

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DE SECUENCIAS DEL ADN  
DEL VIRUS B DE LA HEPATITIS  
POR TECNICAS DE HIBRIDACION IN SITU  
EN HEPATOPATIAS CRONICAS Y CARCIOMA HEPATOCELULAR

TESIS DOCTORAL

RAFAEL CANO MUÑOZ

SEPTIEMBRE 1991

UAM

UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

UNIDAD DOCENTE:

HOSPITALES DE LA PRINCESA Y DEL NIÑO JESUS

EL DOCTOR. D. RICARDO MORENO OTERO, PROFESOR ASOCIADO DE PATOLOGIA MEDICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID Y MEDICO ADJUNTO DEL SERVICIO DE APARATO DIGESTIVO DEL HOSPITAL DE LA PRINCESA

C E R T I F I C A : Que D. RAFAEL CANO MUÑOZ, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha trabajado durante los últimos tres años en el tema de investigación básica "ESTUDIO DE SECUENCIAS DE ADN DEL VIRUS B DE LA HEPATITIS POR TECNICAS DE HIBRIDACION IN SITU EN HEPATOPATIAS CRONICAS Y CARCINOMA HEPATOCELULAR". Este trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y con la supervisión directa del PROFESOR DOCTOR D. MANUEL DIAZ RUBIO, CATEDRATICO DE MEDICINA Y JEFE DEL SERVICIO DE APARATO DIGESTIVO DEL HOSPITAL CLINICO SAN CARLOS de Madrid. Los resultados de su labor investigadora se recogen en el presente Trabajo de TESIS DOCTORAL, para ser presentado en la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID y optar al GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA.

Y para que conste donde convenga, firmo el presente certificado en Madrid, a doce de Agosto de mil novecientos noventa y uno.



Fdo. Doctor. D. Ricardo Moreno Otero.



*Departamento de Medicina*

*Facultad de Medicina  
Universidad Complutense*

*28040 Madrid*

D. MANUEL DIAZ-RUBIO, CATEDRÁTICO DE MEDICINA, JEFE DEL SERVICIO DE APARATO DIGESTIVO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO "SAN CARLOS", MADRID,

C E R T I F I C A: Que D. Rafael CANO MUÑOZ, Licenciado en Medicina y Cirugía ha concluido su trabajo titulado "ESTUDIO DE SECUENCIAS DE ADN DEL VIRUS B DE LA HEPATITIS POR TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN IN SITU EN HEPATOPATIAS CRÓNICAS Y CARCINOMA HEPATOCELULAR" del que he sido Tutor, y que se ha realizado con vistas a la obtención del Grado de Doctor. Y para que conste donde convenga, firmo el presente certificado en Madrid a doce de Agosto de mil novecientos noventa y uno.





*Departamento de Medicina*

*Facultad de Medicina  
Universidad Complutense  
28040 Madrid*

DON CARLOS PEREZAGUA CLAMAGIRAND, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO  
DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

INFORMA: Que el Trabajo de Investigación titulado: "ESTUDIOS DE  
DE SECUENCIAS DE ADN DEL VIRUS B DE LA HEPATITIS POR -  
TECNICAS DE HIBRIDACION IN SITU EN HEPATOPATIAS CRONI-  
CAS Y CARCINOMA HEPATOCELULAR" y dirigido por Dr. D. -  
Ricardo Moreno Otero, reúne los resquisitos para su ad  
misión a trámite de lectura como Tesis Doctoral.

Madrid, 24 de Septiembre 1.991



Fdo.: Dr. D. Carlos Perezagua C.  
DIRECTOR DEPARTAMENTO DE MEDICINA

## AGRADECIMIENTOS

Al Prof. J.Mª Pajares García, con quien me inicié en la asistencia al paciente y que me inculcó la eficacia en mi trabajo, el trato afectuoso al enfermo y la inquietud de buscar más allá de donde parecía terminarse mi conocimiento.

Al Prof. M. Diaz Rubio, por la aceptación y apoyo generoso a este proyecto de Tesis Doctoral.

Al Dr. R. Moreno Otero, copiloto incansable en todos los campos imaginables.

A la Dra. E. Bernet Vegué, por su apoyo espiritual sin condiciones.

Al Dr. C. Heimann por su colaboración en la elaboración de los cálculos estadísticos.

Al Hospital San Agustín de Linares, a su Director Gerente Dr. T. de Haro y a la Dra. B. Esteban por su colaboración y apoyo logístico.

A Francisca Piñas Guzmán, ATS del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Agustín de Linares, cuyo esmero, paciencia y habilidad han hecho posible la realización técnica de

este trabajo.

A D. R. Rodriguez Moreno por su ayuda en la elaboración de la iconografía.

Este trabajo ha sido realizado en parte con la ayuda de la beca de Investigación del FIS nº 91-258.

## DEDICACION

A mis padres,  
que dedicaron y dedican su vida a sus hijos.

To Laia,  
inducer, promoter, helper, mantainer  
and heart robber.

## ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Acido desoxirribonucléico
AEC	Aminoetilcarbazol
ARN	Acido ribonucléico
ARNm	Acido ribonucléico mensajero
Anti-HBc	Anticuerpo contra antígeno Core
Anti-HBe	Anticuerpo contra antígeno e
Anti-HBs	Anticuerpo contra antígeno de superficie
Bio-dUTP	Deoxiuridinatrifosfato biotinilado
C	Cirrosis
Ci	Citosina
CHC	Carcinoma hepatocelular
DAB	Diaminobenzidina
DR	Direct Repeat
ENH	Enhancer (estimulador)
G	Guanina
GRE	Glucocorticoid-responsive element
H	Hematoxilina
HA	Hepatitis aguda
HBcAg	Antígeno Core
HBeAg	Antígeno e
HBsAg	Antígeno de Superficie
HCA	Hepatitis crónica activa

HCL	Hepatitis crónica lobulillar
HCP	Hepatitis crónica persistente
HIS	Hibridación in situ
HR	Hepatitis residual
Kb	Kilobase (mil nucleótidos)
N	Normal
nm	Nanometro (0.000000001 m)
ORF	Open Reading Frame. Zona de lectura abierta
pb	Par de bases o nucleótidos
PBS	Tampón salino fosfato
T	Timina
TTP	Timina trifosfato
VBH	Virus B de la hepatitis
VBH-ADN	ADN del virus B de la hepatitis
VBH-ADNp	ADN polimerasa del Virus B de la hepatitis

**INDICE**

## INDICE

1	INTRODUCCION . . . . .	2
1.1	ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA HEPATITIS . . . . .	2
1.2	SOBRE EL VIRUS B DE LA HEPATITIS . . . . .	4
1.2.1	ASPECTOS HISTORICOS . . . . .	4
1.2.2	MORFOLOGIA DEL VIRUS B DE LA HEPATITIS (VBH) . . . . .	10
1.2.3	MULTIPLICACION VIRAL . . . . .	20
1.3	PATOGENIA. . . . .	22
1.3.1	ASPECTOS GENERALES . . . . .	22
1.3.2	ASPECTOS ESPECIFICOS DEL VIRUS B . . . . .	24
1.4	VBH Y CANCER . . . . .	30
1.5	RECUERDO HISTOPATOLOGICO DE LAS LESIONES INFLAMATORIAS INDUCIDAS POR EL VBH . . . . .	34
1.5.1	FORMAS O TIPOS DE LESION HEPATOCELULAR . . . . .	34
1.5.2	ASPECTOS HISTOQUIMICOS . . . . .	36
1.6	SOBRE LA HIBRIDACION . . . . .	38
1.6.1	GENERALIDADES . . . . .	38
1.6.2	FABRICACION DE LA SONDA . . . . .	43
1.6.3	PROCESO DE HIBRIDACION . . . . .	45
1.6.4	ASPECTOS ESPECIFICOS DE LA HIBRIDACION DEL VBH . . . . .	52

2	OBJETIVOS . . . . .	57
3	MATERIAL Y METODOS . . . . .	59
	3.1 SELECCION DE ENFERMOS . . . . .	59
	3.2 ESTUDIOS BIOQUIMICOS E HISTOLOGICOS . . . . .	60
	3.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO . . . . .	62
	3.4 HIBRIDACION IN SITU . . . . .	66
	3.4.1 SONDA . . . . .	66
	3.4.2 PROTEINASA K . . . . .	67
	3.4.3 ADHESIVO . . . . .	68
	3.4.4 CROMOGENO . . . . .	68
	3.4.5 OTROS REACTIVOS . . . . .	69
	3.4.6 TECNICA DE LA HIBRIDACION IN SITU . . . . .	72
	3.4.7 VALORACION DE LA TECNICA . . . . .	75
4	RESULTADOS . . . . .	86
	4.1 LESIONES HEPATICAS OBSERVADAS . . . . .	86
	4.2 SEROLOGIA DE LOS CASOS . . . . .	86
	4.3 INMUNOHISTOQUIMICA . . . . .	90
	4.4 HIBRIDACION IN SITU . . . . .	96
	4.4.1 CASOS DIGERIDOS . . . . .	96
	4.4.2 CASOS CON SEROLOGIA POSITIVA PARA EL VBH . . . . .	98
	4.4.2.1 Patrón de infección (HBsAg +). . . . .	98
	4.4.2.2 Patrón de inmunidad (Anti-HBs +). . . . .	100
	4.4.2.3 Patrón de contacto antiguo (Anti-HBc). . . . .	101

4.4.3 CASOS CON SEROLOGIA NEGATIVA . . . . .	102
4.4.3.1 Patrón negativo cierto. . . . .	102
4.4.3.2 Patrón negativo dudoso. . . . .	104
4.5 PATRONES DE TINCION . . . . .	104
4.5.1 PATRON DE LOS ACIDOS NUCLEICOS . . . . .	104
4.5.2 PATRON DE LA TINCION CELULAR . . . . .	106
4.5.3 PATRON DE TINCION LOBULILLAR . . . . .	110
4.6 CANTIDAD DE TINCION . . . . .	111
4.6.1 CANTIDAD DE TINCION CELULAR . . . . .	111
4.6.2 CANTIDAD DE CELULAS TEÑIDAS . . . . .	111
4.7 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA HCP Y LA HCA . . . . .	111
4.8 DISCREPANCIA ENTRE SEROLOGIA POSITIVA Y ADN NEGATIVO . . . . .	112
4.9 DISCREPANCIA SEROLOGIA NEGATIVA Y ADN POSITIVO . . . . .	115
4.10 LOS HEPATOCARCINOMAS . . . . .	117
4.10.1 CARCINOMAS HEPATOCELULARES CON SEROLOGIA NEGATIVA . . . . .	118
4.10.2 CARCINOMAS HEPATOCELULARES CON SEROLOGIA POSITIVA . . . . .	118
4.11 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA HIS . . . . .	122
 5 DISCUSION . . . . .	 127
5.1 PATOLOGIA HEPATICA DE LOS ENFERMOS ESTUDIADOS . . . . .	127
5.2 ASPECTOS TECNICOS DE LA HIBRIDACION IN SITU . . . . .	130
5.3 PATRONES DE TINCION DE LA HIS . . . . .	131
5.4 CORRELACION DE LA HIS CON LOS MARCADORES DEL VBH . . . . .	132
5.5 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA HIS . . . . .	134

5.6 LA HIS Y CASOS DE SEROLOGIA DUDOSA PARA EL VBH . .	137
5.7 LA HIBRIDACION IN SITU Y EL CARCINOMA HEPATOCELULAR . . . . .	138
6. CONCLUSIONES . . . . .	143
7. RESUMEN . . . . .	148
8. BIBLIOGRAFIA . . . . .	151

## 1. INTRODUCCION

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA HEPATITIS

La ictericia y su relación con la enfermedad hepática parecen tan antiguos como la historia de la humanidad.

