periodo comprendido entre la realización de las biopsias y uno durante todo el seguimiento). Dos fueron tratados con inmunosupresores y corticoides (uno mejoró su lesión hepática HCA → HC "borderline", y en el otro no hubo cambios HCA). En los otros dos el tratamiento consistió en antivirales; y en antivirales hasta la realización de la última biopsia y luego se le cambió por inmunosupresores más corticoides (el enfermo con tratamiento antiviral mejoró su cuadro histológico hepático: HCA con puentes de fibrosis → HCP; y el otro no lo modificó: HCA con puentes de necrosis, este último era anticuerpo Antidelta +).

Los tres enfermos no tratados presentaban empeoramiento histológico en dos (HCA → HCA con puentes de fibrosis) y estabilidad en el otro (HCA). Estableciendo una relación entre ambos podemos concluir que los efectos del tratamiento son en general favorables, ya que ningún paciente de los tratados mostró empeoramiento ni desde el punto de vista bioquímico ni histológico, mientras que a los que no se les administró ninguna pauta terapéutica, en general, revelan empeoramiento en su evolución histológica aunque no en su bioquímica (las cifras de GPT tienden a normalizarse).

1.DII.- Portadores de virus de la hepatitis delta.

Como ya se ha comentado en los resultados generales de la serología de los 54 enfermos de este estudio, únicamente en 6 de ellos hubo positividad para el anticuerpo Antidelta: dos en

el momento de la determinación sérica de marcadores virales coincidente o próxima a la realización de la última biopsia hepática de control, y en los restantes en las llevadas a cabo durante las revisiones clínicas posteriores a dicho examen histológico.

Las características clínicas y epidemiológicas de este grupo son las siguientes: predominio de varones (5V/1M); edades comprendidas entre los 11 y 30 años (con una media de 18.33 ± 6.6); antecedente de hepatitis aguda previa en 4 enfermos; y 2 revelaban drogadicción intravenosa y uno de ellos tenía , además, serología positiva para HIV. Clínicamente todos eran asintomáticos (sólo 2 habían mostrado, en un primer momento, astenia y anorexia); y en la exploración física, a excepción de un paciente, presentaban hepatomegalia y, en uno, se acompañaba también de esplenomegalia.

Bioquímicamente, se ha observado que todos los pacientes tenían cifras elevadas de la transaminasa GPT (primera biopsia: media 331.33 U/L, DE: 190.60 U/L; último control histológico: media 342 U/L, DE: 149.38 U/L); y sus rasgos serológicos quedan expresados en la Tabla 14A y 14B.

El diagnóstico histológico inicial mostraba un caso con hepatitis crónica "borderline" y los otros 5 con HCA (una con puentes de necrosis (Figs. 11 y 12) y 3 con puentes de fibrosis). En la biopsia última de control, se ha observado: deterioro en 4 (HC "borderline" → HCA con puentes de fibrosis, HCA con necrosis erosiva → HCA con puentes de necrosis, HCA con puentes de fibrosis → Cirrosis, y HCA con puentes de fibrosis → HCA con puentes de fibrosis y mayor actividad inflamatoria lobulillar y portal; los dos primeros eran los que tenían anticuerpos Antidelta positivos en el momento de efectuar el estudio biópsico) y

lesiones similares en los 2 restantes (aunque en el enfermo con HCA con puentes de fibrosis se ha evidenciado un componente periportal con necrosis erosiva menor).

Cuatro de estos pacientes han recibido tratamiento médico previamente al desarrollo de la infección delta: inmunosupresores más corticoides se les administró a 3 (a uno después de haberle dado agentes antivirales y a otro previo a la pauta terapéutica con antivirales), y corticoides (solos) al otro.

--- La comparación con el grupo de pacientes HBsAg positivo pero con negatividad para anticuerpos Antidelta ha demostrado bastante similitud con respecto a los datos clínicos y epidemiológicos; únicamente se aprecia una mayor frecuencia de hepatitis aguda y de hepatomegalia en los pacientes que posteriormente desarrollaron positividad para el virus de la hepatitis delta.

En el grupo anticuerpos Antidelta positivos, el período de seguimiento ha sido algo menor (una media de 2 años y medio) que en el otro (una media de 3 años). Las diferencias entre ambos grupos durante este tiempo han sido objetivadas a nivel analítico e histológico y éstas son:

a) Las alteraciones bioquímicas, y referidas concretamente a la GPT, eran evidentes en ambos grupos pero las elevaciones mayores se han observado en los enfermos con infección delta (pacientes portadores de HBsAg: primera biopsia / media 172.04 U/L, DE: 100.44 U/L / último control histológico: media 167.92 UL, DE: 200.69 U/L; individuos con VHD: primera biopsia media 331.33 U/L, DE: 190.60 U/L / último control histológico media 342

U/L, DE: 149.38 U/L). Existe entre ambas significación estadística, $p=0.003/p=0.02$).

b) Los estudios biópsicos han revelado un mayor deterioro hepático cuando los anticuerpos Antidelta eran positivos (a excepción de un enfermo con hepatitis crónica "borderline", los demás tenían HCA), y consecuentemente el Índice de actividad histológica global (Knodell et al) y el de cada uno de sus componentes, mostraban valores superiores; se apreciaban diferencias significativas a nivel de Índice global (pacientes portadores de HBsAg: media 8.97, DE: 3.7; individuos con VHD: media 11.7, DE: 2.9; $p=0.05$) y del parámetro necrosis intralobulillar (pacientes portadores de HBsAg: media 2.24, DE: 1.1; individuos con VHD: media 3.33, DE: 0.52; $p=0.01$). En el control histológico se seguían evidenciando resultados similares al del primer estudio morfológico, es decir, la lesión hepática existente era mas importante en los enfermos HBsAg positivos con infección delta que en aquellos que no la tenían; también los valores de IAH, global o individualizados, eran algo más elevados, y la significación estadística no sólo se alcanzaba en los parámetros citados al referirnos al estudio biópsico inicial sino, además, en el grado de necrosis erosiva (pacientes portadores de HBsAg: media 1.79, DE: 1.32; individuos con VHD: media 3.7, DE: 1.97, $p=0.003$) y en el de inflamación portal (pacientes portadores de HBsAg: media 2.31, DE: 1.07; individuos con VHD; media 3.33, DE: 0.52; $p=0.02$).

2.- INMUNOHISTOQUIMICA.

2.A.- Resultados generales.

- El **HBsAg tisular**: fué positivo en 18 biopsias hepáticas de diagnóstico inicial y mostraba

una cuantificación leve-moderada en 15 casos (++) en 7, y + en 9), e intensa en dos casos (+++).

El patrón de expresión morfológica que predominaba ha sido el difuso (13 biopsias) (Fig. 13), siguiéndole en frecuencia un patrón mixto (4 casos: 3 con imágenes de positividad difusa más globular y uno difuso más focal) (Fig. 14) y un patrón focal hepatocitario (un caso).

El tipo de distribución más observado ha sido el de hepatocitos con positividad tisular aislados y en cualquiera de los lobulillos hepatocitarios (10 casos). En 3 biopsias el antígeno viral se encontraba en hepatocitos aislados pero sólo en algún lobulillo; en 4 casos aparecía distribuido en hepatocitos aislados y en grupos localizados en cualquiera de los lobulillos hepáticos en tres de ellos, y sólo en algún lobulillo en el otro caso; y en un estudio biopsico la positividad hística se apreciaba en hepatocitos agrupados y localizados en algún lobulillo.

--- Con respecto a la biopsia última de control, los resultados eran muy similares:

Había positividad en 22 estudios, y en la mayoría la cuantificación era leve-moderada (+ en 8 y ++ en 10); sólo fué intensa (+++) en 4.

El patrón de expresión morfológica, también, mostraba un predominio del patrón difuso (13 casos), seguido del patrón mixto (7 biopsias: en 5 era difuso más globular, en uno difuso más focal y en otro se combinaban los tres), del patrón focal (un caso) y del patrón globular (un caso).

El tipo de distribución ha sido muy similar al del primer estudio morfológico: en 11 casos los hepatocitos con antígeno viral eran aislados y localizados en todos los lobulillos; en 5 se encontraba tanto en hepatocitos aislados como en grupos y en cualquiera de los lobulillos hepatocitarios; en 3 casos los hepatocitos positivos estaban agrupados y en alguno de los lobulillos; en 2 biopsias los hepatocitos con HBsAg eran aislados y en algún lobulillo; y en un caso los hepatocitos teñidos, tanto aislados como en grupos, eran hallados en algún lobulillo de la biopsia hepática.

- El **antígeno core (HBcAg)**: fué observado en 28 de los estudios biópsicos hepáticos de diagnóstico inicial, siendo la cuantificación leve-moderada en 21 (+5, ++ ó +/++ 16) e intensa en 7 (+++).

El patrón de expresión morfológica que predominaba era el nuclear (25 casos) (Fig. 15); y únicamente en 3 biopsias se encontró el core tisular tanto en el núcleo como en el citoplasma (Fig. 16).

El tipo de distribución cuando existía positividad tisular era a nivel de todos los lobulillos hepatocitarios en 21 casos, y sólo se hallaba en alguno en 3 biopsias.

--- Con respecto a la biopsia última de control, y al igual que ocurría con el HBsAg, los datos obtenidos eran muy parecidos a los de la primera toma biópsica:

La positividad hística era encontrada en 29, con una cuantificación leve-moderada en 26 (+5, ++ ó +/++ 21) e intensa (+++) en 3 biopsias.

El patrón de expresión morfológica ha sido mayoritariamente a nivel del núcleo (20 casos); el antígeno viral fue hallado en el citoplasma en tres biopsias; y en ambas localizaciones en 6 casos.

El tipo de distribución cuando existía positividad tisular era o en todos los lobulillos hepatocitarios (19 biopsias) o en alguno de ellos (10 casos).

2.B.- Marcadores virales tisulares - Histología.

* No se han observado diferencias estadísticas entre la positividad o negatividad de **HBsAg tisular** con respecto a cada tipo histológico, ni tampoco cuando se ha hecho una agrupación de los casos de hepatitis crónica en base a la actividad inflamatoria (primera biopsia: hepatitis crónica con actividad inflamatoria mínima o moderada 9 de 24 casos y HCA con diferentes grados de actividad 9 de 15 casos, $p=NS$; y en el último control histológico 10 de 14 y 12 de 30 casos respectivamente, $p=NS$) (Gráficas 19 y 20).

No se obtiene significación estadística entre la presencia o ausencia del **HBcAg tisular** y cada uno de los tipos histológicos; pero si se alcanza al realizar la agrupación de los casos de hepatitis crónica según la actividad inflamatoria, existe una mayor positividad tisular en el grupo de hepatitis crónica de actividad inflamatoria mínima o moderada (estudio inicial biopsico: 13 de 15 casos en comparación con el grupo de HCA con diferentes grados de actividad inflamatoria 15 de 31 casos, $0.05 > p > 0.02$, $p=S$, y en el último control histológico: 14 de 16 casos, en comparación con el otro grupo 15 de 33 casos, $0.02 < p < 0.01$, $p=S$) (Gráficas 21 y 22).

--- Se ha estudiado la relación entre dos de los parámetros histológicos (Índice de Knodell et al, necrosis erosiva y necrosis e inflamación intralobulillar) y los antígenos virales en tejido (HBsAg y HBcAg), y no se ha observado ninguna correlación significativa; aunque la presencia hepatocitaria de ambos marcadores, especialmente el HBcAg, se evidencia en la mayor parte de las biopsias con necrosis e inflamación intralobulillar.

-- Análisis multivariante, usando el método de regresión de Cox, ha mostrado que las variables histológicas, fibrosis y necrosis erosiva, en presencia del HBsAg tisular ($p=0.02$) o del core hístico ($p=0.02$) son indicadores de progresión a cirrosis, como también lo son la fibrosis y necrosis e inflamación lobulillar, en presencia del HBsAg tisular ($p=0.01$) o del antígeno core ($p=0.03$).

* El patrón de expresión morfológica muestra con respecto al **HBsAg** hístico un predominio del tipo difuso en cualquiera de las formas de hepatitis crónica; siguiéndole en orden de preferencia un patrón mixto, y en casos aislados formas de tipo globular o de manchas pequeñas ("spotty").

Los 6 casos en que se había desarrollado una cirrosis el patrón que predominaba era el mixto (difuso más globular, y un caso además presentaba algún hepatocito con positividad en forma de pequeñas manchas), y el tipo de distribución ha sido en células hepatocitarias aisladas o formando grupos y localizadas en todos los lobulillos.

En el caso del **core tisular**, el patrón de expresión morfológica se ha caracterizado por una positividad mayoritariamente nuclear en cualquiera de las formas de hepatitis crónica, y

únicamente en algún caso se ha objetivado tinción citoplasmática (sóla o junto con positividad nuclear, por ejemplo en los tres estudios biópsicos con un diagnóstico morfológico de cirrosis).

2.C.- Marcadores virales tisulares - Marcadores virales séricos.

La presencia de **HBsAg en tejido** muestra una correlación significativa con la existencia de HBsAg en suero: el HBsAg sérico fue determinado en 37 de 39 pacientes en cuyas biopsias de diagnóstico se realizó la detección del HBsAg y se obtuvo positividad tisular en 14 casos de 23 casos positivos en suero y ausencia del HBsAg en tejido en 12 de 14 casos con negatividad sérica ($0.01 < p < 0.05$). Un resultado similar existía en las pruebas de seguimiento, la determinación del HBsAg sérico se hizo en 41 de los 44 pacientes en que se estudió el HBsAg tisular: en 26 casos HBsAg positivo en suero, hubo positividad tisular en 20; y en 15 casos HBsAg sérico negativo, la negatividad del HBsAg en tejido fue encontrada en 13 casos ($p < 0.0001$).

También el **HBcAg tisular** ha mostrado un porcentaje importante de positividad con respecto a la presencia en suero del AntiHBc: en 32 casos AntiHBc sérico positivo se encontró el antígeno core en tejido en 20 casos (estudio realizado en las muestras hepáticas para filiar la hepatopatía). Datos similares se obtienen en el material biópsico y sérico de seguimiento: hay positividad tisular en 25 casos de los 38 en que se determinó la presencia del AntiHBc en suero.

* En relación a los 19 pacientes HBsAg negativo/AntiAntígenos VHB positivos se han

hallado los siguientes resultados:

a) Únicamente se encontró positividad histórica para el **HBsAg** en tres enfermos cuya serología era en dos de ellos AntiHBs, AntiHBc y AntiHBe positivos, y en el tercero AntiHBc positivo y el AntiHBs se hizo negativo en los controles de revisión.

b) El **HBcAg tisular** ha sido observado en las biopsias hepáticas de 9 pacientes (6 con serología positiva para los diferentes anticuerpos, 2 con positividad en suero para el AntiHBc, y uno con AntiHBs positivo únicamente).

La presencia del HBcAg tisular podría explicar el mantenimiento e incluso el aumento de la actividad inflamatoria hepatocelular que presentan algunos de estos enfermos.

2.D.- Marcadores virales tisulares - Grupos serológicos con características propias.

* Portadores o no de HBeAg (seroconversión AntiHBe).

Los pacientes seleccionados para valorar la correlación entre los marcadores virales tisulares y este grupo serológico han sido los mismos que fueron elegidos para determinar las características de dicho grupo (ver apartado 1.DI). No se ha apreciado ninguna relación entre la histología y la expresión antigénica tisular ni tampoco entre ésta última y los cambios del sistema antigénico HBeAg/AntiHBe.

Análisis multivariante, usando el método de regresión de Cox, ha mostrado que las variables

edad, Índice de actividad histológica global (Knodell et al), y el core tisular ($p=0.03$) son indicadores de seroconversión AntiHBe; como también lo son, el Índice de actividad histológica global, la necrosis erosiva y el antígeno core hístico ($p=0.02$), o simplemente la necrosis erosiva y el core tisular ($p=0.04$).

* Portadores de virus de la hepatitis delta.

El estudio de los marcadores virales tisulares ha dado los siguientes resultados: presencia del antígeno delta sólo en los dos pacientes con serología positiva para infección delta en el momento en que se ha practicado la biopsia (concretamente la del último control histológico) (Fig. 17). A su vez, uno ha presentado HBsAg en el tejido hepático de la primera biopsia pero no en la última, y antígeno core en las dos; y en el otro, la positividad de ambos marcadores virales ha sido únicamente en el control morfológico último .

Con respecto a los antígenos del virus de la hepatitis B se ha objetivado HBsAg hístico en uno (en la biopsia de control), y ambos marcadores en 3 enfermos (en uno en ambas biopsias, en otro en la última y en el tercero en la primera toma biópsica y en la de control solo se ha hallado el HBcAg).

2.E.- Estudio comparativo con el método histoquímico para la detección tisular del HBsAg.

En las biopsias hepáticas teñidas con hematoxilina eosina y/o con el tricrómico de Masson el hallazgo de hepatocitos esmerilados (Figs. 18 y 19) ha sido infrecuente; y cuando se han evidenciado, la patología hepática correspondía a HCA y ocasionalmente a HCP.

En las muestras biópsicas de 24 de los 54 enfermos incluidos en este estudio además de la inmunohistoquímica, se ha realizado una de las técnicas de histoquímica específicas del HBsAg hístico: la tinción de Shikata (Fig. 20), y los resultados han sido idénticos en los especímenes hepáticos de 18 pacientes (bien en todas las realizadas en cada uno de ellos o en alguna). Únicamente existían diferencias en los estudios histológicos de 6 enfermos: los hepatocitos con el antígeno de superficie eran sólo detectados con el método de inmunoperoxidasa, aunque en 2 pacientes en una de las tomas biópsicas hechas la detección tisular se obtuvo con ambas técnicas.

3.- MORFOMETRIA.

3.A.- Resultados generales.

Los resultados morfométricos muestran en el grupo I, que la relación núcleo/citoplasma de los hepatocitos con presencia de HBsAg no difiere mucho de la obtenida en los hepatocitos sin HBsAg.

En un grupo homogéneo de 80 hepatocitos con HBsAg y otros 80 sin dicho antígeno se objetivó respectivamente que la relación N/C presentada por su media y desviación estandar de la media era de 0.09 ± 0.012 / 0.1 ± 0.0081 , no existiendo diferencias significativas entre ellas; significación que tampoco se aprecia en las medias individuales de la medición del núcleo y del citoplasma, aunque éstas eran relativamente mayores en los hepatocitos con HBsAg (media del parámetro nuclear era 25.89 ± 5.46 en comparación a 23.81 ± 2.06 de las células hepatocitarias sin el antígeno viral; y la media del factor citoplasma era

305.26 ± 76.07 en relación a 248.9 ± 19.62 de los hepatocitos sin el HBsAg).

3.B.- Morfometría - Marcadores virales séricos.

Los datos obtenidos entre el grupo I y el grupo II (serología negativa para HBsAg) muestran que la relación N/C de los hepatocitos con tinción positiva para el HBsAg en biopsias del grupo I es más pequeña que la que presentan los hepatocitos sin el antígeno viral en las muestras biópsicas del grupo II, existiendo significación estadística $p=0.015$; y también es ligeramente más baja la relación N/C de los hepatocitos no teñidos de especímenes hepáticos del grupo I que la de las células hepatocitarias de tomas biópsicas del grupo II, con significación estadística $p=0.024$.

Los hepatocitos del grupo III (serología positiva para HBsAg) revelan una relación N/C muy similar a la de las células hepatocitarias con HBsAg de las biopsias correspondientes al grupo I.

3.C.- Morfometría - Histología.

Las mediciones de los hepatocitos con o sin HBsAg en las muestras biópsicas de los 3 grupos no han demostrado ninguna relación con la lesión hepatocelular. Todas eran muy similares independientemente de si la histología mostraba una actividad inflamatoria mínima (HCP, cambios mínimos) o en cambio presentaba una actividad inflamatoria intensa (HCA en sus diferentes grados, cirrosis).

TABLAS

TABLA 3**MARCADORES DEL VHB EN LOS 54 CASOS DE HEPATITIS CRONICA B.**

GRUPOS	N.ENFERMOS
GRUPO A: HBsAg (+)	35 * (65%)
HBeAg (+)	18**
AntiHBe (+)	5 **
HBeAg/AntiHBe (-)	1
HBeAg/AntiHBe (ND)	12
GRUPO B: Anti Antígenos del VHB(+)	19 (35%)
AntiHBs, AntiHBc con o sin AntiHBe	15
AntiHBs	1
AntiHBc	3

ND: No determinado

* 1 paciente en controles posteriores hizo seroconversión (HBsAg(-)/AntiHBs(+)).

** Inicialmente 1 enfermo era HBeAg(+)/AntiHBe(+), a los 2 meses hizo seroconversión HBeAg(-)/AntiHBe (+).

TABLA 4**CARACTERISTICAS EPIDEMIOLOGICAS Y CLINICAS DE LOS 54 PACIENTES, SEGUN LA PRESENCIA O NO DEL HBsAg.**

	GRUPO A HBsAg(+) (n=35)	GRUPO B Anti Antígenos VHB (+) (n=19)
EPIDEMIOLOGIA		
Edad ⁺	17.91±15.66	28.84±13.29
Sexo (V/M)	28/7	15/4
Hepatitis aguda	15 (43%)	15 (79%)
Transfusiones/ Cirugía	7 (20%)	5 (26%)
Drogadicción i.v.	2 (6%)	7 (37%)
Retraso psicomotor	2 (6%)	-
CLINICA		
Asintomáticos	35 (100%)	18 (95%)
Exploración física normal	20* (57%)	5 ** (26%)
Hepatomegalia:	15 (43%)	14 (74%)
Asociada con:		
Esplenomegalia	2 (11%)	1 (5%)
Telangiectasias	4 (11%)	5 (26%)
Arañas vasculares	2 (6%)	2 (10%)
Eritrosis palmar	1 (3%)	-

(+) El grupo A es significativamente mas joven ($p < 0.02$)

(-) 7 pacientes, sintomatología en algún momento del seguimiento (3 Astenia; 1 Dolor en hipocondrio derecho; 2 Astenia + anorexia; 1 Anorexia). Asintomáticos en la última revisión.

(-) 6 pacientes, sintomatología en algún momento del seguimiento (2 Astenia; 1 Dolor en hipocondrio derecho; 3 varios sintomas: Anorexia + dolor en hipocondrio derecho; Astenia + Anorexia + dolor en hipocondrio derecho; Astenia + dolor en hipocondrio derecho). Asintomáticos en la última revisión, excepto uno (Astenia + dolor).

(*) 7 pacientes, ocasionalmente hepatomegalia. Exploración normal en la última revisión.

(**) 3 pacientes, ocasionalmente hepatomegalia. Exploración normal en la última revisión.

TABLA 5**CARACTERISTICAS EPIDEMIOLOGICAS Y CLINICAS RELACIONADAS CON LA HISTOLOGIA.**

	HEPATITIS CRONICA (IAH \leq 9)	HEPATITIS CRONICA (IAH >9)
Pacientes (n)	16	38
Edad	7.7 \pm 4	27.7 \pm 14.9
Sexo (V/M)	14/2	29/9
Hepatitis aguda	9 (56%)	21 (55%)
Grupos de riesgo:		
Transfusiones/cirugía	1 (6%)	11 (29%)
Drogadicción i.v.	1 (6%)	8 (20%)
Síndrome de Down y otros	2 (12%)	0
CLINICA		
Sintomatología inicial	3	10
Asintomáticos ultima revisión	16	37
Exploración física normal inicial/ última revisión	10/16	5/9
Hepatomegalia inicial/ult.revisión	6/0	33/29 (87%)/(76%)
Esplenomegalia	0	3 (8%)
Telangiectasias	0	9 (24%)
Arañas vasculares	0	4 (10%)
Eritrosis palmar	0	1 (2%)

TABLA 6

IAH DE KNODELL ET AL CORRELACIONADO CON EL SEGUIMIENTO HISTOLOGICO.

IAH BIOPSIA INICIAL	IAH BIOPSIA ULTIMA	
	≤9	>9
≤9	13	3
>9	4	34

p<0.0001

TABLA 7

NUMERO DE PACIENTES CON UN INDICE DE NECROSIS EROSIVA DE ≥ 3 Y < 3 EN LA BIOPSIA INICIAL CORRELACIONADO CON EL NUMERO DE PACIENTES CON UN INDICE DE FIBROSIS DE ≥ 3 O < 3 EN LAS BIOPSIAS DE SEGUIMIENTO ENTRE UN TOTAL DE 54 PACIENTES CON HEPATITIS CRONICA B.

NECROSIS EROSIVA BIOPSIA INICIAL	FIBROSIS BIOPSIA ULTIMA	
	< 3	≥ 3
< 3	12	1
≥ 3	16	25

$p < 0.01$

NUMERO DE PACIENTES CON UN INDICE DE NECROSIS LOBULILLAR DE ≥ 3 Y < 3 EN LA BIOPSIA INICIAL CORRELACIONADO CON EL NUMERO DE PACIENTES CON UN INDICE DE FIBROSIS DE ≥ 3 O < 3 EN LAS BIOPSIAS DE SEGUIMIENTO ENTRE UN TOTAL DE 54 PACIENTES CON HEPATITIS CRONICA B.

NECROSIS LOBULILLAR BIOPSIA INICIAL	FIBROSIS BIOPSIA ULTIMA	
	< 3	≥ 3
< 3	11	2
≥ 3	17	24

$P < 0.017$

TABLA 8**PORTADORES O NO DE HBeAg (SEROCONVERSION AntiHBe) N=30 PACIENTES**

	Grupo 1 HBeAg+/AntiHBe-	Grupo 2 HBeAg-/AntiHBe-	Grupo 3 HBeAg-/AntiHBe+
N° DE PACIENTES	17	6	7
HBsAg POSITIVO	17	1	3
EDAD (años) (X±DS) (gr 1 pS grs 2+3)	7.94±3.96	31.5±21.14	25.86±17.80
SEXO (V/M)	13/4	4/2	6/1
HEPATITIS AGUDA	6	4	5
GPT (gr 1 pS grs 2+3)	190.06±102.51	138.83±82.07	410.14±178.55

EPIDEMIOLOGIA [N° (%)]

Drogadicción i.v.	2 (11.76%)	2 (33.33%)	4 (57.14%)
Transfusión	2 (11.76%)	1 (16.67%)	1 (14.29%)
Desconocida	11 (64.71%)	3 (50%)	2 (28.57%)
Retraso psicomotor	2 (11.76%)	-	-

HISTOLOGIA

Cambios mínimos	3	-	0
HCP *	4	1	0
HC "borderline"	5	1	0
HCA *			
Necrosis erosiva	3	2	5
Puentes de necrosis	-	-	1
Puentes de fibrosis	2	2	1

SEGUIMIENTO (X±DS)

(meses) 1° biopsia/ ult. biopsia	37.41±12.48	21.83±5.71	20.14±7.45
-------------------------------------	-------------	------------	------------

TRATAMIENTO

Corticoides	3	-	-
I+C	-	2	2
Antivirales	-	-	2

HCP=Hepatitis crónica persistente; HC=Hepatitis crónica; HCA=Hepatitis crónica activa;
I+C=Inmunosupresores + corticoides.

*=Diferencia estadísticamente significativa $p < 0.01$ entre las lesiones hepáticas del grupo 1 y las de los grupos 2 y 3.

TABLA 9A**ESTUDIO EVOLUTIVO DEL GRUPO 1 (HBeAg +/-AntiHBe -)
N=17 PACIENTES: PRIMERA BIOPSIA --- BIOPSIA DE CONTROL***

Nº DE PACIENTES	HBeAg POSITIVO	HBeAg NEGATIVO	HBeAg NEGATIVO
	AntiHBe NEGATIVO	AntiHBe NEGATIVO	AntiHBe POSITIVO
Nº DE PACIENTES	12 **	2	3
SEGUIMIENTO (X±DS) (meses)	33.08±11.61	47±14.14	48.33±4.51
SEXO(V/M)	9/3	2/0	2/1
GPT (X±DS)			
Primera biopsia	188.33±116.17	210.5±82.73	183.33±76.95
Biopsia control	183.25±195.27	36±11.31	54.67±47.72
HEPATITIS AGUDA	5	1	-
EPIDEMIOLOGIA			
Drogadicción i.v.	1	1	-
Transfusión/cirugía	2	-	-
Desconocida	7	1	3
Retraso psicomotor	2	-	-

* El periodo medio de seguimiento desde la 1ª hasta la biopsia de control de los 17 pacientes ha sido de 37.41±12.48.

** Estudio evolutivo de los pacientes HBeAg POSITIVO= TABLA 9B

TABLA 9B**ESTUDIO EVOLUTIVO DE LOS PACIENTES HBeAg POSITIVO****N=12 PACIENTES: BIOPSIA DE CONTROL --- ULTIMA REVISION CLINICA***

	HBeAg POSITIVO	HBeAg NEGATIVO AntiHBe POSITIVO
Nº DE PACIENTES	9**	3
SEGUIMIENTO (X±DS) (meses)	6.63±3.02	22.33±2.31
SEXO(V/M)	6/2	2/1
GPT(X±DS)		
Biopsia de control	182.89±226.79	184.34±63.06
Ultima revisión clínica	120.63±69.57	53.67±30.08
HEPATITIS AGUDA	3	2
EPIDEMIOLOGIA		
Drogadicción i.v.	0	-
Transfusión/cirugía	2	-
Desconocida	4	3
Retraso psicomotor	2	-

* El periodo medio de seguimiento desde la biopsia de control hasta la última revisión clínica de los 12 pacientes fue de 10.91 ± 7.82

** La última revisión clínica de un paciente coincidió con la de la realización de la biopsia de control.

TABLA 10A**GRUPO 1. HBeAg (+) / AntiHBe (-) (N = 17 PACIENTES)****FINAL DE ESTUDIO HBeAg (+) PERSISTENTE (N=9)**

	PRIMERA BIOPSIA				ULTIMA REVISION				
Nº CASO	1	3	7	12	14	17*	20	52	53
EDAD INICIAL/ SEXO	7/V	9/V	5/V	11/V	7/V	19/V	4/M	9/M	5/V
BIOQUIMICA									
GPT 1ª biopsia	159	87	80	368	60	415	89	259	122
GPT ult.biopsia	110	93	58	779	67	183	99	109	148
GPTult.revisión	132	84	81	42	62	NR	148	157	259
HISTOLOGIA									
1ª biopsia	CM	CM	HCP	HCBL	HCBL	HCA	HCA	HCApf	HCApf
ult.biopsia	HCP	CM	HCP	HCApf	HCP	HCApn	HCApf	HCApf	HCApf
SEGUIMIENTO (meses)									
1ª biopsia/ ult.biopsia	45	34	50	28	53	17	25	19	36
ult.biopsia/ ult.revisión	12	5	10	7	3	NR	4	6	6
1ª biopsia/ ult.revisión (rango 2a - 6a)	57	39	60	35	56		29	25	42
TRATAMIENTO									
1ª biopsia/ ult.biopsia	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI(C)	NO
ult.biopsia/ ult.revisión	NO	NO	NO	NO	SI(C)	-	NO	NO	NO

CM=cambios mínimos; HCP=Hepatitis crónica persistente; HCBL=Hepatitis crónica "borderline"; HCA=Hepatitis crónica activa; HCApf=HCA con puentes de fibrosis; HCApn=HCA con puentes de necrosis; NR=No revisión; a=años; C=corticoides.

* Paciente con anticuerpos Antidelta positivos en la última biopsia.

TABLA 10B**GRUPO 1. HBeAg (+) / AntiHBe (-) (N = 17 PACIENTES)****FINAL DE ESTUDIO FASE "VENTANA e" (N=2)**

Nº CASO	2	23
EDAD INICIAL/SEXO	8/V	8/V
BIOQUIMICA		
GPT 1ª biopsia	152	269
GPT ult.biopsia	44	28
GPT ult.revisión	-	-
HISTOLOGIA		
1ª biopsia	CM	HCA
ult.biopsia	CM	HCP
SEGUIMIENTO (meses)		
1ª biopsia/ ult.biopsia	57	37
ult.biopsia/ ult.revisión	NR	NR
1ª biopsia/ ult.revisión (rango 2a - 6a)		
TRATAMIENTO		
1ª biopsia/ ult.biopsia	NO	NO
ult.biopsia/ ult.revisión	-	-

CM=cambios mínimos; HCP=Hepatitis crónica persistente; HCA=Hepatitis crónica activa;
NR=No revisión; a=años.

TABLA 10C**GRUPO 1. HBeAg (+) / AntiHBe (-) (N = 17 PACIENTES)****FINAL DE ESTUDIO SEROCONVERSION HBeAg-/AntiHBe+ (N=6)**

	ULTIMA BIOPSIA (N=3)			ULTIMA REVISION (N=3)		
Nº CASO	6	10	15	9	13*	16
EDAD INICIAL/ SEXO	9/V	3/M	12/V	4/V	11/M	4/V
BIOQUIMICA						
GPT 1ª biopsia	144	134	272	185	265	171
GPT ult.biopsia	40	108	16	257	152	144
GPT ult.revisión	NR	144	NR	20	95	46
HISTOLOGIA						
1ª biopsia	HCP	HCP	HCBL	HCP	HCBL	HCBL
ult.biopsia	HCP	HCBL	CM	HCP	HCApf	HCBL
SEGUIMIENTO (meses)						
1ª biopsia/ ult.biopsia	53	44	48	24	30	36
ult.biopsia/ ult.revisión	NR	9	NR	21	25	21
1ª biopsia/ ult.revisión	-	53	-	45	55	57
TRATAMIENTO						
1ª biopsia/ ult.biopsia	NO	NO	SI(C)	NO	SI(C)	NO
ult.biopsia/ ult.revisión	-	NO	-	NO	NO	NO

CM=cambios mínimos; HCP=Hepatitis crónica persistente; HCBL=Hepatitis crónica "borderline";HCApf=HCA con puentes de fibrosis; NR=No revisión; C=Corticoides

* Paciente con anticuerpos Antidelta positivos en la última biopsia.

TABLA 11A**ESTUDIO EVOLUTIVO DEL GRUPO 2 (HBeAg -/AntiHBe -)
N=6 PACIENTES: PRIMERA BIOPSIA --- BIOPSIA DE CONTROL***

	HBeAg NEGATIVO AntiHBe NEGATIVO	HBeAg NEGATIVO AntiHBe POSITIVO
Nº DE PACIENTES	4***	2
SEGUIMIENTO(X±DS) (meses)	20.5±6.56	24.5±3.54
SEXO(V/M)	2/2	2/0
GPT(X±DS)		
Primera biopsia	178.25±65.79	60±45.25
Biopsia de control**	194.5±45.03	65.5±9.19
HEPATITIS AGUDA	2	2
EPIDEMIOLOGIA		
Drogadicción i.v.	1	1
Transfusión/cirugía	1	0
Desconocida	2	1
Retraso psicomotor	0	0

* El periodo medio de seguimiento desde la 1ª hasta la biopsia de control de los 6 pacientes ha sido de 21.83 ± 5.71

** Hay significación estadística entre los dos grupos ($p < 0.02$)

*** Estudio evolutivo de los pacientes HBeAg NEGATIVO/AntiHBe NEGATIVO= TABLA 11B

TABLA 11B**ESTUDIO EVOLUTIVO DE LOS PACIENTES HBeAg NEGATIVO/AntiHBe NEGATIVO****N=4 PACIENTES: BIOPSIA DE CONTROL --- ULTIMA REVISION CLINICA***

	HBeAg NEGATIVO AntiHBe NEGATIVO	HBeAg NEGATIVO AntiHBe POSITIVO
Nº DE PACIENTES	3	1
SEGUIMIENTO(X±DS) (meses)	24±16.09	-
SEXO(V/M)	1/2	1/0
GPT(X±DS)		
Biopsia de control	205.33±48.35	162
Ultima revisión clínica	135.67±65.06	57
HEPATITIS AGUDA	1	1
EPIDEMIOLOGIA		
Drogadicción i.v.	0	1
Transfusión/cirugía	1	-
Desconocida	2	-
Retraso psicomotor	0	-

* El periodo medio de seguimiento desde la biopsia de control hasta la última revisión clínica de los 4 pacientes fue de 20±15.38

TABLA 12**GRUPO 2. HBeAg (-) / AntiHBe (-) (N=6 PACIENTES)****FINAL DE ESTUDIO HBeAg-/AntiHBe- (N=3) SEROCONVERSION:**

Nº CASO	HBeAg-/AntiHBe+ (N=3)					
	PRIMERA BIOPSIA	ULTIMA REVISION	ULTIMA REVISION	ULTIMA REVISION	ULTIMA REVISION	ULTIMA BIOPSIA
	18	27	51	49	8	11

HBsAg	Neg	Neg	Neg	Neg	Post	Neg
-------	-----	-----	-----	-----	------	-----

EDAD INICIAL/ SEXO	49/M	59/V	40/M	20/V	4/V	17/V
-----------------------	------	------	------	------	-----	------

BIOQUIMICA

GPT 1ª biopsia	124	155	274	160	92	28
GPT ult. biopsia*212		250	154	162	59	72
GPT ult. revisión	69	139	199	57	84	141

HISTOLOGIA

1ª biopsia	HCA	HCA	HCApf	HCApf	HCP	HCBL
ult. biopsia	HCApf	HCA	HCApf	HCApf	HCP	HCA

SEGUIMIENTO (meses)

1ª biopsia/ ult. biopsia	28	12	21	21	27	22
-----------------------------	----	----	----	----	----	----

ult. biopsia/ ult. revisión	37	29	6	8	10	15
--------------------------------	----	----	---	---	----	----

1ª biopsia/ ult. revisión	65	41	27	29	37	37
------------------------------	----	----	----	----	----	----

(rango 2a - 6a)

TRATAMIENTO

1ª biopsia/ ult. biopsia	SI(I+C)	NO	SI(I+C)	NO	NO	NO
-----------------------------	---------	----	---------	----	----	----

ult. biopsia/ ult. revisión	NO	NO	SI(I+C)	NO	NO	NO
--------------------------------	----	----	---------	----	----	----

HCApf=Hepatitis crónica activa con puentes de fibrosis; HCBL=Hepatitis crónica "borderline"; HCP=Hepatitis crónica persistente; a=años; I+C=Inmunosupresores + corticoides.

* Hay significación estadística de los valores de GPT de la última biopsia de los pacientes sin seroconversión (18, 27, 51, 49) con los que ya han seroconvertido (8, 11).

TABLA 13**GRUPO 3. HBeAg (-) / AntiHBe (+) (N=7 PACIENTES)**

Nº CASO	19+	22	24	25++	28+++	44	36++++
---------	-----	----	----	------	-------	----	--------

EDAD INICIAL	22	20	20	66	18	19	16
--------------	----	----	----	----	----	----	----

SEXO	V	M	V	V	V	M	V
------	---	---	---	---	---	---	---

HBsAg	Neg	Neg	Neg	Post	Neg	Post	Post
-------	-----	-----	-----	------	-----	------	------

BIOQUIMICA

GPT 1ªbiopsia*	381	230	580	150	585	365	580
----------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

GPT ult.biopsia	171	157	25	17	168	30	476
-----------------	-----	-----	----	----	-----	----	-----

GPTult.revisión*	92	36	NR	NR	175	29	103
------------------	----	----	----	----	-----	----	-----

HISTOLOGIA

1ª biopsia	HCA	HCA	HCA	HCA	HCA	HCApf	HCApn
------------	-----	-----	-----	-----	-----	-------	-------

ult.biopsia	HCApf	HCApf	HCBL	HCA	HCA	HCP	HCApn
-------------	-------	-------	------	-----	-----	-----	-------

SEGUIMIENTO (meses)

1ªbiopsia/ ult.biopsia	28	17	25	25	25	12	9
---------------------------	----	----	----	----	----	----	---

ult.biopsia/ ult.revisión	5	11	NR	NR(+)	8	47	49
------------------------------	---	----	----	-------	---	----	----

1ªbiopsia/ ult. revisión	33	28	-	-	33	59	58
-----------------------------	----	----	---	---	----	----	----

(rango 2a - 5a)

TRATAMIENTO

1ªbiopsia/ ult.biopsia	NO	NO	SI(I+C)	NO	SI(I+C)	SI(AV)	SI(AV)
---------------------------	----	----	---------	----	---------	--------	--------

ult.biopsia/ ult.revisión	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI(AV+I+C)
------------------------------	----	----	----	----	----	----	------------

HCA=hepatitis crónica activa; HCApf=HCA con puentes de fibrosis; HCApn=HCA con puentes de necrosis; HCBL=hepatitis crónica "borderline"; HCP=hepatitis crónica persistente; NR=No revisión; a=años I+C=Inmunosupresores + corticoides, AV=antivirales.

* Hay significación estadística entre sus medias ($p < 0.001$).

+ AntiHBe(-): ult. biopsia y ult.revisión; ++ HBsAg

(-)/AntiHBs(+) : ult.biopsia.

+++ AntiHBs(+): ult.biopsia; ++++ AntiDelta (+): revisiones posteriores a la ult.biopsia.