Existen evidencias de la misma en el Talmud, siglo V a.C., y sin embargo la naturaleza epidémica de la ictericia no se observó hasta el siglo VIII d.C., lo que sugirió su naturaleza epidémica y se recomendaron medidas de aislamiento para prevenir contagios.

En el siglo XVIII se describieron ictericias epidémicas y posteriormente, durante las guerras que ocurrieron hasta el siglo XIX, sucedieron numerosos brotes de hepatitis en los distintos ejércitos (1).

El primer brote de ictericia de transmisión parenteral fue descrito en relación con una vacunación contra la viruela, pero no fue hasta el año 1908 cuando se sugirió que el agente causal de la ictericia epidémica era un virus (2,3).

Se confirmó la transmisión parenteral de la hepatitis durante la Segunda Guerra mundial cuando se observó tanto la presencia de casos aislados en relación con transfusiones como formas epidémicas ocurridas tras vacunaciones contra el sarampión y la fiebre amarilla (4).

En 1944 y como resultado de experiencias en voluntarios sanos se diferencian claramente dos tipos de hepatitis virales, la A y la B (5,6). La primera, de ocurrencia esporádica o epidémica y transmisible por vía fecal-oral y parenteral, y la segunda de contagio exclusivo por vía parenteral. Apenas veinte años más tarde, se describieron los virus MS1 y MS2 como agentes etiológicos de las hepatitis tipos A y B, respectivamente, observándose un período de incubación prolongado para el virus MS2 (7).

A partir de este momento y con la combinación de avances en los campos de la inmunología, microscopía electrónica y biología molecular, el conocimiento del virus de la hepatitis B en sus variadas facetas (morfológica, inmunológica, epidemiológica, patogénica y carcinogénica) ha aumentado considerablemente.

## 1.2 SOBRE EL VIRUS B DE LA HEPATITIS

### 1.2.1 ASPECTOS HISTORICOS

En 1965, Blumberg y cols. (8), investigando la presencia de isoprecipitinas en suero de enfermos politransfundidos, usando un panel de 24 sueros procedentes de individuos normales y de distintas poblaciones, observaron que sueros correspondientes a dos hemofílicos formaban una línea de precipitación con el suero de un aborigen australiano.

En consecuencia, la proteína sérica con la que la isoprecipitina de los hemofílicos había reaccionado fue denominada antígeno Australia.

Al realizar estudios epidemiológicos e inmunológicos de esta reacción, se encontró que su incidencia era alta en las leucemias agudas, por lo que se sugirió por un lado un posible valor en el diagnóstico precoz de dicha enfermedad, y por otro lado, su posible asociación a un hipotético virus como factor etiológico.

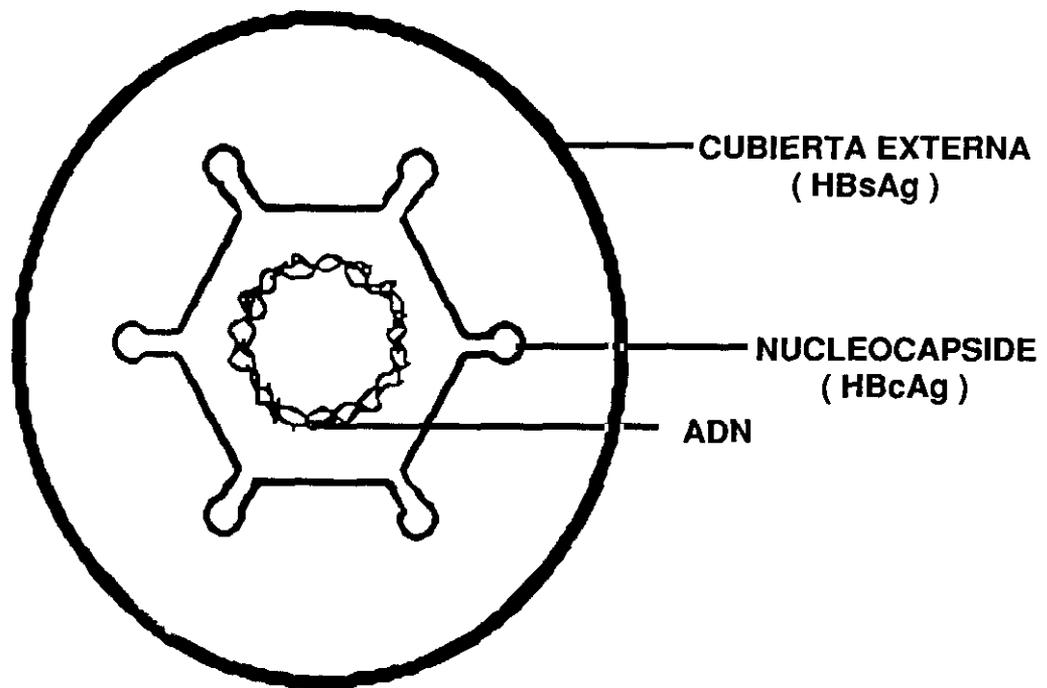
Posteriormente, se amplió el grupo de enfermedades que mostraban frecuente asociación con el antígeno Australia al síndrome de Dawn y a la hepatitis (9).

El hecho de que se encontraran diferentes especificidades inmunológicas del antígeno Australia demostraba de forma indirecta que existía un virus cuyo genoma podía expresarse de forma variada fenotípicamente, y que esta expresión podría servir para la identificación de portadores de hepatitis, si bien tendría más importancia epidemiológica que clínica (10,11).

En 1970, Dane y cols. descubrieron partículas de 42 nm de diámetro en pacientes con serología positiva para el antígeno Australia y sugirieron que dichas partículas correspondían al virus completo. Simultáneamente, identificaron unas partículas más pequeñas, esféricas, de 22 nm, así como otras de morfología tubular de hasta 200 nm de longitud y del mismo diámetro, ambas consideradas material de envoltura viral fabricado en exceso (12).

Analizadas las partículas de 42 nm, se observó que estaban constituidas por una envoltura externa de 7 nm situada alrededor de un núcleo central de 28 nm denominado core. El core contenía ADN polimerasa y una molécula de ADN bicatenario de disposición circular y de una longitud media estimada por microscopía electrónica (ME) de  $0.78 \pm 0.09 \mu\text{m}$ , lo que corresponde a un peso molecular de  $1.6 \times 10^6$  daltons (Fig 1) (13-16).

El material de envoltura viral fue denominado antígeno de superficie (HBsAg), y está formado por una proteína sintetizada por la zona "S" del genoma viral y constituye la membrana más



**PARTICULA DANE ( VIRION COMPLETO ), DIAMETRO 42 nm.**

**Figura 1. ESQUEMA DEL VBH VISTO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA**

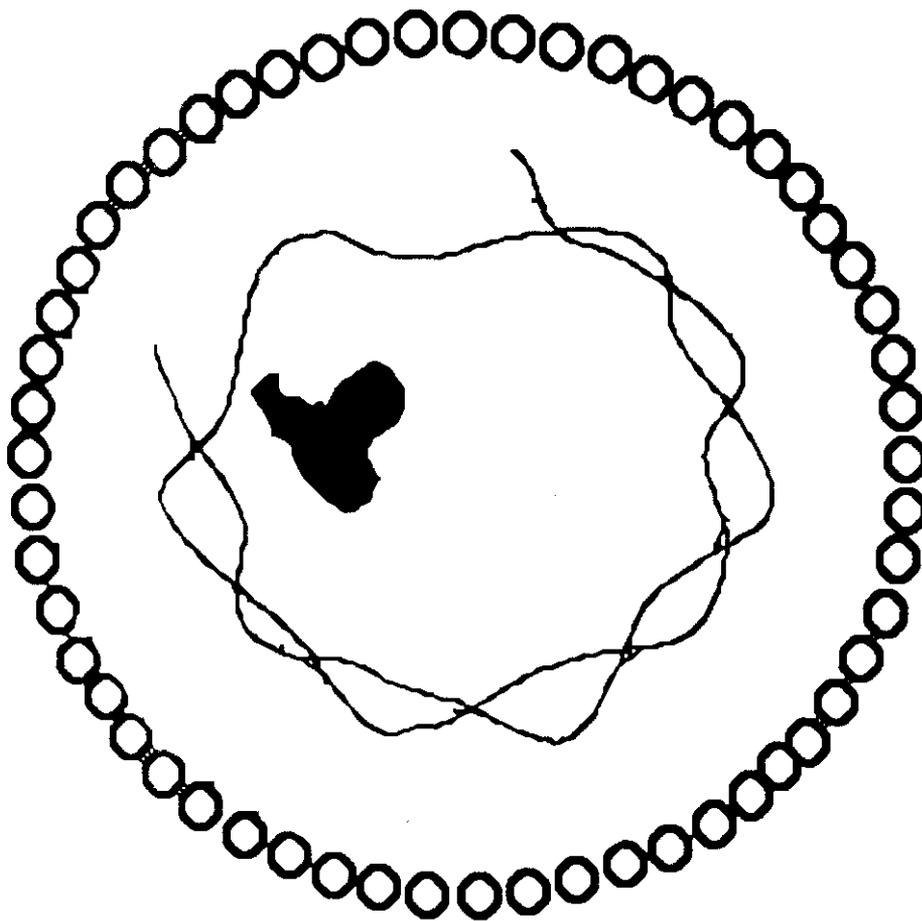
periférica de la estructura del virus.

La intensa tinción citoplásmica cuando se tiñe el HBsAg tisular con su anticuerpo específico (Anti-HBs) se corresponde, a nivel ultraestructural, con la presencia de abundantes estructuras tubulares y circulares de 20 - 30 nm de diámetro en las cisternas del retículo endoplásmico liso. Dichas estructuras corresponden a material de envoltura viral cuya síntesis está codificada en exceso por la zona "S" del genoma viral (17).