TABLA 14A**RASGOS SEROLOGICOS DEL GRUPO DE PORTADORES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS DELTA: MARCADORES DEL VIRUS B**

NºCASO	HBsAg	AntiHBs	AntiHBc	AntiHBcIgM	HBeAg	AntiHBe	PreS1
13	+	-	+	-	-	+	+
17	+	-	+	ND	+	-	ND
36	+	-	+	-	-	+	-
38	+	-	+	-	+	-	+
47	+	-	+	-	-	+	+
54	+	-	+	-	-	+	+

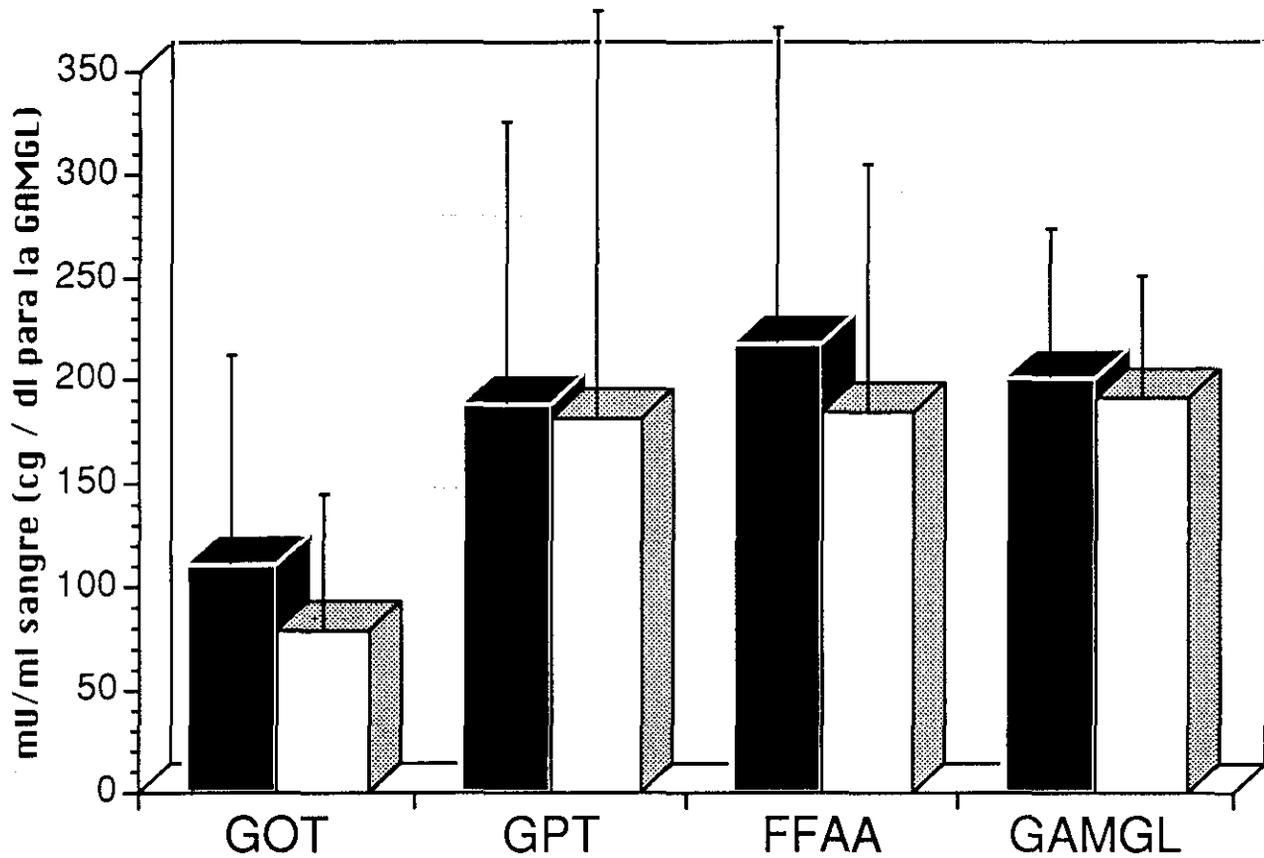
ND=No realización de su determinación a nivel sérico.

TABLA 14B**RASGOS SEROLOGICOS DEL GRUPO DE PORTADORES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS DELTA: MARCADORES DEL VIRUS DELTA Y DNA-VHB**

NºCASO	AntiD	AntiD-M	HDAg	DNA-VHB
13	+	+	-	-
17	+	ND	ND	ND
36	+	-	-	-
38	+	+	-	-
47	+	±	-	-
54	+	-	-	-

ND=No realización de su determinación a nivel sérico.

GRAFICOS

Gráfico 1**Grupo A
Portadores de HBsAg
BIOQUIMICA**

■ 1ª Biopsia

□ Ultima biopsia

Gráfico 2
Grupo B
Anti Antígenos de VHB +
BIOQUIMICA

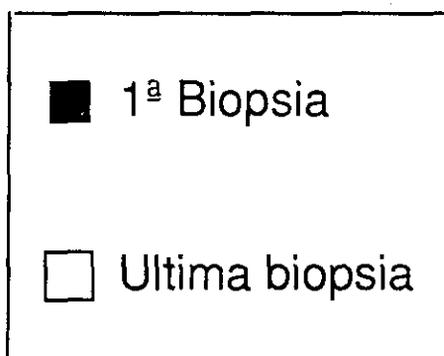
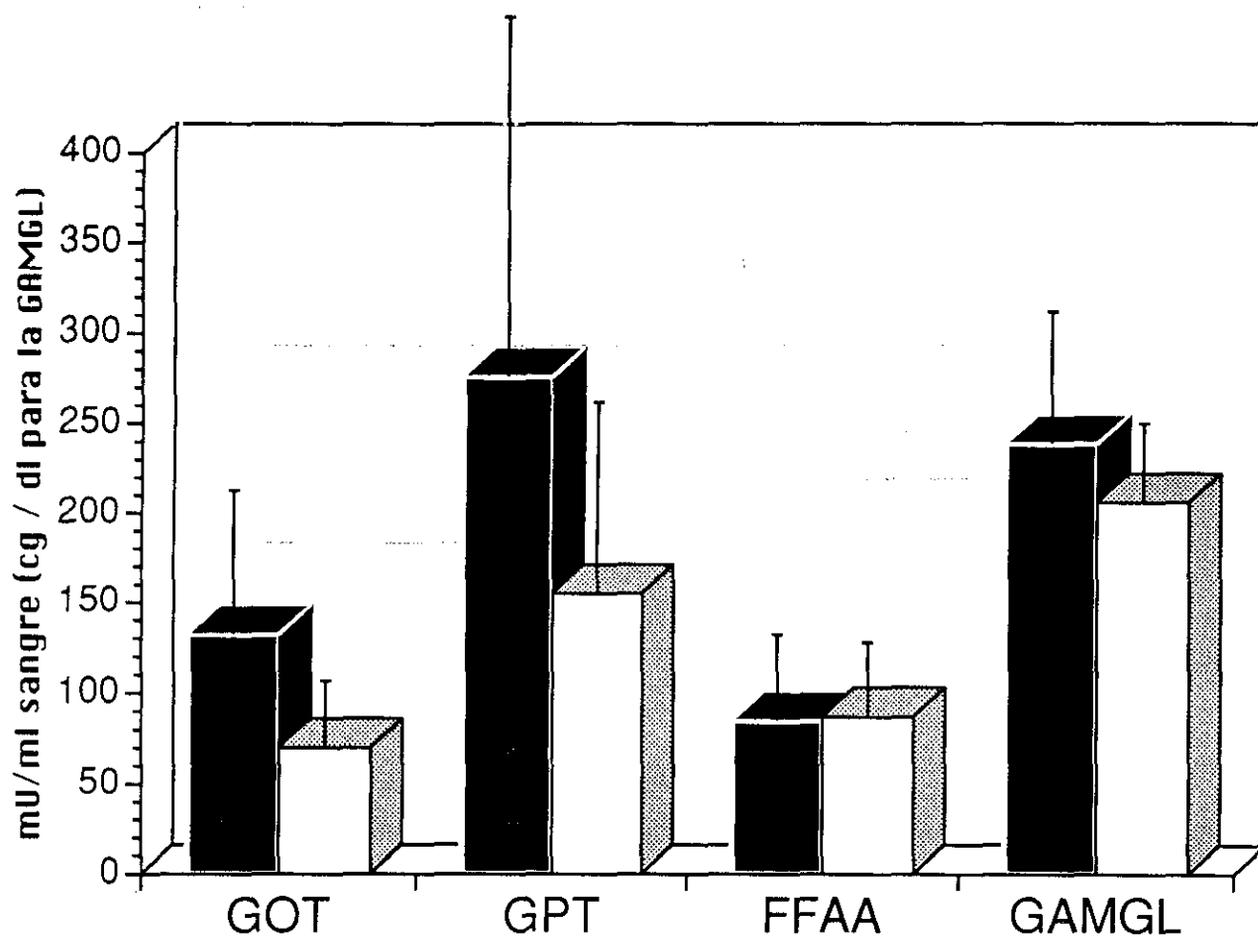
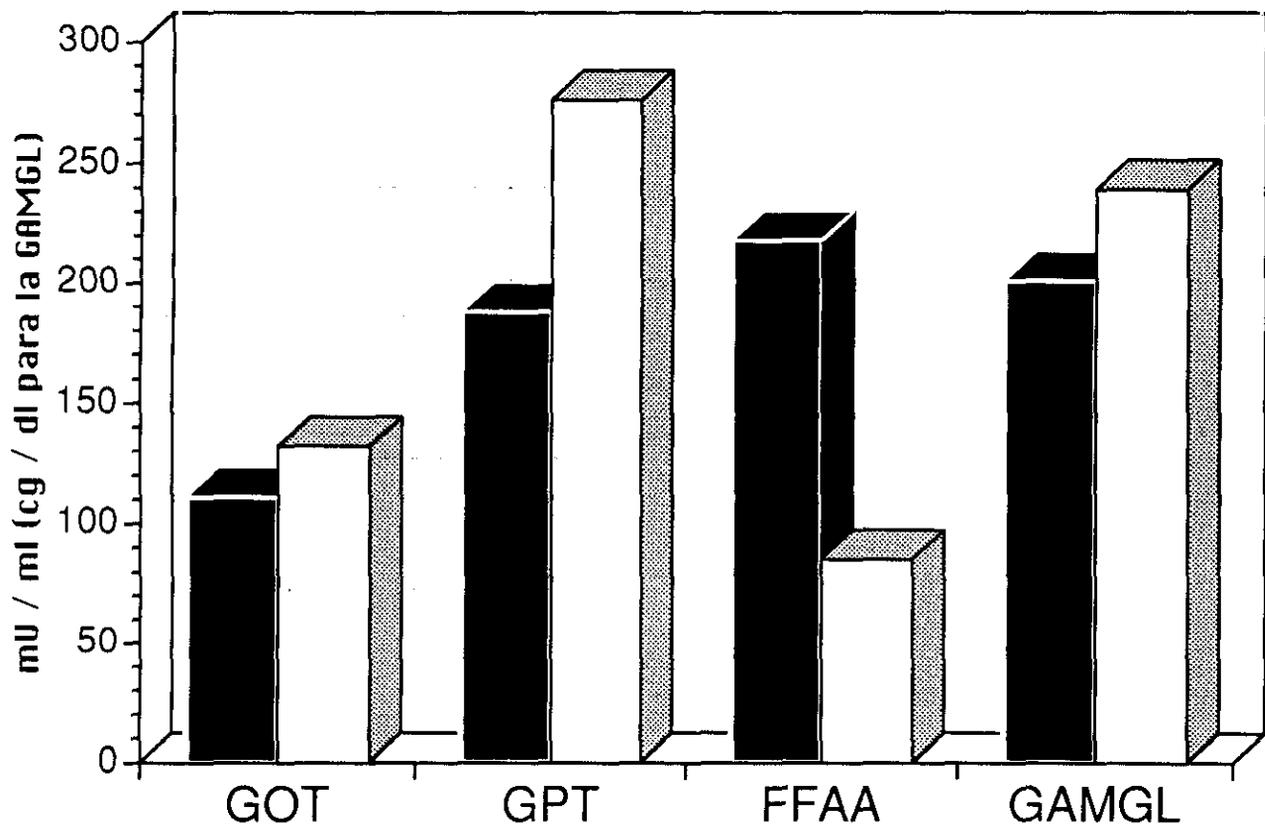
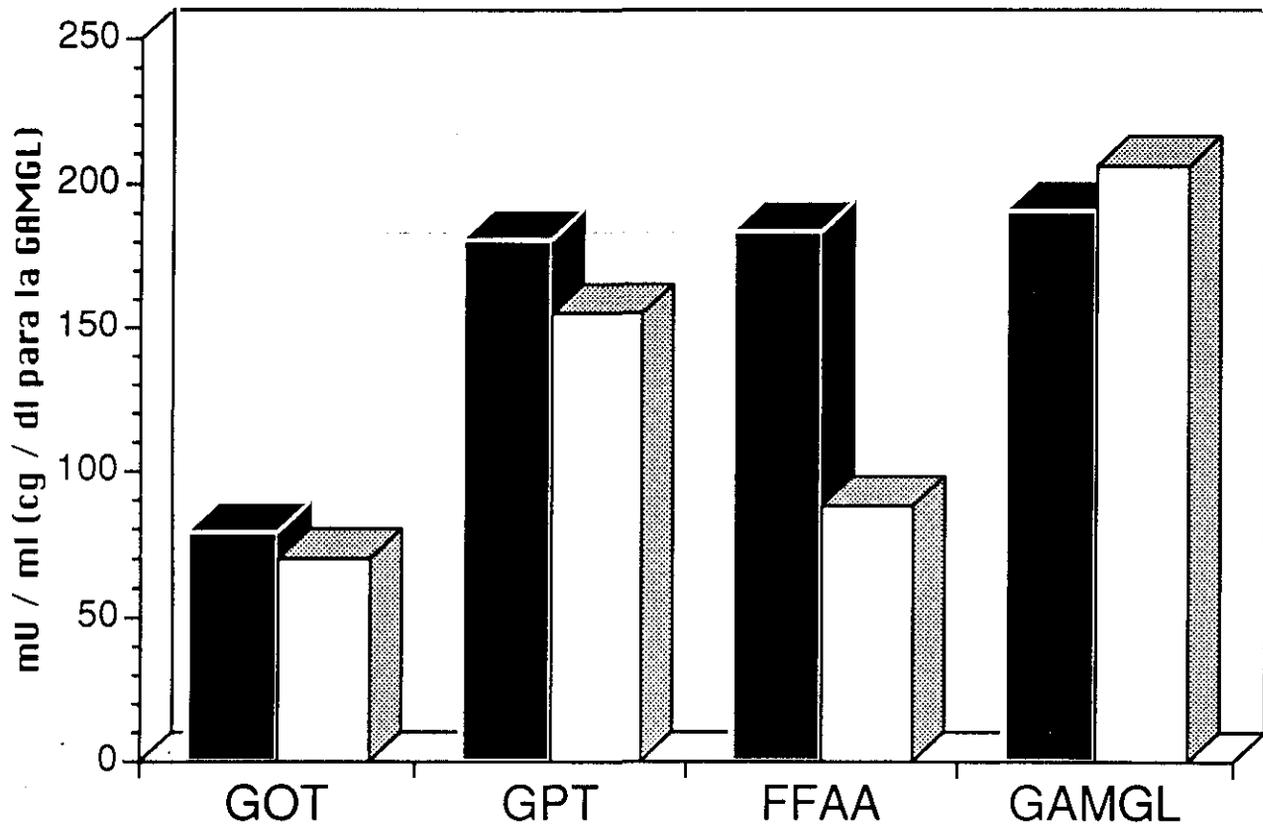


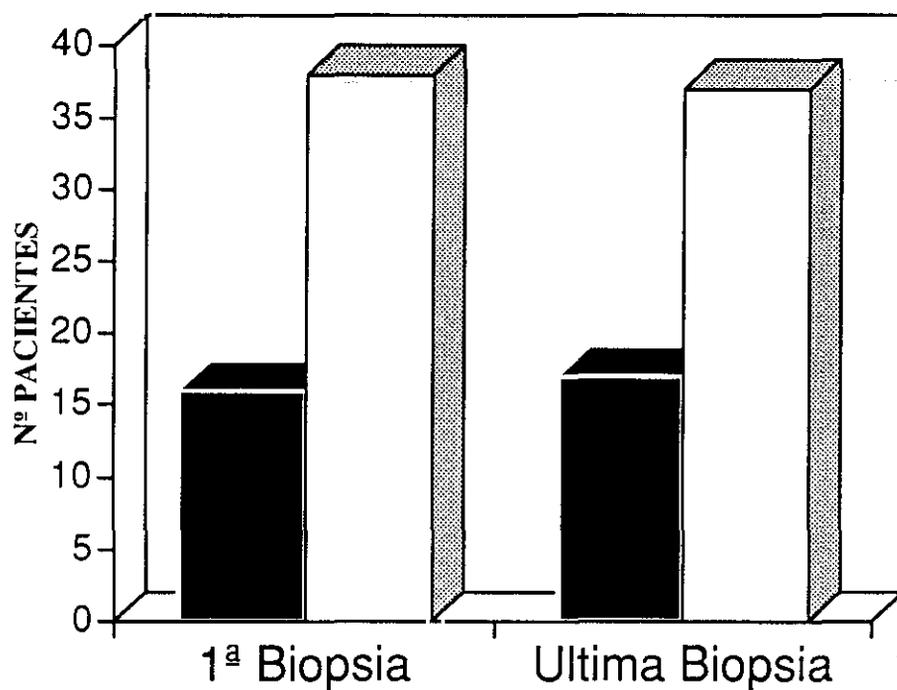
Gráfico 3**Marcadores virales séricos /
Bioquímica
1ª BIOPSIA**

■ A: HBSAG +
□ B: ANTI-VHB +

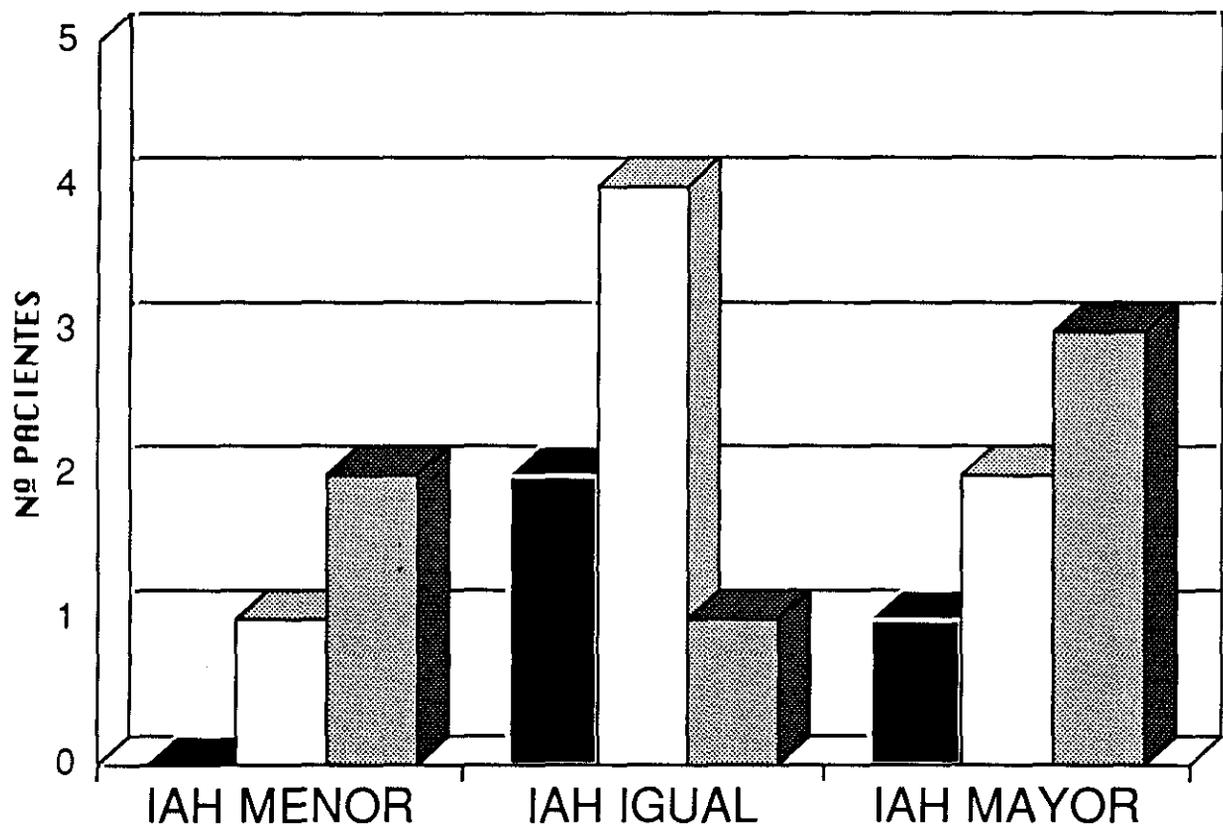
Gráfico 4

**Marcadores virales séricos /
Bioquímica
ULTIMA BIOPSIA**

■ A: HBSAG +
□ B: ANTI-VHB +

Gráfico 5**HISTOLOGIA:
Distribución de los
tipos morfológicos**

- Cambios mínimos + HCP + HC "Borderline"
- HCA (1ª Biopsia) / HCA + Cirrosis (Última Biopsia)

Gráfico 6**Evolución histológica del grupo de Hepatitis Crónica****IAH \leq 9**

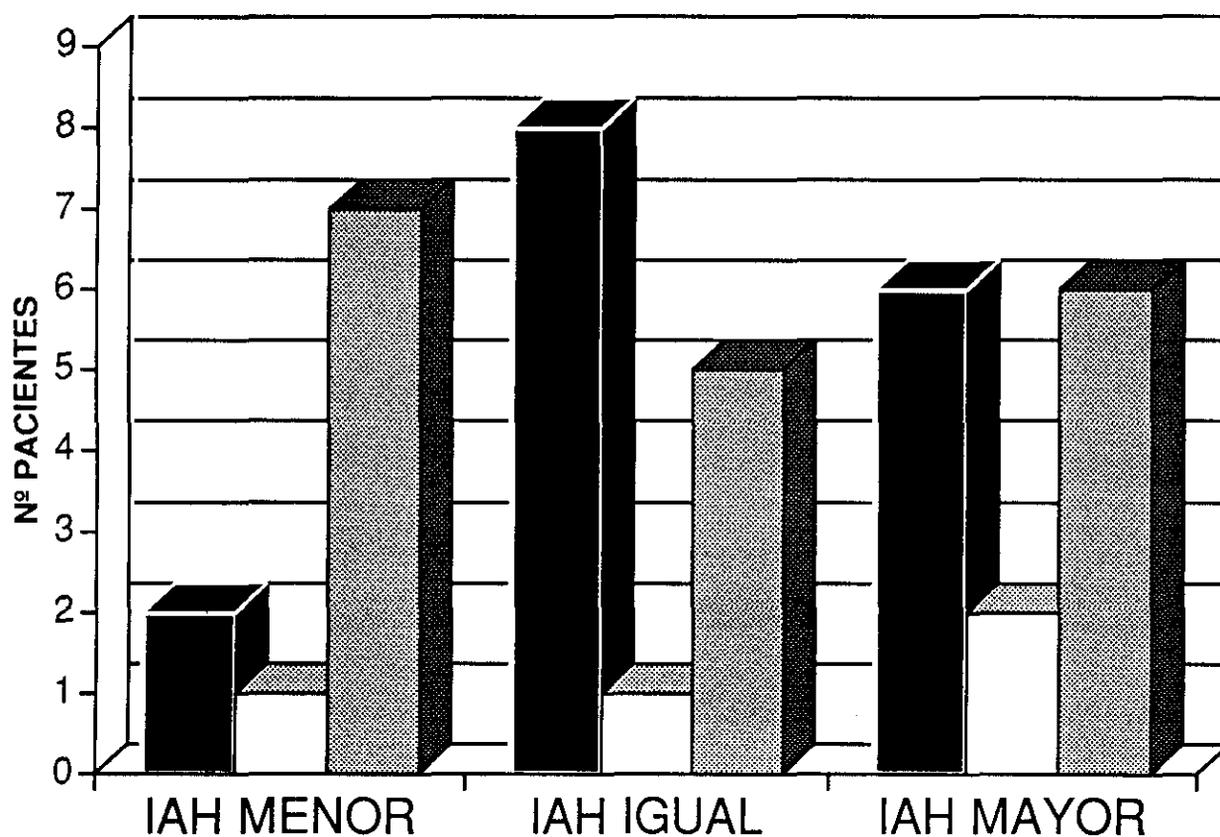
■ Cambios mínimos

□ HCP

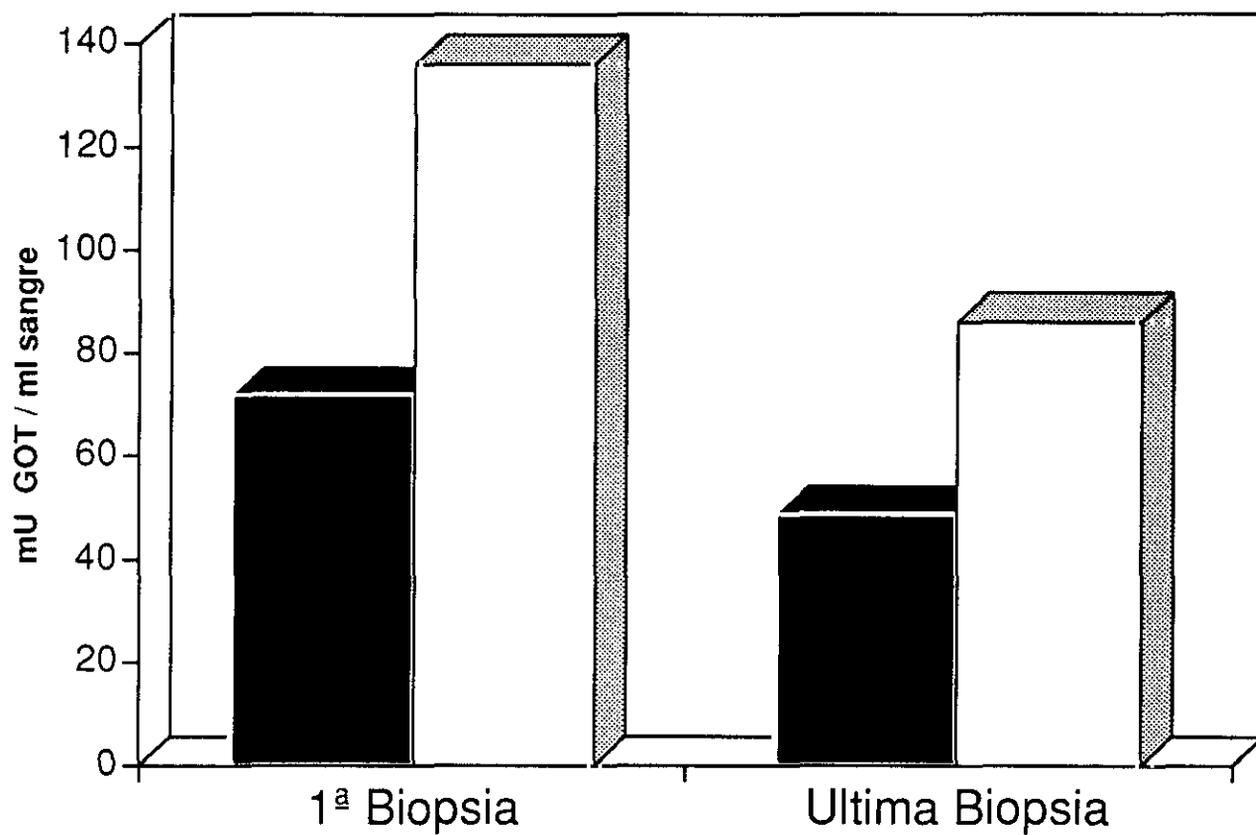
▨ HC "Borderline"

Gráfico 7

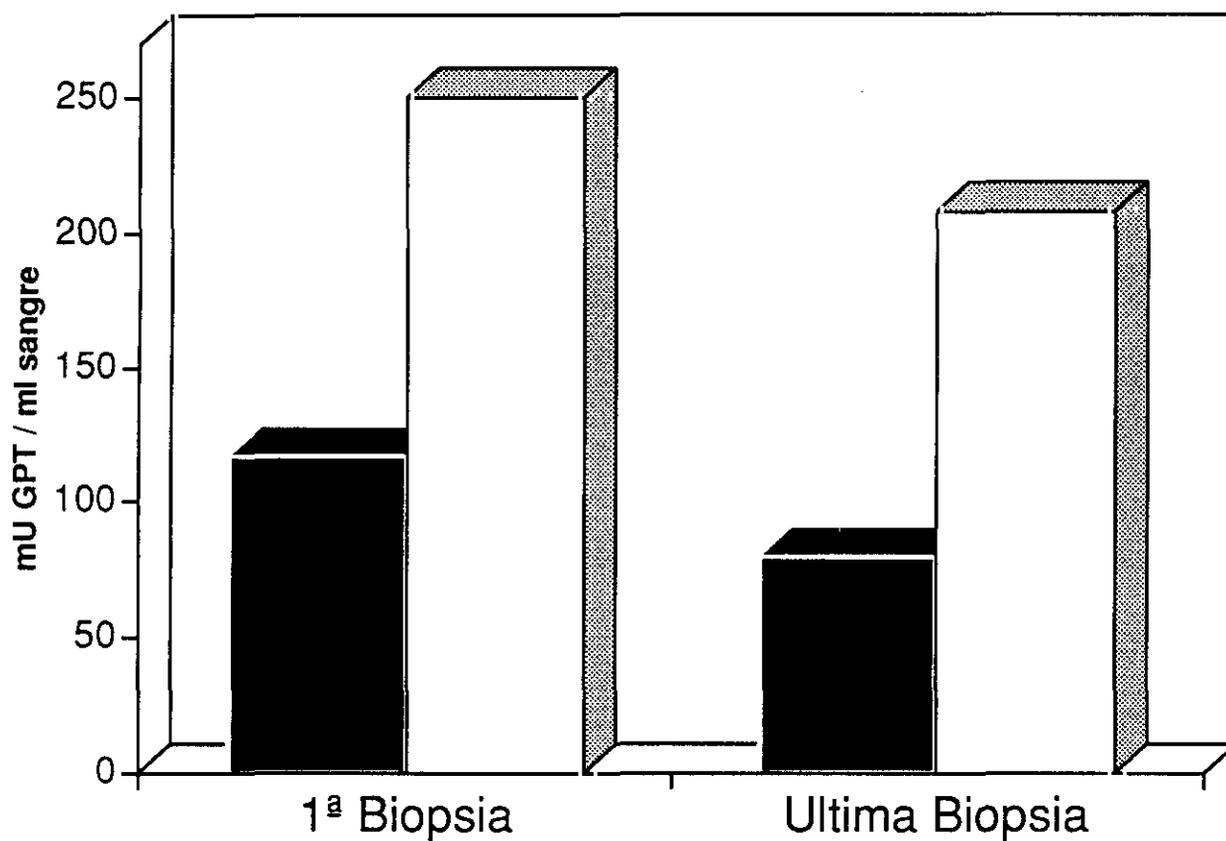
**Evolución histológica del
grupo de Hepatitis Crónica
IAH > 9**



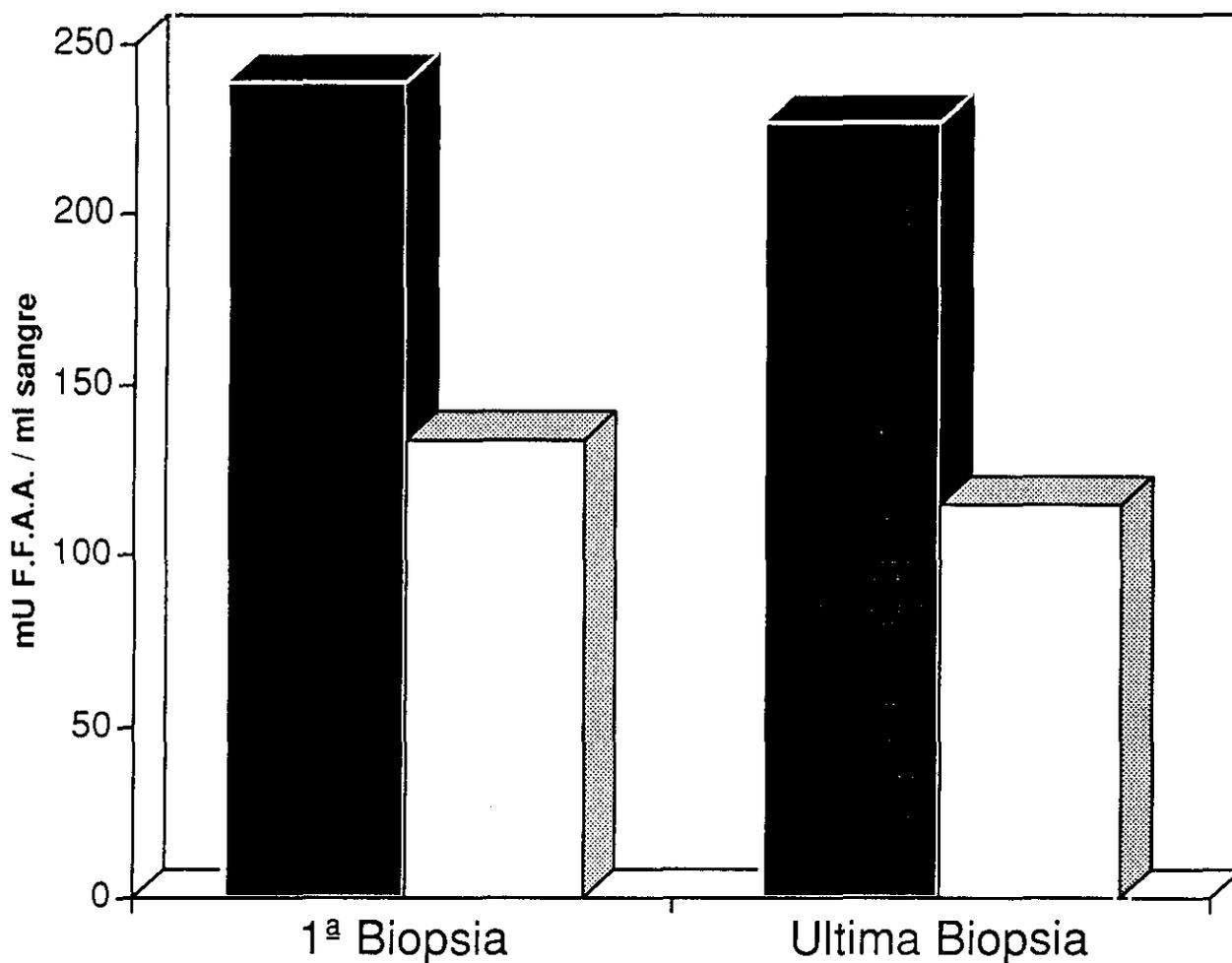
- HCA (Necrosis erosiva)
- HCA (Puentes de necrosis)
- ▒ HCA (Puentes de fibrosis)

Gráfico 8**Histología / Bioquímica GOT**

- HC IAH ≤ 9 (Cambios mínimos + HCP)
- HC IAH > 9 (HCA-1ª Biopsia- / HCA + Cirrosis- Ultima Biopsia-)

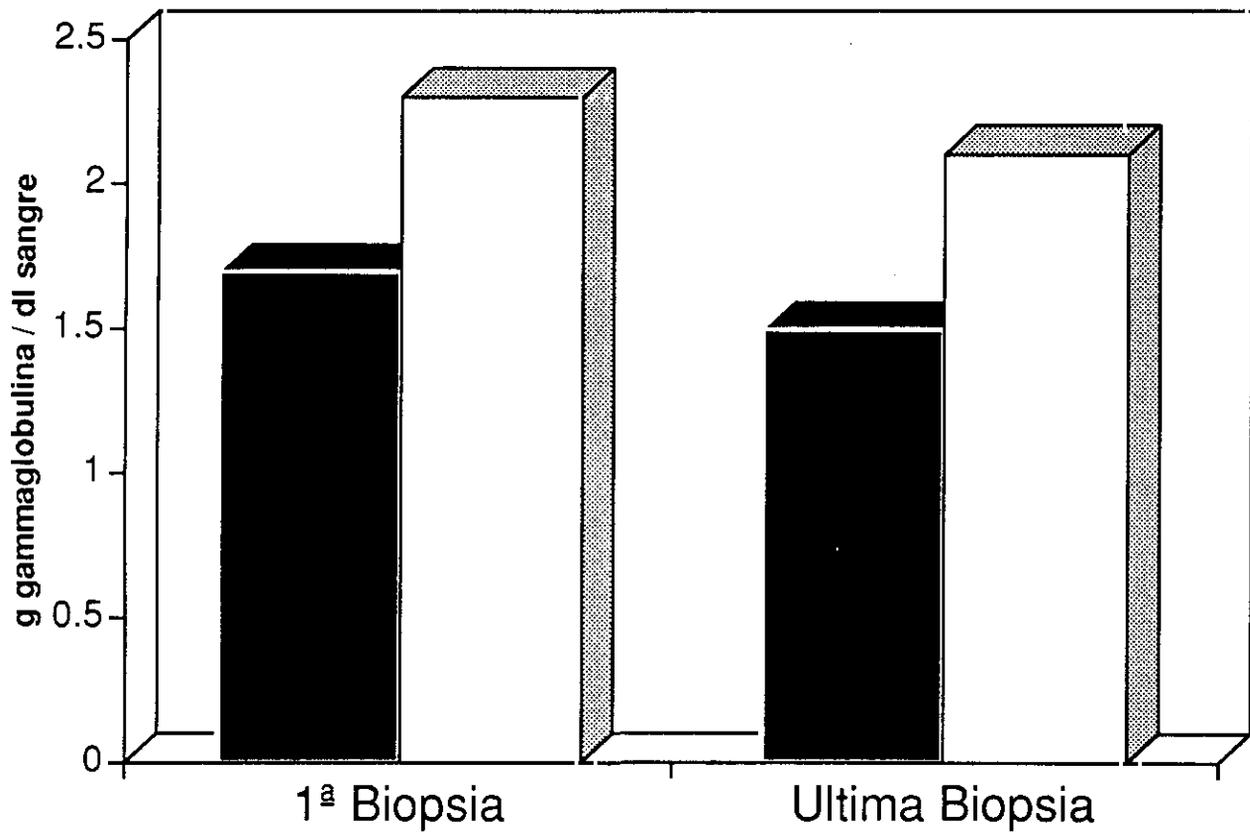
Gráfico 9**Histología / Bioquímica GPT**

- HC IAH ≤ 9 (Cambios mínimos + HCP)
- HC IAH > 9 (HCA-1ª Biopsia-/HCA+Cirrosis-Ultima Biopsia-)

Gráfico 10**Histología / Bioquímica
F.F.A.A.**

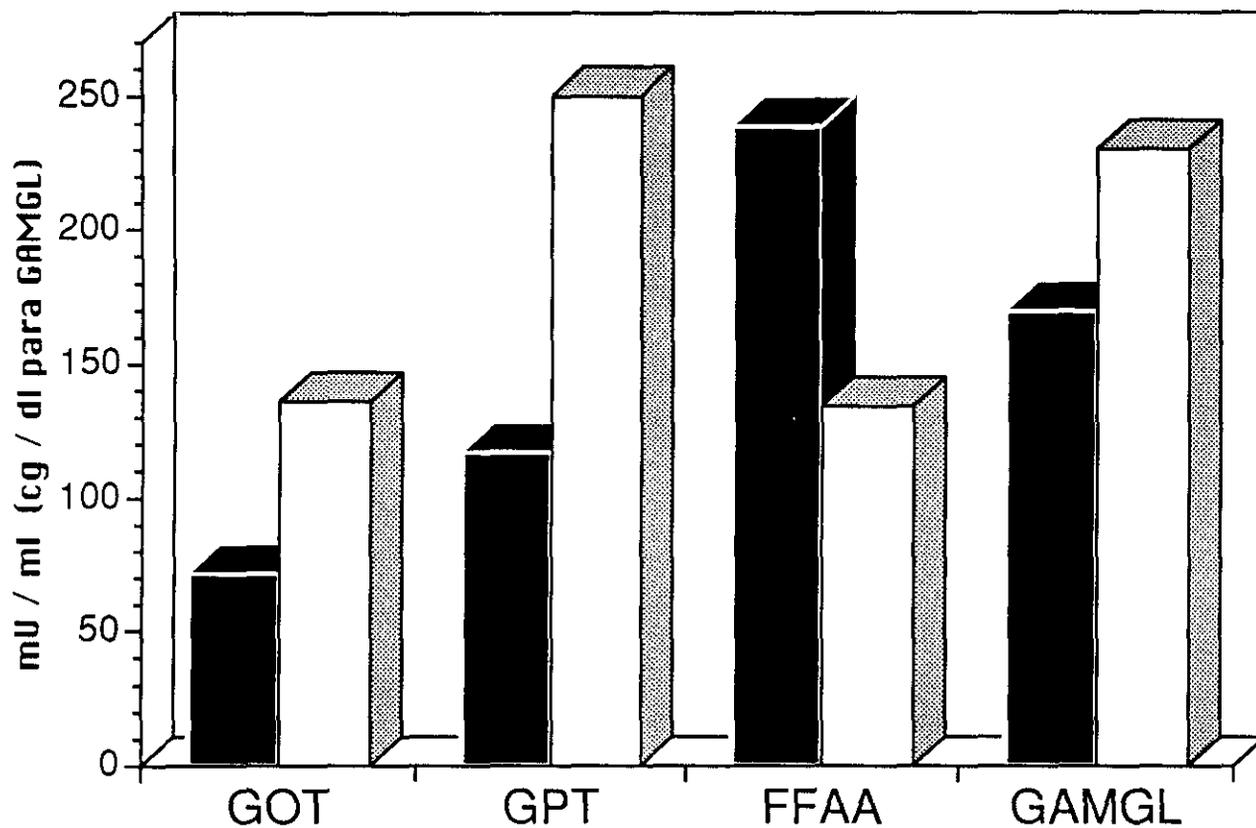
■ HC IAH ≤ 9 (Cambios mínimos + HCP)

▨ HC IAH > 9 (HCA-1ª Biopsia-/HCA+ Cirrosis-Ultima Biopsia-)

Gráfico 11**Histología / Bioquímica
Gammaglobulina**

- HC IAH ≤ 9 (Cambios mínimos + HCP)
- HC IAH > 9 (HCA-1ª Biopsia-/HCA+ Cirrosis-Ultima Biopsia-)

Histología / Bioquímica
1ª BIOPSIA



■ HC IAH ≤ 9

□ HC IAH > 9

**Histología / Bioquímica
ULTIMA BIOPSIA**

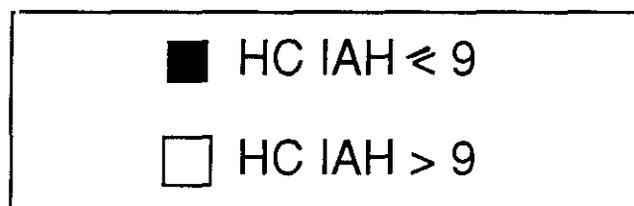
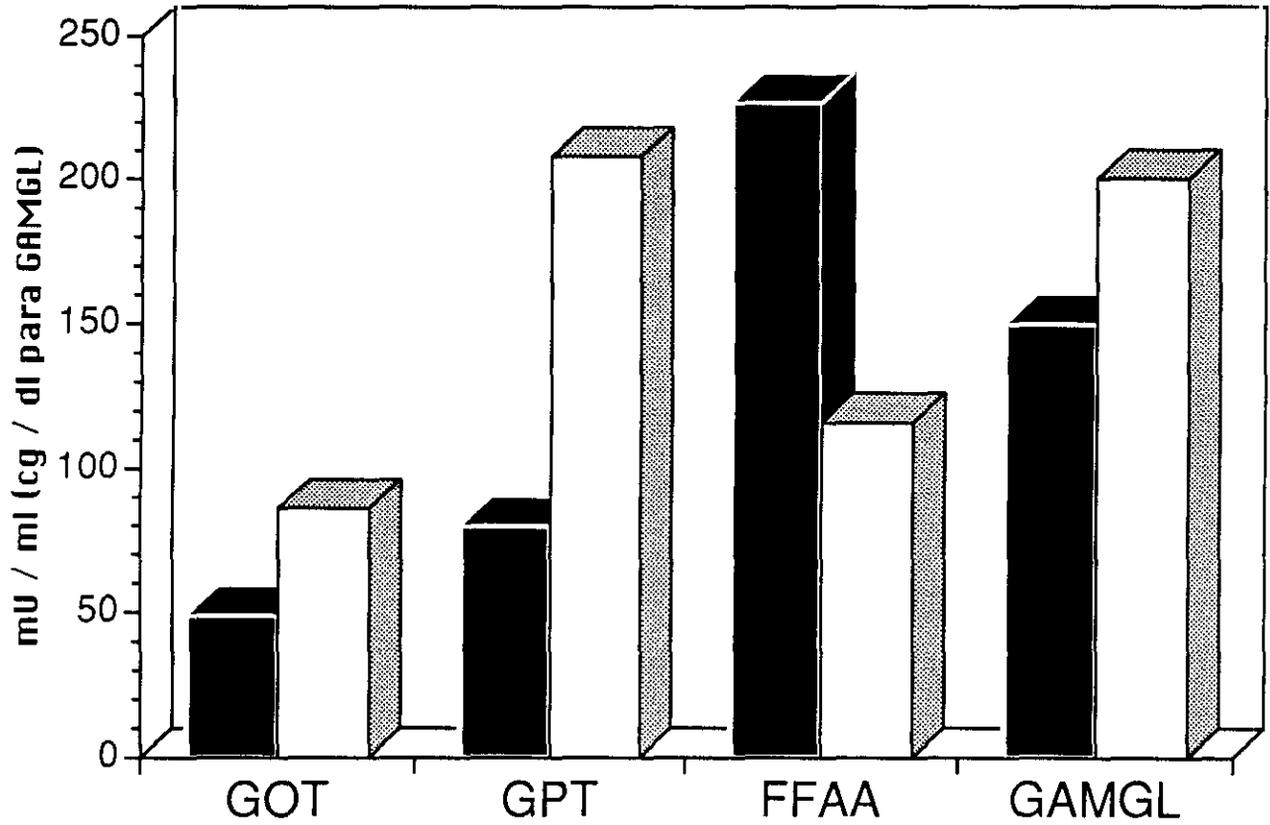
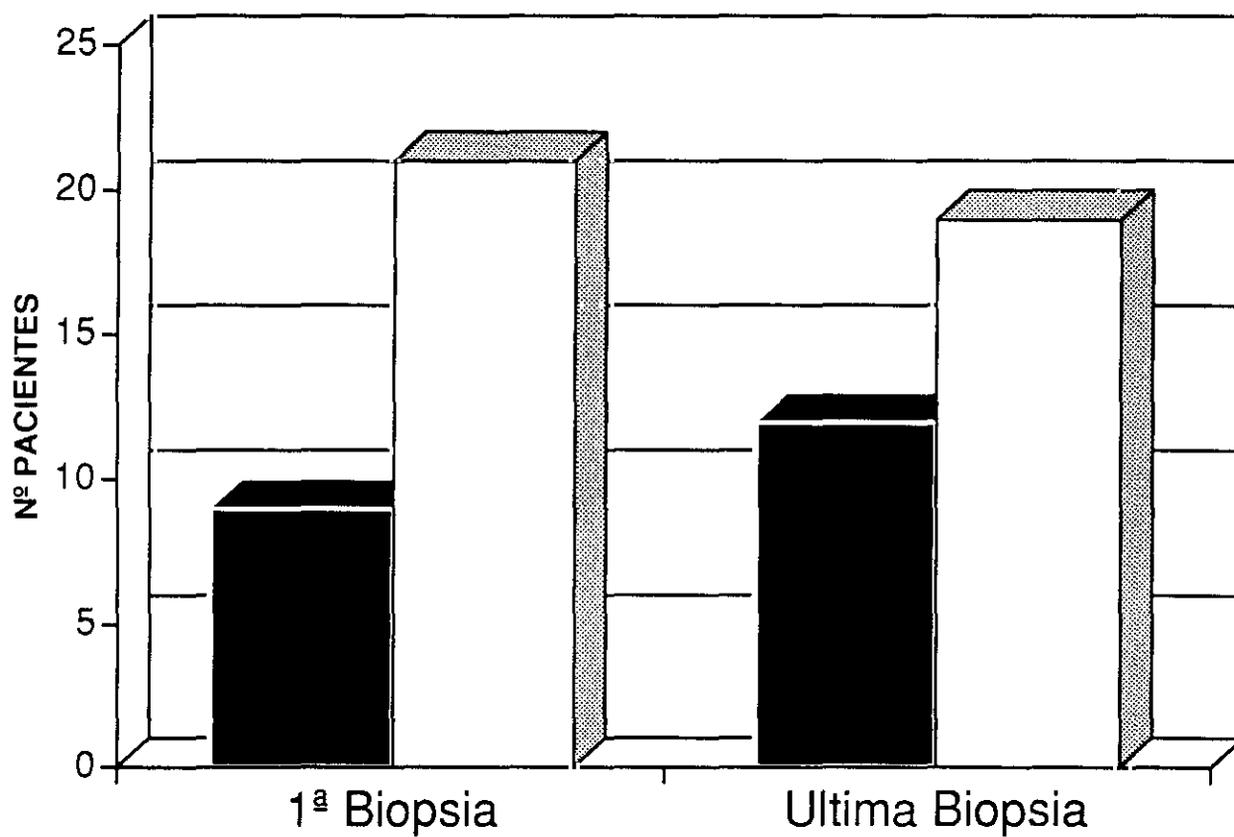
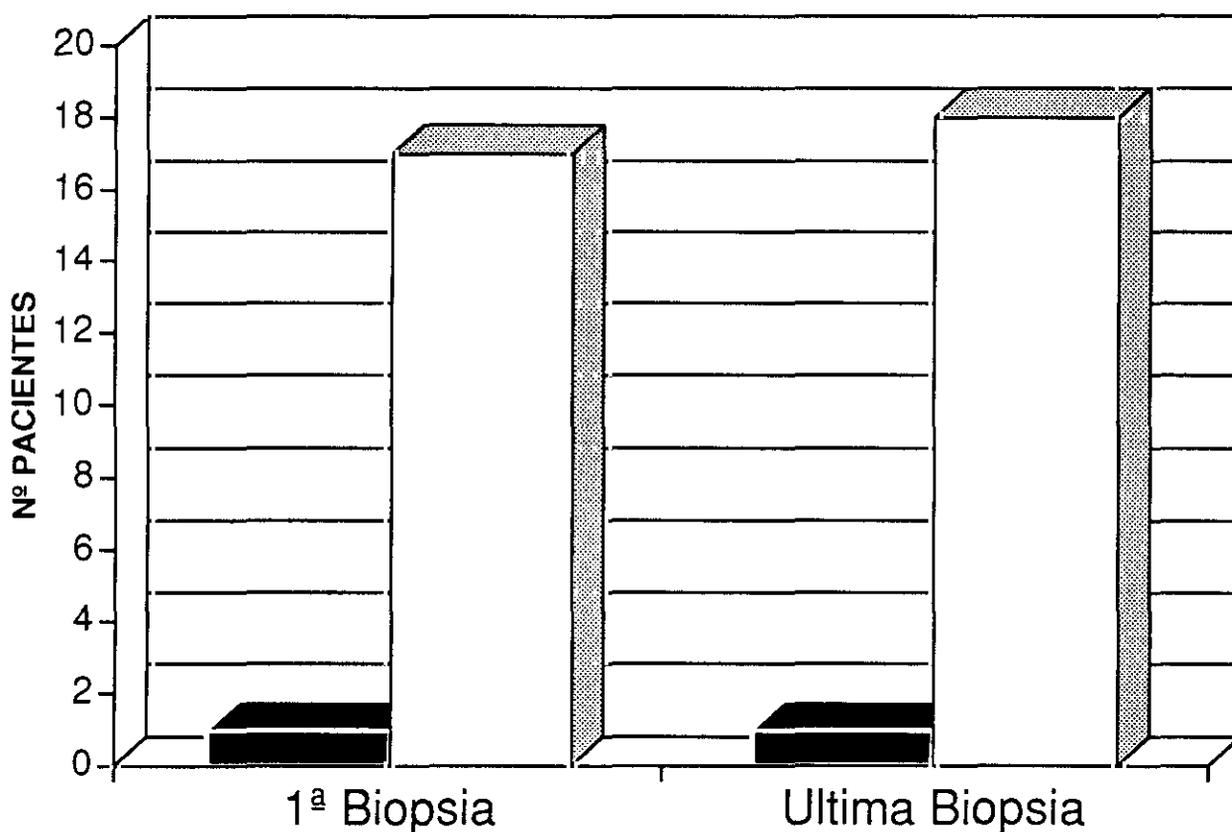
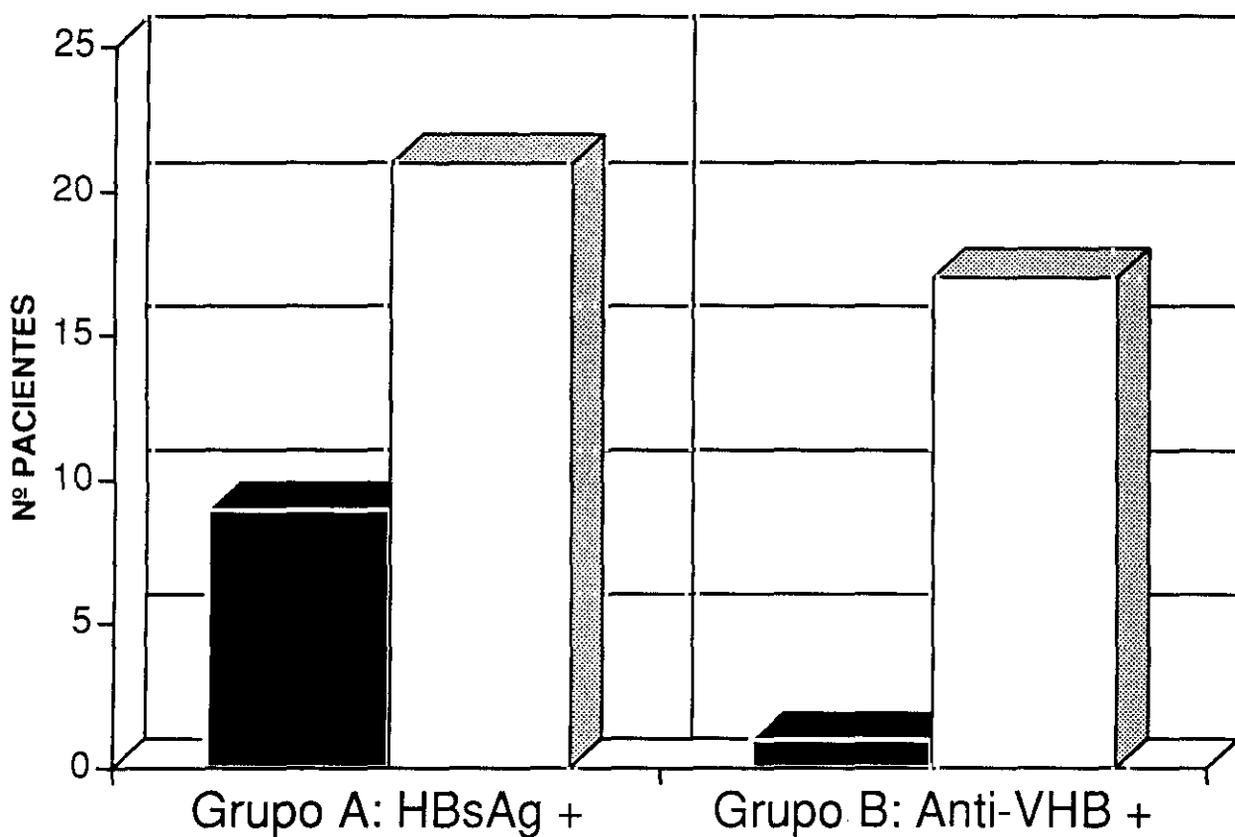


Gráfico 14**Histología Grupo A
Portadores de HBsAg**

- Cambios mínimos + HCP
- HCA (1ª Biopsia) / HCA + Cirrosis (Ultima Biopsia)

Gráfico 15**Histología Grupo B
Anti Antígenos de VHB +**

- Cambios mínimos + HCP
- HCA (1ª Biopsia) / HCA + Cirrosis (Ultima Biopsia)

Gráfico 16**Histología / Marcadores
virales séricos****1ª BIOPSIA**

■ Cambios mínimos + HCP

□ HCA (Necrosis erosiva, puentes de necrosis, puentes de fibrosis)

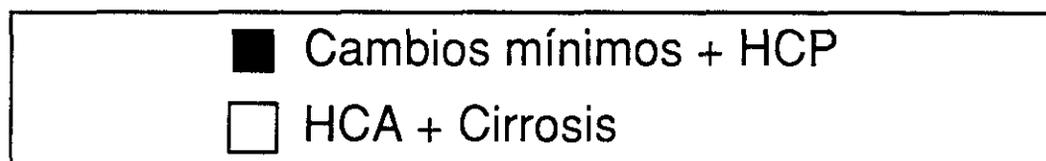
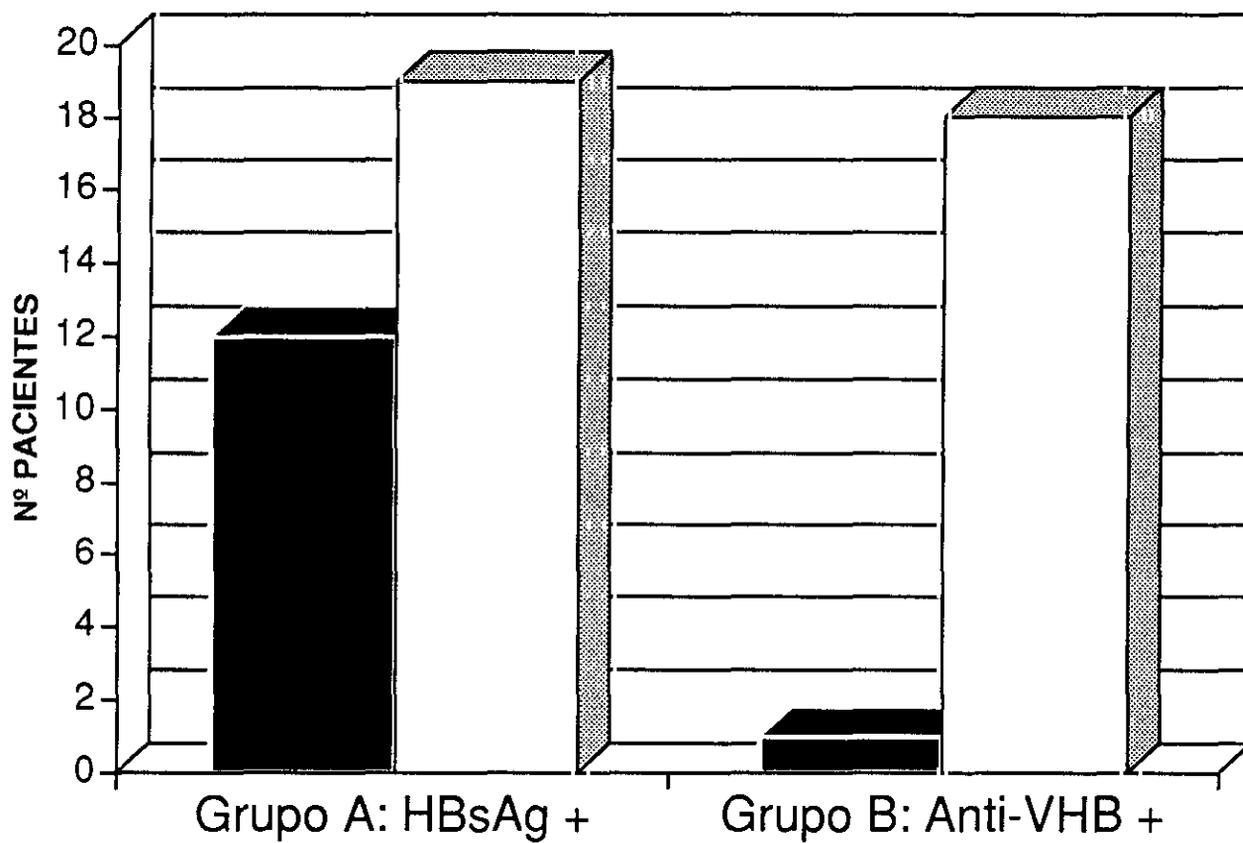
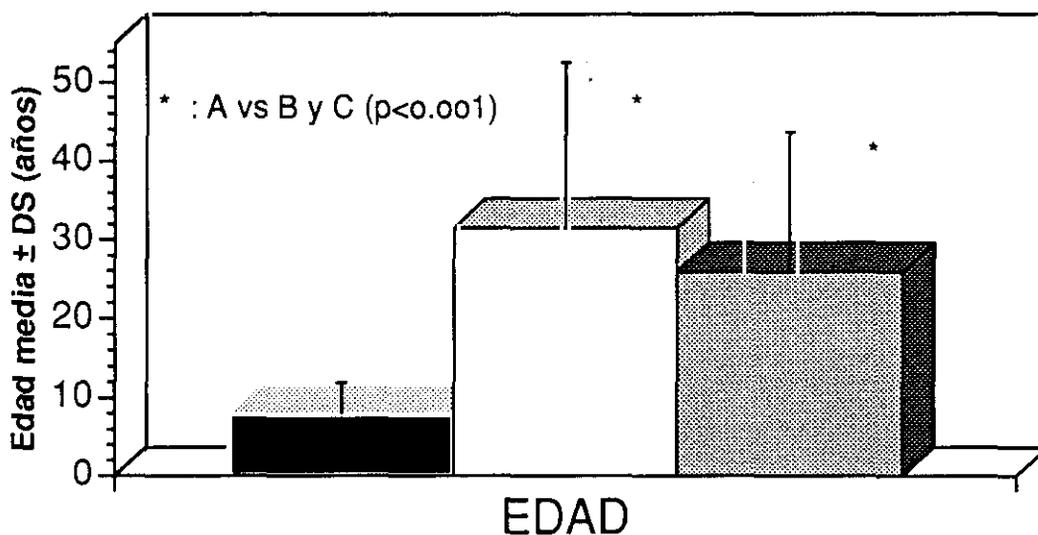
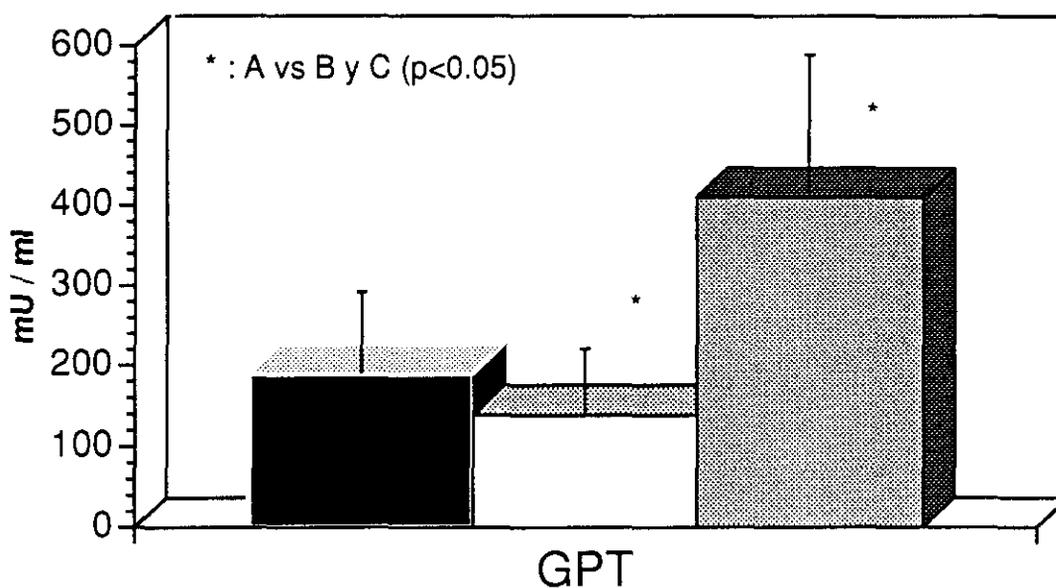
Gráfico 17**Histología / Marcadores
virales séricos
ULTIMA BIOPSIA**

Gráfico 18
Seroconversión AntiHBe

Edad media



Bioquímica GPT

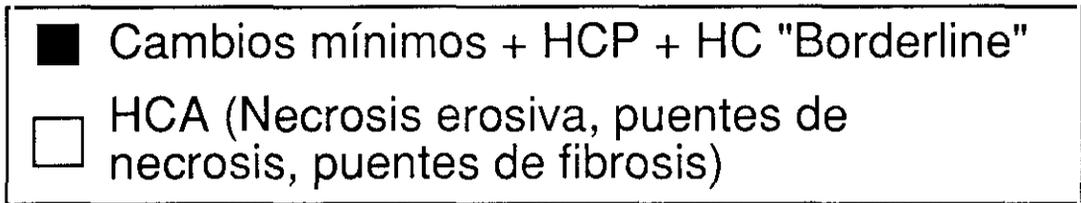
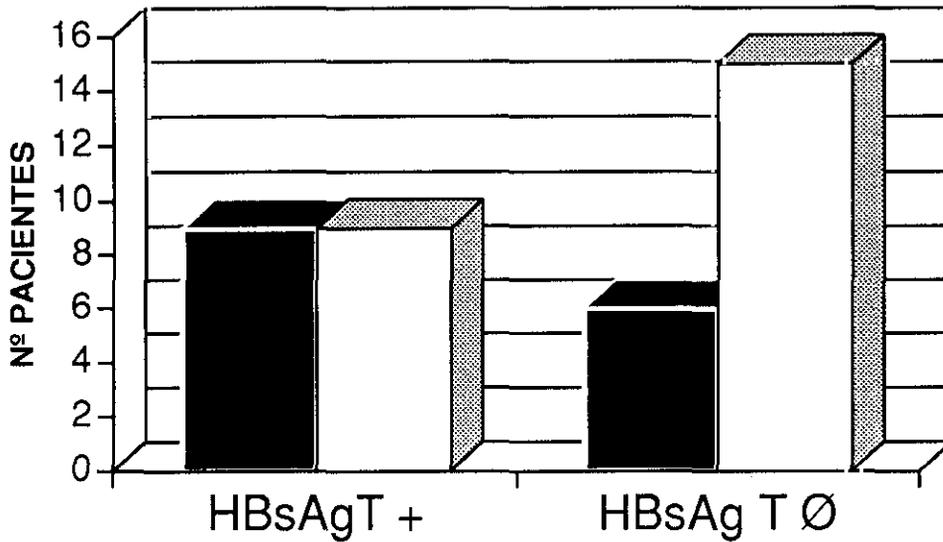


- A: HBeAg + / AntiHBe Ø
- B: HBeAg Ø / AntiHBe Ø
- ▨ C: HBeAg Ø / AntiHBe +

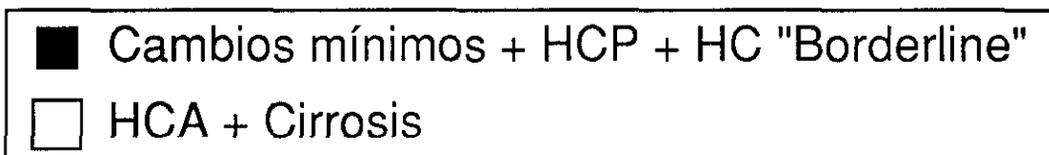
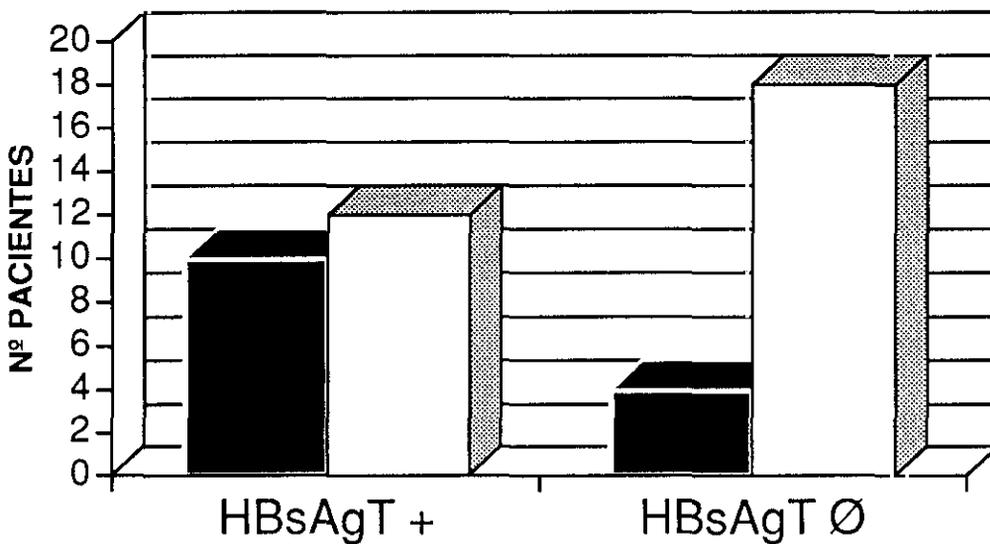
Gráficos 19 y 20

**Marcadores virales tisulares /
Histología**

1ª BIOPSIA



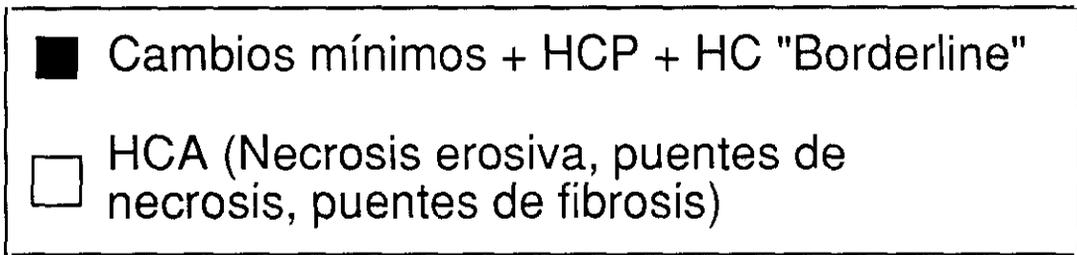
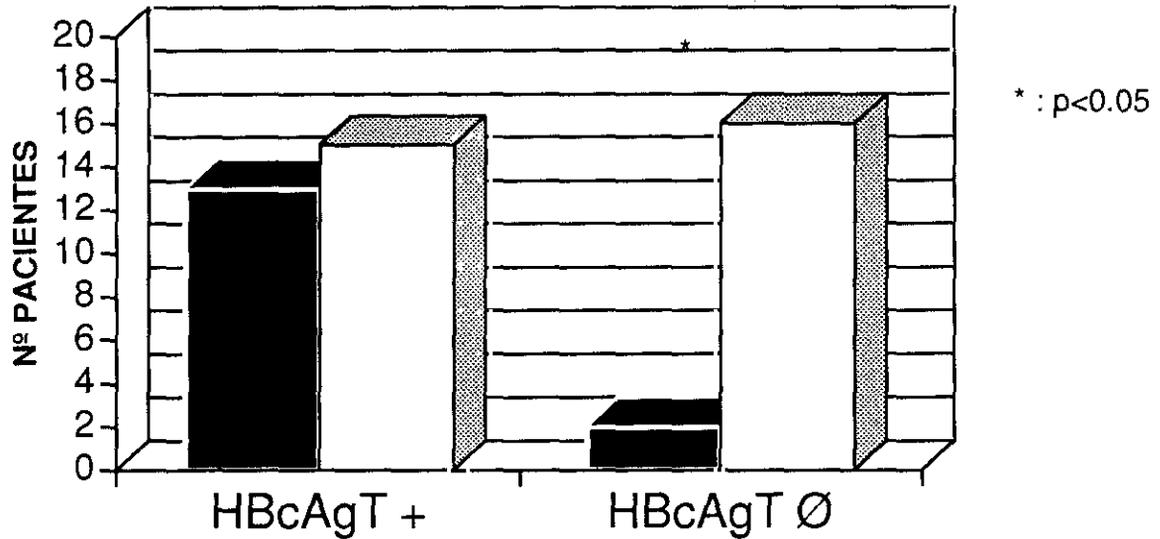
ULTIMA BIOPSIA



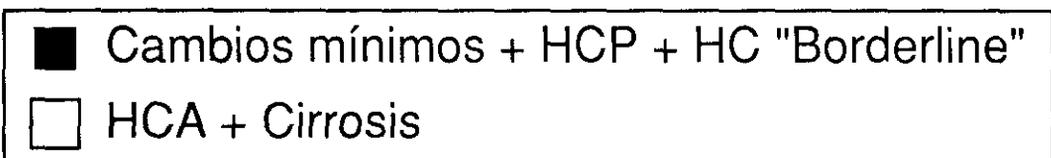
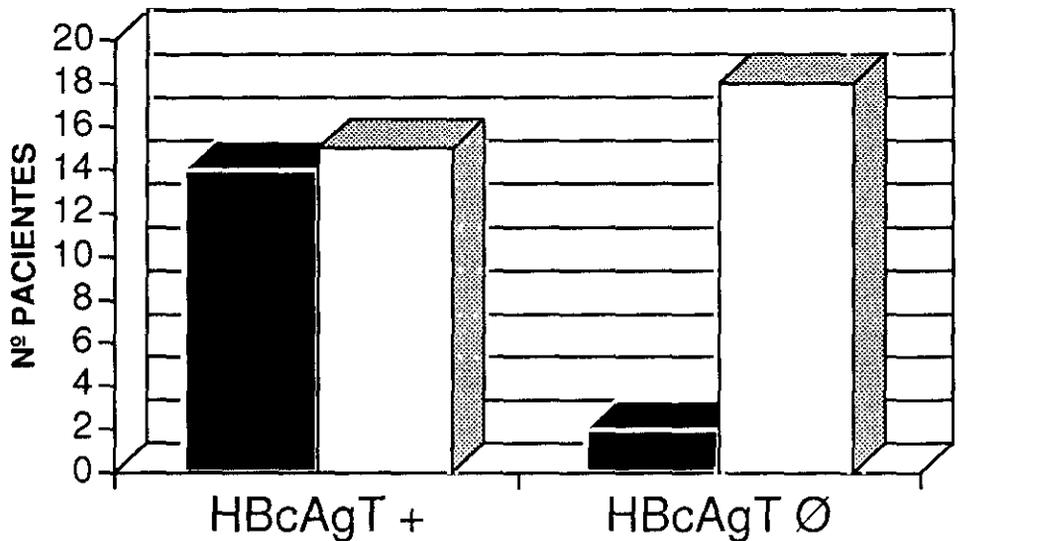
Gráficos 21 y 22

**Marcadores virales tisulares /
Histología**

1ª BIOPSIA



ULTIMA BIOPSIA



DISCUSION

La hepatitis crónica presenta una morfología y un curso evolutivo variado, que se debe a diversos factores como son: el agente etiológico, el huésped, o causas sobreañadidas a la etiología principal ^(40,122,227,257,280,405,414,425).

En la hepatitis asociada a virus y concretamente en la infección por el virus de la hepatitis B se conoce que entre un 5 y un 10% de casos con hepatitis aguda revelan una progresión a la cronicidad ^(18,214).

Hay rasgos que predisponen a la evolución crónica con persistencia del virus, y entre ellos se encuentran la edad en el momento de la infección inicial y el sexo. Los portadores de HBsAg suelen ser individuos jóvenes y varones en su gran mayoría ^(18,140,209,412,413).

En nuestra serie estos factores, también, han sido los más frecuentes: 43 de los 54 pacientes son varones y la edad media es de 21.8 años (DE: 15.7 años). La edad era más avanzada en el grupo de portadores de anticuerpos antiantígenos del virus B, este dato ha sido constatado en otros estudios ^(52,288,478) y se piensa que podría deberse a la pérdida gradual del HBsAg a lo largo del tiempo.

En la infección persistente por el VHB se conocen dos categorías: el portador sano o asintomático, y el portador con enfermedad hepática crónica ^(18,214). Nuestro trabajo se ha centrado en pacientes con infección crónica y marcadores del virus B, y más de la mitad

pertenecen a la categoría de portadores de HBsAg con enfermedad hepática crónica. Los resultados obtenidos se discutirán siguiendo un orden similar al utilizado en su presentación.

La hepatitis crónica B, como ya nos hemos referido previamente, se caracteriza por presentar una clínica poco expresiva, tanto desde el punto de vista de sintomatología como de la exploración física, y unas pruebas analíticas alteradas siendo la hipertransaminasemia persistente la más representativa ^(140,209,418,494). Rasgos clínico-bioquímicos similares son los que hemos hallado en nuestros enfermos.

La hepatitis crónica, ya comentábamos al principio de este trabajo, tiene una expresión morfológica y una evolución variada. La diversidad de aspectos clínicos e histológicos motivó la subdivisión en dos tipos: HCP y HCA ^(122,257). El rasgo óptico que los diferencia es la conservación o no de la limitante del espacio porta; aunque en la Clasificación Internacional el grupo de investigadores admitió entre las características microscópicas de la HCP un grado de "necrosis erosiva leve" ⁽¹²²⁾, actualmente estos casos son considerados como hepatitis crónica con actividad inflamatoria leve (HCP/HCA "borderline") dado que su curso evolutivo es más incierto que el de una hepatitis crónica persistente sin rotura de la limitante ^(40,425).

Estos dos tipos histológicos se han usado para describir los casos de hepatitis crónica independientemente de su etiología; aunque hay agentes causales que pueden originar, además, alguna característica morfológica específica que orienta para su identificación ⁽⁴⁰³⁾.

Este rasgo en la infección por virus de la hepatitis B sería la presencia de hepatocitos esmerilados que las técnicas especiales confirman que son portadores del antígeno de superficie del virus B ^(198,416).

La hepatitis crónica persistente es una entidad histológica inespecífica y para su diagnóstico es necesario descartar clínicamente otras patologías que comparten rasgos microscópicos similares así como la existencia de un tratamiento previo con inmunosupresores ^(23,403,425).

En nuestra casuística, una vez descartadas estas posibilidades diagnósticas, 7 casos fueron considerados como HCP (4 de ellos con necrosis erosiva leve) y en ninguno se objetivó un cambio significativo en los controles histológicos; pero sí se observó un deterioro de las lesiones ópticas hepáticas en varios de los casos de hepatitis crónica "borderline" (HCP/HCA), los cuales además de presentar una necrosis erosiva leve revelaban un infiltrado inflamatorio lobulillar más intenso que el evidenciado en los especímenes informados de HCP.

De nuestro estudio, con respecto a los casos con patología de HCP, se obtiene la conclusión, que es, a su vez, concordante con la de otras series ^(99,122,134,301,322,396,488,493), de que es una entidad que mantiene una histología relativamente estable y consecuentemente un buen pronóstico. Los casos informados como hepatitis crónica "borderline", en función de la presencia de necrosis erosiva leve junto con un infiltrado inflamatorio portal y lobulillar moderado /intenso, son los que requieren una vigilancia más estricta dado que la posibilidad evolutiva hacia una hepatopatía más grave es, en ellos, más frecuente ^(40 54,322,411,425).

En la correlación de la histología tipo HCP con los marcadores virales séricos, se ha observado que 6 de los 7 casos de HCP correspondían al grupo de portadores de HBsAg, y 4 de ellos eran a su vez HBeAg (+). La mayor frecuencia de esta lesión hepática en los pacientes con HBsAg sérico podría ser explicada en base a la edad en que se había adquirido

la infección viral: estos enfermos son de los más jóvenes de nuestra serie. Un dato similar es referido en la serie de Díaz Sanz et al ⁽¹²⁹⁾. En el control histológico existía una relativa estabilidad que se podría atribuir a que en todos, excepto en uno, la seroconversión del sistema antigénico "e" fué completa: AntiHBe sérico positivo, que como ya hemos reflejado al hablar de dicho sistema en la historia natural de la hepatitis asociada al virus de la hepatitis B implica, casi siempre, una evolución quiescente ^(12,150,211,363,396).

En cuanto a los casos de hepatitis crónica "borderline", éstos mostraban HBsAg y HBeAg positivos a nivel sérico y uno de ellos era de los que habían evolucionado a HCA. La edad de estos pacientes era algo mayor que los individuos con HCP pero menor que la mayoría del grupo con lesión morfológica del tipo HCA.

La hepatitis crónica activa implica, en general, un pronóstico peor que cualquier otro tipo de hepatitis crónica, por este motivo es importante realizar su diagnóstico con una gran rigurosidad y dado que la presencia de necrosis erosiva es el rasgo básico que sirve para diferenciarla es preciso no confundirlo con las otras formas de lesión periportal ⁽²⁶⁾.

En este estudio, se ha objetivado un predominio del diagnóstico morfológico de HCA: 38 casos en comparación con los 16 correspondientes al grupo de cambios mínimos, HCP y hepatitis crónica "borderline".

En nuestros casos de HCA se ha producido un empeoramiento en 14, con desarrollo de cirrosis en 7 de ellos. El intervalo de tiempo entre las sucesivas biopsias ha sido tanto más largo cuanto más deterioro existía. Así, en los casos de cirrosis la media ha sido de 41

meses, mientras que en aquellos que habían sufrido una progresión de las alteraciones histológicas, pero sin llegar a cirrosis, la media era de 35 meses; y en los que el diagnóstico no había variado sustancialmente, el tiempo transcurrido era de 28 meses como promedio. Se trata, así, de una enfermedad lentamente progresiva en cuya evolución puede llegar hasta la instauración de una cirrosis. Todo ello corrobora el concepto evolutivo de la HCA ya referido en estudios previos ^(123,135,140,151,209,266,301,323,412,477,487,493).