Estudios por ME evidenciaron abundantes partículas de aspecto viral cuyos diámetros eran de 28 nm tanto en el núcleo como, de manera más ocasional, en el citoplasma de pacientes con hepatitis asociada a antígeno Australia. Las partículas parecían corresponder a nucleocápside sin envoltura externa (18). Posteriormente, las mismas partículas han podido ser también observadas en el nucleólo (19).

Hoy sabemos que la nucleocápside está constituida por una proteína cuya síntesis está codificada por la zona "C" del genoma viral y que sirve de envoltura para el ADN viral (Fig. 2).

La nucleocápside o cubierta del núcleo viral, se corresponde con el antígeno core (HBcAg) mientras que la envoltura externa del virus completo se corresponde con el antígeno de superficie (Fig. 3).

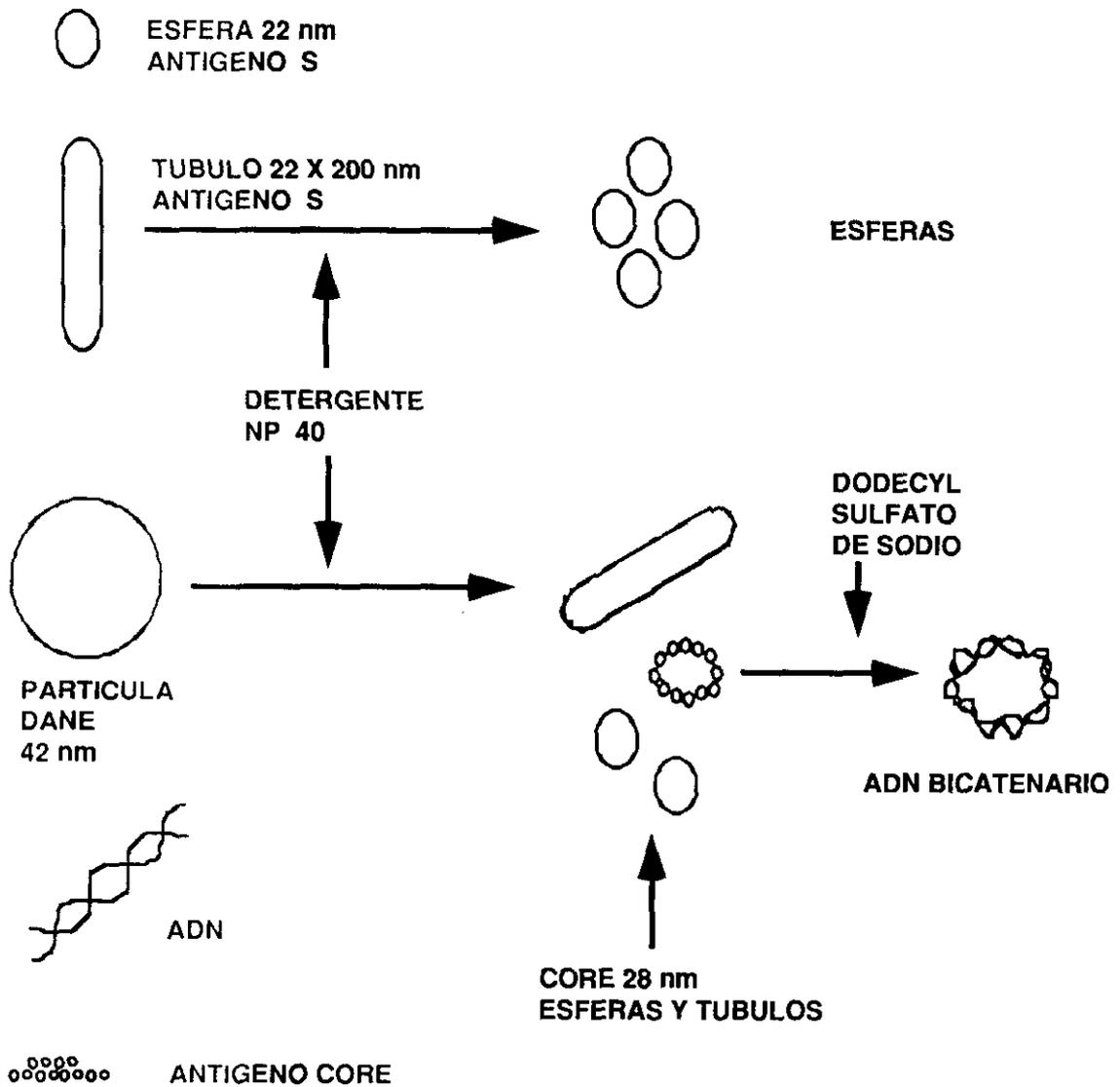


- ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ NUCLEOCAPSIDE ( HBcAg )
- ~~~~~ ADN UNICATENARIO
- ~~~~~ ADN BICATENARIO
- ADN POLIMERASA

FIGURA 2. ESQUEMA DEL NUCLEO O CORE DE LA PARTICULA DANE

**FORMAS CIRCULANTES**

**ESTRUCTURAS DERIVADAS DE TRATAMIENTO  
CON DETERGENTES**



**FIGURA 3. ESQUEMA DE LAS PARTICULAS RELACIONADAS CON EL VBH QUE SE ENCUENTRAN EN LA SANGRE**

La observación de la coincidencia clínica de la partícula Dane con un nuevo determinante antigénico, al que se identificó como antígeno e (HBeAg), así como la coincidencia con los anticuerpos contra los antígenos core (Anti-HBc) y e (Anti-HBe) sugirió que el HBeAg es un componente de la partícula Dane (20).

Se ha evidenciado que ambas proteínas (HBcAg y HBeAg) están producidas por el mismo gen. Es decir, dicho gen tiene dos codones de iniciación distintos y, dependiendo del codón donde se inicie la transcripción, es producida una u otra proteína: la que es soluble y se segrega después de haber sido modificada en el retículo endoplásmico (HBeAg) o la que se retiene (HBcAg) para ser luego incorporada como nucleocápside del virus completo (21).

### 1.2.2 MORFOLOGIA DEL VIRUS B DE LA HEPATITIS (VBH)

El VBH pertenece al grupo de los hepadnavirus, que se caracterizan por ser virus ADN de pequeño tamaño con tropismo por el hígado.

El ADN del virus B está formado por sólo 3.200 pares de bases y es el genoma viral de ADN de menor tamaño capaz de infectar al ser humano.

La organización compacta del genoma viral permite el uso

múltiple de muchas de sus regiones. Ello se debe a la existencia de regiones de transcripción superpuestas entre sí, así como por la presencia de secuencias reguladoras de genes dentro de estas mismas regiones de transcripción (22).

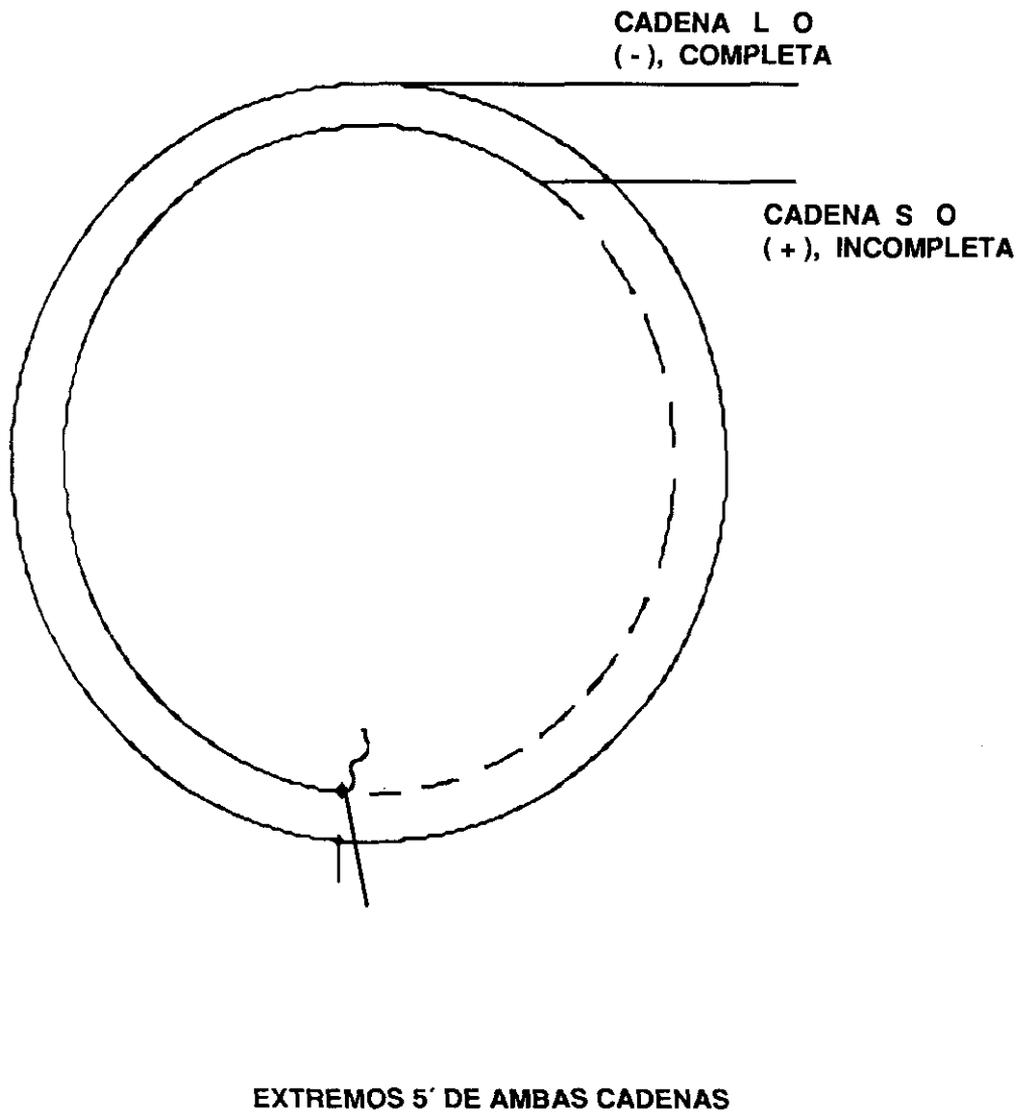
El ADN del virus B es circular y parcialmente bicatenario, manteniéndose la estructura circular por el apareamiento de 224 pares de bases en los extremos 5' de ambas cadenas (Fig. 4).

La cadena completa tiene una longitud fija de 3.2 Kb, denominándose banda L o (-), que es complementaria a los ARN mensajeros virales (Fig. 5).