En las 7 biopsias cuya histología ha revelado cirrosis, se observaba que ésta se había desarrollado tanto a través de HCA con puentes de necrosis (2 de los 4 casos evidenciados en este trabajo) como de HCA con puentes de fibrosis con necrosis erosiva moderada/intensa (5 de las 18 biopsias hepáticas informadas como tal) por lo que nuestra casuística apoya las tesis actuales sobre la importancia, no sólo de la necrosis erosiva, sino también de la necrosis lobulillar (especialmente en su forma de puentes de necrosis) en la evolución de la hepatitis crónica a cirrosis ^(93,104,152,266,402). Otro factor referido en la literatura como determinante en la progresión a cirrosis a partir de HCA ha sido la edad ^(152,266). Nuestros resultados coinciden con ello. Así, 5 de los pacientes eran de los de mayor edad de la serie (el rango variaba entre 33 y 48 años).

Todos los enfermos con HCA presentaban alteraciones de las pruebas de función hepática, en especial de las transaminasas séricas (predominantemente de la GPT) dato que se refleja también en la mayoría de los trabajos sobre la HCA y su curso evolutivo. Los 31 estudios biópsicos sin progresión a cirrosis muestran un cociente GOT/GPT inferior a 1, excepto en 4 casos, siendo el valor medio de $0,55 \pm 0,30$; mientras que en los 7 casos con desarrollo final de cirrosis era, también, inferior a 1, si bien la tasa media era mayor, de $0,99 \pm 0,80$.

Este hallazgo es concordante con los resultados del trabajo de Williams y Hoofnagle sobre el uso de este cociente en la hepatitis crónica y su posible valor pronóstico en la progresión a cirrosis ⁽⁴⁹⁴⁾.

En la correlación de la histología tipo HCA con los marcadores virales séricos, los resultados de este estudio han mostrado que la HCA es frecuente en individuos con marcadores séricos del virus de la hepatitis B, independientemente de que sean o no portadores de HBsAg. El hallazgo de HCA en pacientes con marcadores del virus B pero sin HBsAg sérico ya ha sido comentado en diversos trabajos ^(52,288,392,427,483), algunos de los cuales han mostrado que enfermos con HCA tienen una frecuencia mayor de anticuerpos antiantígenos del VHB que la población general. Esto es atribuido a que en algún momento de su vida hayan estado en contacto con el virus B y desarrollado marcadores virales. La responsabilidad etiológica de la persistencia de la actividad inflamatoria en la enfermedad hepática de estos pacientes se ha atribuido a factores causales diversos, y entre ellos hay que seguir considerando al virus de la hepatitis B basándose en la demostración de los marcadores serológicos y tisulares de infección por dicho virus tanto con los métodos utilizados habitualmente ^(52,164,392,427,483) como con las técnicas de hibridación molecular desarrolladas en estos últimos años ^(42,331,399).

En general, y coincidiendo con los trabajos de otros investigadores ⁽³²³⁾, no ha habido influencia en la evolución de la histología de las biopsias de estos enfermos por parte de la serología vírica que cada uno tuviera; aunque sí se ha apreciado un predominio de los portadores de HBsAg en el grupo de pacientes cuya HCA ha progresado a cirrosis: 5 eran HBsAg positivos en el suero y, de ellos, 3 eran, además HBeAg positivos. Esto apoya la relación causal del virus B y de la presencia de marcadores de replicación viral con el

desarrollo de cirrosis, ya sugerida en otras series ^(152,266).

Entre los objetivos de este estudio se encontraba el conocer la eficacia de realizar un diagnóstico cuantitativo mediante Índices histológicos. Al final del trabajo se ha llegado a la conclusión de su utilidad para precisar de una manera más detallada las lesiones hepatocelulares.

Con el Índice de Knodell et al, el más popular y usado hasta ahora, se ha demostrado que existe una buena correlación entre los valores altos del índice total y la presencia de alteraciones histológicas intensas ^(237,270). Nuestros resultados coinciden con esta apreciación.

La valoración individual de las lesiones morfológicas que constituyen el índice de actividad histológica global, también se ha visto que aporta datos con implicaciones pronósticas, en especial la necrosis erosiva en relación con la fibrosis desarrollada en biopsias realizadas como control del daño hepatocelular ⁽²⁷⁰⁾. Nuestros resultados son similares a los de estos investigadores, y también se ha objetivado este hecho con la necrosis lobulillar. La conclusión que se obtiene sirve de apoyo para las hipótesis actuales, que ya hemos comentado, de que tanto la necrosis erosiva como la necrosis lobulillar son igual de importantes en la progresión de la hepatitis crónica a un mayor deterioro morfológico, e incluso a veces con desarrollo de cirrosis ^(93,104,346,402).

Nuestra casuística, al igual que el trabajo de Lindh et al ⁽²⁷⁰⁾, demuestra que la valoración conjunta de fibrosis con los otros parámetros (necrosis e inflamación) no es, en ocasiones, orientativa sobre el verdadero estado del daño hepático: en esta serie hay biopsias con IAH

= 9 que, según la clasificación histológica convencional, su diagnóstico era tanto una hepatitis crónica "borderline" (HCP/HCA) como una cirrosis inactiva; mientras que otras mostraban un IAH = 11 y reflejaban una HCA con puentes de fibrosis o bien una HCA con ampliación fibrosa portal únicamente.

Este tipo de ejemplos es lo que nos lleva a considerar como más idónea la utilización de otro Índice más actual, el desarrollado por Scheuer hace pocos años y del cual ya hemos hablado previamente ⁽⁴⁰⁵⁾.

Scheuer, en su índice y en base a la importancia, que ya está prácticamente admitida, de la necrosis tanto erosiva como lobulillar en la evolución de la enfermedad hepática crónica, y con lo que nuestros resultados coinciden, también ha valorado los puentes de necrosis (como consecuencia de la necrosis confluyente lobulillar) en la categoría de actividad lobulillar de grado intenso ⁽⁴⁰⁵⁾, separándola de la categoría de necrosis erosiva (necrosis periportal) en que había sido incluida por Knodell et al en su índice ⁽²³⁷⁾. Este es otro motivo para aconsejar el uso actual del Índice de Scheuer.

El diagnóstico histológico cualitativo y cuantitativo de la hepatitis crónica es imprescindible para precisar el daño hepatocelular que presuponen las alteraciones bioquímicas. La biopsia hepática no sólo sirve para realizar el diagnóstico morfológico sino que también ayuda en el reconocimiento de algunas etiologías, siendo el ejemplo más representativo la hepatitis asociada a virus.

En la hepatitis B permite la identificación de varios marcadores virales, entre ellos el

antígeno de superficie y el del core. La expresión tisular de los mismos ha sido objeto de numerosos trabajos para determinar tanto sus patrones de tinción y distribución en el hepatocito como para observar su relación con la lesión hepática y por lo tanto, su posible consideración como factores pronósticos en la evolución de la hepatitis asociada al VHB.

No siempre se ha encontrado una correlación entre la presencia de hepatocitos con antígenos virales y las lesiones microscópicas de los especímenes ^(79,200,225,307,325). En cambio, en algunas de estas series se objetiva una implicación más estrecha con la duración de la antigenemia hasta el momento de la toma biopsica ⁽⁷⁹⁾ así como con las variaciones de los antígenos del virus B en el suero ^(67,307). Globalmente los datos de nuestro estudio están más de acuerdo con los trabajos en los que no se detecta ninguna implicación entre el hallazgo tisular de los marcadores víricos y las alteraciones histológicas que puedan existir en dichas biopsias.

Esta ausencia de correlación no es un hecho generalizado. Algunos patrones de expresión morfológica se demuestran más frecuentemente en situaciones concretas: el HBsAg confiere un aspecto óptico característico al citoplasma del hepatocito en donde se halla (homogéneo y eosinófilo, "esmerilado"), y puede ponerse en evidencia por histo e inmunohistoquímica; estas células hepatocitarias reflejan la existencia de una cantidad excesiva de antígeno de superficie, y están asociadas preferentemente a biopsias hepáticas con una actividad inflamatoria nula o mínima ^(79,169,198,200,361). En nuestros enfermos esta hallazgo ha sido infrecuente.

La expresión tisular de la membrana hepatocelular, tanto del antígeno de superficie como del HBcAg, se suele vincular a tipos histológicos con actividad inflamatoria intensa (HCA,

cirrosis, hepatitis aguda en transición a cronicidad) ^(67,225,332,361,395); aunque hay estudios que ponen de manifiesto, sobre todo con la tinción de la membrana celular para el HBsAg, una correlación más estrecha con la fase de replicación viral activa y consecuentemente con una patología hepática de actividad inflamatoria mínima ^(108,217). En nuestra serie no se ha evidenciado este tipo de patrón tisular; este hecho podría apoyar la sugerencia aportada por algunos equipos de investigación de que el material fijado en formol es peor para mantener la antigenicidad tisular ^(189,470).

La demostración de núcleos de hepatocitos positivos para el HBcAg suele indicar una fase de tolerancia inmune, y por tanto se objetiva en biopsias con una actividad inflamatoria nula o mínima ^(10,108,111,220,438); esta asociación no ha sido encontrada siempre, hay estudios donde la proporción mayor de positividad nuclear para el antígeno core se ha observado en la HCA y en cirrosis activa ^(200,360) y la divergencia entre dichos resultados se piensa que estaría en función del estado inmune de los pacientes ⁽¹⁹⁵⁾. En cambio, la expresión citoplásmica del HBcAg se correlaciona casi constantemente con hepatitis crónica de actividad inflamatoria intensa (HCA) o en cirrosis ^(50,67,108,111,189,218,220,360,432,438,470). Nosotros hemos hallado antígeno core nuclear en la mayoría de las hepatitis crónicas con actividad inflamatoria mínima o moderada, pero también ha sido visualizado en casi la mitad de los casos de HCA y en dos de los enfermos cirróticos. Con respecto al patrón citoplásmico, se ha observado junto a la expresión tisular nuclear en 6 de las 9 muestras hepáticas en que ha sido objetivado, independientemente del diagnóstico histológico que éstas revelaban; siendo lo más peculiar su presencia en tres de los pacientes cuyas biopsias mostraban ya un deterioro de cirrosis (en dos casos se asociaba al patrón nuclear).

No sólo el patrón morfológico manifiesta, a veces, una implicación con la lesión hepatocelular; algunas series han obtenido una correlación entre el tipo de distribución de los hepatocitos con antígenos virales y el daño tisular: el patrón difuso o en grupos se relaciona con hepatitis crónica de actividad inflamatoria mínima o moderada, con replicación viral inactiva o con ausencia de viremia, mientras que un patrón focal va más unido a HCA (51,150,200,217,351,438,446).

Además de estos hallazgos hay otros que también han sido constatados. La existencia de una relación inversa entre valoración cuantitativa de los antígenos virales hísticos y la actividad inflamatoria (sobre todo en relación al HBsAg), es decir las células con marcadores víricos son más numerosas cuando la actividad inflamatoria es menor (127,193,244,251,321 361,446,470,471). La correlación entre la lesión microscópica y los antígenos virales es más significativa cuando el estudio comprende un mayor número de biopsias y sobre todo si se trata de cuñas o resecciones en vez de cilindros (219,225,434,462,471).

La histo e inmunohistoquímica no sólo confirman una etiología viral demostrada con el análisis serológico de los marcadores del virus B, sino que puede ayudar a no confundir un cuadro clínico de hepatitis aguda con una exacerbación aguda de una hepatitis crónica ya que en la primera los antígenos virales raramente son detectados a nivel hístico (67,79,127,169,244,251,351,360,431) y consecuentemente su positividad favorece más que se trate de un brote agudo en la evolución de la hepatitis crónica (431,471). Estos métodos además contribuyen a tipificar hepatitis crónica cuando los marcadores séricos del virus B son negativos o únicamente hay positividad para algún anticuerpo antiantígeno del VHB (2,60,98,325,362,389,427,481,483). Dos de nuestros 19 enfermos con serología positiva sólo para

anticuerpos han mostrado a nivel tisular antígeno de superficie, ocho antígeno del core y uno ambos marcadores, por lo que, en estos casos, se podía afirmar que su patología era debida al virus de la hepatitis B.

En la mayoría de los casos que desde el punto de vista serológico se encuentran en fase de replicación viral activa, se puede detectar HBcAg en los hepatocitos; incluso en situaciones de ausencia de HBeAg sérico puede encontrarse antígeno core en el tejido hepático, por lo que se piensa que es un marcador más sensible y específico que el HBeAg y más similar al DNA-VHB ^(69,182,228,314,325). También el HBcAg tisular se ha hallado en enfermos con serología positiva para AntiHBe y en éstos podría ser la causa de un nivel bajo de replicación vírica (fase de "replicación mínima") con persistencia del daño hepatocelular ^(10,50,69,200). Nuestros datos apoyan esta correlación: el HBcAg tisular se ha detectado en las biopsias de 15 de los 17 de enfermos HBeAg sérico positivo, así como en las de 3 casos serológicamente negativos para el sistema antigénico "e" y en los especímenes hepáticos de 2 pacientes con serología positiva para el anticuerpo AntiHBe desde el inicio del estudio.

Nuestros resultados, por tanto, apoyan la idea general de que la biopsia hepática es un método diagnóstico útil en la hepatitis crónica, y en este estudio concretamente en la hepatitis asociada al VHB, no sólo para precisar cuali y cuantitativamente el daño morfológico existente y sus implicaciones pronósticas en la evolución de la misma tanto en los casos con alteraciones bioquímicas como en aquellos que ni la clínica ni las pruebas de función hepática presuponen un deterioro hepatocelular ^(92,123,175,403,406,412,425,476,487,493), sino también para definir la etiología y el estado de replicación viral, en especial en los casos en que el examen serológico de los marcadores víricos no ayuda en su clarificación ^(171,486). La biopsia es

imprescindible para un diagnóstico exacto que a su vez es ineludible para seleccionar los pacientes que se beneficiarán de un tratamiento ⁽⁴⁵⁾.

La biopsia es además de gran utilidad en los estudios morfométricos que demuestran que los hepatocitos y sus núcleos tienen variaciones de tamaño, no sólo debido a causas extrínsecas (drogas, desequilibrios nutricionales, diabetes ...) sino que también ocurren de forma fisiológica en relación con la edad ^(334,358,403,425,491).

Los trabajos llevados a cabo para valorar la influencia del VHB en los hepatocitos portadores del mismo, así como en los cambios hepatocitarios relacionados con el desarrollo de lesiones neoplásicas, han demostrado resultados coincidentes en la consideración del virus B como uno de los factores responsables de las alteraciones consideradas preneoplásicas (hipertrofia, hiperplasia y displasia) ya que se objetiva una relación núcleo/citoplasma mayor en estos hepatocitos que en aquellos sin marcadores virales; se estima que se debería a la presencia en el núcleo de DNA viral en forma integrada ⁽¹⁰¹⁾. En cambio no hay uniformidad con respecto a si el hepatocito y su núcleo muestran modificación de su tamaño por el simple hecho de ser portador de virus B ^(101,382a).

Nuestros hallazgos son más similares a los de las series que no objetivan cambios relevantes entre los hepatocitos con o sin virus de la hepatitis B.

La historia natural de la infección asociada al virus B puede ser modificada, entre otros factores, por el estado de replicación viral del VHB; es decir, la evolución de la enfermedad parece encontrarse en relación con el sistema antigénico "e" e incluso, a veces también, con

la coexistencia en el suero y/o en el tejido hepático del DNA del virus B así como del antígeno core a nivel hepatocitario ^(18,153,391,413); en general, la presencia del HBeAg sérico se suele asociar a una situación de replicación viral activa con actividad inflamatoria hepática (tanto HCP como HCA y cirrosis) e hipertransaminasemia persistente; mientras que la determinación en suero de su anticuerpo está más implicada en un estado no replicativo del VHB y en la mejoría analítica e histológica, o por lo menos en la no progresión, de la enfermedad hepática.

A pesar de esta idea general expresada en los diferentes estudios, existen divergencias sobre la influencia de este sistema antigénico viral en el curso evolutivo del daño hepatocelular de la infección B, ya que el pronóstico cuando se detecta el anticuerpo AntiHBe sérico dependerá del grado de lesión hepática existente antes de la seroconversión.

Algunos trabajos que tratan sobre el sistema antigénico "e" sugieren que el desarrollo de la seroconversión se iniciaría antes si se encontrasen uno o varios de los siguientes factores: desde el punto de vista clínico-analítico serían la edad (los jóvenes aclaran el HBeAg más tardíamente) ^(17,113), hepatitis aguda previa ⁽⁵³⁾, las exacerbaciones agudas durante la fase en que el HBeAg sérico es positivo ⁽²⁶⁷⁾, valores de transaminasas altos ^(53,394), negativización o niveles bajos de DNA viral ^(107,228) y títulos altos de AntiHBc tipo IgM ^(53,420). Con respecto a las lesiones histológicas se ha considerado el daño necroinflamatorio lobulillar o periportal de actividad intensa ^(53,113,262,383,394,432) y cuantitativamente índices de actividad histológica elevados y un grado alto de fibrosis ⁽³⁹⁴⁾. También el análisis etiológico definido por la inmunohistoquímica da aportaciones como la distribución focal del antígeno core expresado en los citoplasmas de los hepatocitos ^(108,357,383,394,432).

En el período en el que se va a desarrollar la seroconversión puede observarse, en ocasiones, una exacerbación aguda de la enfermedad con elevación de las transaminasas y una lesión hepática activa similar a una hepatitis aguda, así como disminución de la presencia del HBcAg en los hepatocitos ^(53,262,264,410,432).

En nuestro estudio los enfermos con HBeAg sérico han presentado valores bioquímicos (GPT) altos, y con respecto al diagnóstico histológico cualitativo se han observado lesiones de HCP, hepatitis crónica "borderline" y HCA con diferentes grados de actividad inflamatoria. Las alteraciones analíticas e histológicas se han mantenido en todos aquellos casos que al final del seguimiento han permanecido con HBeAg sérico positivo, incluso en 4 pacientes la biopsia de control puso de manifiesto un deterioro morfológico. Estos hallazgos coinciden con lo comentado en la literatura ^(143,153,209,211,271,320,363,391).

Los casos con seroconversión completa (AntiHBe sérico positivo) o en vías de alcanzarla (negatividad para ambos marcadores virales) han mostrado disminución de los valores analíticos con tendencia a la normalización bioquímica. La transición hacia la positividad AntiHBe se ha realizado, excepto en dos casos, en enfermos con hepatitis crónica con actividad inflamatoria mínima o moderada, y sólo 5 casos han mostrado cambios morfológicos tras ella, siendo de mejoría en dos de ellos; y en la valoración semicuantitativa de sus biopsias también se ha observado disminución de los índices totales de actividad histológica así como de los de necrosis erosiva e inflamación portal. La evolución clínico-bioquímica e histológica ha sido similar a lo expresado en otras series ^(53,153,209,211,271,320), aunque en algunas la seroconversión era más frecuente en los casos con estudios biopsicos de HCA y/o cirrosis ^(153,363).

La seroconversión completa o el inicio de ella (49% de los pacientes) ha tenido lugar entre los 2 y los 5 años de seguimiento, siendo más corto en aquellos en que al inicio del estudio se encontraban ya en la transición de la misma. Este período de tiempo es concordante con el demostrado en otros trabajos y en el cual es común objetivar la seroconversión de HBeAg a AntiHBe ^(153,320,363).

La presencia de HBeAg sérico puede persistir durante un tiempo largo e incluso, a veces, toda la vida ⁽³⁹¹⁾. Por esta razón, no es infrecuente observar enfermos HBeAg positivos con un daño hepático tipo HCA (con diferentes grados de actividad inflamatoria) así como una progresión a cirrosis ^(152,320,487). En nuestra serie 5 casos ya presentaban HCA desde el inicio del estudio y uno la había desarrollado cuando éste finalizó.

Esta persistencia del antígeno "e" motiva que, en ocasiones, la seroconversión sea tardía y consecuentemente, estos pacientes con una lesión hepatocelular activa del tipo morfológico antes referido podrán revelar una asociación con AntiHBe sérico positivo, a pesar de que, generalmente y como hemos comentado este anticuerpo suele estar relacionado con hepatitis crónica de actividad inflamatoria mínima o moderada. Esto queda, también, reflejado en nuestro trabajo en donde dos pacientes seroconvirtieron siendo su daño hepatocelular previo una HCA con puentes de fibrosis; y lo mismo podría ocurrir en tres enfermos que se encuentran en la fase de transición hacia la seroconversión AntiHBe, como en los 5 que siguen HBeAg positivo en suero tras el seguimiento realizado.

Además, ésta sería una de las posibles explicaciones en nuestros 7 casos con positividad sérica para el AntiHBe desde el inicio del estudio, ya que sus biopsias han puesto de

manifiesto HCA y al no conocerse el momento de la seroconversión no se ha podido saber cuando se produjo dicho daño hepático. Lo que sí se ha objetivado en la mayoría de ellos, y como ya hemos comentado en los enfermos que han seroconvertido, es una tendencia a la normalización de la actividad bioquímica y a la no progresión de la lesión histológica.

La observación de pacientes que, a pesar de la seroconversión con aparición de AntiHBe en suero o con éste ya inicialmente existente a nivel sérico, mantenían todavía una actividad de su enfermedad hepática crónica hizo que se conociera que no siempre la presencia de este anticuerpo implica cese de la replicación del virus B; estos enfermos seguían teniendo otros marcadores virales de replicación como el DNA-VHB o el HBcAg tisular. Dicha actividad de la infección B, no siempre se debe a una continuidad de la replicación vírica del VHB, también pudiera ser motivada por otras causas como la sobreinfección viral y, entre ellas, la de mayor frecuencia es la infección delta como comentaremos a continuación (10,36,50,63,107,151,153,200,273,291).

En nuestro estudio, esta situación fué observada en cinco casos y en uno de ellos el factor causal había sido una sobreinfección delta y en otros dos se demostró la presencia de antígeno core en los especímenes hepáticos. También, tres enfermos se han mantenido con una actividad bioquímica alta, en dos de ellos se ha detectado el HBcAg en la biopsia hepática y en el otro había positividad sérica para anticuerpos Antidelta.

Concluyendo, hemos observado que la presencia del HBeAg en suero implica una enfermedad hepática activa mientras que la detección del anticuerpo AntiHBe supone una tendencia a la normalización bioquímica de la infección viral y con respecto al daño hepático,

también se ha objetivado una disminución o estabilización de la actividad inflamatoria que, a su vez, depende de la lesión hepatocelular previa al desarrollo de la seroconversión, y siempre teniendo en cuenta las causas que impiden considerar completamente la presencia del anticuerpo AntiHBe como un marcador pronóstico favorable en el curso de la infección asociada al VHB.

Otro factor que modula la historia natural de la hepatitis crónica B es la sobreinfección viral. Entre los virus que pueden originarla se encuentra el agente delta ó VHD ⁽³⁶⁸⁾. En España, la infección delta ha sido demostrada desde 1976 ⁽⁷⁷⁾; aunque en una serie sueca un enfermo presentaba el antecedente de transfusión de sangre realizada en 1973 en España, lo cual hace pensar que en nuestro país dicha infección pudiera estar algunos años antes ⁽²⁰²⁾.

En diversos trabajos de investigadores españoles, la prevalencia de infección delta se estima en menos del 10%, y entre un 30 a un 50%, si se tiene en cuenta la población drogadicta, ya que ésta representa uno de los grupos de riesgo altamente susceptible de contraer dicha infección ^(31,73,192,393). Nuestros datos son muy similares: seis de los 54 pacientes examinados han presentado marcadores delta, por tanto la prevalencia es del 11% y, si excluimos dos pacientes toxicómanos, sería de un 7,4%.

La hepatitis delta muestra una clínica similar a la de cualquier hepatitis asociada a virus, como puede ser la infección por el virus de la hepatitis B ^(368,393). En cambio, analíticamente se caracteriza por unas alteraciones bioquímicas de cifras más elevadas que las observadas en la hepatitis B ^(30,31,149,269,277,337,385,393); aunque hay alguna serie en la que no se han encontrado diferencias entre los valores séricos de transaminasas de pacientes con infección

delta y los que no tienen marcadores de virus delta ^(90,312). Los rasgos clínico-bioquímicos de los 6 pacientes de nuestra casuística concuerdan con lo descrito, mayoritariamente, en la literatura.

El antecedente de hepatitis aguda ha sido objetivado en una proporción mayor que en el resto de los enfermos, pero es desconocido el momento en que ha sido desarrollada. Este hallazgo también se ha constatado en estudios clínicos sobre infección delta ^(90,149,180,277,316,377,393).

Con respecto a la influencia del virus de la hepatitis delta en los marcadores del virus B y sobre lo que ya hemos comentado previamente, no existe una opinión uniforme: hay trabajos cuyos resultados apoyan una disminución de la replicación vírica B, e incluso, a veces, con aclaramiento de los antígenos del virus de la hepatitis B o una probable asociación entre el virus delta y la infección B inactiva ^(31,83,100,149,188,201,247,271,300,312,377,385,421); en cambio, en otros se aprecia una coexistencia de los marcadores de ambos virus ^(30,62,81,454). El examen serológico de nuestros enfermos se encuentra mas en consonancia con los de los estudios que sugieren una cierta acción supresora del virus delta sobre la replicación viral B como con los que indican que la infección delta podría haberse desarrollado sobre casos de hepatitis asociada al virus B en fase no replicativa, ya que en ninguno de los pacientes se detectó DNA-VHB y en cuatro de ellos había positividad para el AntiHBe sérico (en tres la seroconversión HBeAg-AntiHBe fué anterior a la determinación sérica positiva de los Ac antidelta). En este perfil serológico, el cual es indicativo de una infección B sin replicación viral, también hemos hallado la presencia de las proteínas pre S₁. Un hallazgo que apoya lo ya expuesto en otras series de la literatura, las cuales comentan la no supresión de los polipéptidos codificados por la región pre S (relacionados con la envoltura externa del virus

B) por parte del virus de la hepatitis delta ^(206,453).

En la hepatitis crónica B, la detección del virus delta se relaciona con un peor pronóstico: en nuestros 6 casos, 5 revelaban histológicamente una HCA, y el otro una hepatitis crónica "borderline". En el control biopsico, se apreció un deterioro en 4 de ellos, y un curso estacionario en el resto. Estos datos son parecidos a los obtenidos en diversos estudios ^(30,31,62,90,149,186,277,337,377,385,393).

Lesiones microscópicas como puentes de necrosis y puentes de fibrosis (expresión de un daño hepático importante) son evidenciadas más frecuentemente en biopsias de portadores crónicos con infección delta que sin ella ^(62,69,231,253,260,377,393,482). Dichas lesiones también existían en los especímenes hepáticos de la mayoría de nuestros pacientes.

El diagnóstico histológico cuantitativo confirmó lo ya demostrado cualitativamente: tanto el IAH global como los valores correspondientes a cada parámetro evaluado (especialmente el de la necrosis y degeneración lobulillar) eran superiores a los apreciados en las muestras hepáticas de los portadores B sin infección delta. Resultados que coinciden con los expresados en otros trabajos donde se realizan valoraciones semicuantitativas de las lesiones hepáticas ^(69,90,231,253,277,385).

Además, y al igual que se observó en las biopsias de los enfermos sólo con infección por VHB, en las de estos pacientes ocurría algo similar al hacer el diagnóstico cuantitativo con el Índice de Knodell ⁽²³⁷⁾, es decir, al valorar conjuntamente la fibrosis con los otros dos parámetros, no ha resultado como el indicador más idóneo del deterioro hepático: así, en la

toma bióptica que mostraba una cirrosis como evolución de una HCA con puentes de fibrosis, su IAH global era inferior al de las otras biopsias de control, las cuales todavía no habían progresado a dicha distorsión arquitectural nodular. Por tanto, reiteramos el aconsejar el uso del Índice de Scheuer también en la hepatitis B cuando es sobreinfectada por el virus de la hepatitis delta ⁽⁴⁰⁵⁾; o bien, se puede utilizar el Índice que Lau et al efectúan en sus estudios sobre la infección delta ^(253,255).

En conclusión, el análisis histológico (cuali y cuantitativo) de estos 6 pacientes, y cuyos resultados son muy similares a los trabajos citados, apoya que la infección por virus de la hepatitis B, en la mayoría de los casos, suele conllevar un deterioro hepatocelular peor y, a veces, más rápido cuando es sobreinfectada por el virus delta.

CONCLUSIONES

1. La hepatitis crónica B es una enfermedad de personas jóvenes, predominantemente varones y clínicamente asintomáticos o con una sintomatología banal e inespecífica.
2. Los estudios bioquímicos de función hepática muestran alteraciones, siendo la hipertransaminasemia mantenida la más característica de los pacientes con lesión hepática, estando en relación directa los niveles de transaminasas con el grado histológico de lesión. El cociente GOT/GPT tiende a ser más elevado cuanto mayor es el deterioro hepatocelular, en especial en estadios cirróticos.
3. La biopsia hepática se confirma como el método más eficaz para el diagnóstico de la hepatitis crónica: permite realizar un estudio morfológico cualitativo y cuantitativo así como un análisis etiológico. Los cambios evolutivos histológicos empiezan a observarse a partir de los 3 años de seguimiento. Por lo tanto el control biopsico dentro de estos tres años sólo estará indicado si se presentan modificaciones clínicobioquímicas relevantes.
4. Los índices de mayor importancia pronóstica son los que valoran la actividad necróticoinflamatoria. La fibrosis debe estudiarse como un parámetro independiente ya que es secundaria a la inflamación e indica el grado de deterioro arquitectural al que ha llegado el tejido hepático y no el nivel de actividad de la enfermedad en el momento de la biopsia.
5. Los marcadores virales B séricos no influyen en el daño morfológico hepático aunque es

importante la detección de los relacionados con replicación viral ya que éstos podrían explicar cambios que ocurren en la historia natural de la hepatitis crónica B.

6. La histo e inmunohistoquímica confirman la presencia del virus de la hepatitis B en el tejido hepático y además permiten atribuir esta etiología a hepatitis crónicas en enfermos que, en suero, o no tienen marcadores virales o sólo tienen anticuerpos. También son fundamentales en el diagnóstico diferencial entre hepatitis agudas y exacerbaciones agudas de una hepatitis crónica.

7. La detección tisular de HBcAg explica el deterioro hepático en pacientes con serología positiva para AntiHBe.

8. No se han detectado diferencias clínicas, bioquímicas ni histológicas entre los enfermos con HBsAg sérico y los que únicamente presentan anticuerpos antiantígenos del VHB.

9. La sobreinfección por virus de la hepatitis delta empeora el pronóstico y por ello es necesario el estudio serológico pertinente sobre todo en pacientes de alto riesgo, como son en nuestro medio, los adictos a drogas por vía intravenosa.

10. La detección de HBsAg en suero y en tejido da lugar a modificaciones morfométricas, disminuyendo la razón núcleo/citoplásmica, en relación con pacientes con negatividad sérica y tisular. Sin embargo dentro de una misma biopsia no se han detectado diferencias significativas entre hepatocitos HBsAg positivos y negativos. Las alteraciones morfométricas no se han demostrado relacionadas con el tipo morfológico de hepatitis crónica.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ANONIMO. The A to F of viral hepatitis (Editorial). *Lancet* 1990; 336: 1158-1160.
- 2.- AFROUDAKIS AP, ASHCAVAI M, PETERS RL, TONG MJ. The immunohistochemical detection of HBsAg in liver tissue of serologically HBsAg negative patients (Abstract). *Am J Clin Pathol* 1976; 66: 461-462.
- 3.- AFROUDAKIS AP, LIEW CT, PETERS RL. An immunoperoxidase technic for the demonstration of the hepatitis B surface antigen in human livers. *Am J Clin Pathol* 1976; 65: 533-539.
- 4.- AIKAWA T, SAIRENJI H, FURUTA S et al. Seroconversion from hepatitis B e antigen to antiHBe in acute hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1978; 298: 439-441.
- 5.- AKAHANE Y, YAMANAKA T, SUZUKI H et al. Chronic active hepatitis with hepatitis B virus DNA and antibody against e antigen in the serum. Disturbed synthesis and secretion of e antigen from hepatocytes due to a point mutation in the precore region. *Gastroenterology* 1990; 99: 1113-1119.
- 6.- ALBERTI A. Diagnosis of hepatitis C. Facts and perspectives. *J Hepatol* 1991; 12: 279-282.
- 7.- ALBERTI A, DIANA S, SCULLARD GH, EDDLESTON ALWF, WILLIAMS R. Full and empty Dane particles in chronic hepatitis B virus infection. Relation to hepatitis B e antigen and presence of liver damage. *Gastroenterology* 1978; 75: 869-874.
- 8.- ALBERTI A, REALDI G, BORTOLOTTI F, RIGOLI AM. T lymphocyte cytotoxicity to HBsAg-coated target cells in hepatitis B virus infection. *Gut* 1977; 18:1004-1009.
- 9.- ALBERTI A, REALDI G, TREMOLADA F, CADROBBI P. HBsAg on liver-cell surface in viral hepatitis (letter). *Lancet* 1975; 1: 346
- 10.- ALBERTI A, TREMOLADA F, FATTOVICH G, BORTOLOTTI F, REALDI G. Virus replication and liver disease in chronic hepatitis B virus infection. *Dig Dis Sci* 1983; 28: 962-966.
- 11.- ALBIN C, ROBINSON WS. Protein Kinase activity in hepatitis B virus. *J Virol* 1980; 34: 297-302
- 12.- ALDERSHVILE J, DIETRICHSON O, SKINHØJ P et al. Chronic persistent hepatitis: serological classification and meaning of the hepatitis B e system. *Hepatology* 1982; 2: 243-246.
- 13.- ALDERSHVILE J, FRÖSNER GG, NIELSEN JO et al. Hepatitis B e antigen and antibody measured by radioimmunoassay in acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis. *J Infect Dis* 1980; 141: 293-298.
- 14.- ALMEIDA JD, RUBENSTEIN D, STOTT EJ. New antigen antibody system in Australia antigen positive hepatitis. *Lancet* 1971; 2: 1225-1227.
- 15.- ALONSO MARTI C, MORENO A, BARAT A, SOLERA JC, OLIVA H. Coexistence of hepatocyte ground-glass inclusions from several causes.

- Histopathology 1990; 16: 304-307
- 16.- ALTER HJ, PURCELL RH, SHIH JW et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321: 1494-1500.
 - 17.- ALWARD WLM, MCMAHON BJ, HALL DB, HEYWARD WL, FRANCIS DP, BENDER TR The long-term serological course of asymptomatic hepatitis B virus carriers and the development of primary hepatocellular carcinoma. *J Infect Dis* 1985; 151: 604-609.
 - 18.- ANDERSON MG, MURRAY-LYON IM. Natural history of the HBsAg carrier. *Gut* 1985; 26: 848-860.
 - 19.- ANTHONY PP, ISHAK KG, NAYAK NC, POULSEN HE, SCHEUER PJ, SOBIN LH. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature and classification. *Bull WHO* 1977; 55: 521-540.
 - 20.- ARAGONA M, MACAGNO S, CAREDDA F et al. Serological response to the hepatitis delta virus in hepatitis D. *Lancet* 1987; 1: 478-480.
 - 21.- ARICO S, ARAGONA M, RIZZETTO M et al. Clinical significance of antibody to the hepatitis delta virus in symptomless HBsAg carriers. *Lancet* 1985; II: 356-358.
 - 22.- ARNOLD W, HESS G, HÜTTEROTH T, MEYER ZUM BÜSCHENFELDE K-H. Immunological status as basis for appropriate treatment in subgroups of HBsAg-positive chronic hepatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 385-388.
 - 23.- BAGGENSTOSS AH, SOLOWAY RD, SUMMERSKILL WHJ, ELVEBACK LR, SCHOENFIELD LJ. Chronic active liver disease: the range of histologic lesions, their response to treatment and evolution. *Hum Pathol* 1972; 3: 183-198.
 - 24.- BANCROFT JD, STEVENS A. Theory and practice of histological techniques. 3. ed. Nueva York: Churchill Livingstone, 1990: 723.
 - 25.- BANNINGER P, ALTORFER J, FROSNER GG et al. Prevalence and significance of anti-HBc IgM (radioimmunoassay) in acute and chronic hepatitis B and in blood donors. *Hepatology* 1983; 3: 337-342.
 - 26.- BAPTISTA A, BIANCHI L, DE GROOTE J et al. The diagnostic significance of periportal hepatic necrosis and inflammation. *Histopathology* 1988; 12: 569-579.
 - 27.- BARCENA MARUGAN R, BOIXEDA DE MIQUEL D, GONZALEZ MARTIN JA. El "agente delta". Características, infectividad y aspectos clínicos de su infección. *Rev Esp Enf Digest* 1985; 68: 366-373.
 - 28.- BARDADIN KA, DESMET VJ. Interdigitating and dendritic reticulum cells in chronic active hepatitis. *Histopathology* 1984; 8: 657-667.
 - 29.- BARTOLOME J, BAS C, PORRES JC, MORA I, HERNANDEZ-GUIO C, CARREÑO F. Estudio de los patrones de aparición del VBH-DNA en biopsias hepáticas (Abstract). *Gastroenterol Hepatol* 1987; 10: 222
 - 30.- BAS C, BARTOLOME J, LA BANDA F et al. Assessment of hepatitis B virus DNA levels in chronic HBsAg carriers with or without hepatitis delta virus superinfection. *J Hepatol* 1988; 6: 208-213.
 - 31.- BAS L, CARREÑO V, PORRES JC et al. Sobreinfección con agente delta en portadores crónicos de AgHBs en España. Características clínicas, epidemiológicas y virológicas. *Rev Clín Esp* 1984; 175: 67-69.
 - 32.- BEASLEY RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocelular carcinoma. *Cancer* 1988; 61: 1942-1956.
 - 33.- BERG PA, WIEDMANN KH, SAYERS T, KLOPPEL G, LINDNER H. Serological classification of chronic cholestatic liver disease by the use of two different types of

- antimitochondrial antibodies. *Lancet* 1980; 1: 1329-1332.
- 34.- BERGMANN KF, GERIN JL. Antigens of hepatitis delta virus in the liver and serum of humans and animals. *J Infect Dis* 1986; 154: 702-706.
 - 35.- BERNUAU D, ROGIER E, FELDMANN G. In situ ultrastructural detection and quantitation of liver mononuclear phagocytes in contact with hepatocytes in chronic type B hepatitis. *Lab Invest* 1984; 51: 667-674.
 - 36.- BERQUIST KR, MAYNARD JE, MURPHY BL. Infectivity of serum containing HBsAg and antibody to e antigen. *Lancet* 1976; 1:1026-1027.
 - 37.- BIANCHI L, DE GROOTE J, DESMET VJ et al. Acute and chronic hepatitis revisited. Review by an International Group. *Lancet* 1977; 2: 914-919.
 - 38.- BIANCHI L, DE GROOTE J, DESMET VJ et al. Morphological criteria in viral hepatitis. Review by an International Group. *Lancet* 1971; 1: 333-337.
 - 39.- BIANCHI L, GUDAT F. Sanded nuclei in hepatitis B: eosinophilic inclusions in liver cell nuclei due to excess in hepatitis B core antigen formation. *Lab Invest* 1976; 35: 1-5.
 - 40.- BIANCHI L, SPICHTIN HP, GUDAT F. Chronic hepatitis. En: Macsween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, eds. *Pathology of the liver*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987: 310-341.
 - 41.- BLUM HE, HAASE AT, VYAS GN. Molecular pathogenesis of hepatitis B virus infection: simultaneous detection of viral DNA and antigens in paraffin-embedded liver sections. *Lancet* 1984; ii: 771-775
 - 42.- BLUM HE, OFFENSPERGER WB, WALTER E, OFFENSPERGER S, GEROK W. Latent hepatitis B virus infection with full-length viral genome in a patient serologically immune to hepatitis B virus infection. *Liver* 1988; 8: 307-316
 - 43.- BLUMBERG BS, GERSTLEY BJS, HUNGERFORD DA, LONDON WT, SUTNICK AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* 1967; 66: 924-931
 - 44.- BLUMBERG BS, SUTNICK AI, LONDON WT, MILLMAN I. Australia antigen. En: Gall EA, Mostofi FK, eds. *The liver*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1973: 269-285.
 - 45.- BONINO F. Chronic viral hepatitis. From clinical trials to the therapeutic decision in the individual patient. *J Hepatol* 1991; 13: S27-S30.
 - 46.- BONINO F, BRUNETTO MR, NEGRO F, SMEDILE A, PONZETTO A. Hepatitis delta virus, a model of liver cell pathology. *J Hepatol* 1991; 13: 260-266.
 - 47.- BONINO F, BRUNETTO MR, RIZZETTO M, WILL H. Hepatitis B virus unable to secrete e antigen (Editorial). *Gastroenterology* 1991; 100: 1138-1141.
 - 48.- BONINO F, HEERMANN KH, RIZZETTO M, GERLICH WH. Proteins of hepatitis delta virus (HDV) (Abstract). *Hepatology* 1986; 6: 770a.
 - 49.- BONINO F, HOYER B, SHIH JWK, RIZZETTO M, PURCELL RH, GERIN JL. Delta hepatitis agent: structural and antigenic properties of the delta associated particle. *Infect Immun* 1984; 43: 1000-1005.
 - 50.- BONINO F, ROSINA F, RIZZETTO M et al. Chronic hepatitis in HBsAg carriers with serum HBV-DNA and antiHBe. *Gastroenterology* 1986; 90:1268-1273.
 - 51.- BORCHARD F, GUSSMANN V. Detection of HBsAg containing cells in liver biopsies by different stains and classification of positively reacting ground-glass hepatocytes. *Virchows Arch A* 1979; 384: 245-261.
 - 52.- BORIES P, COURSAGET P, GOUDEAU A, DEGOTT C, MAUPAS P,

- BENHAMOU JP. Antibody to hepatitis B core antigen in chronic active hepatitis. *Br Med J* 1978; 1: 396-397.
- 53.- BORTOLOTTI F, CADROBBI P, CRIVELLARO C et al. Long-term outcome of chronic type B hepatitis in patients who acquire hepatitis B virus infection in childhood. *Gastroenterology* 1990; 99: 805-810.
 - 54.- BOYER JL. Chronic hepatitis. A perspective on classification and determinants of prognosis. *Gastroenterology* 1976; 70: 1161-1171.
 - 55.- BRANCH AD, BENENFELD BJ, BAROUDY BM, WELLS FV, GERIN JL, ROBERTSON HD. An ultraviolet-sensitive RNA structural element in a viroid-like domain of the hepatitis delta virus. *Science* 1989; 241: 649-652.
 - 56.- BRECHOT C, DEGOS F, LUGASSY C et al. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1985; 312: 270-276.
 - 57.- BRECHOT C, HADCHOUEL M, SCOTTO J et al. Detection of hepatitis B virus DNA in liver and serum: a direct appraisal of the chronic carrier state. *Lancet* 1981; 2: 765-768.
 - 58.- BRECHOT C, HADCHOUEL M, SCOTTO J et al. State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with hepatitis B surface antigen-positive and - negative liver diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 3906-3910
 - 59.- BRECHOT C, LUGASSY C, DEJEAN A et al. Hepatitis B virus DNA in infected human tissues. En: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH eds. *Viral hepatitis and liver disease*. Orlando, Florida: Grune and Stratton, 1984: 395-409
 - 60.- BRECHOT C, TREPO C, NINOVA-BRADISTILOVA D, et al. Hepatitis B core antigen in hepatocytes of patients with chronic active hepatitis. *Dig Dis Sci* 1980; 25: 593-596.
 - 61.- BROWN JL, CARMAN WF, THOMAS HC. The clinical significance of molecular variation within the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1992; 15: 144-148.
 - 62.- BRUGUERA M, SANCHEZ TAPIAS JM, BARRERA JM et al. Prevalencia de la infección por el virus de la hepatitis B y por el agente delta en drogadictos. *Gastroenterol Hepatol* 1985; 8: 63-66.
 - 63.- BRUNETTO MR, OLIVERI F, ROCCA G et al. Natural course and response to interferon of chronic hepatitis B accompanied by antibody to hepatitis B e antigen. *Hepatology* 1989; 10: 198-202.
 - 64.- BUDKOWSKA A, DUBREVIL P, CAPEL F, PILLOT J. Hepatitis B virus pre-S gene-encoded antigenic specificity and anti-preS antibody: relationship between anti-preS response and recovery. *Hepatology* 1986; 6: 360-368.
 - 65.- BUDKOWSKA A, SHIH JWK, GERIN JL. Immunochemistry and polypeptide composition of hepatitis B core antigen (HBc Ag). *J Immunol* 1977; 118: 1300-1305.
 - 66.- BUITRAGO B, POPPER H, HADLER SC et al. Specific histologic features of Santa Marta hepatitis: a severe form of hepatitis delta-virus infection in Northern South America. *Hepatology* 1986; 6: 1285-1291.
 - 67.- BURRELL CJ, GOWANS EJ, ROWLAND R, HALL P, JILBERT AR, MARMION BP. Correlation between liver histology and markers of hepatitis B virus replication in infected patients: a study by in situ hybridization. *Hepatology* 1984; 4: 20-24.
 - 68.- BUTI M. Hepatitis delta. *Gastroenterol Hepatol* 1987; 10 (Supl 1): 62-69.
 - 69.- BUTI M, ESTEBAN R, ALLENDE H, JARDI R, MORAGAS A, GUARDIA J. Correlación serológica y hepática de los marcadores del virus de la hepatitis B y D.