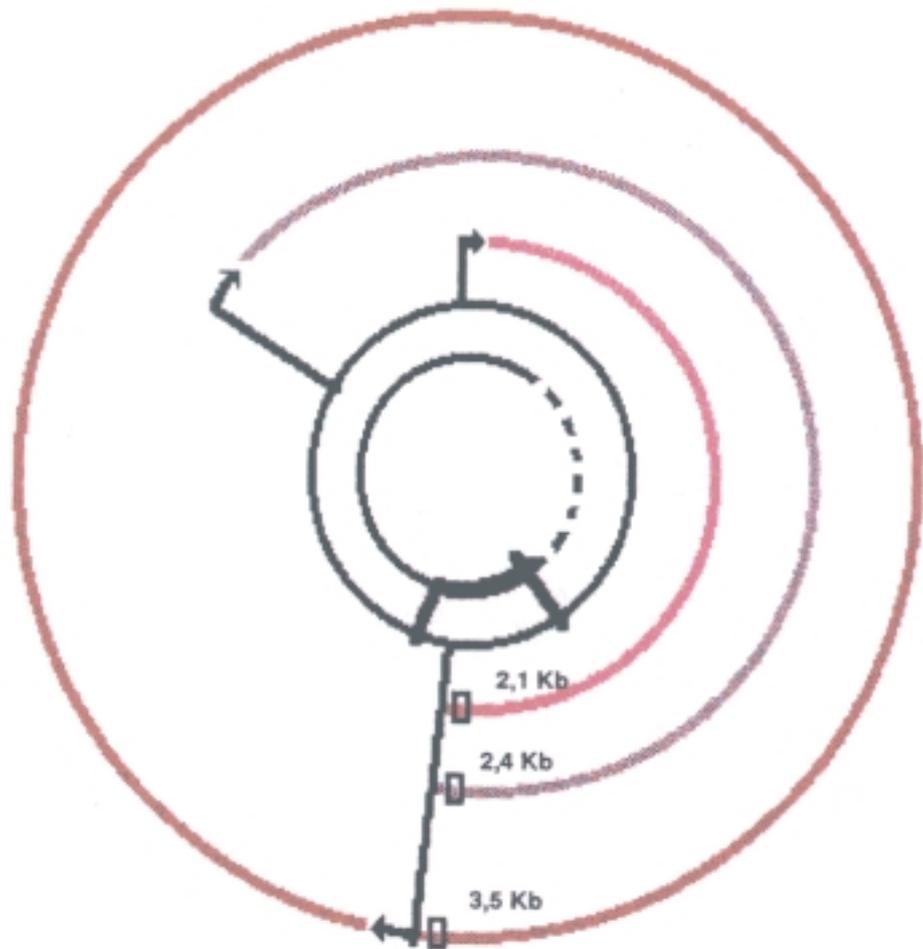
La cadena complementaria mide del 20 al 80 % de la cadena completa y se denomina cadena S o (+).

Sobre la cadena L (-) se localizan cinco regiones de lectura abierta (open reading frames, ORF) que se superponen de forma irregular (22). Se entiende por zona de lectura abierta u ORF a los segmentos del genoma viral capaces de dirigir la síntesis de proteínas específicas del virus, ya sean constituyentes estructurales o funcionales (Fig. 6).

Las cuatro primeras ORFs, denominadas S, C, P y X codifican respectivamente para las proteínas de la envoltura del virus (HBsAg), de la nucleocápside (HBcAG y HBeAg), la ADN polimerasa

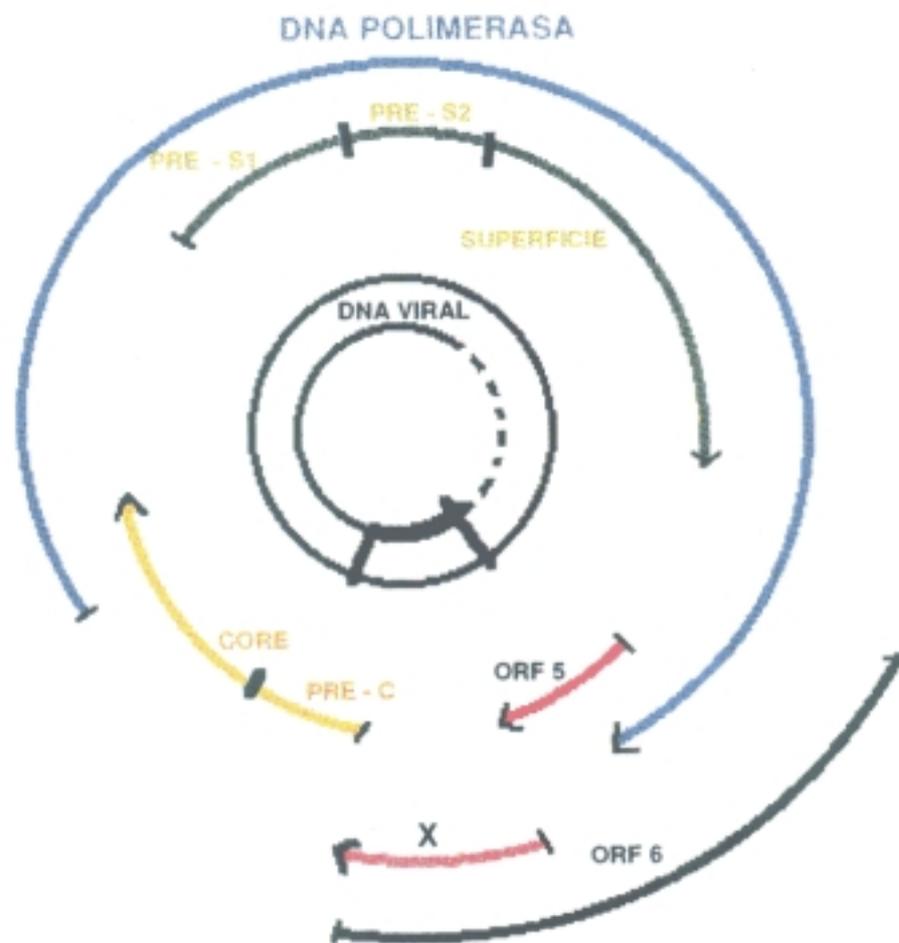


**FIGURA 4. ESTRUCTURA BASICA DEL GENOMA DEL VBH**



 LUGARES 5' DE INICIACION  
 TERMINACION 3' COMUN

**FIGURA 5. GENOMA DEL VBH :  
 AREAS DE TRANSCRIPCION PARA LA SINTESIS DE  
 LOS TRES RNA MENSAJEROS MAYORES DE  
 2,1 Kb, 2,4 Kb Y 3,5 Kb.**



**SUPERPOSICION DE LAS AREAS TRADUCTORAS DEBIDO A LA ESTRUCTURA COMPACTA DEL VIRUS**

**FIGURA 6. GENOMA DEL VBH:  
POSICION DE LAS SECUENCIAS DE GENES  
DESDE CODON DE INICIACION A CODON DE TERMINACION  
Y SENTIDO DE LA TRANSCRIPCION DE LOS O.R.F.  
HASTA AHORA IDENTIFICADOS**

(ADNp) y la proteína X (HBxAg). Esta última es, al parecer, una quinasa proteica con propiedades transactivadoras de genes reguladores del virus, y más específicamente relacionada con la región de función aumentadora de la expresión genética. (23-25).

La expresión de estas proteínas transcritas tiene significación clínica como indicativos de replicación viral, de tal forma que la presencia de HBeAg y ADNp en suero así como la de HBcAg nuclear en tejido son indicativos de altos niveles de replicación. En cambio, una tinción citoplásmica del HBcAg y la ausencia de HBeAg y ADNp en suero indican baja replicación viral (Tabla I).

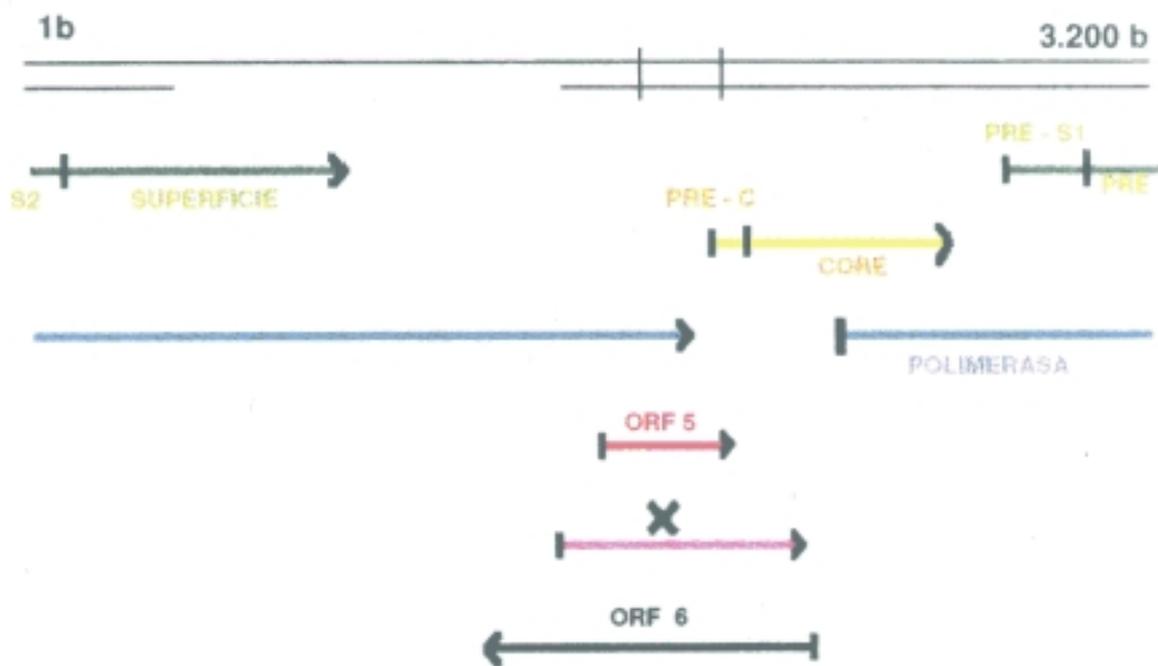
De los dos ORFs restantes, la ORF6 se localiza curiosamente en la cadena corta del ADN viral y se transcribe en sentido contrario a las demás ORFs, y tanto ésta como la ORF5 tienen una función aún no clarificada (Fig. 7).

En las ORFs se contienen además seis secuencias de nucleótidos que son receptores de proteínas específicas y que se detallan a continuación (Fig. 8).

Al producirse la unión entre dichas proteínas y las secuencias de nucleótidos mencionadas se regulan tanto la replicación viral como la expresión del material genético.