- Med Clín (Barc) 1986; 87: 753-756.
- 70.- BUTI M, ESTEBAN R, ESPAÑOL MT et al. Influence of human immunodeficiency virus infection on cell-mediated immunity in chronic D hepatitis. *J Infect Dis* 1991; 163: 1351-1353.
 - 71.- BUTI M, ESTEBAN R, ESTEBAN JI, ALLENDE H, JARDI R, GUARDIA J. Anti-HD IgM as a marker of chronic delta infection. *J Hepatol* 1987; 4: 62-65.
 - 72.- BUTI M, ESTEBAN R, FERNANDEZ J, JARDI R, ALLENDE H, GUARDIA J. Determinación del RNA-VHD sérico en la infección aguda y crónica delta. *Gastroenterol Hepatol* 1987; 10: 493-499.
 - 73.- BUTI M, ESTEBAN R, GENESCA J, JARDI R, HERNANDEZ JM, GUARDIA J. Prevalencia de la infección por virus delta en pacientes infectados por el virus de la hepatitis B. *An Med Intern (Madrid)* 1984; 1: 421-423.
 - 74.- BUTI M, ESTEBAN R, JARDI R et al. Chronic delta hepatitis: detection of hepatitis delta virus antigen in serum by immunoblot and correlation with other markers of delta viral replication. *Hepatology* 1989; 10: 907-910.
 - 75.- BUTI M, ESTEBAN R, JARDI R, ALLENDE H, ESTEBAN JI, GUARDIA J. Evolución clinicoserológica de la hepatitis aguda delta. *Gastroenterol Hepatol* 1986; 9: 217-220.
 - 76.- BUTI M, ESTEBAN R, ROGGENDORF M et al. Hepatitis D virus RNA in acute delta infection: serological profile and correlation with other markers of hepatitis D virus infection. *Hepatology* 1988; 8: 1125-1129.
 - 77.- BUTI M, GENESCA J, ESTEBAN JI, ESTEBAN R, GUARDIA J. Infección por agente delta en España. *An Med Intern (Madrid)* 1984; 3: 62-63
 - 78.- BUTI M, MAS A, ESTEBAN R, SANCHEZ-TAPIAS JM, ALLENDE H, BRUGUERA M. Historia natural de la sobreinfección delta en portadores del HBsAg: seguimiento histológico durante dos años (Abstract). *Gastroenterol Hepatol* 1987; 10: 220
 - 79.- CAMILLERI JP, AMAT C, CHOUSTERMAN M et al. Immunohistochemical patterns of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in patients with hepatitis, renal homografts recipients and normal carriers. *Virchows Arch A* 1977; 376: 329-341.
 - 80.- CANESE MG, RIZZETTO M, ARICO S et al. An ultrastructural and immunohistochemical study on the delta antigen associated with the hepatitis B virus. *J Pathol* 1979; 128: 169-175.
 - 81.- CAPORASO N, DEL VECCHIO-BLANCO C, SERVILLO F et al. Role of delta infection in the progression to chronicity of acute HBsAg positive hepatitis. *Gastroenterol Clin Biol* 1984; 8: 646-650.
 - 82.- CAREDDA F, ANTINORI S, PASTECCHIA C et al. Incidence of hepatitis delta virus infection in acute HBsAg negative hepatitis. *J Infect Dis* 1989; 159: 977-979.
 - 83.- CAREDDA F, ROSSI E, D'ARMINIO MONFORTE A et al. Hepatitis B virus-associated coinfection and superinfection with delta agent: indistinguishable disease with different outcome. *J Infect Dis* 1985; 151: 925-928.
 - 84.- CARMAN WF, JACYNA MR, HADZIYANNIS S et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 2: 588-591.
 - 85.- CARREÑO GARCIA V, BARTOLOME NEBREDA FJ. Progresos en el conocimiento de la hepatitis por virus B: aporte de la biología molecular. *Rev Clín Esp* 1986; 178: 238-239.

- 86.- CARREÑO V, FAYA E, GUTIEZ J, CASTRO G, PORRES JC, HERNANDEZ-GUIO C. T-lymphocytes subsets in chronic active hepatitis. Relation with the presence of hepatitis B virus markers (Abstract). *Hepatology* 1983; 3: 1049A.
- 87.- CASTILLO I, BARTOLOME J, QUIROGA JA, PORRES JC, CARREÑO V. Detection of HBeAg/antiHBe immune complexes in the reactivation of hepatitis B virus replication among anti-HBe chronic carriers. *Liver* 1990; 10: 79-84.
- 88.- CECH TR. Ribozymes and their medical implications. *JAMA* 1988; 260: 3030-3034.
- 89.- CIVEIRA MP, PRIETO J, MORTE S, RIÑON M, SERRANO M. Interleukins in chronic active hepatitis B. Relationship with viral markers. *J Hepat* 1987; 5: 37-44.
- 90.- COLOMBO M, CAMBIERI R, RUMI MG, RONCHI G, DEL NINNO E, DE FRANCHIS R. Long-term delta superinfection in hepatitis B surface antigen carriers and its relationship to the course of chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1983; 85: 235-239.
- 91.- COLUCCI G, COLOMBO M, DEL NINNO E, PARONETTO F. In situ characterization by monoclonal antibodies of the mononuclear cell infiltrate in chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1983; 85: 1138-45.
- 92.- COMBES B. The initial morphologic lesion in chronic hepatitis, important or unimportant? (Editorial). *Hepatology* 1986; 6: 518-522.
- 93.- COOKSLEY WGE, BRADBPEAR RA, ROBINSON W et al. The prognosis of chronic active hepatitis without cirrhosis in relation to bridging necrosis. *Hepatology* 1986; 6: 345-348.
- 94.- CRAIG JR, GOVINDARAJAN S, DE COCK KM. Delta viral hepatitis: histopathology and course. En: *Pathology Annual*. Sommers SC, Rosen PP, Fechner RE, eds. Appleton-Century-Crofts, 1986 (part.II); 21: 1-21.
- 95.- CRAXI A, RAIMONDO G, LONGO G et al. Delta agent infection in acute hepatitis and chronic HBsAg carriers with and without liver disease. *Gut* 1984; 25: 1288-1290.
- 96.- CRAXI A, WELLER IVD, BASSENDINE MF, et al. Relationship between HBV-specific DNA polymerase and HBe antigen/antibody system in chronic HBV infection: factors determining selection of patients and outcome of antiviral therapy. *Gut* 1983; 24: 143-147.
- 97.- CRIVELLI O, RIZZETTO M, LAVARINI C, SMEDILE A, GERIN JL. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to the hepatitis B surface antigen-associated delta antigen. *J Clin Microbiol* 1981; 14: 173-177.
- 98.- CUCCURULLO L, RAMBALDI M, IAQUINTO G et al. Importance of showing HBsAg and HBcAg positivity in the liver for better aetiological definition of chronic liver disease. *J Clin Pathol* 1987; 40: 167-171.
- 99.- CHADWICK RJ, GALIZZI J, HEATHCOTE J et al. Chronic persistent hepatitis: hepatitis B virus markers and histological follow-up. *Gut* 1979; 20: 372-377.
- 100.- CHEN PJ, CHEN DS, CHEN CR et al. Delta infection in asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen: low prevalence of delta activity and effective suppression of hepatitis B virus replication. *Hepatology* 1988; 8: 1121-1124.
- 101.- CHEN ML, GERBER MA, THUNG SN, THORNTON JC, CHUNG WK. Morphometric study of hepatocytes containing hepatitis B surface antigen. *Am J Pathol* 1984; 114: 217-221.
- 102.- CHEN PJ, KALPANA G, GOLDBERG J et al. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 8774-8778.

- 103.- CHEN DS, LAI MY, SUNG JL. Delta agent infection in patients with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma - an infrequent finding in Taiwan. *Hepatology* 1984; 4: 502-503.
- 104.- CHEN TJ, LIAW YF. The prognostic significance of bridging hepatic necrosis in chronic type B hepatitis: a histopathologic study. *Liver* 1988; 8: 10-16.
- 105.- CHOO QL, KUO G, WEINER AJ, OVERBY LR, BRADLEY DW, HOUGHTON M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
- 106.- CHU CM, FARCI P, LIAW YF, BALESTRIERI A, THOMAS HC. The role of delta superinfection in acute exacerbations of chronic type B hepatitis. *Liver* 1986; 6: 26-29.
- 107.- CHU CM, KARAYIANNIS P, FOWLER MJF, MONJARDINO J, LIAW YF, THOMAS HC. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan: studies of hepatitis B virus DNA in serum. *Hepatology* 1985; 5: 431-434.
- 108.- CHU CM, LIAW YF. Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigens in chronic hepatitis B virus infection: hepatocyte with cytoplasmic/membranous hepatitis B core antigen as a possible target for immune hepatocytolysis. *Gastroenterology* 1987; 92: 220-225.
- 109.- CHU CM, LIAW YF. Acute delta superinfection in a previously unrecognized HBsAg carrier with transient loss of HBsAg simulating acute non-A non-B hepatitis. *Gut* 1988; 29: 1013-1015.
- 110.- CHU CM, LIAW YF. Studies on the composition of the mononuclear cell infiltrates in liver from patients with chronic active delta hepatitis. *Hepatology* 1989; 10: 911-915.
- 111.- CHU CM, LIAW YF. Immunohistological study of intrahepatic expression of hepatitis B core and E antigens in chronic type B hepatitis. *J Clin Pathol* 1992; 45: 791-795.
- 112.- CHU CM, LIAW YF, PAO CC, HUANG MJ. The etiology of acute hepatitis superimposed upon previously unrecognized asymptomatic HBsAg carriers. *Hepatology* 1989; 9: 452-456.
- 113.- CHU CM, LIAW YF, SHEEN IS, CHEN JJ. Correlation of age with the status of hepatitis B virus replication and histological changes in chronic type B hepatitis. *Liver* 1985; 5: 117-122.
- 114.- CHU CM, LIAW YF, YANG CY, SHEEN IS. Peripheral T-cell subsets in chronic type B hepatitis: correlation with biochemical and histological activities and hepatitis B e antigen/antibody status. *Cell Immunol* 1984; 86: 562-566.
- 115.- DANE DS, CAMERON CH, BRIGGS M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1: 695-698.
- 116.- DAVIS GL, HOOFNAGLE JH. Reactivation of chronic hepatitis B virus infection (Editorial). *Gastroenterology* 1987; 92: 2028-2031.
- 117.- DAVIS GL, HOOFNAGLE JH. Reactivation of chronic type B hepatitis presenting as acute viral hepatitis. *Ann Intern Med* 1985; 102: 762-765.
- 118.- DAVIS GL, HOOFNAGLE JH, WAGGONER JG. Spontaneous reactivation of chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1984; 86: 230-235.
- 119.- DAVISON F, ALEXANDER GJM, TROWBRIDGE R, FAGAN EA, WILLIAMS R. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes, of chronic HBsAg carriers. A lack of relationship with serum markers of replication. *J Hepatol* 1987; 4: 37-44.

- 120.- DE COCK KM, GOVINDARAJAN S, REDEKER AG. Acute delta hepatitis without circulating HBsAg. *Gut* 1985; 26: 212-214.
- 121.- DE FRANCHIS R, D'ARMINIO A, VECCHI M et al. Chronic asymptomatic HBsAg carriers: histologic abnormalities and diagnostic and pronostic value of serologic markers of the HBV. *Gastroenterology* 1980; 79: 521-527.
- 122.- DE GROOTE J, DESMET VJ, GEDIGK P et al. A classification of chronic hepatitis. *Lancet* 1968; ii: 626-628.
- 123.- DE GROOTE J, FEVERY J, LEPOUTRE L. Long-term follow-up of chronic active hepatitis of moderate severity. *Gut* 1978; 19: 510-513.
- 124.- DEGOS F, LUGASSY C, DEGOTT C et al. Hepatitis B virus and hepatitis B-related viral infection in renal transplant recipients. A prospective study of 90 patients. *Gastroenterology* 1988; 94: 151-156.
- 125.- DEINHARDT F. Predictive value of markers of hepatitis virus infection. *J Infect Dis* 1980; 141: 299-305.
- 126.- DENNISTON KJ, HOYER BH, SMEDILE A, WELLS FV, NELSON J, GERIN JL. Cloned fragment of the hepatitis delta virus RNA genome: sequence and diagnostic application. *Science* 1986; 232: 873-875.
- 127.- DEODHAR KP, TAPP E, SCHEUER PJ. Orcein staining of hepatitis B antigen in paraffin sections of liver biopsies. *J Clin Pathol* 1975; 28: 66-70.
- 128.- DEVINE P, TASWELL HF, MOORE SB, GILCHRIST GS, JACOBSON TM. Passively acquired antibody to hepatitis B surface antigen. Pitfall in evaluating immunity to hepatitis B viral infections. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 529-531.
- 129.- DIAZ SANZ A, REZINOVSKI C, BLE ORAMAS C, HERNANDEZ GUIO C. Hepatitis crònica en nuestro medio. *Gastroenterol Hepatol* 1980; 3: 56-62.
- 130.- DI BISCEGLIE AM, NEGRO F. Diagnosis of hepatitis delta virus infection (Editorial). *Hepatology* 1989; 10: 1014-1016.
- 131.- DIENES HP, HÜTTEROTH T, HESS G, MEUER SC. Immunoelectron microscopic observations on the inflammatory infiltrates and HLA antigens in hepatitis B and non-A, non-B. *Hepatology* 1987; 7: 1317-1325.
- 132.- DIENSTAG JL. Immunologic mechanisms in chronic viral hepatitis. En: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, eds. *Viral hepatitis and liver disease*. Orlando, Florida: Grune and Stratton, 1984: 135-166.
- 133.- DIENSTAG JL, BHAN AK. Enhanced in vitro cell-mediated cytotoxicity in chronic hepatitis B virus infection: absence of especificity for virus-expressed antigen on target cell membranes. *J Immunol* 1980; 125: 2269-2276
- 134.- DIETRICHSON O. Chronic persistent hepatitis. A clinical, serological and prognostic study. *Scand J Gastroenterol* 1975; 10: 249-255.
- 135.- DIETRICHSON O, CHRISTOFFERSEN P. The prognosis of chronic aggressive hepatitis. A clinical and morphological follow-up study. *Scand J Gastroenterol* 1977; 12: 289-295.
- 136.- DI SAPIO M, CAPORASO N, DEL VECCHIO-BLANCO C, COLTORTI M. Prevalence of HBcAg and delta-Ag in liver tissue of patients with HBsAg positive chronic hepatitis. *Liver* 1988; 8: 236-240.
- 137.- DORMEYER HH, ARNOLD W, SCHONBORN H et al. The significance of serologic, histologic and immunohistologic findings in the prognosis of 88 asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 1981; 144: 33-37.

- 138.- DRAGOSICS B, FERENCI P, HITCHMAN E, DENK H. Long-term follow-up study of asymptomatic HBsAg positive voluntary blood donors in Austria: a clinical and histologic evaluation of 242 cases. *Hepatology* 1987; 7: 302-306.
- 139.- DUDLEY FJ, FOX RA, SHERLOCK S. Cellular immunity and hepatitis-associated Australia antigen liver disease. *Lancet* 1972; i: 723-726.
- 140.- DUDLEY FJ, SCHEUER PJ, SHERLOCK S. Natural history of hepatitis-associated antigen-positive chronic liver disease. *Lancet* 1972; 2: 1388-1393.
- 141.- EDDLESTON ALWF, WILLIAMS R. Inadequate antibody response to HBAg or suppressor T-cell defect in development of active chronic hepatitis. *Lancet* 1974; 2: 1543-1545.
- 142.- EGGINK HF, HOUTHOFF HJ, HUITEMA S, WOLTERS G, POPPEMA S, GIPS CH. Cellular and humoral immune reactions in chronic active liver disease. II. Lymphocyte subsets and viral antigens in liver biopsies of patients with acute and chronic hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 1984; 56: 121-128.
- 143.- EL SHEIKH N, WOOLF IL, GALBRAITH RM, EDDLESTON ALWF, DYMOCK IW, WILLIAMS R. e Antigen-antibody system as indicator of liver damage in patients with hepatitis-B antigen. *Br Med J* 1975; 4: 252-253.
- 144.- ERCILLA MG, BARRERA JM, JOVE J et al. Influence of HBV replication and delta agent superinfection on T cell subsets and killer (Leu 7+) in chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1986; 3: 378-383.
- 145.- ESTEBAN JI, ESTEBAN R, VILADOMIU L et al. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1989; 2: 294-297.
- 146.- FACCHETTI F, TARDANICO R, BONETTI MF, GUERINI A, CALLEA F. HBsAg, HBcAg and Delta-Ag in liver tissue: simultaneous visualization in a single tissue section by triple immunostaining. *Histol Histopath* 1986; 1: 181-185.
- 147.- FARCI P, GERIN JL, ARAGONA M et al. Diagnostic and prognostic significance of the IgM antibody to the hepatitis delta virus. *Jama* 1986; 255: 1443-1446.
- 148.- FARCI P, SMEDILE A, LAVARINI C et al. Delta hepatitis in inapparent carriers of hepatitis surface antigen. A disease simulating acute hepatitis B progressive to chronicity. *Gastroenterology* 1983; 85: 669-673.
- 149.- FATTOVICH G, BOSCARO S, NOVENTA F et al. Influence of hepatitis delta virus infection on progression to cirrhosis in chronic hepatitis type B. *J Infect Dis* 1987; 155: 931-935.
- 150.- FATTOVICH G, BROLLO L, ALBERTI A et al. Chronic persistent hepatitis type B can be a progressive disease when associated with sustained virus replication. *J Hepatol* 1990; 11: 29-33.
- 151.- FATTOVICH G, BROLLO L, ALBERTI A, PONTISSO P, GIUSTINA G, REALDI G. Long-term follow-up of Anti-HBe positive chronic active hepatitis B. *Hepatology* 1988; 8: 1651-1654.
- 152.- FATTOVICH G, BROLLO L, GIUSTINA G et al. Natural history and prognostic factors for chronic hepatitis type B. *Gut* 1991; 32: 294-298.
- 153.- FATTOVICH G, RUGGE M, BROLLO L et al. Clinical, virologic and histologic outcome following seroconversion from HBeAg to AntiHBe in chronic hepatitis type B. *Hepatology* 1986; 6: 167-172.
- 154.- FEINMAN SV, COOTER N, SINCLAIR JC, WROBEL DM, BERRIS B. Clinical and epidemiological significance of the HBsAg (Australia antigen): carrier state. *Gastroenterology* 1975; 68: 113-120.

- 155.- FEITELSON MA. Products of the "X" gene in hepatitis B and related viruses. *Hepatology* 1986; 6: 191-198.
- 156.- FERRARI C, MONDELLI MU, PENNA A, FIACCADORI F, CHISARI FV. Functional characterization of cloned intrahepatic, hepatitis B virus nucleoprotein-specific helper T cell lines. *J Immunol* 1987; 139: 539-544.
- 157.- FERRARI C, PENNA A, DEGLIANTONI A, FIACCADORI F. Cellular immune response to hepatitis B virus antigens. An overview. *J Hepatol* 1988; 7: 21-33
- 158.- FERRARI C, PENNA A, GIUBERTI T et al. Intrahepatic, nucleocapsid antigen-specific T cells in chronic active hepatitis B. *J Immunol* 1987; 139: 2050-2058.
- 159.- FOWLER MJF, GREENFIELD C, CHU CM et al. Integration of HBV-DNA may not be a prerequisite for the maintenance of the state of malignant transformation. An analysis of 110 liver biopsies. *J Hepatol* 1986; 2: 218-229.
- 160.- FOWLER MJF, MONJARDINO J, WELLER IVD, LOK ASF, THOMAS HC. Analysis of the molecular state of HBV-DNA in the liver and serum of patients with chronic hepatitis or primary liver cell carcinoma and the effect of therapy with adenine arabinoside. *Gut* 1984; 25: 611-618.
- 161.- FRANCA STM, KIYOSAWA K, IMAI Y et al. Change of intrahepatic expression of hepatitis B core antigen during the clinical course of type B chronic hepatitis. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 454-460.
- 162.- FREIMAN J, ECKSTEIN R, McCAUGHAN G et al. Significance of serum and hepatic markers of hepatitis B viral infection in HBsAg-positive and HBsAg-negative chronic active hepatitis. *Hepatology* 1985; 5: 50-53.
- 163.- FROMMEL D, ALLAIN JP, COUROUCE AM et al. Long-lasting abatement of HBsAg synthesis induced by acute delta infection. *Lancet* 1983; 1: 656-657.
- 164.- FUJITA YK, KAMATA K, KAMEDA H, ISSELBACHER KJ, WANDS JR. Detection of hepatitis B virus infection in hepatitis B surface antigen-negative hemodialysis patients by monoclonal radioimmunoassays. *Gastroenterology* 1986; 91: 1357-1363.
- 165.- GALAN MI, TOMAS J, BERNAL MC, SALMERON FJ, MAROTO MC. Evaluation of the pre-S (pre - S (1) Ag/pre - S (2) Ab) system in hepatitis B virus infection. *J Clín Pathol* 1991; 44: 25-28.
- 166.- GANEM D, VARMUS HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 651-693.
- 167.- GENESCA J, JARDI R, BUTI M et al. Hepatitis B virus replication in acute hepatitis B, acute hepatitis B virus-hepatitis delta virus coinfection and acute hepatitis delta superinfection. *Hepatology* 1987; 7: 569-578.
- 168.- GERBER MA. Immunopathology of chronic hepatitis. En: Farber E, Phillips MJ, Kaufmann N ed. *Pathogenesis of liver diseases*. Baltimore: The Williams and Wilkins, 1987: 54-64 (Mostofi FK, ed. *International Academy of Pathology monograph*; n° 28)
- 169.- GERBER MA, HADZIYANNIS S, VERNACE S, VISSOULIS C. Incidence and nature of cytoplasmic hepatitis B antigen in hepatocytes. *Lab Invest* 1975; 32: 251-256.
- 170.- GERBER MA, THUNG SN. Molecular and cellular pathology of hepatitis B. *Lab Invest* 1985; 52: 572-590.
- 171.- GERBER MA, THUNG SN. The diagnostic value of immunohistochemical demonstration of hepatitis viral antigens in the liver. *Hum Pathol* 1987; 18: 771-774.

- 172.- GERBER MA, THUNG SN. The preS₂ region of hepatitis B virus: more questions than answers (Editorial). *Hepatology* 1989; 9: 328-330
- 173.- GERBER MA, VERNACE S. Chronic septal hepatitis. *Virchows Arch A* 1974; 363: 303-309.
- 174.- GERBER MA, VERNACE S, POPPER H. Groundglass hepatocytes in hepatitis B antigen (HBsAg) positive chronic hepatitis and cirrhosis (Abstract). *Gastroenterology* 1974; 66: 885.
- 175.- GONZALEZ A, GUARDIA J, ¿Cómo evolucionan los portadores de HBsAg? (Editorial). *Med Clin (Barc)* 1989; 92: 737-740.
- 176.- GONZALEZ O, MORA I, CARREÑO V, GUTIEZ J, HERNANDEZ-GUIO C. Hepatitis B core antigen (HBcAg) in serum from HBsAg carriers. It relation with dynamic phases of viral replicacion (Abstract). *Hepatology* 1983; 3: 1049.
- 177.- GOODMAN ZD, LANGLOSS JM, BRATTHAUER GL, ISHAK KG. Immunohistochemical localization of hepatitis B surface antigen and hepatitis B core antigen in tissue sections. A source of false positive staining. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 533-537.
- 178.- GOVINDARAJAN S, CHIN KP, REDEKER AG, PETERS RL. Fulminant B viral hepatitis: role of delta agent. *Gastroenterology* 1984; 86: 1417-1420.
- 179.- GOVINDARAJAN S, DE COCK KM, PETERS RL. Morphologic and immunohistochemical features of fulminant delta hepatitis. *Hum Pathol* 1985; 16: 262-267.
- 180.- GOVINDARAJAN S, DE COCK KM, REDEKER AG. Natural course of delta superinfection in chronic hepatitis B virus infected patients: histopathologic study with multiple liver biopsies. *Hepatology* 1986; 6: 640-644.
- 181.- GOVINDARAJAN S, FIELDS HA, HUMPHREY CD, MARGOLIS HS. Pathologic and ultrastructural changes of acute and chronic delta hepatitis in an experimentally infected chimpanzee. *Am J Pathol* 1986; 122: 315-322.
- 182.- GOVINDARAJAN S, FONG TL, VALINLUCK B, EDWARDS V, REDEKER AG. Markers of viral replication in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 233-237.
- 183.- GOVINDARAJAN S, GUPTA S, VALINLUCK B, REDEKER AG. Correlation of IgM anti-hepatitis D virus (HDV) to HDV-RNA in sera of chronic HDV. *Hepatology* 1989; 10: 34-35.
- 184.- GOVINDARAJAN S, HEVIA FJ, PETERS RL. Prevalence of delta antigen/antibody in B-viral associated hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1984; 53: 1692-1694.
- 185.- GOVINDARAJAN S, KANEL GC, DE COCK KM, REDEKER AG, FALZARANO JS. Delta agent superinfection: rapidly progressive liver disease in a hepatitis B virus carrier. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109: 395-397.
- 186.- GOVINDARAJAN S, KANEL GC, PETERS RL. Prevalence of delta-antibody among chronic hepatitis B virus infected patients in the Los Angeles area: its correlation with liver biopsy diagnosis. *Gastroenterology* 1983; 85: 160-162.
- 187.- GOVINDARAJAN S, LIM B, PETERS RL. Immunohistochemical localization of the delta antigen associated with hepatitis B virus in liver biopsy sections embedded in araldite. *Histopathology* 1984; 8: 63-67.
- 188.- GOVINDARAJAN S, VALINLUCK B. Serum hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B and delta infection. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109: 398-399.

- 189.- GOWANS EJ, BURRELL CJ. Widespread presence of cytoplasmic HBcAg in hepatitis B infected liver detected by improved immunochemical methods. *J Clin Pathol* 1985; 38: 393-398.
- 190.- GOWANS EJ, BURRELL CJ, JILBERT AR, MARMION BP. Cytoplasmic (but not nuclear) hepatitis B virus (HBV) core antigen reflects HBVDNA synthesis at the level of the infected hepatocyte. *Intervirology* 1985; 24: 220-225.
- 191.- GRIFFIN FM. Hepatitis B antigenemia in apparently healthy blood donors. *Jama* 1973; 226: 753-755.
- 192.- GUARDIA J, ESTEBAN R. La infección por virus delta o virus D de la hepatitis (VHD): su significado e incidencia en España (Editorial). *An Med Intern (Madrid)*. 1984; 1: 403-404.
- 193.- GUBETTA L, RIZZETTO M, CRIVELLI O, VERME G, ARICO S. A trichrome stain for the intrahepatic localization of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Histopathology* 1977; 1: 277-288.
- 194.- GUDAT F, BIANCHI L. Evidence for phasic sequences in nuclear HBcAg formation and cell membrane directed flow of core particles in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1977; 73: 1194-1197.
- 195.- GUDAT F, BIANCHI L, SONNABEND W, THIEL G, AENISHAENSLIN W, STALDER GA. Pattern of core and surface expression in liver tissue reflects state of specific immune response in hepatitis B. *Lab Invest* 1975; 32: 1-9.
- 196.- GUPTA H, JOSHI YK, TANDON BN. An enzyme-linked immunoassay for the possible detection of non-A, non-B viral antigen in patients with epidemic viral hepatitis. *Liver* 1988; 8: 111-115.
- 197.- GUPTA S, VALINLUCK B, GOVINDARAJAN S. Detection of hepatitis delta virus in serum and liver tissue by molecular hybridization. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 218-221.
- 198.- HADZIYANNIS S, GERBER MA, VISSOULIS C, POPPER H. Cytoplasmic hepatitis B antigen in "ground-glass" hepatocytes of carriers. *Arch Pathol* 1973; 96: 327-330.
- 199.- HADZIYANNIS S, RAIMONDO G, PAPAIOANNOU C et al. Expression of pre-S gene-encoded proteins in liver and serum during chronic hepatitis B virus infection in comparison to other markers of active virus replication. *J Hepatol* 1987; 5: 253-259.
- 200.- HADZIYANNIS SJ, LIEBERMAN HM, KARVOUNTZIS GG, SHAFRITZ DA. Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg vs. antiHBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology* 1983; 3:656-662.
- 201.- HADZIYANNIS SJ, SHERMAN M, LIEBERMAN HM, SHAFRITZ DA. Liver disease activity and hepatitis B virus replication in chronic delta antigen-positive hepatitis B virus carriers. *Hepatology* 1985; 5: 544-547.
- 202.- HANSSON BG, MOESTRUP T, WIDELL A, NORDENFELT E. Infection with delta agent in Sweden: introduction of a new hepatitis agent. *J Infect Dis* 1982; 146: 472-478.
- 203.- HANSON RG, HOOFNAGLE JH, MINUK GY, PURCELL RH, GERIN JL. Cell-mediated immunity to hepatitis B surface antigen in man. *Clin Exp Immunol* 1984; 57: 257-264.
- 204.- HARUNA Y, HAYASHI N, KATAYAMA K et al. Expression of X protein and hepatitis B virus replication in chronic hepatitis. *Hepatology* 1991; 13. 417-421.

- 205.- HEERMANN KH, GOLDMANN U, SCHWARTZ W, SEYFFARTH T, BAUMGARTEN H, GERLICH WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J Virol* 1984; 52: 396-402.
- 206.- HESS G, MOLLER B, GERKEN G, WEBER C, MANNS M, MEYER ZUM BÜSCHENFELDE KH. Expression of pre-S encoded proteins in sera of individuals chronically infected with hepatitis D virus. *Digestion* 1988; 40: 61-64.
- 207.- HIRSCHOWITZ BI, DASHER CA, WHITT FJ, COLE GW. Hepatitis B antigen and antibody and tests of liver function. A prospective study of 310 hospital laboratory workers. *Am J Clin Pathol* 1980; 73: 63-68.
- 208.- HOOFNAGLE JH. Type D (delta) hepatitis. *Jama* 1989; 261: 1321-1325.
- 209.- HOOFNAGLE JH, ALTER HJ. Chronic viral hepatitis. En: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, eds. *Viral hepatitis and liver disease*. Orlando, Florida: Grune and Stratton, 1984: 97-113.
- 210.- HOOFNAGLE JH, DUSHEIKO GM, SCHAFER DF et al. Reactivation of chronic hepatitis B virus infection by cancer chemotherapy. *Ann Intern Med* 1982; 96: 447-449.
- 211.- HOOFNAGLE JH, DUSHEIKO GM, SEEFF LB, JONES EA, WAGGONER JG, BALES ZB. Seroconversion from hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis. *Ann Intern Med* 1981; 94: 744-748.
- 212.- HOOFNAGLE JH, GERETY RJ, BARKER LF. Antibody to hepatitis-B virus core in man. *Lancet* 1973; 2: 869-873.
- 213.- HOOFNAGLE JH, SEEFF LB, BALES ZB, ZIMMERMAN HJ, VA. Hepatitis Cooperative Study Group. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *N Engl J Med* 1978; 298: 1379-1383.
- 214.- HOOFNAGLE JH, SHAFRITZ DA, POPPER H. Chronic type B hepatitis and the "healthy" HBsAg carrier state. *Hepatology* 1987; 7: 758-763.
- 215.- HOPF U, MOLLER B, KUTHER D et al. Long-term follow-up of posttransfusion and sporadic chronic hepatitis non-A, non-B and frequency of circulating antibodies to hepatitis C virus (HCV). *J Hepatol* 1990; 10: 69-76.
- 216.- HRUSKA JF, CLAYTON DA, RUBENSTEIN JLR, ROBINSON WS. Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J Virol* 1977; 21: 666-672.
- 217.- HSU HC, LAI MY, SU IJ et al. Correlation of hepatocyte HBsAg expression with virus replication and liver pathology. *Hepatology* 1988; 8: 749-754.
- 218.- HSU HC, LIN YH, CHANG MH, SU IJ, CHEN DS. Pathology of chronic hepatitis B virus infection in children: with special reference to the intrahepatic expression of hepatitis B virus antigens. *Hepatology* 1988; 8: 378-382.
- 219.- HSU HC, LIN WSJ, TSAI MJ. Hepatitis B surface antigen and hepatocellular carcinoma in Taiwan: with special reference to types and localization of HBsAg in the tumor cells. *Cancer* 1983; 52: 1825-1832.
- 220.- HSU HC, SU IJ, LAI MY et al. Biologic and prognostic significance of hepatocyte hepatitis B core antigen expressions in the natural course of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1987; 5: 45-50.
- 221.- HSU SM, RAINE L, FANGEN H. Use of avidin-biotin, peroxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled led antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.

- 222.- HU KQ, YU ZQ, LI FH, HAO LJ. Expression and clinical significance of preS₁ and S₂ proteins of HBV in sera of patients with chronic liver disease. *Liver* 1989; 9: 146-152.
- 223.- HUANG SN. Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Lab Invest* 1975; 33: 88-95.
- 224.- HUANG SN, MILLMAN I, O'CONNELL A, ARONOFF A, GAULT H, BLUMBERG BS. Virus-like particles in Australia antigen-associated hepatitis: an immunoelectron microscopy study of human liver. *Am J Pathol* 1972; 67: 453-470.
- 225.- HUANG SN, NEURATH AR. Immunohistologic demonstration of hepatitis B viral antigens in liver with reference to its significance in liver injury. *Lab Invest* 1979; 40: 1-17.
- 226.- JACOB JR, EICHBERG JW, LANFORD RE. In vitro replication and expression of hepatitis B virus from chronically infected primary chimpanzee hepatocytes. *Hepatology* 1989; 10: 921-927.
- 227.- JAMES DG. The Chianciano conference to redefine chronic liver disease. *Postgrad Med J* 1990; 66: 163-165.
- 228.- JAUREGUI JI, SERRANO M, CIVEIRA MP, PRIETO J. Correlación entre los distintos marcadores de replicación del virus de la hepatitis B. *Gastroenterol Hepatol* 1987; 10: 105-109.
- 229.- JUNG MC, SPENGLER U, SCHRAUT W et al. Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1991; 13: 310-317.
- 230.- KAMIMURA T, PONZETTO A, BONINO F, FEINSTONE SM, GERIN JL, PURCELL RH. Cytoplasmic tubular structures in liver of HBsAg carrier chimpanzees infected with delta agent and comparison with cytoplasmic structures in non-A, non-B hepatitis. *Hepatology* 1983; 3: 631-637.
- 231.- KANEL GC, GOVINDARAJAN S, PETERS RL. Chronic delta infection and liver biopsy changes in chronic active hepatitis B. *Ann Intern Med* 1984; 101: 51-54.
- 232.- KAPLAN PM, GREENMAN RL, GERIN JL, PURCELL RH, ROBINSON WS. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J. Virol.* 1973; 12: 995-1005.
- 233.- KATAYAMA K, HAYASHI N, SASAKI Y et al. Detection of hepatitis B virus X gene protein and antibody in type B chronic liver disease. *Gastroenterology* 1989; 97: 990-998.
- 234.- KAWANISHI H. Hepatitis B antigen in hepatocytes of chronic active liver disease. Studies in organ culture. *Arch Pathol Lab Med* 1979; 103: 157-164.
- 235.- KERR JFR, COOKSLEY WGE, SEARLE J et al. The nature of piecemeal necrosis in chronic active hepatitis. *Lancet* 1979; 2: 827-828.
- 236.- KLATSKIN G. Persistent HB antigenemia: associated clinical manifestations and hepatic lesions. *Am J Med Scien* 1975; 270: 33-40.
- 237.- KNODELL RG, ISHAK KG, BLACK WC et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435.
- 238.- KOFF RS. Natural history of acute hepatitis B in adults reexamined (Editorial). *Gastroenterology* 1987; 92: 2035-2037.
- 239.- KOJIMA T, CALLEA F, DESMYTER J, DESMET VJ. Immune electron microscopy of hepatitis delta antigen in hepatocytes. *Lab Invest* 1986; 55: 217-225.