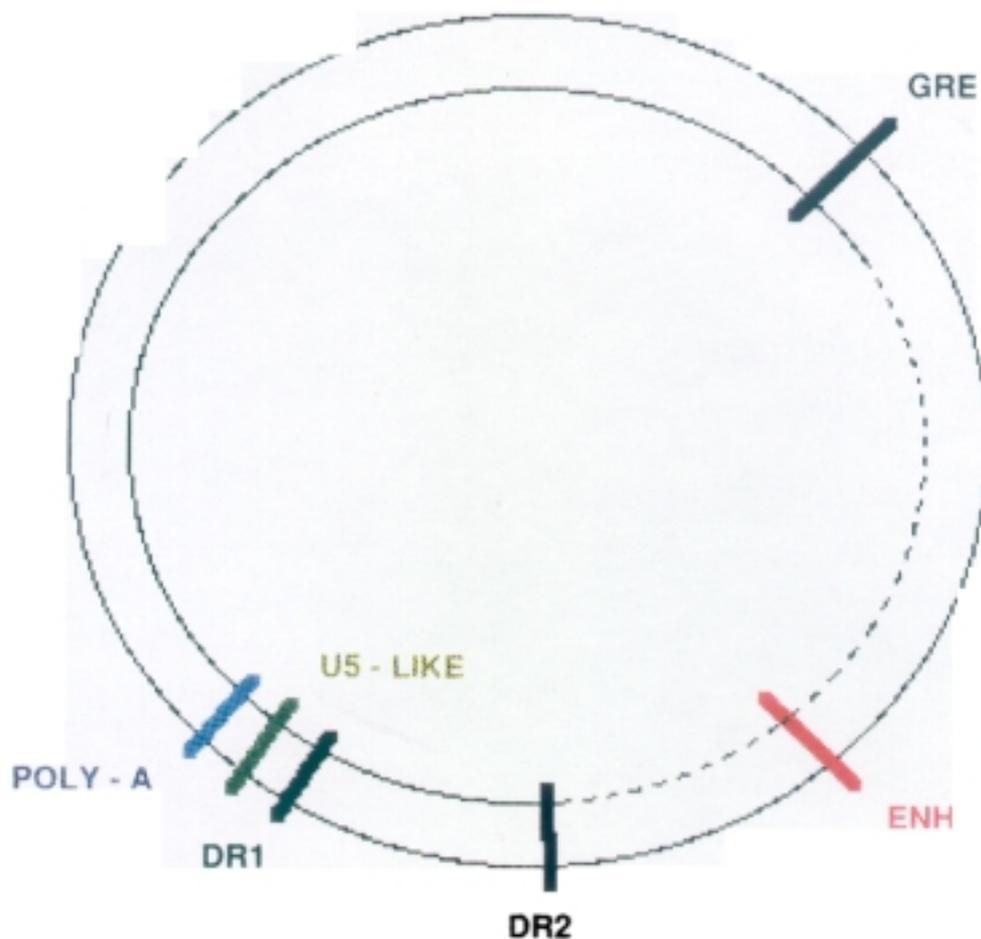
TABLA I. MARCADORES SEROLOGICOS Y TISULARES DE REPLICACION VIRAL

MARCADOR	REPLICACION BAJA	REPLICACION ALTA
EN SUERO:		
HBsAg	+/-	+
Anti-HBc	+	+
Anti-HBs	+	-
HBeAg	-	+
Anti-HBe	+	-
VBH DNA	-	+
VBH DNAp	-	+
EN TEJIDO:		
HBsAg	+	+
HBcAg	citoplásmico	nuclear
VBH DNA integrado	+	-
VBH DNA episómico	-	+



PRE - S1	2850 - 3173	ORF 5	1477 - 1659
PRE - S2	3174 - 156	ORF 6	1219 - 1836
SUPERFICIE	157 - 837	X	1376 - 1840
PRE CORE	1816 - 1903	POLIMERASA	2309 - 1625
CORE	1903 - 2454		

**FIGURA 7. GENOMA DEL VBH:  
DESARROLLO HORIZONTAL DEL GENOMA VIRAL  
CON LOCALIZACION DE LAS ORF E IDENTIFICACION DE  
LOS CODONES DE INICIO ( | ) Y TERMINACION ( > )**



DR 1	1826 - 1836
DR 2	15692 - 1602
U 5 LIKE	1857 - 1918

ELEMENTOS REPLICATIVOS

ENH	1182 - 1216
POLY - A	1919 - 1962
GRE	351 - 368

ELEMENTOS REGULADORES DE GENES

**FIGURA 8. GENOMA DEL VBH:  
POSICION DE LAS ESTRUCTURAS RELACIONADAS CON LA  
REPLICACION Y REGULACION DE GENES Y EXPRESION DE  
LOS CODONES DE INICIACION Y TERMINACION**

Esto distingue al virus B de la hepatitis de otros virus donde los nucleótidos receptores para proteínas reguladoras asientan en segmentos no-ORF de su genoma.

Las secuencias de 11 pares de bases repetidas dos veces y relacionadas con la replicación son denominadas DR 1 y DR 2 (Direct Repeat) (26).

La DR 1 asienta dentro de la ORF precore y es el lugar donde se inicia la síntesis de la cadena L o (-) del ADN. La DR 2, que asienta donde se superponen las ORF polimerasa y X, actúa como lugar de iniciación para la síntesis de la cadena S o (+) del ADN.

Una secuencia de 62 nucleótidos forma la región denominada U5 like, por su parecido estructural a la región 5' del genoma de los retrovirus con función de iniciación de síntesis de cadena (-) de ADN. Su función, en el VBH, es aún imprecisa, aunque probablemente esté también relacionada con la síntesis del ADN (26).

Las otras tres secuencias son: la señal de poliadenilación (Poly-A), esencial para la terminación de la transcripción, el aumentador (enhancer, ENH) que mejora los niveles de transcripción, y el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), que unido a un receptor hormonal aumenta el nivel de transcripción de ciertos genes (27,28).

### 1.2.3 MULTIPLICACION VIRAL

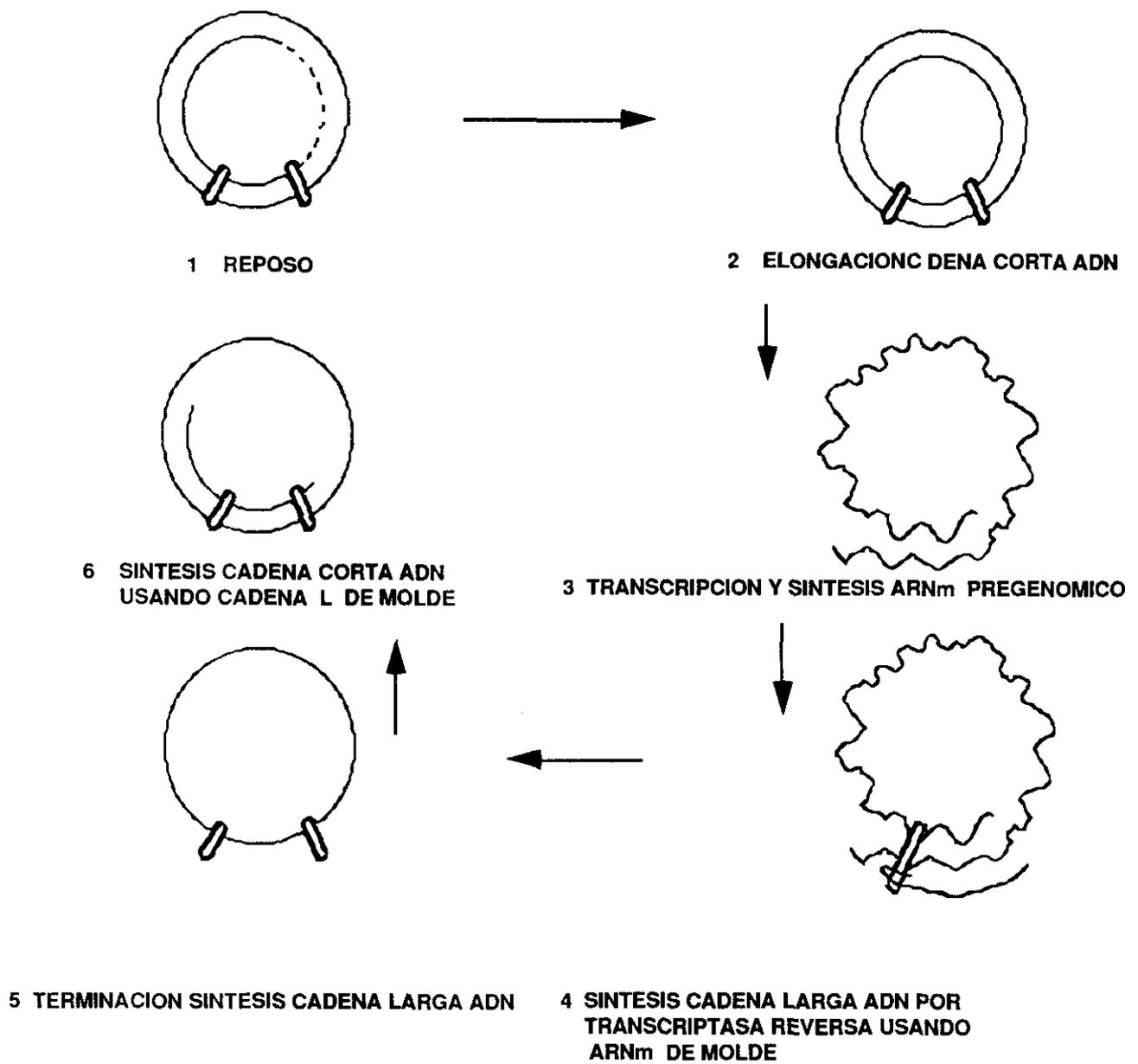
La replicación del VBH (29) comienza por la elongación de la cadena S del ADN debido a la acción de la ADN polimerasa viral, formándose así un ADN bicatenario con estructura circular que se cierra por uniones covalentes (Fig. 9).

A continuación, por medio de una ARN polimerasa celular, se transcribe el ADN, generándose un ARN pregenómico de 3.5 Kb. Este ARN servirá de molde para que se sintetice la cadena L del ADN viral por medio de una transcriptasa reversa viral.

A continuación, se sintetiza la cadena S del ADN viral complementaria de la cadena L.

De forma parecida a los retrovirus, para la transferencia de información desde el ARN al ADN, el virus B de la hepatitis utiliza una transcriptasa reversa para la transcripción de un ARN intermedio. Ello produce un acúmulo de cadena L en el lugar de la replicación, donde será molde para la cadena S.

Las últimas fases de la replicación viral tienen lugar en el citoplasma celular (30-32).



**FIGURA 9. REPLICACION DEL VBH**

### 1.3 PATOGENIA.

#### 1.3.1 ASPECTOS GENERALES

Desde los años 30 y por estudios veterinarios, se sabe que existen enfermedades virales cuya sintomatología aparece bastante después de la exposición al agente etiológico (33).