- 240.- KOJIMA T, CALLEA F, DESMYTER J, SAKURAI I, DESMET VJ. Immuno-light and electron microscopic features of chronic hepatitis D. *Liver* 1990; 10: 17-27.
- 241.- KOJIMA M, UDO K, TAKAHASHI Y et al. Correlation between titer of antibody to hepatitis B core antigen and presence of viral antigens in the liver. *Gastroenterology* 1977; 73: 664-667.
- 242.- KORETZ RL, LEWIN KJ, REBHUN DJ, GITNICK GL. Hepatitis B surface antigen carriers-to biopsy or not to biopsy. *Gastroenterology* 1978; 75: 860-863.
- 243.- KOS A, DIKEMA R, ARNBERG AC, VAN DER MEIDE PH, SCHELLEKENS H. The hepatitis delta virus possesses a circular RNA. *Nature* 1986; 323: 558-560.
- 244.- KRAWCZYNSKY K, NAZAREWICZ T, BRZOSKO WJ, NOWOSLAWSKI A. Cellular localization of hepatitis-associated antigen in livers of patients with different forms of hepatitis. *J Infect Dis* 1972; 126: 372-377.
- 245.- KROGSGAARD K, ALDERSHVILE J, KRYGER P et al. Hepatitis B virus DNA, HBeAg and delta infection during the course from acute to chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1985; 5: 778-782.
- 246.- KROGSGAARD K, ALDERSHVILE J, KRYGER P et al. Reactivation of viral replication in Anti-HBe positive chronic HBsAg carriers. *Liver* 1990; 10: 54-58.
- 247.- KROGSGAARD K, KRYGER P, ALDERSHVILE J et al. Delta-infection and suppression of hepatitis B virus replication in chronic HBsAg carriers. *Hepatology* 1987; 7: 42-45.
- 248.- KRONE B, LENZ A, HEERMANN KH, SEIFER M, XUANGYONG L, GERLICH WH. Interaction between hepatitis B surface proteins and monomeric human serum albumin. *Hepatology* 1990; 11: 1050-1056.
- 249.- KUO G, CHOO QL, ALTER HJ et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364.
- 250.- KURAI K, IINO S, KOIKE K, MITAMURA K, ENDO Y, OKA H. Serum titers of pre-S (2) antigen in patients with acute and chronic type B hepatitis: relation to serum aminotransferase activity and other hepatitis B virus markers. *Hepatology* 1989; 9: 175-179.
- 251.- LAMOTHE F, LAURENCIN-PICHE J, COTE J, GUEVIN R, VIALLET A, RICHER G. Detection of surface and core antigens of hepatitis B virus in the liver of 164 human subjects. A study by immunoperoxidase and orcein staining. *Gastroenterology* 1976; 71: 102-108.
- 252.- LARZUL D, THIERS V, COUROUCE AM, BRECHOT C, GUESDON JL. Non-radioactive hepatitis B virus DNA probe for detection of HBV-DNA in serum. *J Hepatol* 1987; 5: 199-204.
- 253.- LAU JYN, HANSEN LJ, BAIN VG et al. Expression of intrahepatic hepatitis D viral antigen in chronic hepatitis D virus infection. *J Clin Pathol* 1991; 44: 549-553.
- 254.- LAU JYN, NAOUMOV NV, ALEXANDER GJM, WILLIAMS R. Rapid detection of hepatitis B virus DNA in liver tissue by in situ hybridisation and its combination with immunohistochemistry for simultaneous detection of HBV antigens. *J Clin Pathol* 1991; 44: 905-908.
- 255.- LAU JYN, PORTMANN BC, ALEXANDER GJM, WILLIAMS R. Differential effect of chronic hepatitis D virus infection on intrahepatic expression of hepatitis B viral antigen. *J Clin Pathol* 1992; 45: 314-318.

- 256.- LEENDERS WPJ, GLANSBEEK HL, DE BRUIN WCC, YAP SH. Binding of the major and large HBsAg to human hepatocytes and liver plasma membranes: putative external and internal receptors for infection and secretion of hepatitis B virus. *Hepatology* 1990; 12: 141-147.
- 257.- LEEVY CM, POPPER H, SHERLOCK S. Diseases of the liver and biliary tract. Standardization of nomenclature, diagnostic criteria and diagnostic methodology. Washington: Fogarty International Center Proceedings No. 22. US Government Printing Office Washington DC, 1976; DHEW Publication No (NIH) 76- 725.
- 258.- LEFKOWITZ JH, GOLDSTEIN H, YATTO R, GERBER MA. Cytopathic liver injury in acute delta virus hepatitis. *Gastroenterology* 1987; 92: 1262-1266.
- 259.- LEWIN R. New class of animal virus found in virulent form of human hepatitis. *Science* 1986; 234: 423-424.
- 260.- LIAW YF, CHEN TJ, CHU CM, LIN HH. Acute hepatitis delta virus superinfection in patients with liver cirrhosis. *J Hepatol* 1990; 10: 41-45.
- 261.- LIAW YF, CHU CM. Changing intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigens along the course of chronic hepatitis B virus infection (Abstract). *Hepatology* 1986; 6: 792.
- 262.- LIAW YF, CHU CM, SU IJ, HUANG MJ, LIN DY, CHANG-CHIEN CS. Clinical and histological events preceding hepatitis B e antigen seroconversion in chronic type B hepatitis. *Gastroenterology* 1983; 84: 216-219.
- 263.- LIAW YF, HUANG MJ, CHU CM, SHEEN IS, LIN DY. The window period between hepatitis B e antigen and antibody in chronic type B hepatitis. *Hepatology* 1984; 4: 619-621.
- 264.- LIAW YF, PAO CC, CHU CM, SHEEN IS, HUANG MJ. Changes of serum hepatitis B virus DNA in two types of clinical events preceding spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in chronic type b hepatitis. *Hepatology* 1987; 7: 1-3.
- 265.- LIAW YF, SUNG JL. Liver biopsy in asymptomatic carriers of HBsAg (letter). *Gastroenterology* 1979; 76: 1084.
- 266.- LIAW YF, TAI DI, CHU CM, CHEN TJ. The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. *Hepatology* 1988; 8: 493-496.
- 267.- LIAW YF, TAI DI, CHU CM, PAO CC, CHEN TJ. Acute exacerbation in chronic type B hepatitis: comparison between HBeAg and antibody positive patients. *Hepatology* 1987; 7: 20-23.
- 268.- LIEBERMAN HM, LABRECQUE DR, KEW MC, HADZIYANNIS SJ, SHAFRITZ DA. Detection of hepatitis B virus DNA directly in human serum by a simplified molecular hybridization test: comparison to HBeAg/AntiHBe status in HBsAg carriers. *Hepatology* 1983; 3: 285-291.
- 269.- LIN HH, LIAW YF, CHEN TJ, CHU CM, HUANG MJ. Natural course of patients with chronic type B hepatitis following acute hepatitis delta virus superinfection. *Liver* 1989; 9: 129-134.
- 270.- LINDH G, WEILAND O, GLAUMANN H. The application of a numerical scoring system for evaluating the histological outcome in patients with chronic hepatitis B followed in long term. *Hepatology* 1988; 8: 98-103.
- 271.- LINDH G, WEILAND O, SVEDMYR A, GLAUMANN H, HANSSON BG. Long-term follow-up of 60 patients with chronic hepatitis B. I. Seroconversion in the hepatitis B e-system, frequency of delta infection and histological outcome. *Liver* 1986; 6: 7-12.

- 272.- LINDSAY KL, REDEKER AG, ASHCAVAI M. Delayed HBsAg clearance in chronic hepatitis B viral infection. *Hepatology* 1981; 1: 586-589
- 273.- LOK ASF, HADZIYANNIS SJ, WELLER IVD et al. Contribution of low level HBV replication to continuing inflammatory activity in patients with antiHBe positive chronic hepatitis B virus infection. *Gut* 1984; 25: 1283-1287.
- 274.- LOK ASF, LAI CL. Acute exacerbations in Chinese patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. Incidence, predisposing factors and etiology. *J Hepatol* 1990; 10: 29-34.
- 275.- LOK ASF, LAI CL, WU PC. Prevalence of isolated antibody to hepatitis B core antigen in an area endemic for hepatitis B virus infection: implications in hepatitis B vaccination programs. *Hepatology* 1988; 8: 766-770.
- 276.- LOK ASF, LAI CL, WU PC, LEUNG EKY, LAM TS. Spontaneous hepatitis B e antigen to antibody seroconversion and reversion in chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1987; 92: 1839-1843.
- 277.- LOK ASF, LINDSAY I, SCHEUER PJ, THOMAS HC. Clinical and histological features of delta infection in chronic hepatitis B virus carriers. *J Clin Pathol* 1985; 38: 530-533.
- 278.- LOPEZ MORANTE A, DE LA CRUZ F, RODRIGUEZ DE LOPE C, ECHEVARRIA S, RODRIGUEZ GM, PONS-ROMERO F. Hepatitis B virus replication in hepatitis B and D coinfection. *Liver* 1989; 9: 65-70.
- 279.- LOPEZ TALAVERA JC, GONZALEZ A, ESTEBAN R. Hepatitis C. *Medicine (Mad)* 1991; 76: 2988-2994.
- 280.- LUDWIG J. The nomenclature of chronic active hepatitis. An obituary. *Gastroenterology* 1993; 105: 274-278.
- 281.- MACHIDA A, KISHIMOTO S, OHNUMA H et al. A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-S region of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology* 1984; 86: 910-918.
- 282.- MACKAY IR, FRAZER IH. Autoantibodies, autoimmunity, and chronic hepatitis. En: Chisari FV (ed). *Advances in Hepatitis Research*. New York: Masson, 1984: 179-189.
- 283.- MAGNIUS LO, ESPMARK JA. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the le Bouvier determinants. *J Immunol* 1972; 109: 1017-1021.
- 284.- MAGNIUS LO, LENKEI R, NORDER H, BIBERFELD G, MUSHAHWAR IK. Autoantibodies to thymic epithelial cells in hepatitis B virus associated delta infection. *J Infect Dis* 1985; 152: 232.
- 285.- MAHER JJ. Primary hepatocyte culture. Is it home away from home? *Hepatology* 1988; 8: 1162-1166.
- 286.- MARIANI E, FACCHINI A, MIGLIO F et al. Analysis with OKT monoclonal antibodies of T-lymphocyte subsets present in blood and liver of patients with chronic active hepatitis. *Liver* 1984; 4: 22-28.
- 287.- MARION PL, CULLEN JM, AZCARRAGA RR, Van DAVELAAR MJ, ROBINSON WS. Experimental transmission of duck hepatitis B virus to pekin ducks and to domestic geese. *Hepatology* 1987; 7: 724-731.
- 288.- MARTINEZ MONTIEL MP, CASTELLANO TORTEJADA G, COLINA RUIZ-DELGADO F, PEREZ SOLA A, SOLIS HERRUZO JA. Hepatitis crónica activa. Análisis de 207 casos. *An Med Intern (Madrid)* 1988; 5: 183-189.

- 289.- MASON WS, TAYLOR JM. Experimental systems for the study of hepadnavirus and hepatitis delta virus infections. *Hepatology* 1989; 9: 635-645.
- 290.- MATHIESEN LR, HARDT F, DIETRICHSON O et al. The role of acute hepatitis type A, B, and non-A non-B in the development of chronic active liver disease. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 49-54.
- 291.- MATSUYAMA Y, OMATA M, YOKOSUKA O, IMAZEKI F, ITO Y, OKUDA K. Discordance of hepatitis B e antigen/antibody and hepatitis B virus deoxyribonucleic acid in serum: analysis of 1063 specimens. *Gastroenterology* 1985; 89: 1104-1108.
- 292.- MAZZETTI M, STEFANINI GF, MAZZEO V et al. Alterations in helper-specific circulating T lymphocytes and in the autologous mixed lymphocyte reaction in chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 1987; 82: 130-134
- 293.- MCDONALD GSA, COURTNEY MG, SHATTOCK AG, WEIR DG. Prolonged IgM antibodies and histopathological evidence of chronicity in hepatitis A. *Liver* 1989; 9: 223-228.
- 294.- MEYER ZUM BÜSCHENFELDE KH, GERKEN G, HESS G, MANNS M. The significance of the pre-S region of the hepatitis B virus. *J Hepatol* 1986; 3: 273-279.
- 295.- MICHITAKA K, HORIIKE N, NADANO S, ONJI M, OHTA Y. Change of hepatitis B virus DNA distribution associated with the progression of chronic hepatitis. *Liver* 1988; 8: 247-253.
- 296.- MIELI-VERGANI G, VERGANI D, PORTMANN B et al. Lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in HBsAg positive chronic liver disease. *Gut* 1982; 23: 1029-1036.
- 297.- MILLER RH, KANEKO S, CHUNG CT, GIRONES R, PURCELL RH. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1989; 9: 322-327.
- 298.- MILLS CT, LEE E, PERRILLO R. Relationship between histology, aminotransferase levels, and viral replication in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1990; 99: 519-524.
- 299.- MISHIRO S, IMAI M, TAKAHASHI K et al. A 49,000- dalton polypeptide bearing all antigenic determinants and full immunogenicity of 22 nm hepatitis B surface antigen particles. *J Immunol* 1980; 124: 1589-1593.
- 300.- MOESTRUP T, HANSSON BG, WIDELL A, NORDENFELT E. Clinical aspects of delta infection. *Br Med J* 1983; 286: 87-90.
- 301.- MOESTRUP T, HANSSON BG, WIDELL A, NORDENFELT E, HAGERSTRAND I. Long-term follow-up of chronic hepatitis B virus infection in intravenous drug abusers and homosexual men. *Br Med J* 1986; 292: 854-857.
- 302.- MOLLER B, HOPF U, PÖSCHKE S et al. Serological assessment of HBcAg and HBV DNA: its prognostic relevance in acute hepatitis B. *Liver* 1987; 7: 298-305.
- 303.- MÖLLER B, HOPF U, STEMEROWICZ R, HENZE G, GELDERBLUM H. HBcAg expressed on the surface of circulating dane particles in patients with hepatitis B virus infection without evidence of AntiHBc formation. *Hepatology* 1989; 10: 179-185.
- 304.- MONDELLI MU, MANNS M, FERRARI C. Does the immune response play a role in the pathogenesis of chronic liver disease?. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 489-497.

- 305.- MONDELLI M, MIELE-VERGANI G, ALBERTI A et al. Specificity of T lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection: evidence that T cells are directed against HBV core antigen expressed on hepatocytes. *J Immunol* 1982; 129: 2773-2777.
- 306.- MONTAÑO L, ARANGUIBEL F, BOFFILL M, GOODALL AH, JANOSSY G, THOMAS HC. An analysis of the composition of the inflammatory infiltrate in autoimmune and hepatitis B virus-induced chronic liver disease. *Hepatology* 1983; 3: 292-296.
- 307.- MONTAÑO L, CARREÑO V, ORTIZ O. Replicación viral y cambios en la expresión de los antígenos tisulares HBs y HBe en pacientes con hepatitis viral crónica tipo B. *Rev Clin Esp* 1983; 169: 99-101.
- 308.- MORENO A, RAMON Y CAJAL S, MARAZUELA M et al. Sanded nuclei in delta patients. *Liver* 1989; 9: 367-371.
- 309.- MORGAN TR, REDEKER AG, YAMADA S, ASHCAVAI M. HBsAg clearance in chronic active hepatitis B. A possible cause of cryptogenic cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1986; 31: 700-704.
- 310.- MORIARTY AM, ALEXANDER H, LERNER RA, THORNTON GB. Antibodies to peptides detect new hepatitis B antigen: serological correlation with hepatocellular carcinoma. *Science* 1985; 227: 429-433.
- 311.- MUSHAHWAR IK, DIENSTAG JL, POLESKY HF, MCGRATH LC, DECKER RH, OVERBY LR. Interpretation of various serological profiles of hepatitis B virus infection. *Am J Clin. Pathol* 1981; 76: 773-777.
- 312.- NAOUMOV NV, GUEORGIEV A, OGNYANOV M, MALEEV A. Infection with hepatitis delta virus in patients with fulminant hepatitis B and chronic HBsAg carriers in Bulgaria. *Hepatogastroenterol* 1986; 33: 49-51.
- 313.- NAOUMOV NV, MONDELLI M, ALEXANDER GJM, TEDDER RS, EDDLESTON ALWF, WILLIAMS R. Relationship between expression of hepatitis B virus antigens in isolated hepatocytes and autologous lymphocyte cytotoxicity in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1984; 4: 63-68
- 314.- NAOUMOV NV, PORTMANN BC, TEDDER RS et al. Detection of hepatitis B virus antigens in liver tissue. A relation to viral replication and histology in chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology* 1990; 99: 1248-1253.
- 315.- NAYAK NC, SACHDEVA R. Localization of hepatitis B surface antigen in conventional paraffin sections of the liver. Comparison of immunofluorescence, immunoperoxidase and orcein staining methods with regard to their specificity and reliability as antigen marker. *Am J Pathol* 1975; 81: 479-492.
- 316.- NEGRO F, BALDI M, BONINO F et al. Chronic HDV (hepatitis delta virus) hepatitis. Intrahepatic expression of delta antigen, histologic activity and outcome of liver disease. *J Hepatol* 1988; 6: 8-14.
- 317.- NEGRO F, BERGMAN KF, BAROUDY BM et al. Chronic hepatitis D virus (HDV) infection in hepatitis B virus carrier chimpanzees experimentally superinfected with HDV. *J Infect Dis* 1988; 158: 151-159.
- 318.- NEGRO F, BONINO F, DI BISCEGLIE A, HOOFNAGLE JH, GERIN JL. Intrahepatic markers of hepatitis delta virus infection. A study by in situ hybridization. *Hepatology* 1989; 10: 916-920.
- 319.- NEGRO F, GERIN JL, PURCELL RH, MILLER RH. Basis of hepatitis delta virus disease?. *Nature* 1989; 341: 111.

- 320.- NORKRANS G, LINDBERG J, FROSNER G, HERMODSSON S, LUNDIN P, IWARSON S. Clearance of hepatitis B e-antigen in chronic hepatitis B infection. *Scand J Gastroenterol* 1982; 17: 383-387.
- 321.- NOWOSLAWSKI A, BRZOSKO WJ, MADALINSKI K, KRAWCZYNSKI K. Cellular localisation of Australia antigen in the liver of patients with lymphoproliferative disorders. *Lancet* 1970; 1: 494-498.
- 322.- OLASO V, BRETO M, ORTUÑO J, MARTINEZ M, RAYON M, BERENGUER J. Hepatitis crónica persistente (HCP): evolución y análisis de parametros de significación pronóstica (Abstract). *Gastroenterol Hepatol* 1983; 6: 134-135.
- 323.- OLASO V, BRETO M, ORTUÑO J, MARTINEZ M, RAYON M, BERENGUER J. Hepatitis crónica activa (HCA): evolución y análisis de parámetros de significación pronóstica (Abstract). *Gastroenterol Hepatol* 1983; 6: 150-151.
- 324.- OLIVIERO S, D'ADAMIO L, SMEDILE A et al. Detection by polymerase chain reaction, cloning and sequencing of hepatitis delta virus (HDV)-RNA from the liver of a patient with rapidly progressive HDV disease. *J Hepatol* 1989; 9: S68.
- 325.- OMATA M, AFROUDAKIS A, LIEW CT, ASHCAVAI M, PETERS RL. Comparison of serum hepatitis B surface antigen (HBsAg) and serum anticore with tissue HBsAg and hepatitis B core antigen (HBcAg). *Gastroenterology* 1978; 75: 1003-1009.
- 326.- OMATA M, LIEW CT, ASHCAVAI M, PETERS RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 1980; 73: 626-632.
- 327.- OMATA M, YOKOSUKA O, IMAZEKI F et al. Correlation of hepatitis B virus DNA and antigens in the liver. A study in chronic liver disease. *Gastroenterology* 1987; 92: 192-196.
- 328.- OTTOBRELLI A, SALIZZONI M, CORNU C et al. Patterns of HDV reinfection in liver transplantation. *J Hepatol* 1989; 9: S68.
- 329.- OU JH, LAUB O, RUTTER WJ. Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1578-1582.
- 330.- PARONETTO F. Cell-mediated immunity in liver disease. *Hum Pathol.* 1986; 17: 168-178.
- 331.- PATERLINI P, BRECHOT C. The detection of hepatitis B virus (HBV) in HBsAg negative individuals with primary liver cancer. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 1122-1129.
- 332.- PAZ MOA, BRENES F, KARAYIANNIS P, JOWETT TP, SCHEUER PJ, THOMAS HC. Chronic hepatitis B virus infection: Viral replication and patterns of inflammatory activity: serological, clinical and histological correlations. *J Hepatol* 1986; 3: 371-377.
- 333.- PERRILLO RP, CAMPBELL CR, SANDERS GE, REGENSTEIN FG, BODICKY CJ. Spontaneous clearance and reactivation of hepatitis B virus infection among male homosexuals with chronic type B hepatitis. *Ann Intern Med* 1984; 100: 43-46.
- 334.- PETERS RL. Viral hepatitis: a pathologic spectrum. *Am J Med Sci* 1975; 270: 17-31.
- 335.- PETIT MA, PILLOT J. HBc and HBe antigenicity and DNA-binding activity of major core protein P 22 in hepatitis B virus core particles isolated from the cytoplasm of human liver cells. *J Virol* 1985; 53: 543-551.

- 336.- PETIT MA, ZOULIM F, CAPEL F, DUBANCHET S, DAUGUET C, TREPO C. Variable expression of pre S 1 antigen in serum during chronic hepatitis B virus infection: an accurate marker for the level of hepatitis B virus replication. *Hepatology* 1990; 11: 809-814.
- 337.- PICCIOTTO A, CELLE G. Chronic delta hepatitis: a difficult problem for the hepatologist. *Hepato-gastroenterol* 1984; 31: 162-163.
- 338.- PIGNATELLI M, WATERS J, THOMAS HC. Evidence that cytotoxic T-cells sensitised to HBe are responsible for hepatocyte lysis in chronic hepatitis B virus infection (Abstract). *Hepatology* 1985; 5: 988.
- 339.- POHL C, BAROUDY BM, BERGMANN KF et al. A human monoclonal antibody that recognizes viral polypeptides and in vitro translation products of the genome of the hepatitis D virus. *J Infect Dis* 1987; 156: 622-629.
- 340.- POLESKY HF, HANSON MR. Transfusion-associated hepatitis C virus (non-A, non-B) infection. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 232-235.
- 341.- PONS ROMERO F. Valor clínico y epidemiológico de los marcadores del virus de la hepatitis B (Editorial). *Gastroenterol Hepatol* 1980; 3: 147-148.
- 342.- PONTISSO P, BORTOLOTTI F, DIODATI G, ALBERTI A, REALDI G. Hidden hepatitis B core antigen (HBcAg) in serum of patients with acute and chronic hepatitis B virus (HBV) infection (Abstract). *Liver* 1984; 4: 69.
- 343.- PONZETTO A, KOYER BH, POPPER H, ENGLE R, PURCELL RH, GERIN JL. Titration of the infectivity of hepatitis D virus in chimpanzees. *J Infect Dis* 1987; 155: 72-78.
- 344.- PONZETTO A, NEGRO F, POPPER H et al. Serial passage of hepatitis delta virus in chronic hepatitis B virus carrier chimpanzees. *Hepatology* 1988; 8: 1655-1661.
- 345.- POPPER H. Drug induced liver injury. En: Gall EA, Mostofi FK, eds. *The Liver*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1973: 182-198.
- 346.- POPPER H. Changing concepts of the evolution of chronic hepatitis and the role of piecemeal necrosis (Editorial). *Hepatology* 1983; 3: 758-762.
- 347.- POPPER H, SCHAFFNER F. The vocabulary of chronic hepatitis (Editorial). *N Engl J Med* 1971; 284: 1154-1156.
- 348.- POPPER H, SHAFRITZ DA, HOOFNAGLE JH. Relation of the hepatitis B virus carrier state to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1987; 7: 764-772.
- 349.- POPPER H, THUNG SN, GERBER MA et al. Histologic studies of severe delta agent infection in Venezuelan Indians. *Hepatology* 1983; 3: 906-912.
- 350.- POPPER H, THUNG SN, McMAHON BJ, LANIER AP, HAWKINS I, ALBERTS SR. Evolution of hepatocellular carcinoma associated with chronic hepatitis B virus infection in alaskan eskimos. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 498-504.
- 351.- PORTMANN B, GALBRAITH RM, EDDLESTON ALWF, ZUCKERMAN AJ, WILLIAMS R. Detection of HBsAg in fixed liver tissue-use of a modified immunofluorescent technique and comparison with histochemical methods. *Gut* 1976; 17: 1-9.
- 352.- PRIETO J, CASTILLA A, SERRANO M, CIVEIRA MP. Mecanismos patogénicos en las hepatitis crónicas víricas. *Gastroenterol Hepatol* 1987; 10 (Supl. 1): 39-45.
- 353.- QUIROGA JA, GONZALEZ O, CARREÑO V et al. Radioimmunoassay for detecting hepatitis B core antigen in serum from patients with chronic hepatitis B infection. *Clin Chem* 1985; 31: 831-834.

- 354.- RAIMONDO G, CRAXI A, LONGO G et al. Delta infection in hepatocellular carcinoma positive for hepatitis B surface antigen. *Ann Intern Med* 1984; 101: 343-344.
- 355.- RAIMONDO G, LONGO G, SQUADRITO G. Exacerbation of chronic liver disease due to hepatitis B surface antigen after delta infection. *Br Med J* 1983; 286: 845.
- 356.- RAKELA J, REDEKER AG, EDWARDS VM, DECKER R, OVERBY LR, MOSLEY JW. Hepatitis A virus infection in fulminant hepatitis and chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1978; 74: 879-882.
- 357.- RAMALHO F, BRUNETTO MR, ROCCA G et al. Serum markers of hepatitis B virus replication, liver histology and intrahepatic expression of hepatitis B core antigen. *J Hepatol* 1988; 7: 14-20.
- 358.- RANEK L, KEIDING N, JENSEN ST. A morphometric study of normal human liver cell nuclei. *Acta Pathol Microbiol Scand. Sect A* 1975; 83: 467-476.
- 359.- RASSHOFER R, BUTI M, ESTEBAN R, JARDI R, ROGGENDORF M. Demonstration of hepatitis D virus RNA in patients with chronic hepatitis. *J Infect Dis* 1988; 157: 191-195.
- 360.- RAY MB, DESMET VJ, BRADBURNE AF, DESMYTER J, FEVERY J, DE GROOTE J. Differential distribution of hepatitis B surface antigen and hepatitis B core antigen in the liver of hepatitis B patients. *Gastroenterology* 1976; 71: 462-469.
- 361.- RAY MB, DESMET VJ, FEVERY J, DE GROOTE J, BRADBURNE AF, DESMYTER J. Distribution patterns of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the liver of hepatitis patients. *J Clin Pathol* 1976; 29: 94-100.
- 362.- RAY MB, DESMET VJ, FEVERY J, DE GROOTE J, BRADBURNE AF, DESMYTER J. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the liver of patients with hepatitis: a comparison with serological detection. *J Clin Pathol* 1976; 29: 89-93.
- 363.- REALDI G, ALBERTI A, RUGGE M et al. Seroconversion from hepatitis B e antigen to antiHBe in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1980; 79: 195-199.
- 364.- RECCHIA S, RIZZI R, ACQUAVIVA F et al. Immunoperoxidase staining of the HBV-associated delta antigen in paraffinated liver specimens. *Pathologica* 1981; 73: 773-777.
- 365.- REINICKE V, DYBKJAER E, POULSEN H, BANKE O, LYLLOFF K, NORDENFELT E. A study of Australia-antigen-positive blood donors and their recipients, with special reference to liver histology. *N Engl J Med* 1972; 286: 867-870.
- 366.- REYES GR, PURDY MA, KIM JP et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; 247: 1335-1339.
- 367.- RIJNTJES PJM, VAN DITZHUIJSEN JM, VAN LOON AM, VAN HAELST UJGM, BRONKHORTST FB, YAP SH. Hepatitis B virus DNA detected in formalin-fixed liver specimens and its relation to serologic markers and histopathologic features in chronic liver disease. *Am J Pathol* 1985; 120: 411-418.
- 368.- RIZZETTO M. The delta agent. *Hepatology* 1983; 3: 729-737.
- 369.- RIZZETTO M, BONINO F, VERME G. Hepatitis delta virus infection of the liver: progress in virology, pathobiology, and diagnosis. *Semin Liver Dis* 1988; 8: 350-356.

- 370.- RIZZETTO M, CANESE MG, ARICO S et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/antidelta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 1977; 18: 997-1003.
- 371.- RIZZETTO M, CANESE MG, GERIN JL, LONDON WT, SLYD L, PURCELL RH. Transmission of the hepatitis B virus associated delta antigen to chimpanzees. *J Infect Dis* 1980; 141:590-602.
- 372.- RIZZETTO M, HOYER B, CANESE MG, SHIH JWK, PURCELL RH, GERIN JL. Delta agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 6124-6128
- 373.- RIZETTO M, PONZETTO A, BONINO F, PURCELL RH. Superimposed hepatitis and the effect on viral replication in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1986; 3(Suppl 2): S35-S41.
- 374.- RIZZETTO M, SHIH JWK, GERIN JL. The hepatitis B virus associated delta antigen: isolation from liver, development of solid phase radioimmunoassays for delta antigen and anti-delta and partial characterization of delta antigen. *J Immunol* 1980; 125: 318-324.
- 375.- RIZZETTO M, SHIH JWK, GOCKE DJ et al. Incidence and significance of antibodies to delta antigen in hepatitis B virus infection. *Lancet* 1979; ii: 986-990.
- 376.- RIZZETTO M, SHIH JWK, VERME G, GERIN JL. A radioimmunoassay for HBcAg in the sera of HBsAg carriers: serum HBcAg, serum DNA polymerase activity, and liver HBcAg immunofluorescence as markers of chronic liver disease. *Gastroenterology* 1981; 80: 1420-1427.
- 377.- RIZZETTO M, VERME G, RECCHIA S et al. Chronic hepatitis in carriers of hepatitis B surface antigen, with intrahepatic expression of the delta antigen. An active and progressive disease unresponsive to immunosuppressive treatment. *Ann Intern Med* 1983; 98: 437-441.
- 378.- ROBINSON WS, CLAYTON DA, GREENMAN RL. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 1974; 14: 384-391.
- 379.- ROBINSON WS, GREENMAN RL. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 1974; 13: 1231-1236.
- 380.- ROBINSON WS, MILLER RH, KLOTE L, MARION PL, LEESC. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. En: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, eds. *Viral hepatitis an liver disease*. Orlando, Florida: Grune and Stratton, 1984: 245-263.
- 381.- ROBINSON WS, MILLER RH, MARION PL. Hepadnavirus and retroviruses share genome homology and features of replication. *Hepatology* 1987; 7: 64 S-73 S.
- 382.- ROINGEARD P, LU S, SUREAU C et al. Immunocytochemical and electron microscopic study of hepatitis B virus antigen and complete particle production in hepatitis B virus DNA transfected HepG2 cells. *Hepatology* 1990; 11: 277-285.
- 382a RONCALLI M, BORZIO M, TOMBESI MV, FERRARI A, SERVIDA E. A morphometric study of liver cell dysplasia. *Hum Pathol* 1988; 19: 471-474.
- 383.- RUGGE M, GUIDO M, BORTOLOTTI F et al. Histology and virus expression in the liver. A pronostic puzzle in chronic hepatitis B. *Vichows Archiv A* 1991; 419: 93-97.

- 384.- RUMI MG, COLOMBO M, ROMEO R, COLUCCI G, GRINGERI A, MANNUCCI PM. Serum hepatitis B virus DNA detects cryptic hepatitis B virus infections in multitransfused hemophilic patients. *Blood* 1990; 75: 1654-1658
- 385.- SAGNELLI E, FELACO FM, FILIPPINI P et al. Influence of HDV infection on clinical, biochemical and histological presentation of HBsAg positive chronic hepatitis. *Liver* 1989; 9: 229-234.
- 386.- SAGNELLI E, PICCININO F, PASQUALE G, GIOVANNA DI COSTANZO M, FRANZESE R, PEINETTI P. Delta agent infection: an unfavourable event in HBsAg positive chronic hepatitis. *Liver* 1984; 4: 170-176.
- 387.- SAKAMOTO Y, YAMADA G, MIZUNO M et al. Full and empty particles of hepatitis B virus in hepatocytes from patients with HBsAg-positive chronic active hepatitis. *Lab Invest* 1983; 48: 678-682.
- 388.- SAKUMA K, TAKAHARA T, OKUDA K, TSUDA F, MAYUMI M. Prognosis of hepatitis B virus surface antigen carriers in relation to routine liver function tests: a prospective study. *Gastroenterology* 1982; 83: 114-117.
- 389.- SAKURAI M, MIYAJI T. Orcein staining of hepatitis B surface antigen in paraffin sections of liver on autopsy cases. *Acta Hepato-Gastroenterol* 1977; 24: 334-339.
- 390.- SAMPLINER RE, HAMILTON FA, ISERI OA, TABOR E, BOITNOTT J. The liver histology and frequency of clearance of the hepatitis B surface antigen (HBsAg) in chronic carriers. *Am J Med Scien* 1979; 277: 17-22.
- 391.- SANCHEZ TAPIAS JM. Historia natural de la hepatitis crónica B. *Gastroenterol Hepatol* 1987; 10 (Supl 1): 24-31.
- 392.- SANCHEZ-TAPIAS JM, CABALLERIA J, BRUGUERA M, BALLESTA A, GUAL J, RODES J. Marcadores serológicos de infección por virus de la hepatitis B en las hepatopatías crónicas HBsAg negativo. *Gastroenterol Hepatol* 1980; 3: 111-117.
- 393.- SANCHEZ-TAPIAS JM, COSTA J, GOMEZ-MOLI J et al. Frecuencia y características de la sobreinfección delta en las hepatopatías crónicas HBsAg positivo. *Gastroenterol Hepatol* 1984; 7: 533-540.
- 394.- SANCHEZ TAPIAS JM, COSTA J, MAS A, PARES A, BRUGUERA M, RODES J. Analysis of factors predicting early seroconversion to antiHBe in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1988; 6: 15-22.
- 395.- SANCHEZ TAPIAS JM, MAS A, COSTA J, FERRER A, BRUGUERA M, RODES J. HBsAg en tejido hepático en la infección crónica por el virus de la hepatitis B. Patrones, significado y valor pronóstico (Abstract). *Gastroenterol Hepatol* 1988; 11: 215-216.
- 396.- SANCHEZ TAPIAS JM, VILAR JH, BRUGUERA M et al. Marcadores del virus de la hepatitis B (VHB) en suero y tejido hepático e historia natural de la hepatitis crónica persistente (HCP) HBsAg positiva (Abstract). *Gastroenterol Hepatol* 1983; 6: 133-134.
- 397.- SANSONNO DE, FIORE G, PIETROPAOLO F, AVELLIS D, NAPOLI N, MANGHISI OG. Hepatitis A virus and non-A, non-B virus superinfections in HBsAg chronic carriers. *Digestion* 1988; 39: 197-203.
- 398.- SARACCO G, ROSINA F, BRUNETTO MR et al. Rapidly progressive HBsAg positive hepatitis in Italy. The role of hepatitis delta virus infection. *J Hepatol* 1987; 5: 274-281.

- 399.- SCOTTO J, HADCHOUËL M, HERY C, YVART J, TIOLLAIS P, BRECHOT C. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: comparison with results for other viral markers. *Hepatology* 1983; 3: 279-284.
- 400.- SCHEUER PJ. Chronic hepatitis: a problem for the pathologist. *Histopathology* 1977; 1: 5-19.
- 401.- SCHEUER PJ. Liver biopsy in chronic hepatitis: 1968-78. *Gut* 1978; 19: 554-557.
- 402.- SCHEUER PJ. Changing views on chronic hepatitis. *Histopathology* 1986; 10: 1-4.
- 403.- SCHEUER PJ. Liver biopsy interpretation 4th ed. London: Baillière Tindall, 1988: 113-130.
- 404.- SCHEUER PJ. Non-A, non-B hepatitis (Editorial). *Virchows Archiv A* 1989; 415: 301-303.
- 405.- SCHEUER PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13: 372-374.
- 406.- SCHLICHTING P, HØLUND B, POULSEN H. Liver biopsy in chronic aggressive hepatitis. Diagnostic reproducibility in relation to size of specimen. *Scand J Gastroenterol* 1983; 18: 27-32
- 407.- SEEGER C, GANEM D, VARMUS HE. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 1986; 232: 477-484.
- 408.- SHAFRITZ DA, ROGLER CE. Molecular characterization of viral forms observed in persistent hepatitis infections, chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in woodchucks and humans. En: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, eds. *Viral hepatitis and liver disease*. Orlando, Florida: Grune and Stratton, 1984: 225-243.
- 409.- SHATTOCK AG, MORGAN BM, PEUTHERER J, INGLIS JM, FIELDING JF, KELLY MG. High incidence of delta antigen in serum. *Lancet* 1983; ii: 104-105.
- 410.- SHEEN IS, LIAW YF, TAI DI, CHU CM. Hepatic decompensation associated with hepatitis B e antigen clearance in chronic type B hepatitis. *Gastroenterology* 1985; 89: 732-735.
- 411.- SHERLOCK S. Chronic hepatitis. *Gut* 1974; 15: 581-597.
- 412.- SHERLOCK S. Chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 1984; 4: 25S-28S.
- 413.- SHERLOCK S. The natural history of hepatitis B. *Postgrad Med J* 1987; 63 (Suppl 2): 7-11.
- 414.- SHERLOCK S. Classifying chronic hepatitis. *Lancet* 1989; ii: 1168-1170.
- 415.- SHIKATA T. Australia antigen in liver tissue: An immunofluorescent and immunoelectron microscopic study. *Japan J Exp Med* 1973; 43: 231-245.
- 416.- SHIKATA T, UZAWA T, YOSHIWARA N, AKATSUKA T, YAMAZAKI S. Staining methods of Australia antigen in paraffin section-detection of cytoplasmic inclusion bodies. *Japan J Exp Med* 1974; 44: 25-36.
- 417.- SHIMIZU YK, PURCELL RH. Cytoplasmic antigen in hepatocytes of chimpanzees infected with non-A, non-B hepatitis virus or hepatitis delta virus: relationship to interferon. *Hepatology* 1989; 10: 764-768.
- 418.- SIMO FALCO MD, LISSEN OTERO E, CARABALLO GUIJARRO R et al. Portadores persistentes y asintomáticos de antígeno Australia. *Sistemática para la valoración de series amplias*. *Med Clín (Barc)* 1981; 76: 158-160.
- 419.- SIMON JB, PATEL SK. Liver disease in asymptomatic carriers of hepatitis B antigen. *Gastroenterology* 1974; 66: 1020-1028.

- 420.- SJOGREN M, HOOFNAGLE JH. Immunoglobulin M antibody to hepatitis B core antigen in patients with chronic type B hepatitis. *Gastroenterology* 1985; 89: 252-258.
- 421.- SMEDILE A, DENTICO P, ZANETTI A et al. Infection with the delta agent in chronic HBsAg carriers. *Gastroenterology* 1981; 81: 992-997.
- 422.- SMEDILE A, RIZZETTO M, DENNISTON K et al. Type D hepatitis: the clinical significance of hepatitis D virus RNA in serum as detected by a hybridization-based assay. *Hepatology* 1986; 6: 1297-1302.
- 423.- SMEDILE A, ROSINA F, SARACCO G et al. Hepatitis B virus replication modulates pathogenesis of hepatitis D virus in chronic hepatitis D. *Hepatology* 1991; 13: 413-416.
- 424.- SMEDILE A, VERME G, CARGNEL A et al. Influence of delta infection on severity of hepatitis B. *Lancet* 1982; 2: 945-947.
- 425.- SNOVER DC. *Biopsy diagnosis of liver disease*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1992: 141-154.
- 426.- SOLIS HERRUZO JA, SANTALLA PECAÑA F. Pruebas de función hepática. *Gastroenterol Hepatol* 1984; 7: 565-584.
- 427.- SPERO JA, LEWIS JH, VAN THIEL DH, HASIBA U, RABIN BS. Asymptomatic structural liver disease in hemophilia. *N Engl J Med* 1978; 298: 1373-1378.
- 428.- STEIN O, FAINARU M, STEIN Y. Visualization of virus-like particles in endoplasmic reticulum of hepatocytes of Australia antigen carriers. *Lab Invest* 1972; 26: 262-269.
- 429.- STIBBE W, GERLICH WH. Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J Virol* 1983; 46: 626-628.
- 430.- STOCKLIN E, GUDAT F, KREY G et al. Delta antigen in hepatitis B: immunohistology of frozen and paraffin embedded liver biopsies and relation to HBV infection. *Hepatology* 1981; 1: 238-242.
- 431.- SU IJ, KUO TT, LIAW YF. Hepatocyte hepatitis B surface antigen. Diagnostic evaluation of patients with clinically acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109: 400-402.
- 432.- SU IJ, LAI MY, HSU HC et al. Diverse virological, histopathological and prognostic implications of seroconversion from hepatitis B e antigen to antiHBe in chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1986; 3: 182-189.
- 433.- SU TS, LUI WY, LIN LH, HAN SH, P'ENG FK. Analysis of hepatitis B virus transcripts in infected human livers. *Hepatology* 1989; 9: 180-185.
- 434.- SUMITHRAN E. Methods for detection of hepatitis B surface antigen in paraffin sections of liver; a guideline for their use. *J Clin Pathol* 1976; 30: 460-463.
- 435.- SUMMERS J. Replication of hepatitis B viruses. En: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, eds. *Viral hepatitis and liver disease*. Orlando, Florida: Grune and Stratton, 1984: 87-96.
- 436.- SUMMERS J, MASON WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982; 29: 403-415.
- 437.- SUN SC, BEASLEY RP, ANDERSON KE, BERG HS, HSU CP, LEE WC. Serial liver biopsy observations in hepatitis B antigen carriers by light and electron microscopy. *Dig Dis Sci* 1976; 21: 366-369.