Para que una infección viral sea prolongada, el virus no debe ser letal para el huésped. Por lo tanto, la selección natural favorece tanto a cepas virales que permiten la supervivencia del huésped como a huéspedes que no son afectados fatalmente por el virus (33).

Los cuadros clínicos resultantes son variados ya que el patrón de persistencia depende tanto del virus como del huésped; es decir, un mismo virus produce cuadros distintos según el huésped.

Hay infecciones en las que el virus es identificable y cultivable, pero en otras en cambio el agente etiológico no se identifica por los métodos habituales de diagnóstico, existiendo incluso casos en los que ni el sistema inmunológico del huésped puede detectarlos (34).

En cualquier caso, el genoma viral completo está presente mientras dura la infección.

La detección de la infección viral mantenida se basa en los efectos citopáticos ocasionados por el virus (elevación de las transaminasas), en los cambios serológicos de tipo inmunológico (positividad antígeno/anticuerpo) y en la identificación tisular de la expresión de proteínas virales (inmunohistoquímica).

En aquellos casos en que ninguno de esos métodos consiga detectar la infección, la hibridación de ácidos nucleicos se revela especialmente útil por ser capaz de evidenciar incluso genoma viral incompleto o inactivo (35).

Se produce una infección latente o prolongada cuando virus no citolíticos infectan células "permissivas" (permiten la replicación) o células "semi o no permissivas" susceptibles de ser transformadas por el virus (36).

Algunos virus ADN y retrovirus son capaces de insertar su material genético en el genoma del huésped, lo que se denomina integración (37).

Aún en el caso de que sólo parte del genoma viral sea insertado en el genoma del huésped, su efecto puede ser considerable aunque no se detecte otra forma de expresión viral

(serológica o tisular) o ésta sea muy pequeña.

En el caso de que el genoma viral se integre en el ADN del huésped, la infección será transmisible por el óvulo o espermatozoide (33).

Una consecuencia de la infección viral prolongada es la transformación neoplásica. Factores que influyen en el desarrollo de la neoplasia son: la edad en el momento de producirse la infección, la competencia inmunológica del huésped, y la integración del genoma viral.

Posiblemente, la integración actúe activando oncogenes tras la inserción de secuencias virales reguladoras (38).

### 1.3.2 ASPECTOS ESPECIFICOS DEL VIRUS B

Se conocen dos tipos de infección por el VBH: transitoria y prolongada.

En la infección transitoria o aguda, la respuesta inmunitaria del huésped resulta en la curación de la hepatitis y la eliminación del virus.

En la infección prolongada, el sistema inmunitario del huésped no puede eliminar el virus. El ADN viral acaba incorporándose a las células del huésped después de un tiempo relativamente largo de portador.

En consecuencia, la infección prolongada se traduce clínicamente en hepatitis crónica, cirrosis y posiblemente hepatocarcinoma (39-41).

Por lo tanto, es importante distinguir entre ambos tipos de infección y para ello se ha usado, entre otros métodos, el título del anticuerpo contra el core (Anti-HBc), especialmente si es de tipo IgM que es positivo en la infección aguda y en la crónica con replicación viral activa (42).

Existe evidencia de que el VBH no es directamente citopático sino que la lesión hepática es mediada por la inmunidad celular dirigida contra hepatocitos que expresan simultáneamente un antígeno HLA de clase I y el HBcAg (43-45).

Recientemente se han reconocido como más directos mediadores de la citólisis a linfocitos T CD8+ activados, que expresan la molécula inductora de activación (activation-inducer molecule, AIM), los cuales se han localizado en las zonas portal y periportal de hepatitis crónicas en relación con las áreas de necrosis hepatocelular (44).

El papel del sistema inmunitario en la infección prolongada por el VBH ha sido también demostrado al observar que enfermos infectados y a su vez tratados con inmunosupresores y/o quimioterapia sufren un daño hepático agudo cuando se suprime la inmunosupresión.

Se explica este fenómeno por la supresión del sistema inmunitario secundaria al tratamiento, lo que facilita la replicación viral y resultando en un gran número de hepatocitos infectados. Al volver la inmunocompetencia del huésped a la normalidad, se observa una mayor defensa contra el virus con la consiguiente citolisis de los hepatocitos infectados (46,47).

La propia infección prolongada por el VBH provoca también trastornos de naturaleza inmunológica, mediados sobre todo por el depósito de inmunocomplejos, reconociéndose entre ellos la enfermedad del suero, algunas glomerulonefritis, y una forma de periarteritis nodosa (48).

Aunque el VBH manifiesta un tropismo selectivo por el hígado, como todos los hepadnavirus, debido a la facilitación para la replicación y expresión genética que ofrece el hepatocito maduro y diferenciado (49), otros tejidos pueden también ser infectados. De hecho, tanto en enfermos con serología del VBH positiva como, incluso, en enfermos con serología negativa, se ha detectado el virus en distintos órganos, con un patrón de expresión del genoma

viral libre o integrado según los casos (50).

Las consecuencias de la infección extrahepática todavía hoy no son del todo conocidas. El hecho de que el virus tenga capacidad replicativa o infectiva podría ser la causa de la transmisión vertical, puesto que ha sido ya demostrada la existencia de ADN viral libre en el semen, tanto en sus células sanguíneas como en los espermatozoides (51-53).

Estudios sobre el ADN viral practicados en portadores del VBH demostraron que su distribución puede presentar dos formas distintas. Una de 3.300 pares de bases, correspondiente al genoma viral completo y a toda la longitud de su estructura bicatenaria. La otra, de 2.000 a 2.800 pares de base (como el ADN de la partícula Dane) en que una de las cadenas de la estructura bicatenaria, aunque completa, presenta una discontinuidad, mientras que a la otra cadena le falta del 15 al 50% de su secuencia complementaria (40).

Según el patrón de hibridación de electroforesis en gel, se distinguió en los portadores de larga evolución un área difusa en la zona de alto peso molecular indicativa de una integración difusa del genoma viral en el genoma del huésped, no hallándose en estos casos ADN viral libre. Todo lo contrario sucede en enfermos con una historia corta de infección por VBH, donde prácticamente todo el ADN viral aparece en forma libre o episómica (54).

La integración del ADN del VBH ocurre por tanto en el curso de la infección viral prolongada y precede el desarrollo de neoplasia, favoreciendo probablemente, que subpoblaciones hepatocitarias se transformen en clones que contienen ADN viral integrado en sitios específicos (54).

En este sentido se han observado tres tipos distintos en las formas de integrarse el ADN del VBH, con incorporación de cantidades variables de genoma viral, y que producen desde microdelecciones a delecciones groseras en los cromosomas (55).

Con el método de hibridación de Southern blot, se han identificado dos patrones de ADN viral libre; uno replicativo y otro no replicativo. Asimismo, se han identificado dos patrones de ADN viral integrado; la forma integrada clonal y la forma integrada al azar (56).

Al relacionar estos datos con la patología hepática, se observa que a mayor integración corresponde menor actividad necroinflamatoria de la hepatopatía, así como un estado evolutivo más avanzado de la misma. Así, cuando se desarrolla hepatocarcinoma en hígados infectados por VBH, la enfermedad hepática acompañante es siempre avanzada (hepatitis crónica activa-cirrosis) (56).

La forma integrada del ADN viral se encuentra frecuentemente en la infección crónica en estadio de seroconversión a anti-HBe, o

de bajo nivel de replicación viral, y usualmente en carcinoma hepatocelular y en líneas celulares derivadas del hepatocarcinoma (57-59).

Con un método muy sensible de detección de ácidos nucleicos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ha demostrado la presencia de genomas transcripcionalmente activos del VBH en enfermos con hepatocarcinoma que eran HBsAg negativos. Todo ello, además de corroborar la asociación del VBH con el hepatocarcinoma, demuestra la necesidad de mantener una actitud crítica ante la sensibilidad de los métodos de detección de esta infección (60-63).

El mecanismo por el que el VBH induciría el carcinoma hepatocelular sigue siendo tema de debate. Se ha propuesto la posible existencia de dos tipos de hepatocitos en el huésped: los S, más maduros con pérdida casi completa de su capacidad de reproducirse y cuya infección conllevaría escasas consecuencias dado que su fin es morir, y los R, menos maduros y con capacidad reproductora, aunque resistentes a la infección por VBH, podrían infectarse cuando la exposición es prolongada, haciendo posible la integración del material genético viral (64).

Si esta integración se produce próxima a un gen regulador del crecimiento y lo activa, ello da lugar a la producción de un clon celular, posiblemente maligno (64).

#### 1.4 VBH Y CANCER

Estudios epidemiológicos realizados en Asia y Africa sugirieron la posibilidad de que un virus pudiera ser o estar relacionado con el agente o agentes etiológicos del hepatocarcinoma. En ese tiempo, los únicos agentes reconocidos como causantes de dicho cancer, tanto clínica como experimentalmente, eran el alcohol y los carcinógenos químicos (65,66).

Hoy se sabe que, en realidad, el VBH no es el único agente implicado en el desarrollo del hepatocarcinoma, ya que ciertos agentes químicos (polucionantes, micotoxinas, esteroides) pueden inducirlo, así como ciertos procesos patológicos como la cirrosis (ya sea alcohólica, secundaria a hemocromatosis, por déficit de  $\alpha$ -1-antitripsina, etc).

Diversos estudios epidemiológicos establecieron que existía una relación entre áreas donde la infección por el VBH era endémica y la incidencia de carcinoma hepatocelular era elevada.

En estas áreas, que incluyen el Oriente Medio, Asia sur-oriental, China, Japón y Africa sub-sahariana, existen de 25 a 100 casos de hepatocarcinoma por cada 100.000 muertes y, a pesar de la controversia establecida al respecto, la evidencia epidemiológica

favorece la existencia de una relación causal entre el VBH y el carcinoma hepatocelular (67-71).

Estas conclusiones fueron reforzadas por la aplicación de técnicas inmunológicas. De tal forma, que los títulos de Anti-HBc más altos se encontraron en enfermos con hepatocarcinoma en las áreas de Hong Kong, Africa occidental, USA y Japón. Ello permitió establecer una probabilidad del 24 % para desarrollar hepatocarcinoma en aquellos casos en que el título de Anti-HBc era superior a  $2^{10}$  U. Por el contrario, si dicho título era inferior a  $2^9$  U., la probabilidad disminuía al 5 - 7% (72,73).

Aparte de las evidencias epidemiológicas, como la ya mencionada correlación geográfica que existe entre la prevalencia de positividad para el HBsAg y la incidencia de hepatocarcinoma (74), se han obtenido resultados positivos de los estudios realizados en animales de experimentación.

Así se ha observado activación del oncogen N-myc en la infección de la marmota mona por su hepadnavirus específico, al igual que en otras especies animales (75).

La aplicación de técnicas inmunológicas al estudio de los tejidos apoyó también las mismas observaciones, ya que los carcinomas hepatocelulares muestran una mayor frecuencia de positividad para el HBsAg, así como, aunque más raramente, para el

HBcAg (76-78).

La aplicación de técnicas de biología molecular demostró también la relación entre el VBH y el hepatocarcinoma al detectar ADN viral en cultivos de células tumorales (79,80) y, posteriormente, en suero y tejido de enfermos (81,82).

Por medio de esos métodos de diagnóstico tan sensibles, se demostró también ADN viral incluso en enfermos cuya serología para el HBsAg era negativa. En estos casos el número de copias de genoma viral por célula era inferior al de los pacientes que tenían serología positiva (83). Además se observó el origen clonal de los hepatocarcinomas, la capacidad mutagénica del VBH al aumentar la expresión del receptor para el ácido retinoico, y la integración de su genoma en el gen Cyclin A, importante en el control de la división celular y cuya disrupción pudiera contribuir a la carcinogénesis (84-86).

Se acepta por tanto uniformemente la relación causal entre VBH y carcinoma hepatocelular, considerándose actualmente que en áreas de alta prevalencia de infección por el VBH el 80% de los carcinomas primarios de hígado son la consecuencia directa de la infección por este virus (87,88).

Actualmente, el reto se cifra en evaluar el riesgo de desarrollo del cancer. Para ello, se ha trabajado especialmente

para valorar el significado de los datos serológicos, observándose que la positividad para HBsAg es indicadora de alto riesgo (38,89) así como la positividad con título alto para el Anti-HBc (64,90-91).

También se ha tratado de establecer alguna correlación entre displasia hepatocelular y la expresión del HBsAg, si bien los resultados son controvertidos, no aceptándose todavía de manera general el significado premaligno de esta asociación (92-94).

Asumida la relación entre el VBH y el hepatocarcinoma, no es sorprendente que dichos tumores sean usualmente monoclonales y que muestren un patrón integrado del ADN viral, si bien desconocemos el papel exacto que desempeña dicha integración (95,96).

Se supone que la integración del ADN viral en el genoma del huésped puede modificar la expresión genética, tanto por reajuste cromosómico (chromosomal rearrangement) como por provocación de una mutagénesis por inserción (97). El HBxAg podría actuar como un factor transactivador en los genes celulares asociados con la transformación maligna (98).

El hecho de que se produzca integración del ADN viral en el huésped no excluye que el virus persista en su actividad replicativa y de expresión de proteínas, habiéndose demostrado virus completos en células de hepatocarcinomas, así como expresión

de HBsAg y HBcAg, aunque la expresión antigénica de los hepatocarcinomas puede ser variada (99-100).

El tiempo de evolución necesario para la transformación maligna suele ser superior a 20 años. En los niños, contrariamente, se ha observado un período de latencia corto que oscila alrededor de los 7 años. Dicha reducción sugiere una integración del genoma viral en un estadio precoz de la infección lo que estaría favorecido en caso de transmisión vertical (101-103).

#### 1.5 RECUERDO HISTOPATOLOGICO DE LAS LESIONES INFLAMATORIAS INDUCIDAS POR EL VBH

##### 1.5.1 FORMAS O TIPOS DE LESION HEPATOCELULAR

El daño hepatocelular es la vía final común de la defensa inmunitaria del huésped tras la infección viral.

Aunque se detectó un anticuerpo dirigido contra una lipoproteína específica de la membrana hepatocitaria (83), la inmunidad celular juega un papel de máxima importancia en la actividad necroinflamatoria de las lesiones hepáticas; de hecho, la presencia de linfocitos T8 activados en los espacios portales y periportales en proporciones estadísticamente significativas es altamente sugestiva de su papel citotóxico local (44).

Los cambios histológicos básicos son la degeneración y necrosis intralobular, la necrosis periportal (necrosis erosiva o piecemeal necrosis) y en puentes, la inflamación portal y la fibrosis.

Dependiendo de la distribución e intensidad de estas lesiones, así como del tiempo de evolución, distinguimos entre hepatitis aguda, hepatitis residual, hepatitis crónica lobulillar, hepatitis crónica persistente, hepatitis crónica activa y cirrosis.

La hepatitis aguda se caracteriza por exudado linfocitario portal acompañado de degeneración balonzante hepatocitaria centrozonal así como necrosis focal con formación de cuerpos eosinófilos intralobulillares.

La hepatitis residual muestra cambios parecidos a la hepatitis aguda si bien menos intensos, observándose un tabicamiento perilobulillar discreto y fagocitos con pigmento pardo. Este cuadro puede mantenerse varios meses en evolución.

La hepatitis crónica lobulillar se parece también a la hepatitis aguda en que los cambios predominantes son la degeneración hepatocelular centrozonal y necrosis focal, con menor componente inflamatorio portal.

La hepatitis crónica persistente muestra característicamente

un exudado inflamatorio portal que no desborda la placa o membrana limitante del mismo y puede acompañarse de necrosis focal intralobulillar.

En la hepatitis crónica agresiva el infiltrado inflamatorio portal desborda la placa limitante, adentrándose entre los hepatocitos periportales y acompañándose de necrosis de los mismos, con colapso de la reticulina que los soporta y fibrosis secundaria en cantidad variable.

La cirrosis muestra una total desorganización de la arquitectura hepática, con una combinación de necrosis, fibrosis y regeneración hepatocelular.

Con la intención de obviar la subjetividad en la valoración de las lesiones fundamentales antes descritas, se ha construido una escala de valores donde cada dato recibe una puntuación específica según sus características, y cuya suma da un índice de actividad de la lesión hepática (104).

#### 1.5.2 ASPECTOS HISTOQUIMICOS

También las tinciones inmunohistoquímicas han permitido observar patrones especiales según el grado de actividad de la enfermedad.

La mayor positividad tisular nuclear, citoplasmática o mixta a los antígenos virales corresponde a los casos de menor actividad necroinflamatoria. Dichas tinciones son más positivas en hepatocitos morfológicamente normales. Los hepatocitos en degeneración y aquéllos próximos a los focos inflamatorios, en cambio, no contienen antígenos virales tingibles ni ADN viral (105,106).

Esto induce a pensar que la inmunidad celular es ajena a la replicación viral y a la expresión de antígenos intranucleares e intracitoplásmicos, siendo en cambio efectiva cuando a nivel de la membrana citoplásmica se expresan conjuntamente el HBcAg y los antígenos de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA I) (44).

El reconocimiento de síntesis de ADN viral en el citoplasma de hepatocitos de algunas formas de hepatitis crónicas subclínicas, sin evidencia por inmunohistoquímica de positividad para el HBsAg ni para el HBcAg, sugiere que la detección de ADN viral puede ser un método más sensible para reconocer la existencia de infección por VBH (107).

La asociación entre el tiempo de evolución de la infección y la pérdida de positividad para el HBsAg permite suponer que la probabilidad de eliminar la infección crónica es mayor cuanto más precozmente ésta sea tratada. Es decir, que el tratamiento en fases

en que el ADN viral existe sobre todo, si no exclusivamente, en estado libre o episómico (no integrado) permite mayores probabilidades de resolución.

Los tratamientos actuales, basados en el uso de Interferón  $\alpha$  recombinante consiguen una seroconversión de HBeAg a anti-HBe y la pérdida sostenida de VHB-ADN detectada por PCR en un alto porcentaje de enfermos, así como la desaparición, aunque en menor porcentaje, de la positividad del HBsAg, lo que indica la terminación del estado de portador. Es de suponer que esto se traducirá en una disminución del riesgo y, por tanto, de la incidencia de hepatocarcinoma (108,109).

## 1.6 SOBRE LA HIBRIDACION

### 1.6.1 GENERALIDADES

Los avances en inmunología y biología molecular han provisto a la ciencia médica de nuevas y poderosas herramientas para mejorar el conocimiento de las enfermedades y para facilitar el diagnóstico de las mismas.

Así como con los procedimientos clásicos se observa la

estructura de los órganos, tejidos y células, con los métodos citoquímicos se logran visualizar carbohidratos, aminoácidos, etc. Con la inmunohistoquímica, nos acercamos a la localización de proteínas y otros constituyentes a nivel celular y subcelular, observándose así los productos de la información genética.

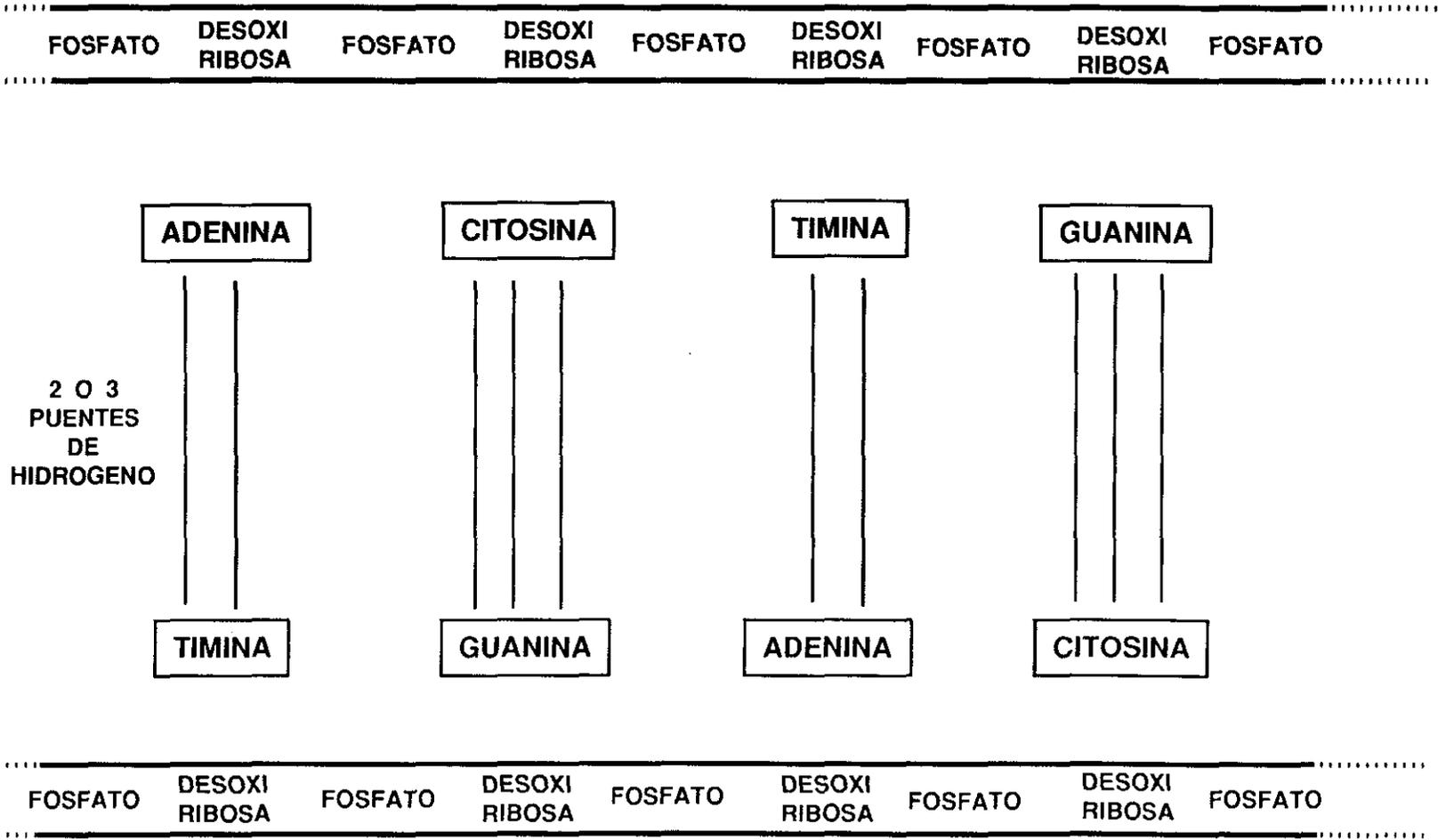
Se aumentan nuestros conocimientos con la posibilidad de estudiar los ácidos nucleicos, tanto en los estudios de bandas en cromosomas como al poder distinguir el ADN del ARN con la reacción de Feulgen.