- 438.- SUZUKI K, UCHIDA T, SHIKATA T. Histopathological analysis of chronic hepatitis B virus (HBV) infection in relation to HBV replication. *Liver* 1987; 7: 260-270.
- 439.- SWINSCOW TDV. Statistics at square one. VIII. Differences between means. *Br Med J* 1976; 2:94-95.
- 440.- SWINSCOW TDV. Statistics at square one. XII. The t tests (continued). *Br Med J* 1976; 2:358-359.
- 441.- SWINSCOW TDV. Statistics at square one. XV. The X² tests. (continued). *Br Med J* 1976; 2: 513-514.
- 442.- TAKAHASHI K, AKAHANE Y, GOTANDA T et al. Demonstration of hepatitis B e antigen in the core of dane particles. *J Immunol* 1979; 122: 275-279.
- 443.- TAKAHASHI K, KISHIMOTO S, OHNUMA H et al. Polypeptides coded for by the region pre S and gen S of hepatitis B virus DNA with the receptor for polymerized human serum albumin: expression on hepatitis B particles produced in the HBeAg or AntiHBe phase of hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1986; 136: 3467-3472.
- 444.- TAKAHASHI K, MACHIDA A, FUNATSU G et al. Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum. *J Immunol* 1983; 130: 2903-2907.
- 445.- TANAKA Y, ESUMI M, SHIKATA T. Persistence of hepatitis B virus DNA after serological clearance of hepatitis B virus. *Liver* 1990; 10: 6-10
- 446.- TAPP E, JONES DM. HBsAg and HBeAg in the livers of asymptomatic hepatitis B antigen carriers. *J Clin Pathol* 1977; 30: 671-677.
- 447.- TAPP E, JONES DM, HOLLANDERS D, DYMOCK IW. Serial liver biopsies in blood donors with persistent HBs antigenaemia. *J Clin Pathol* 1976; 29: 884-886.
- 448.- TASSOPOULOS NC, PAPA EVANGELOU GJ, SJOGREN MH, ROUMELIOTOU-KARAYANNIS A, GERIN JL, PURCELL RH. Natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greek adults. *Gastroenterology* 1987; 92: 1844-1850.
- 449.- TASSOPOULOS NC, ROUMELIOTOU-KARAYANNIS A, NAKOPOULOU L, CALAFATAS P, PAPA EVANGELOU G. Fulminant delta hepatitis in chronic asymptomatic HBsAg carriers. *Jama* 1985; 253: 2362-2363.
- 450.- TASSOPOULOS NC, ROUMELIOTOU-KARAYANNIS A, PAPA EVANGELOU GJ. Acute delta hepatitis and hepatitis B antigen carriage. *Ann Intern Med* 1986; 105: 804-805.
- 451.- TAYLOR CR. Immunoperoxidase techniques. Practical and theoretical aspects. *Arch Pathol Lab Med* 1978; 102: 113-121.
- 452.- THEILMANN L, FISCHER M, GALLE PR, NASSAL M. Detection of HBV DNA in HBsAg-positive sera after amplification using the polymerase chain reaction. *Liver* 1989; 9: 322-328.
- 453.- THEILMANN L, GMELIN K, TAPALAGA D, SALFELD J, KOMMERELL B, PFAFF E. Pre-S1 proteins in sera of patients positive for HBsAg and antibodies to hepatitis delta virus. *Hepato-gastroenterol* 1987; 34: 53-55.
- 454.- THEILMANN L, GMELIN K, WILL H, CZYGAN P, ROGGENDORF M, KOMMERELL B. Detection of hepatitis B viral DNA in sera positive for antibody to delta antigen. *J Infect Dis* 1984; 150: 118-120.

- 455.- THEILMANN L, KLINKERT MQ, GMELIN K, SALFELD J, SCHALLER H, PFAFF E. Detection of Pre S₁ proteins in serum and liver of HBsAg-positive patients: a new marker for hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1986; 6: 186-190.
- 456.- THIERS V, NAKAJIMA E, KREMSDORF D et al. Transmission of hepatitis B from hepatitis B seronegative subjects. *Lancet* 1988; ii: 1273-1276.
- 457.- THOMAS HC. The delta agent comes of age (leading article). *Gut* 1985; 26: 1-3.
- 458.- THOMAS HC, BROWN D, ROUTHIER G et al. Inducer and suppressor T-cells in hepatitis B virus-induced liver disease. *Hepatology* 1982; 2: 202-204.
- 459.- THOMAS HC, JACYNA M, WATERS J, MAIN J. Virus-host interaction in chronic hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis* 1988; 8: 342-349.
- 460.- THOMAS HC, PIGNATELLI M, SCULLY LJ. Viruses and immune reactions in the liver. *Scand J Gastroenterol* 1985; 114: 105-117.
- 461.- THUNG SN, GERBER MA. HBsAg-associated albumin receptors and antialbumin antibodies in sera of patients with liver disease. *Gastroenterology* 1981; 80: 260-264.
- 462.- THUNG SN, GERBER MA, SARNO E, POPPER H. Distribution of five antigens in hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 1979; 41: 101-105.
- 463.- TIOLLAIS P, CHARNAY P, VYAS GN. Biology of hepatitis B virus. *Science* 1981; 213: 406-411.
- 464.- TIOLLAIS P, POURCEL C, DEJEAN A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317: 489-495.
- 465.- TOH H, HAYASHIDA H, MIYATA T. Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature* 1983; 305: 827-829.
- 466.- TOZUKA S, UCHIDA T, SUZUKI K, ESUMI M, SHIKATA T. State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with noncarcinomatous liver disease. Its special relationship with necroinflammatory activity and the stage of disease. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 20-25.
- 467.- TREVISAN A, GUDAT F, BUSACHI C, STOCKLIN E, BIANCHI L. An improved method for HBcAg demonstration in paraffin-embedded liver tissue. *Liver* 1982; 2: 331-339.
- 468.- TREVISAN A, REALDI G, ALBERTI A, ONGARO G, PORNARO E, MELICONI R. Core antigen-specific immunoglobulin G bound to the liver cell membrane in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1982; 82: 218-222.
- 469.- TUR-KASPA R, BURK RD, LIEBERMAN HH, SHAFRITZ DA. Hepatitis B virus gene expression in relation to virus replication and HBV-DNA integration. New concepts for antiviral therapy. *J Hepatol* 1986; 3 (Suppl 2): S25-S33.
- 470.- ULICH TR, ANDERS K, LAYFIELD L, CHENG L, LEWIN KJ. Chronic active hepatitis of hepatitis B and non-A, non-B etiology. Immunohistochemical localization of hepatitis B core antigen in a series of needle biopsies. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109: 403-407.
- 471.- ULICH TR, CHENG L, GITNICK G, THORNE CA, LEWIN KJ. Chronic active hepatitis of hepatitis B and non-A, non-B etiology. Immunoperoxidase staining of HBsAg in a series of 66 needle biopsies. *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 33-39.
- 472.- UNANUE ER. Cooperation between mononuclear phagocytes and lymphocytes in immunity. *N Engl J Med* 1980; 303: 977-985.

- 473.- VALENZUELA P, GRAY P, QUIROGA M, ZALDIVAR J, GOODMAN HM, RUTTER WJ. Nucleotide sequence of the gene coding for the mayor protein of hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 1979; 280: 815-819.
- 474.- VAN DEN OORD JJ, DE VOS R, DESMET VJ. In situ distribution of major histocompatibility complex products and viral antigens in chronic hepatitis B virus infection: evidence that HBc-containing hepatocytes may express HLA-DR antigens. *Hepatology* 1986; 6: 981-989.
- 475.- VAN DEN OORD JJ, DE VOS R, FACCHETTI F, DELABIE J, DE WOLF-PEETERS C, DESMET VJ. Distribution of non-lymphoid, inflammatory cells in chronic HBV infection. *J Pathol* 1990; 160: 223-230.
- 476.- VAN NESS MM, DIEHL AM. Is liver biopsy useful in the evaluation of patientes with cronically elevated liver enzymes?. *Ann Intern Med* 1989; 111: 473-478.
- 477.- VAN WAES L, SEGERS J, VAN EGMOND J et al. Chronic liver disease and hepatitis B antigen: a prospective study. *Br Med J* 1974; 3: 444-446.
- 478.- VARGAS V, PEDREIRA JD, ESTEBAN R, HERNANDEZ JM, PIQUERAS J, GUARDIA J. Marcadores serológicos del virus de la hepatitis B en población sana. *Med Clin (Barc)* 1982; 78: 265-267.
- 479.- VAZQUEZ J. JAIME Ground-glass hepatocytes: light and electron microscopy. Characterization of the different types. *Histol Histopath* 1990; 5: 379-386.
- 480.- VENTO S, HEGARTY JE, ALBERTI A et al. T Lymphocyte sensitization to HBcAg and T cell-mediated unresponsiveness to HBsAg in hepatitis B virus-related chronic liver disease. *Hepatology* 1985; 5: 192-197.
- 481.- VERGANI D, LOCASCIULLI A, MASERA G et al. Histological evidence of hepatitis B virus infection with negative serology in children with acute leukaemia who develop chronic liver disease. *Lancet* 1982; 1: 361-364.
- 482.- VERME G, AMOROSO P, LETTIERI G et al. A histological study of hepatitis delta virus liver disease. *Hepatology* 1986; 6: 1303-1307.
- 483.- VILLA E, JENKINS P, PORTMANN B, EDDLESTON ALWF, WILLIAMS R. Evidence for hepatitis B and other virus infection in HBsAg-negative chronic active hepatitis. *Dig Dis Sci* 1980; 25: 347-352.
- 484.- VILLA E, THEODOSSI A, PORTMANN B, EDDLESTON ALWF, WILLIAMS R. Reactivation of hepatitis B virus infection in two patients. Immunofluorescence studies of liver tissue. *Gastroenterology* 1981; 80: 1048-1053.
- 485.- VILLARI D, RAIMONDO G, BRANCATELLI S, LONGO G, RODINO G, SMEDILE V. Histological features in liver biopsy specimens of patients with acute reactivation of chronic type B hepatitis. *Histopathology* 1991; 18: 73-77.
- 486.- VILLARI D, RAIMONDO G, SMEDILE V et al. Hepatitis B-DNA replication and histological patterns in liver biopsy specimens of chronic HBsAg positive patients with and without hepatitis delta virus superinfection. *J Clin Pathol* 1989; 42: 689-693.
- 487.- VIOLA LA, BARRISON IG, COLEMAN JC et al. Natural history of liver disease in chronic hepatitis B surface antigen carriers. Survey of 100 patients from Great Britain. *Lancet* 1981; 2: 1156-1159.
- 488.- VUCELIC B, HADZIC N, DUBRAVCIC D. Chronic persistent hepatitis. Long-term prospective study on the natural course of the disease. *Scand J Gastroenterol* 1988; 23: 551-554.

- 489.- WANG KS, CHOO QL, WEINER AJ et al. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta viral genome. *Nature* 1986; 323: 508-514.
- 490.- WANTZIN P, ALDERSHVILE J, JANS H, DYBKJAER E, NIELSEN JO. The prognosis of the healthy HBsAg carrier state. A 5 - to 8 -year follow-up study. *Scand J Gastroenterol* 1981; 16: 1077-1081.
- 491.- WATANABE T, TANAKA Y. Age-related alterations in the size of human hepatocytes. A study of mononuclear and binucleate cells. *Virchows Arch B [Cell Pathol]* 1982; 39: 9-20.
- 492.- WATERS JA, PIGNATELLI M, BROWN D, O'ROURKE S, LEVER A, THOMAS HC. The immune response to hepatitis B virus. *Postgrad Med J* 1987; 63 (Suppl 2): 51-56.
- 493.- WEISSBERG JI, ANDRES LL, SMITH CI et al. Survival in chronic hepatitis B. An analysis of 379 patients. *Ann Intern Med* 1984; 101: 613-616.
- 494.- WILLIAMS ALB, HOOFNAGLE JH. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. Relationship to cirrhosis. *Gastroenterology* 1988; 95: 734-739.
- 495.- WINCLER K, JUNGE U, CREUTZFELDT W. Ground-glass hepatocytes in unselected liver biopsies. Ultrastructure and relationship to hepatitis B surface antigen. *Scand J Gastroenterol* 1976; 11: 167-170.
- 496.- WOOD JR, TASWELL HF, CZAJA AJ, RABE D. Pattern and duration of HBV DNA seropositivity in acute hepatitis B. *Dig Dis Sci* 1988; 33: 477-480.
- 497.- WOOLF IL, BOYES BE, JONES DM et al. Asymptomatic liver disease in hepatitis B antigen carriers. *J Clin Pathol* 1974; 27: 348-352.
- 498.- WU HN, LAI MMC. Reversible cleavage and ligation of hepatitis delta virus RNA. *Science* 1989; 243: 652-654.
- 499.- WU TT, HSU HC, CHEN DS et al. Clearance of hepatitis B surface antigen (HBsAg) after surgical resection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1987; 4: 45-51.
- 500.- YAMADA G, FEINBERG LE, NAKANE PK. Hepatitis B: cytologic localization of virus antigens and the role of the immune response. *Hum Pathol* 1978; 9: 93-109.
- 501.- YAMADA G, NAKANE PK. Hepatitis B core and surface antigens in liver tissue. Light and electron microscopic localization by the peroxidase-labeled antibody method. *Lab Invest* 1977; 39: 649-659.
- 502.- YAMADA G, TAKAGUCHI K, MATSUEDA K et al. Immunoelectron microscopic observation of intrahepatic HBeAg in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1990; 12: 133-140.
- 503.- YAMADA G, TSUJI T. Intranuclear inclusion bodies in liver of chronic hepatitis B with delta infection. *Acta Pathol Jpn* 1988; 36: 759-768.
- 504.- YOFFE B, NOONAN CA. Hepatitis B virus. New and evolving issues. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1-9
- 505.- YOKOSUKA O, OMATA M, IMAZEKI F, OKUDA K. Active and inactive replication of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid in chronic liver disease. *Gastroenterology* 1985; 89: 610-616.
- 506.- YOKOSUKA O, OMATA M, IMAZEKI F, YOSHIMI I, OKUDA K. Hepatitis B virus RNA transcripts and DNA in chronic liver disease. *N Engl J Med* 1986; 315: 1187-1192.
- 507.- YOUNG B, HICKE B. Delta virus as a cleaver. *Nature* 1990; 343: 28.

- 508.- ZAULI D, CRESPI C, BIANCHI FB, CRAXI A, PISI E. Autoimmunity in chronic liver disease caused by hepatitis delta virus. *J Clin Pathol* 1986; 39: 897-899.
- 509.- ZIMMERMAN HJ, ISHAK KG. Hepatic injury due to drugs and toxins. En: Mascween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ eds. *Pathology of the liver*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987: 503-507.
- 510.- ZITO DR, GURDAK RG, TUCKER FL, NORMANSELL DE. Loss of antibody to surface antigen. *Am J Clin Pathol* 1987; 88: 229-231.
- 511.- ZURÍÑE IBARRA M, MORA I, BARTOLOME J, PORRES JC, CARREÑO V. Detection of proteins encoded by the pre S region of hepatitis B virus in the sera of HBsAg carriers: relation to viral replication. *Liver* 1989; 9: 153-158.

FIGURAS

Figura 1.

Cambios mínimos. Espacio porta con infiltrado inflamatorio leve. H.E. x 400.

Figura 2.

Biopsia de control a los 34 meses. Histología similar. H.E. x 100.

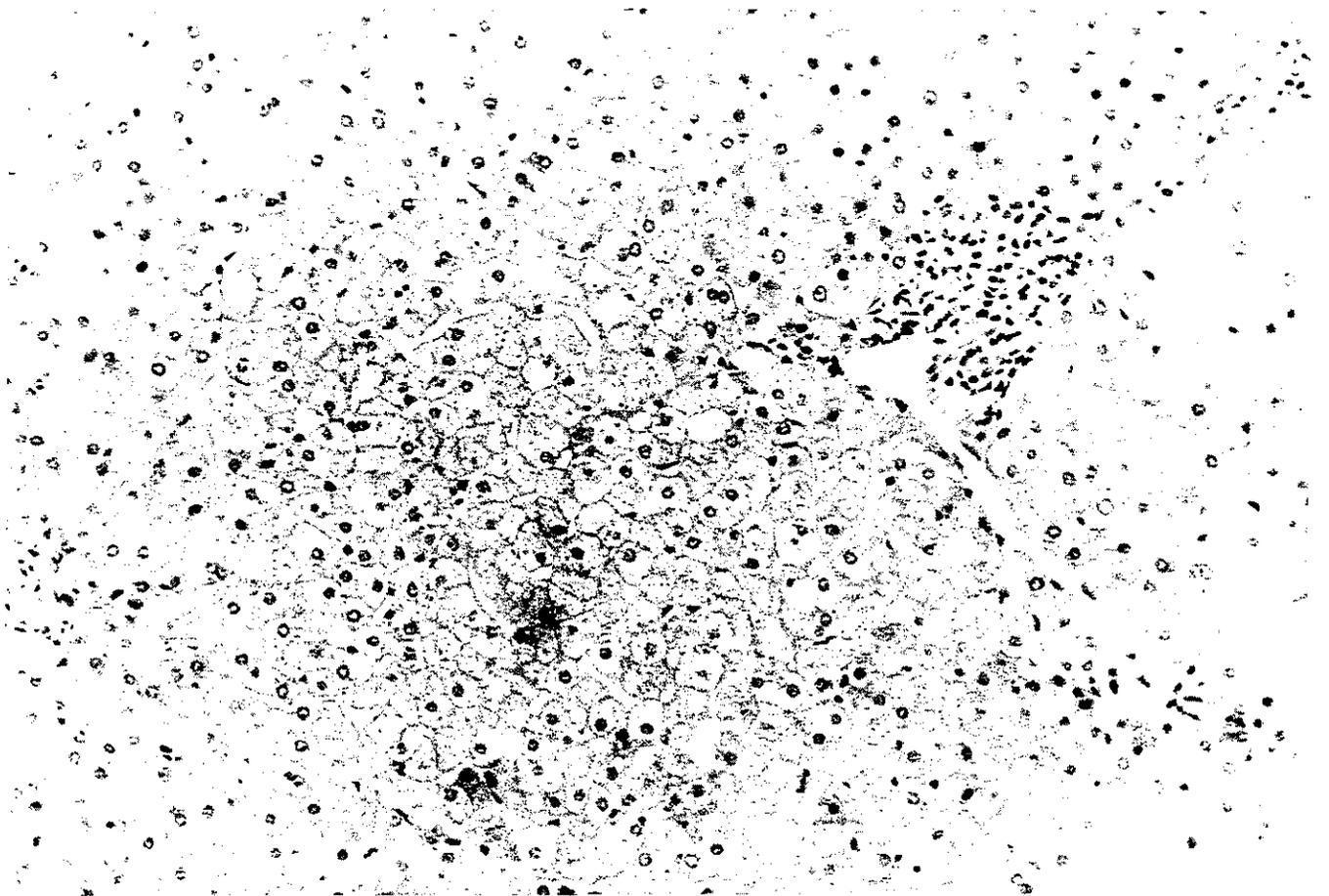
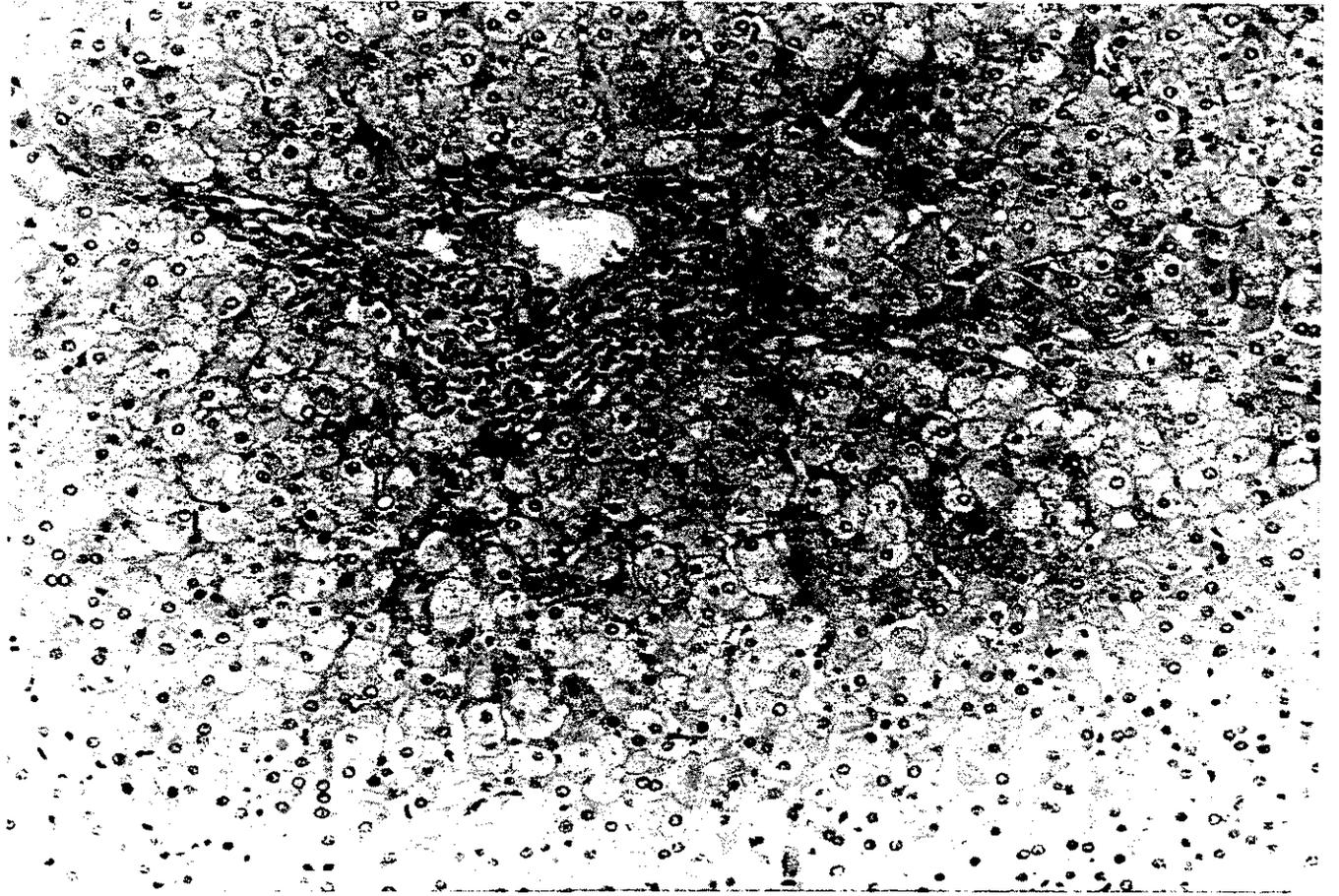


Figura 3.

Hepatitis crónica persistente. Espacio porta con infiltrado inflamatorio moderado. Lobulillo hepatocitario con algún foco linfocítico. H.E. x 100.

Figura 4.

Biopsia de control a los 27 meses. Histología similar. H.E. x 100.

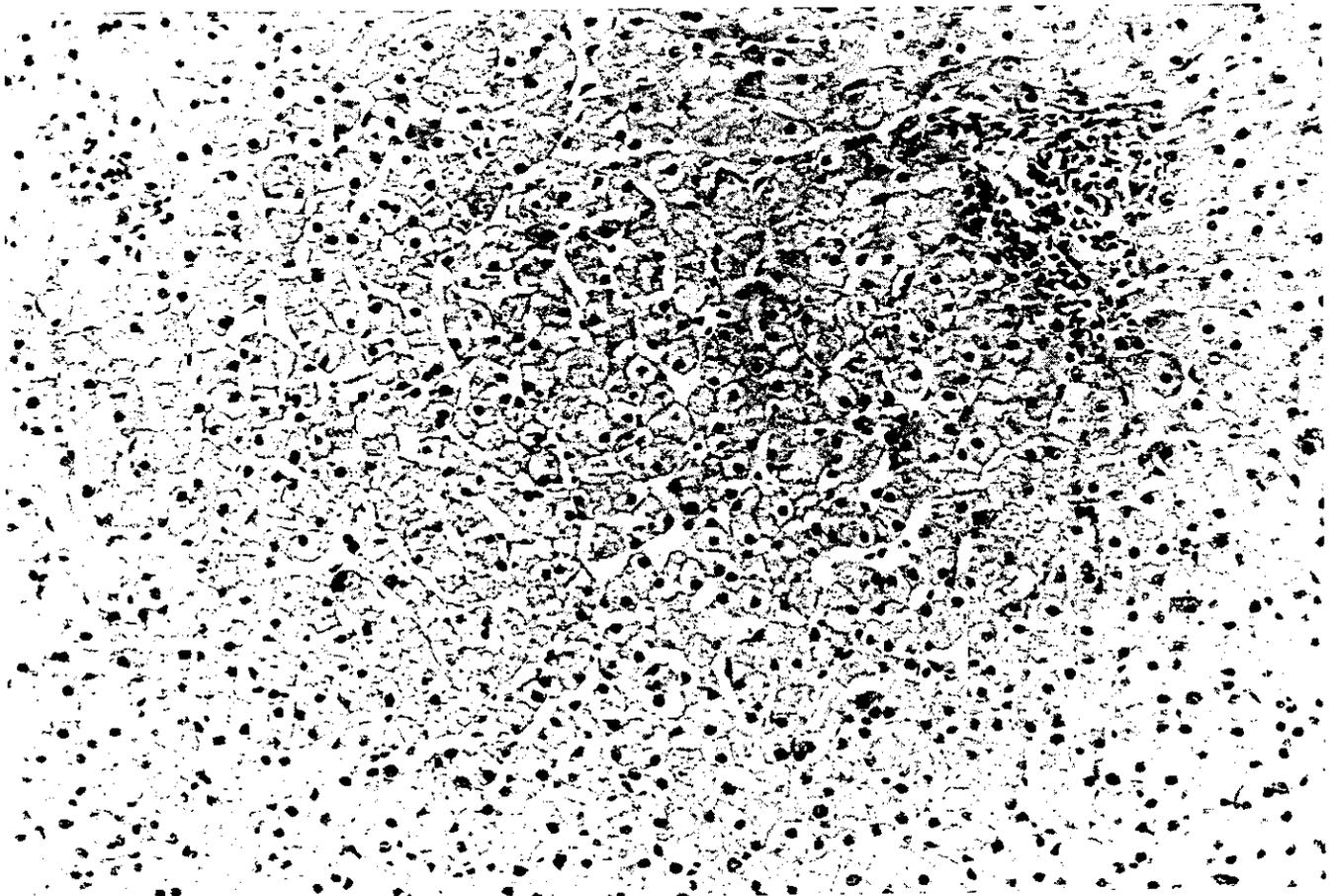
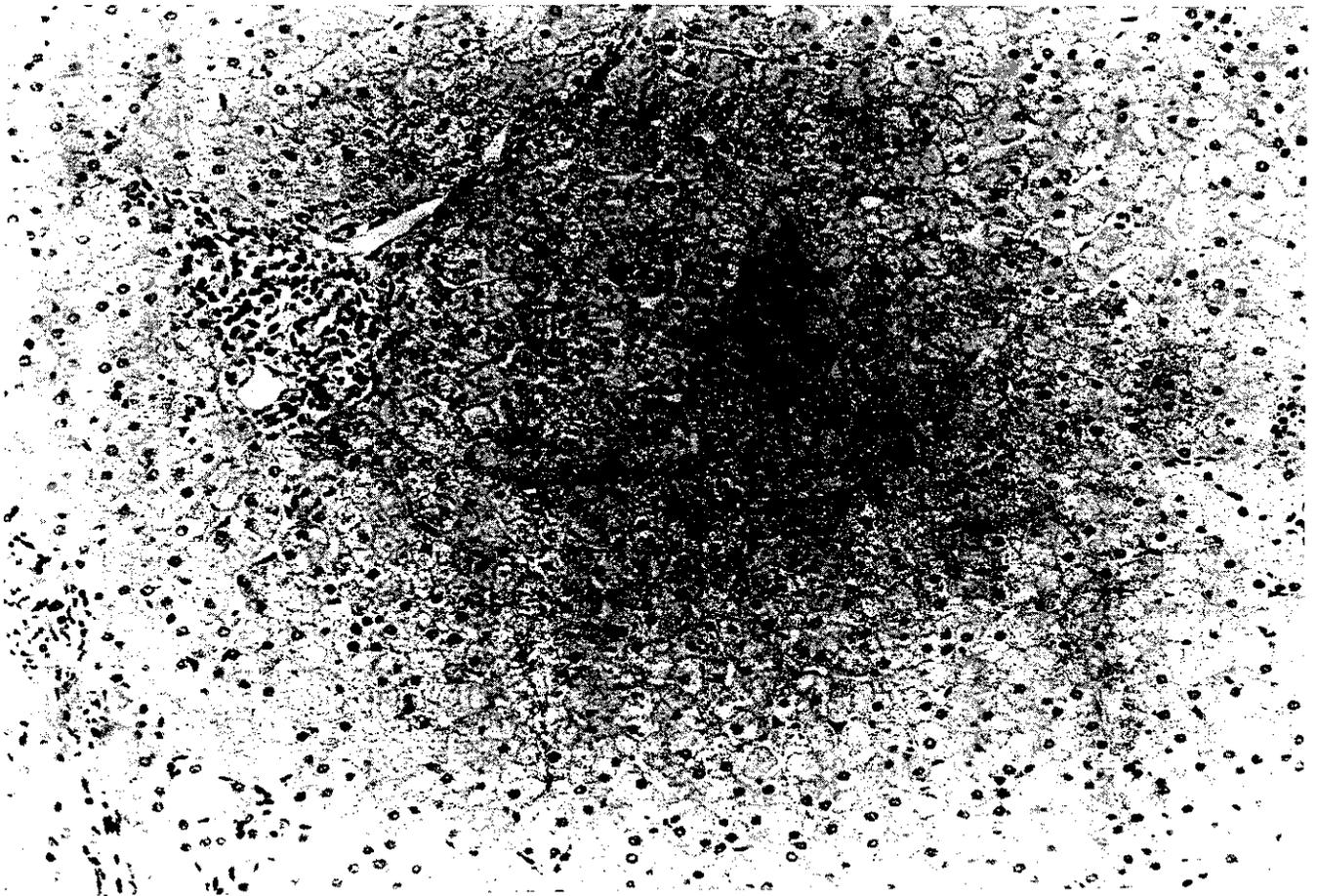


Figura 5.

Hepatitis crónica "borderline". Espacio porta con infiltrado inflamatorio moderado y necrosis erosiva leve. Lobulillo hepático con lesión necroinflamatoria. H.E. x 100.

Figura 6.

Biopsia de control a los 22 meses. Hepatitis crónica activa. Espacio porta con infiltrado inflamatorio más intenso y necrosis erosiva intensa. Lobulillo hepático con focos linfocíticos y necrosis hepatocelular. H.E. x 100.

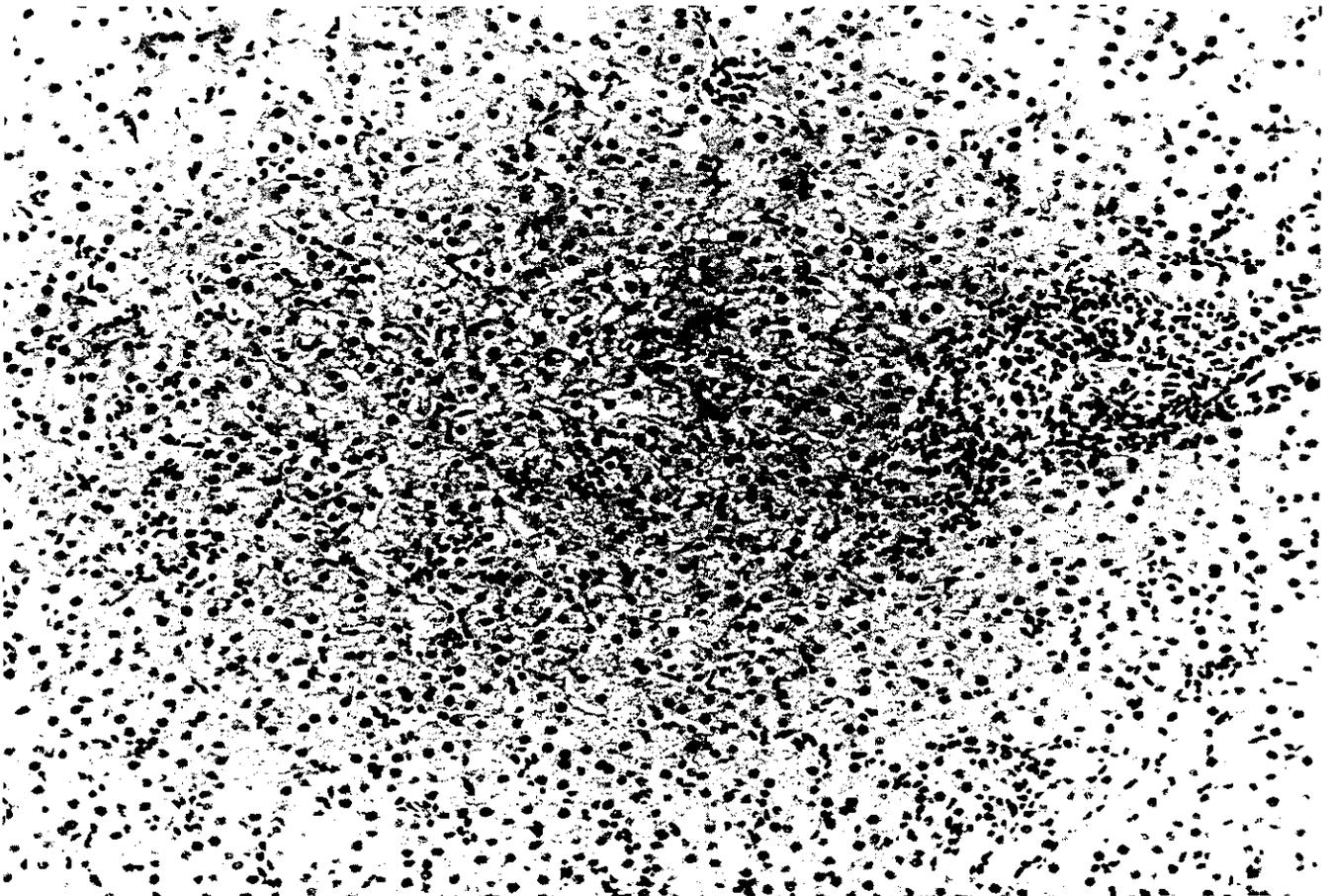
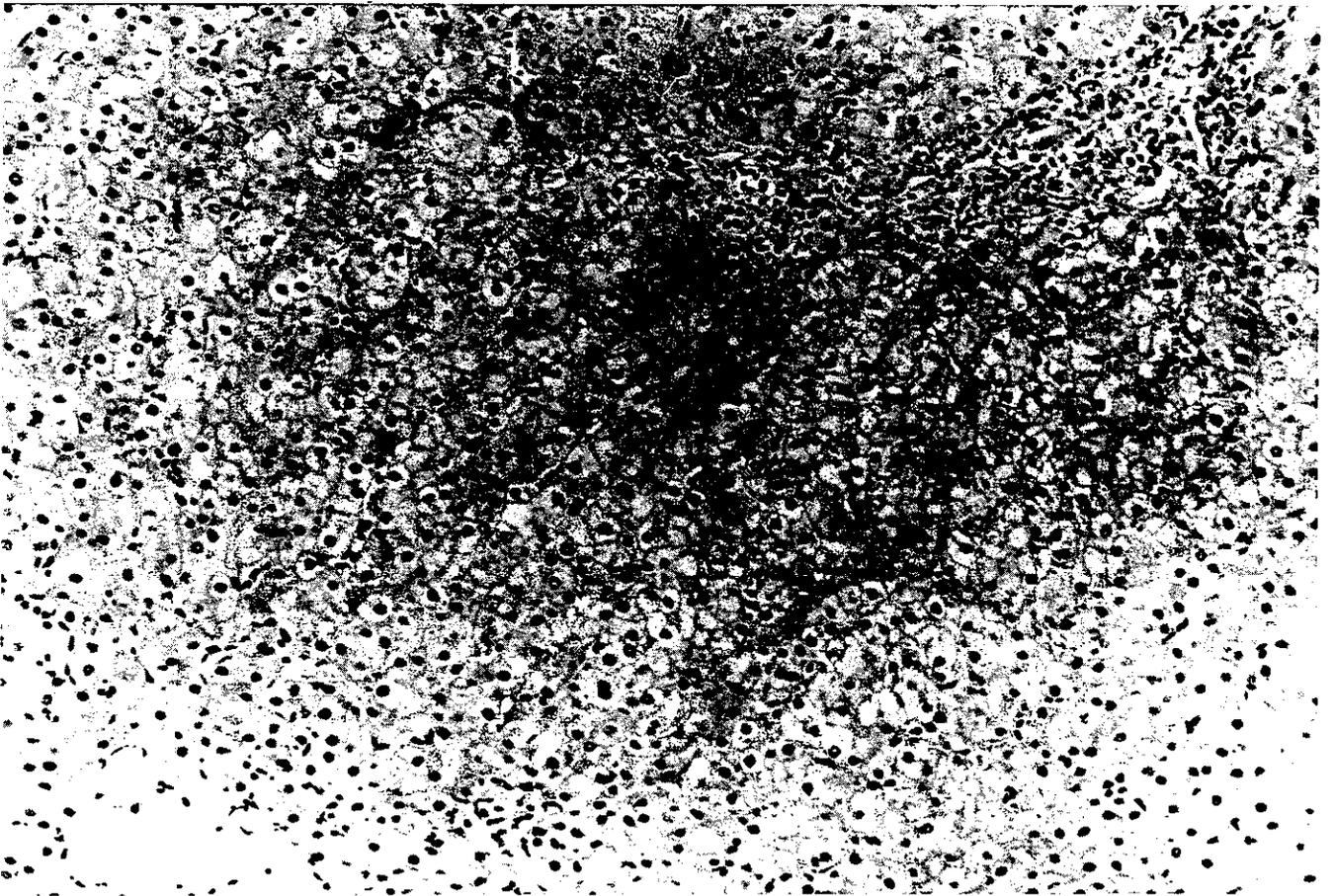


Figura 7.

Hepatitis crónica activa con puentes fibrosos portoportales con rotura de la limitante. H.E. x 400.

Figura 8.

Biopsia de control a los 22 meses. Cirrosis activa. H.E. x 100.

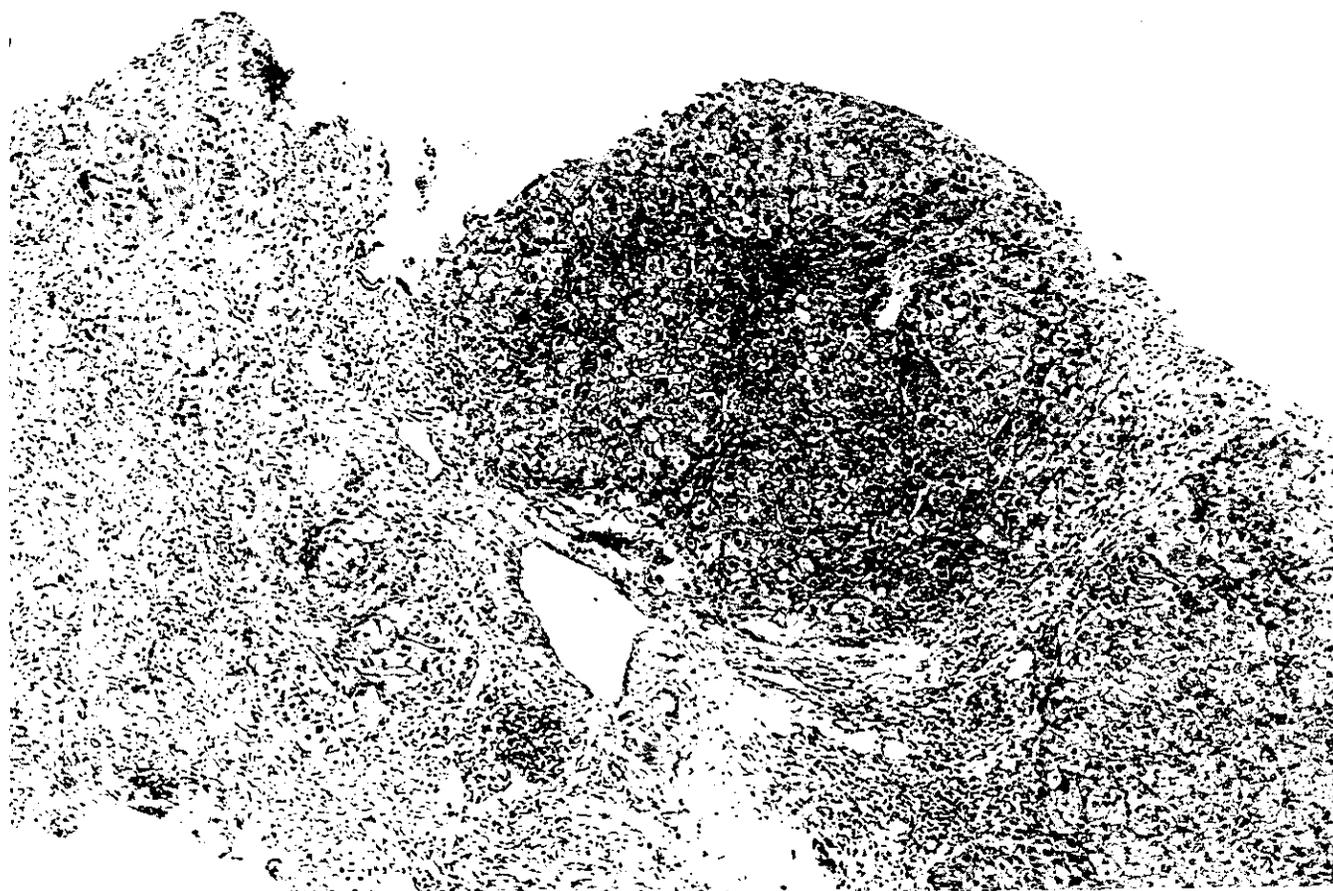
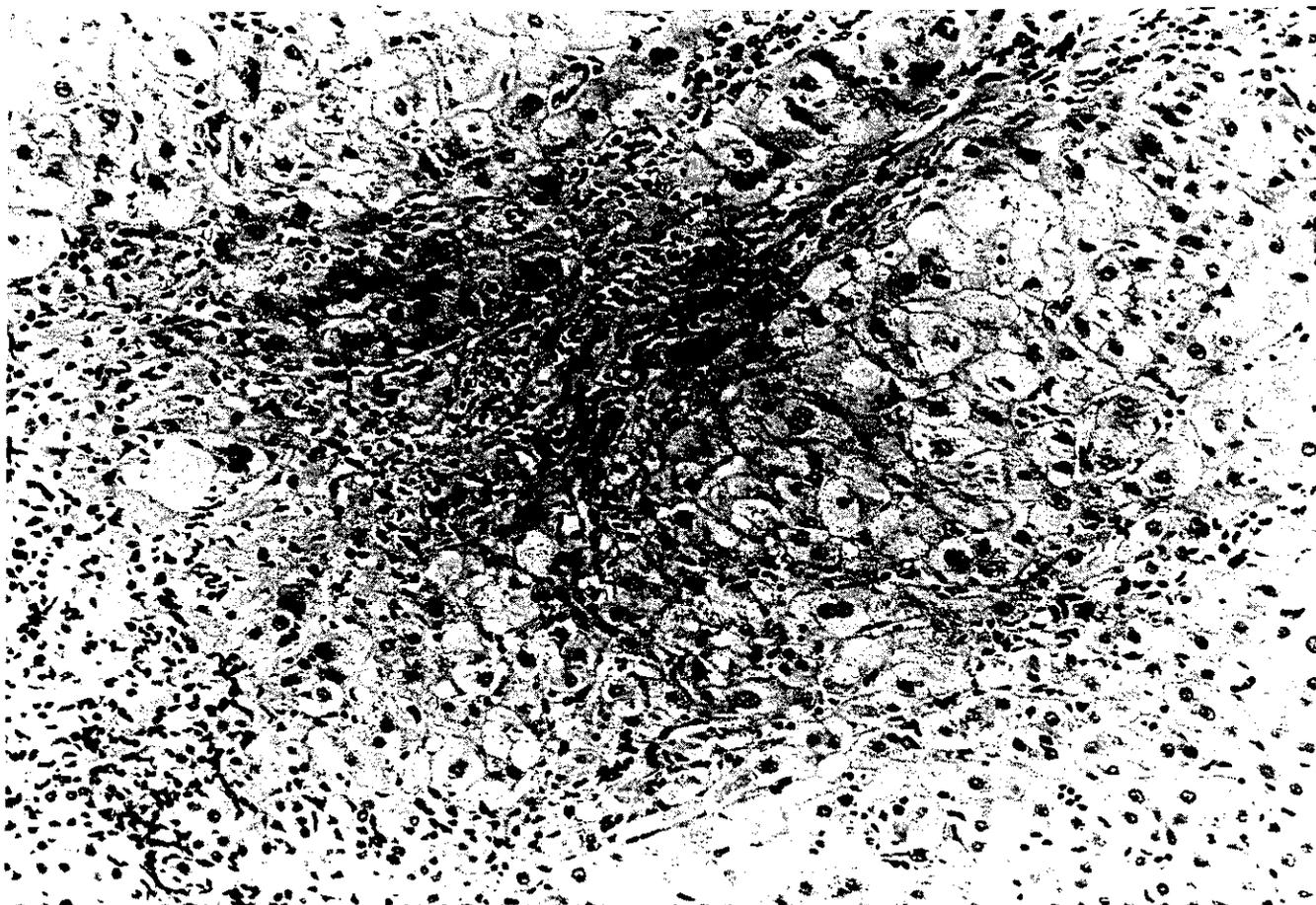


Figura 9.

Hepatitis crónica activa con puentes de reticulina portoportales. Wilder Reticulina x 100.

Figura 10.

Biopsia de control a los 12 meses, tras tratamiento con antivirales. Hepatitis crónica persistente con necrosis erosiva leve. Wilder Reticulina x 400.

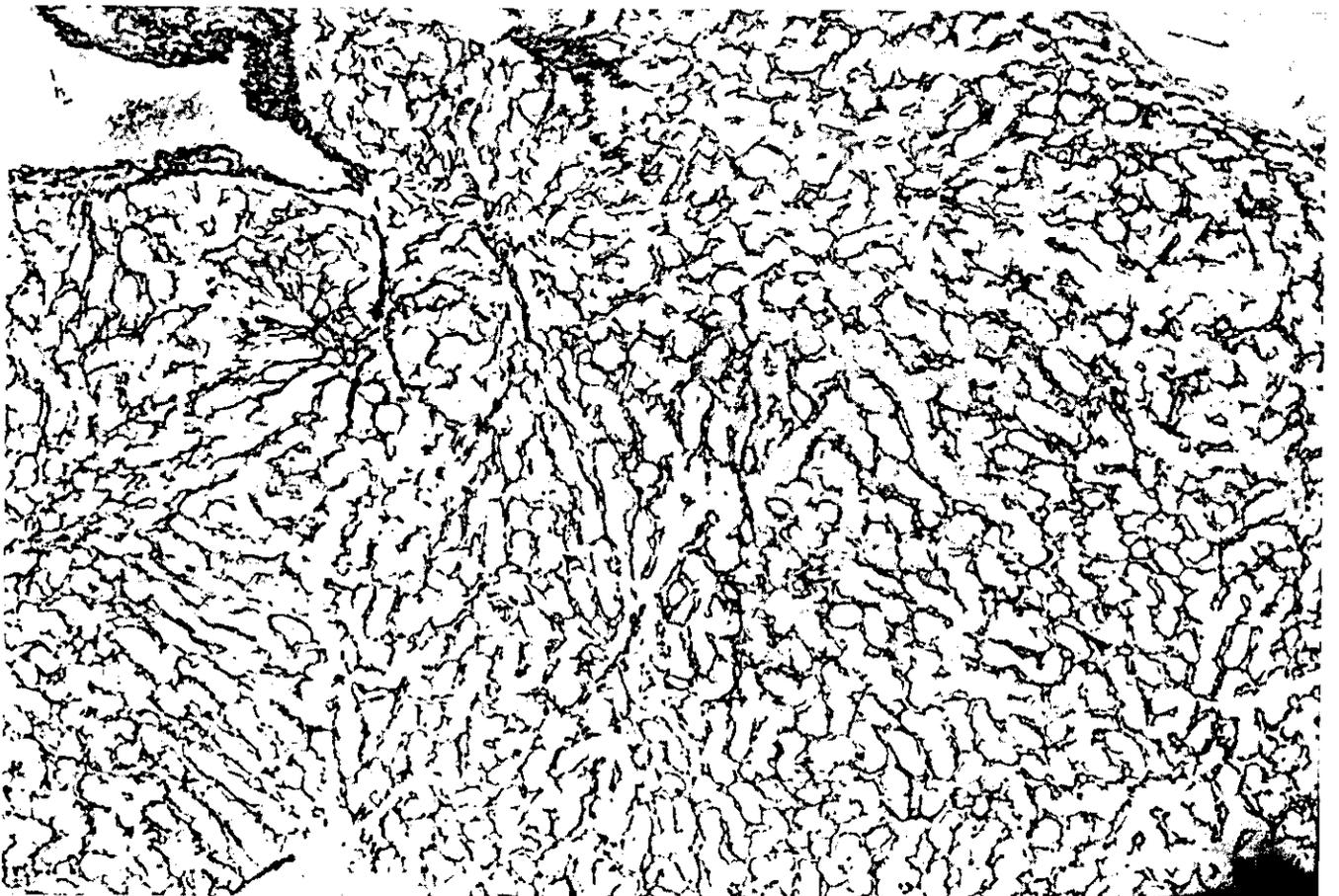
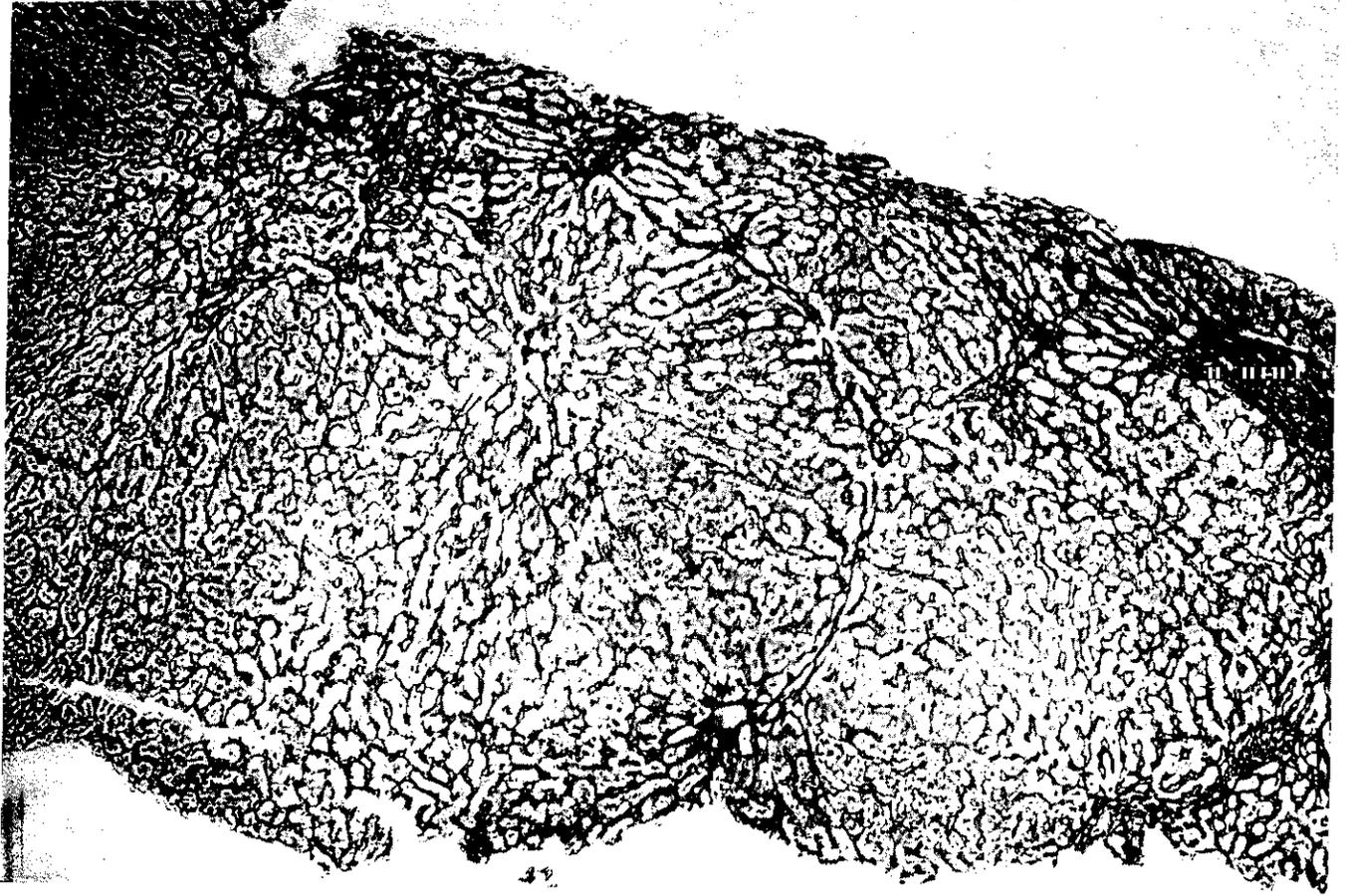


Figura 11.

Hepatitis crónica activa con puente de necrosis. Lobulillo hepatocitario con lesión necroinflamatoria. H.E. x 100.

Figura 12.

Biopsia de control a los 9 meses. Histología similar. Detalle de la lesión lobulillar. H.E. x 400.

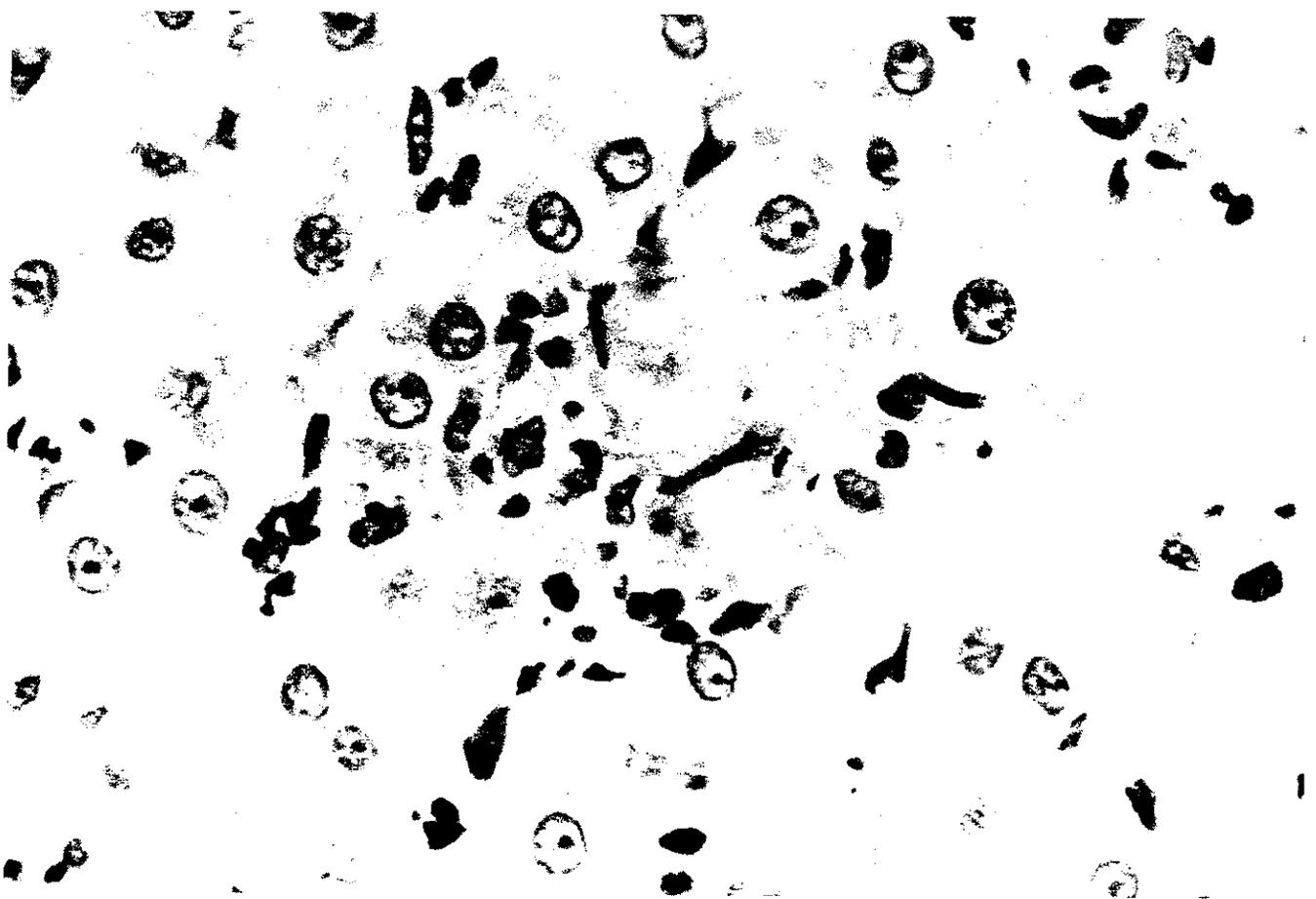
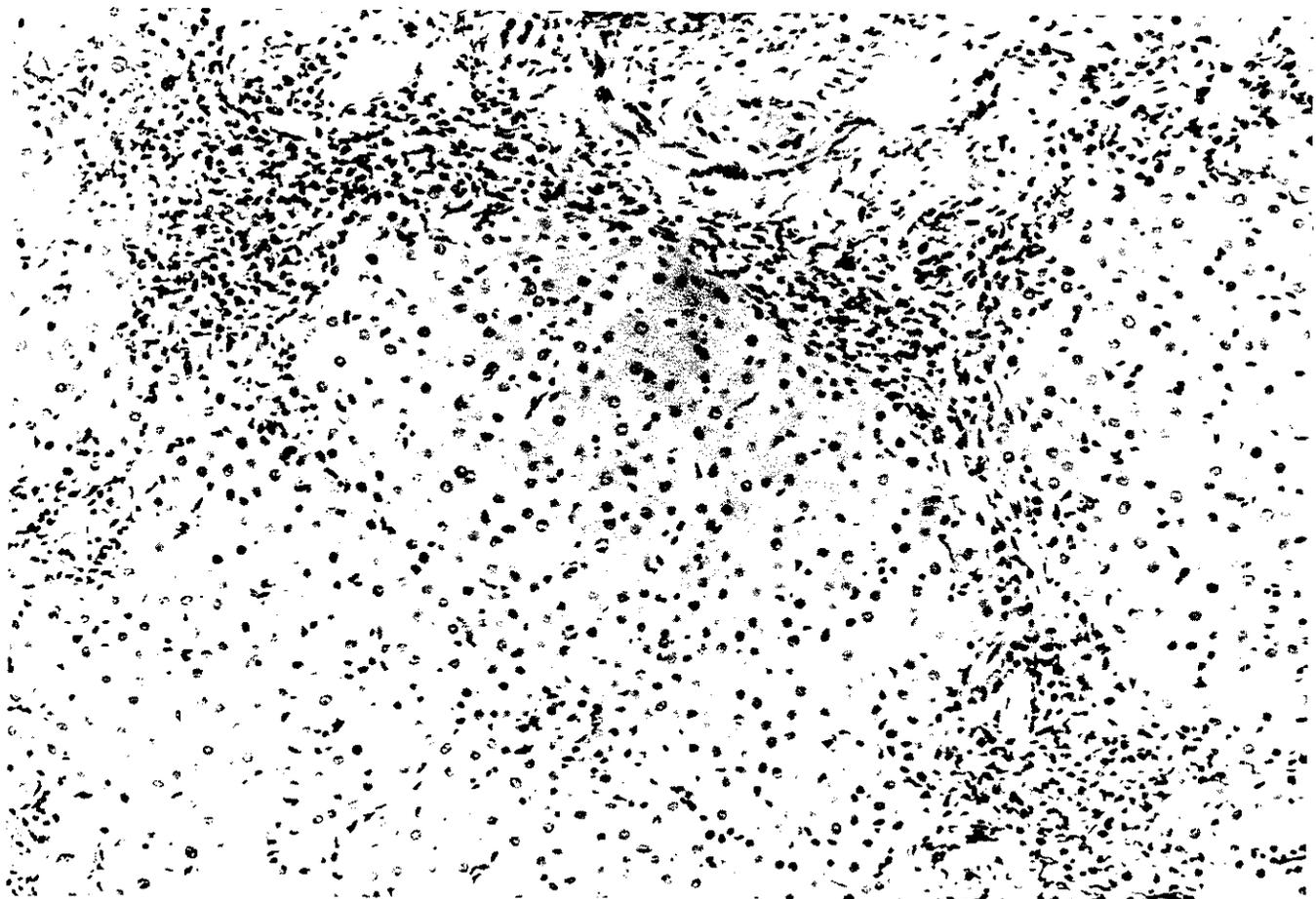


Figura 13.

HBsAg tisular. Tinción de tipo difuso y distribución en forma aislada.

Inmunoperoxidasa x 400.

Figura 14.

HBsAg tisular. Tinción de tipo difuso y de tipo globular. Distribución en

grupo. Inmunoperoxidasa x 400.

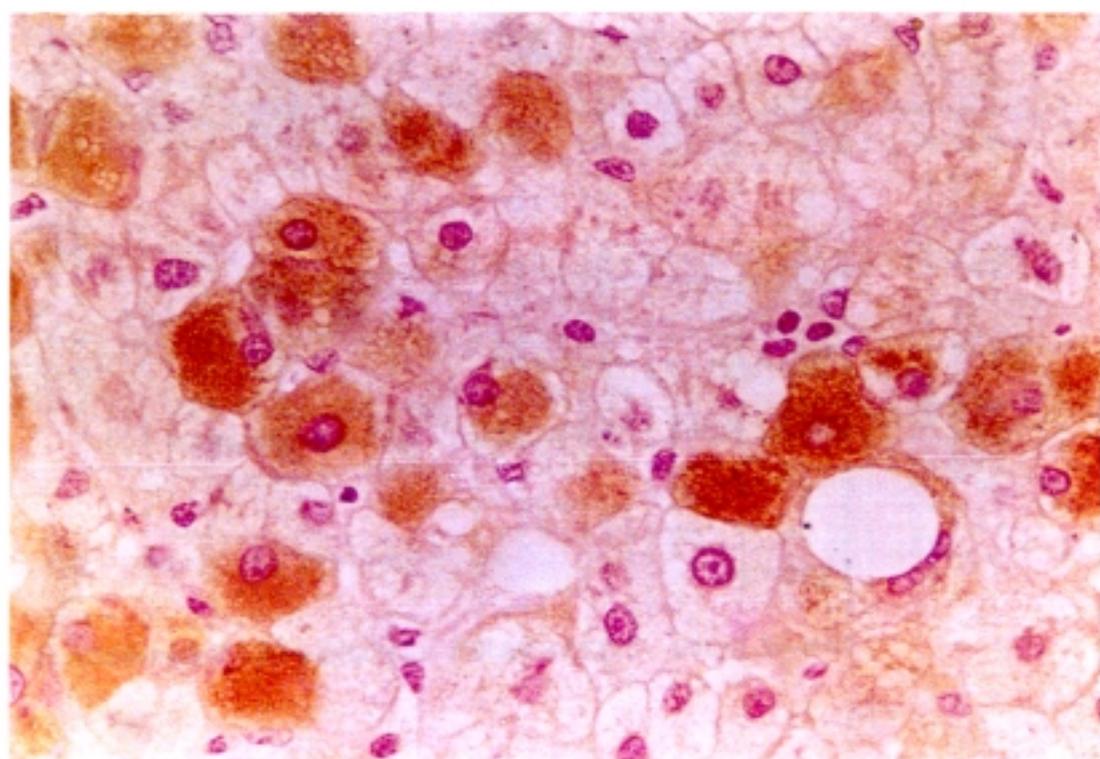
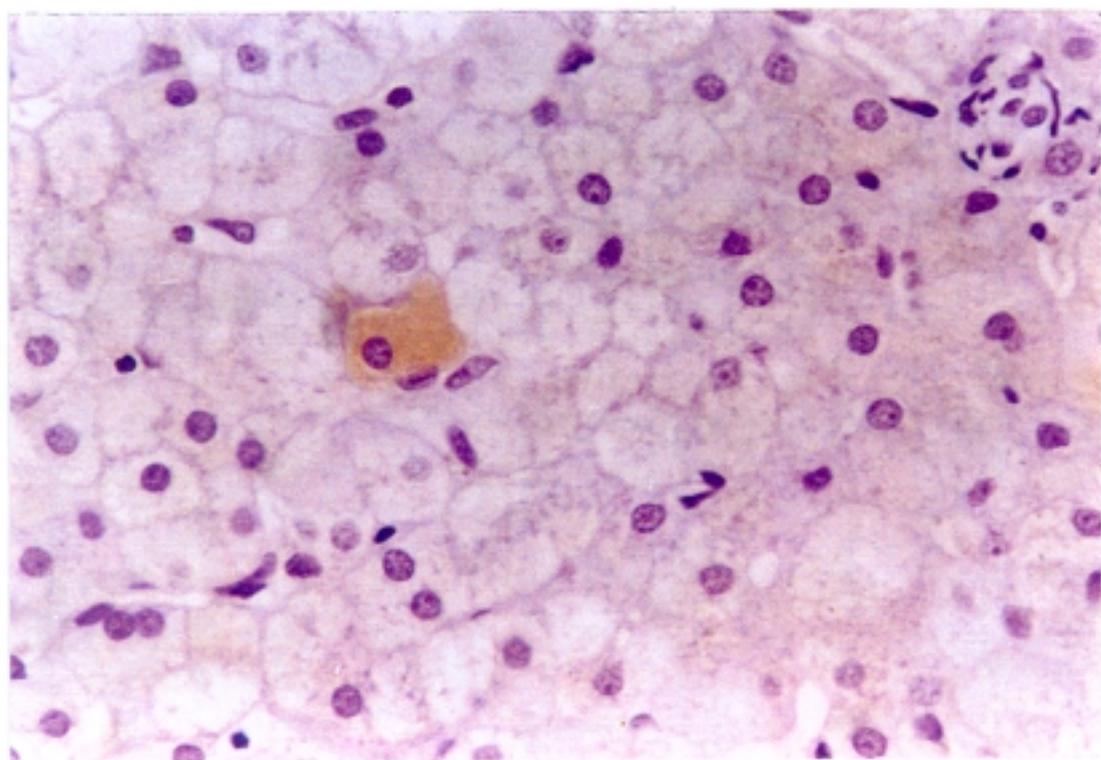


Figura 15.

HBcAg tisular. Tinción nuclear. Inmunoperoxidasa x 400.

Figura 16.

HBcAg tisular. Tinción nuclear y citoplásmica. Inmunoperoxidasa x 400.

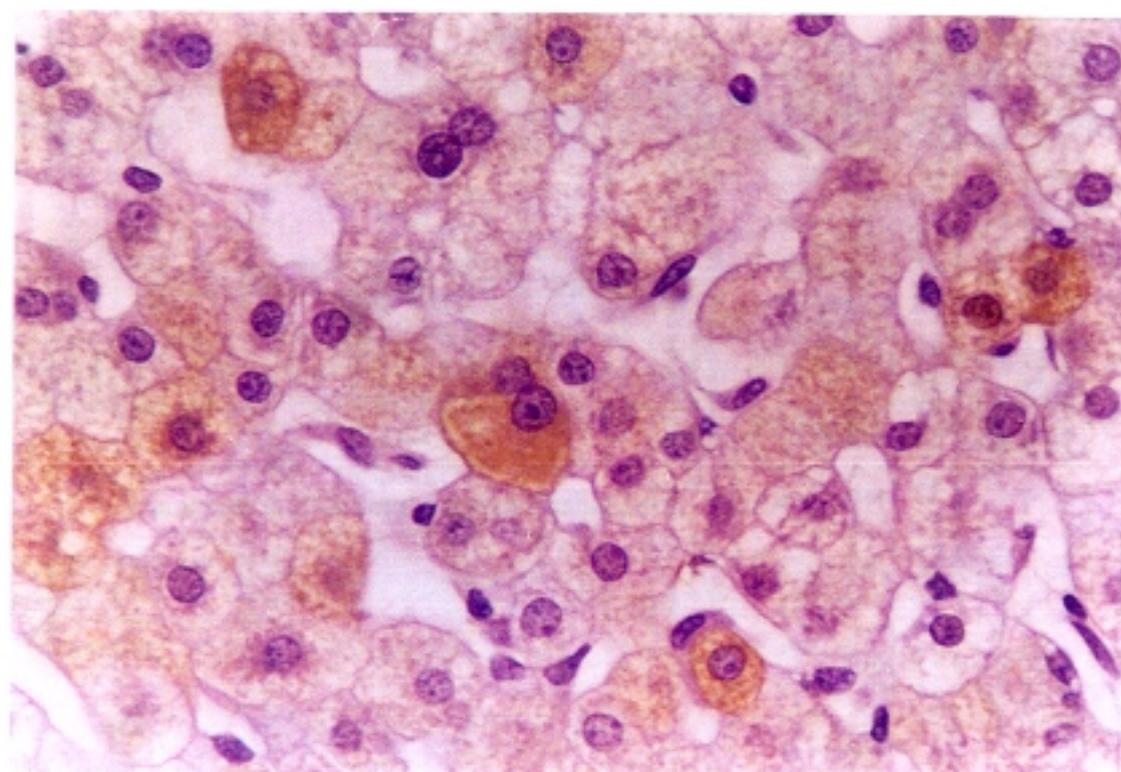
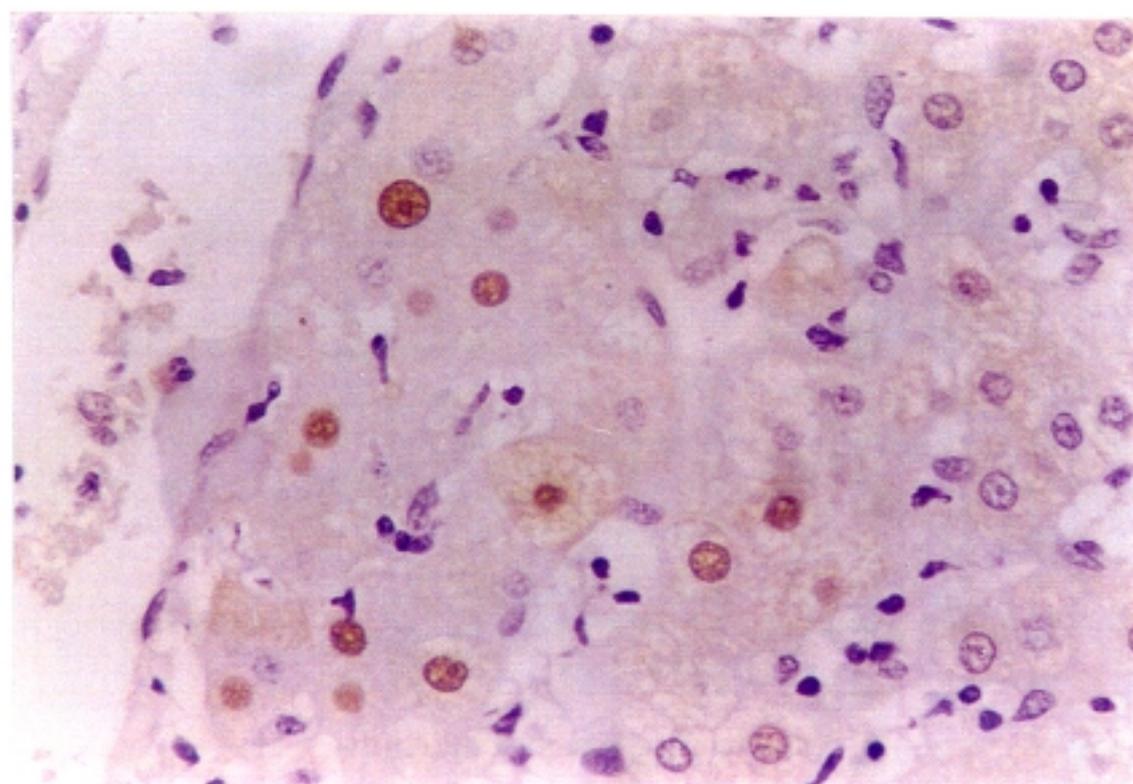


Figura 17.

HDAg tisular. Positividad nuclear. Inmunofluorescencia x 400.

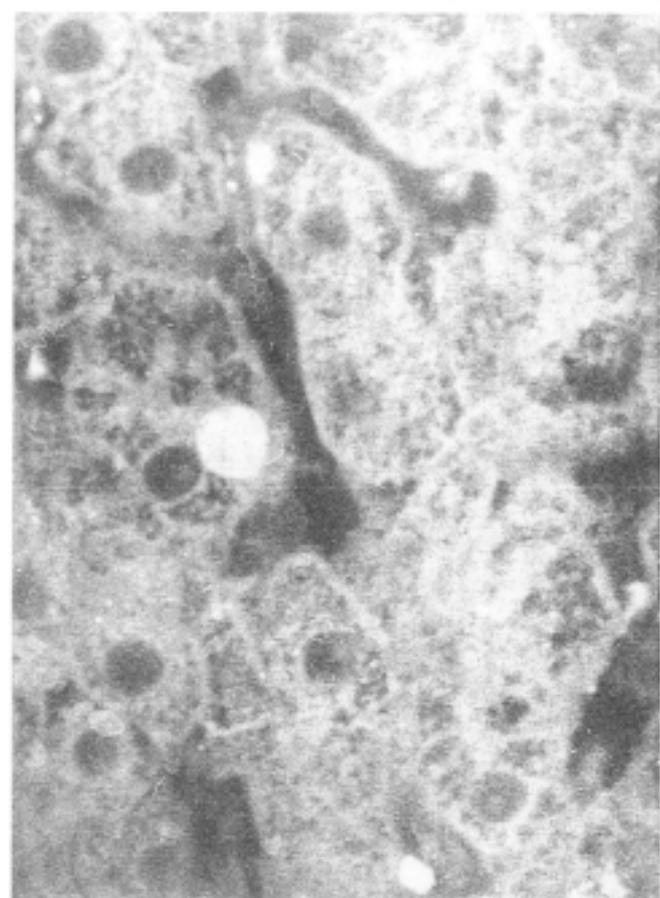


Figura 18.

Hepatocitos esmerilados (expresión óptica de la presencia de HBsAg). H.E.
x400.

Figura 19.

HBsAg tisular. Tinción difusa. Técnica de Masson x 400.

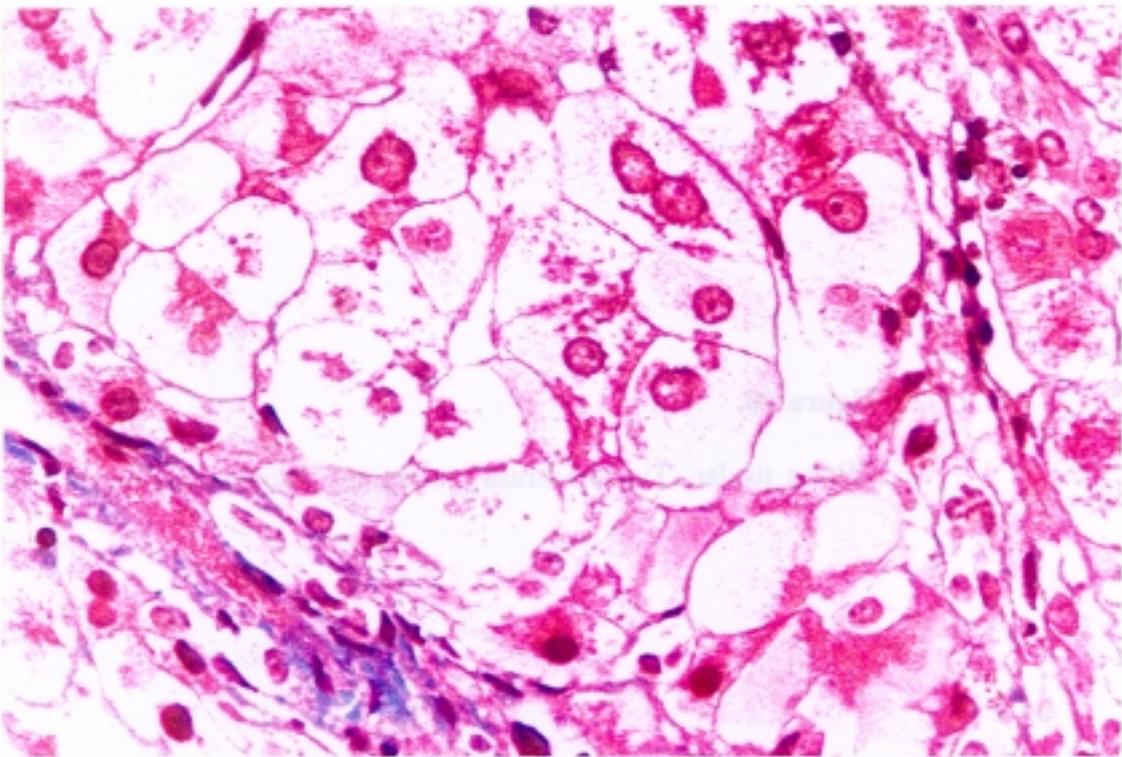
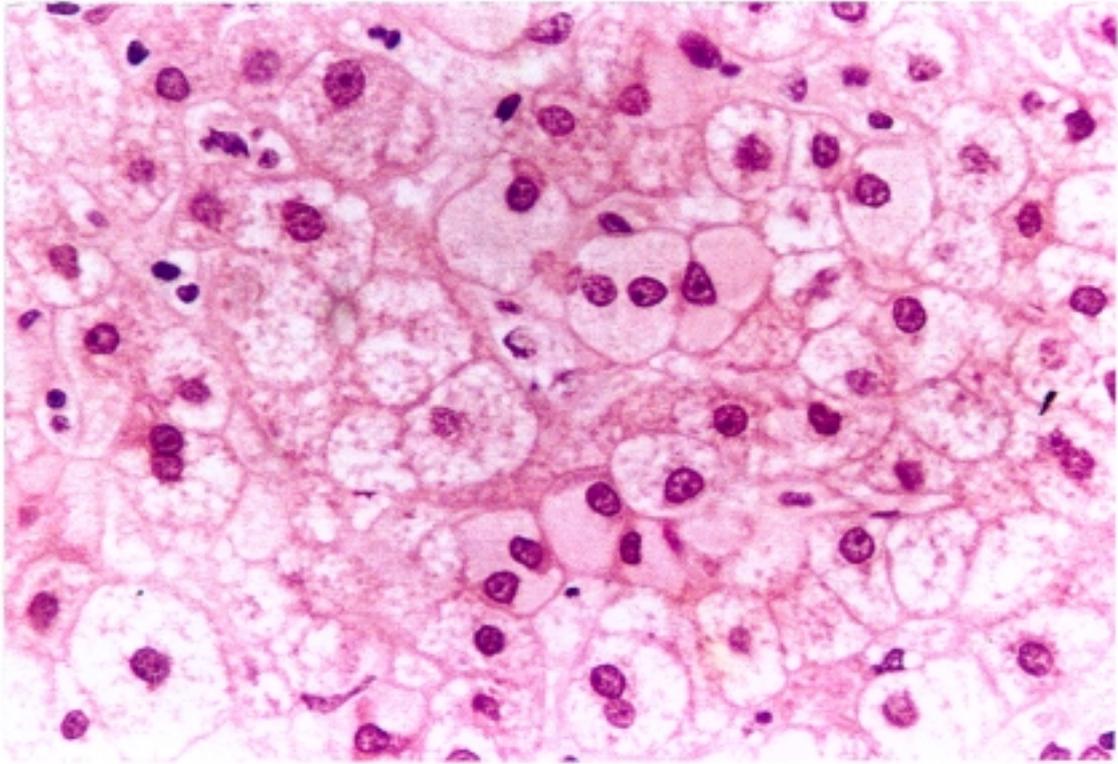


Figura 20.

HBsAg tisular. Tinción difusa y marginal. Técnica de Shikata x 400.