El último avance de la biología molecular y su transferencia al laboratorio es la aplicación de la tecnología de los ácidos nucleicos desde la investigación básica a la investigación clínica.

En su estado natural, el ADN está formado por dos cadenas de nucleótidos dispuestas en forma helicoidal. Cada nucleótido de una de las cadenas se une específicamente a su nucleótido complementario de la cadena opuesta a través de puentes de hidrógeno entre las moléculas de desoxiribosa fosfato, siendo la Timidina (T) complementaria de la Adenina (A) (Uridina (U) en caso de ARN) y la Guanina (G) complementaria de la Citosina (Ci) (Fig. 10).

El fenómeno de la hibridación molecular se basa en que la desnaturalización de los ácidos nucleicos es un proceso reversible

FIGURA 10. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL ADN



y que los fragmentos unicitenarios de ADN y ARN forman complejos estables o híbridos a través de uniones de hidrógeno entre bases complementarias (110-114).

Dicha técnica aplicada in situ, además de extender la visión de la enfermedad desde el nivel fenotípico al genotípico, facilita la correlación con los cambios morfológicos (115), pudiendo también detectar ARN mensajero, el cual puede estar presente en la célula en mayor cantidad que el ADN (116).

El método inicial de la hibridación in situ se basó en parámetros aplicables a medios líquidos y con sondas radiactivas, usándose para caracterizar la organización de ADN satélite en cromosomas de ratón y en preparaciones citológicas (117-120).

Las modificaciones recientes al método original permiten trabajar en medios sólidos, con material fijado en formol e incluido en parafina. Además, el uso de sondas biotiniladas y su detección colorimétrica facilita tanto el procedimiento como el almacenaje y la reproductibilidad, evitando los problemas y riesgos inherentes a la sonda radiactiva (121,122).

En el campo de la virología, la hibridación en cualquiera de sus formas (Dot blot, Southern blot o in situ) demuestra mayor sensibilidad que los métodos convencionales de detección viral, ya que éstos detectan determinantes antigénicos que pueden estar

ausentes o deteriorados por el procesamiento de la muestra. Aún más, en los casos de infección viral latente, los ácidos nucleicos pueden estar presentes pero sin que sus antígenos sean expresados.

La hibridación detecta ADN viral libre e integrado, así como su ARN mensajero transcrito, que no se alteran por el procesamiento de la muestra (35,123).

La hibridación in situ (HIS) es por tanto particularmente adecuada para el diagnóstico de la infección viral, incluso cuando dicha infección está clínica e histológicamente oculta, permitiendo estudiar el papel patogénico que juegan los virus en las enfermedades crónicas y la búsqueda de soluciones para problemas importantes en Biología y Medicina (122,124,125).

Esta adecuación se apoya tanto en la especificidad de la reacción como en su sensibilidad.

La especificidad, aparte de las consideraciones teóricas derivadas de la estructura de los ácidos nucleicos y sus afinidades naturales, ha sido comprobada usando síncronamente las técnicas de HIS e hibridación con electroforesis (Dot blot y Southern blot) (126).

La sensibilidad, gracias al uso de sondas biotiniladas y sistemas de detección con complejos de Avidina-Biotina o

Streptavidina-Biotina que producen escasa tinción inespecífica (background noise, ruido de fondo) y mayor amplificación de la señal, es tal que se han llegado a detectar incluso sólo cinco copias de secuencias de ADN, observándose la señal citoplásmica más proxima a la membrana nuclear. En los casos en que la señal es nuclear, ésta se observaba más intensa en la vecindad de la membrana nuclear (127).

#### 1.6.2 FABRICACION DE LA SONDA

El elemento primordial para realizar la hibridación es la sonda.

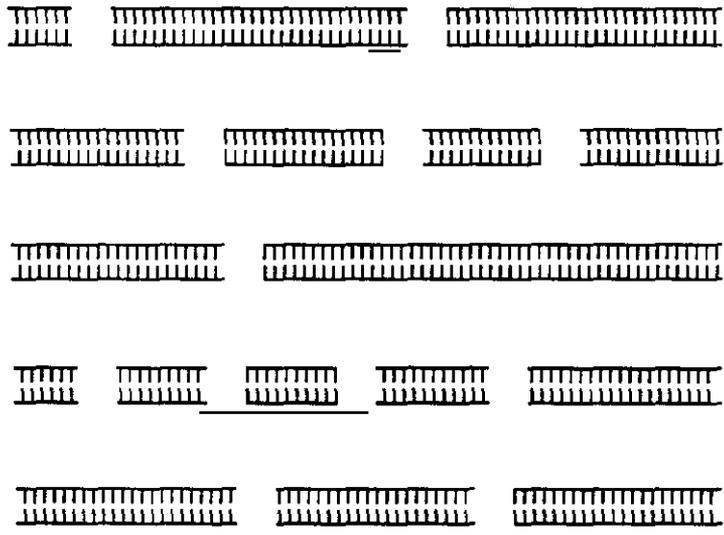
Se denomina sonda, en el campo de la biología molecular, a un fragmento o mezcla de fragmentos de ADN o ARN de longitud variable cuya única similitud es el estar marcados con un dispositivo (radiactivo o biológico) detectable por el investigador (placa sensible o microscopio).

Su fabricación comienza con el aislamiento, bien a partir de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción (endonucleasas) o bien a través de ARN mensajero que fabrique el ADN complementario, del fragmento genético deseado (Fig. 11).

**ADN BICATENARIO**

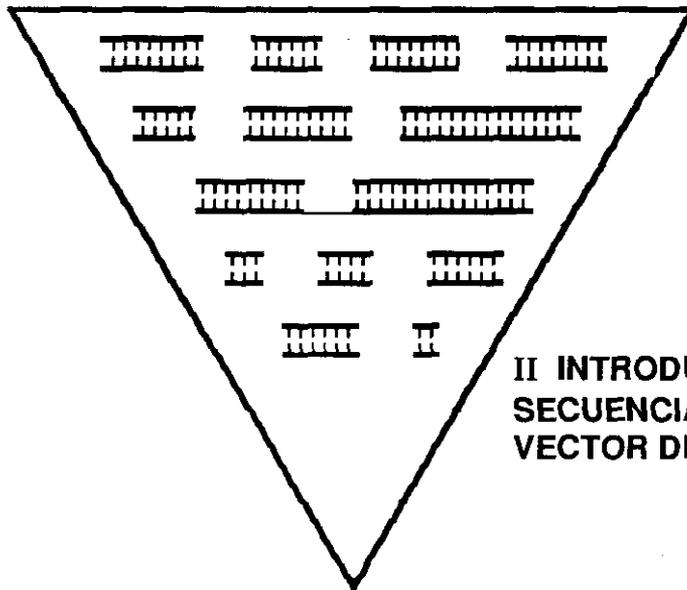


**FRAGMENTOS ADN DERIVADOS DE LA ACCION DE ENDONUCLEASAS**



**VARIAS  
ENDONUCLEASAS  
DE RESTRICCION**

**I. FRAGMENTACION DEL ADN**



**II INTRODUCCION DE LAS SECUENCIAS ELEGIDAS EN UN VECTOR DE CLONACION.**



**FIGURA 11. FASES DE FABRICACION DE LA SONDA**

Su posterior clonación en vectores que se insertan a bacterias y su cultivo a gran escala para su ulterior lisis y purificación del ADN, es la fase de producción (Fig. 12).

El marcaje de la sonda obtenida se hace con medios isotópicos o biológicos. En cualquier caso, se realiza fragmentando la sonda con Desoxirribonucleasa I y posterior reparación con ADN Polimerasa en presencia de nucleótidos marcados.

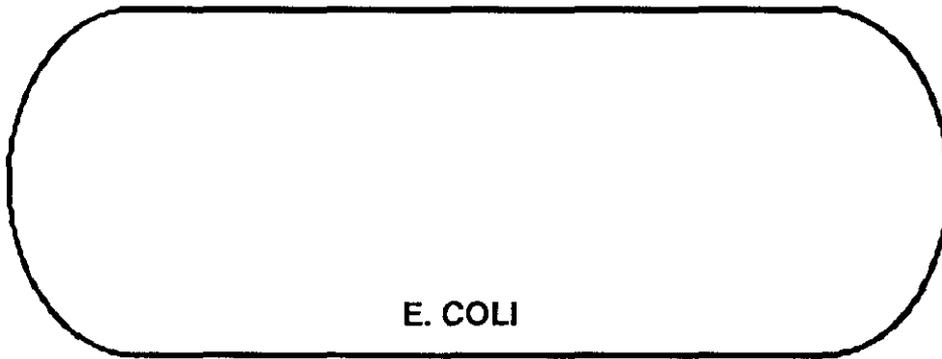
En el caso de los medios biológicos se usan compuestos biotinilados derivados de la Uridina trifosfato y Deoxiuridina trifosfato y que se denominan Bio-11-UTP y Bio-11-dUTP y que en la acción de marcaje se sitúan en lugar de la Uridina (UTP) y Timina (TTP), de las cadenas previamente fragmentadas, de ARN y ADN respectivamente (Fig. 13) (110,123.128).

### 1.6.3 PROCESO DE HIBRIDACION

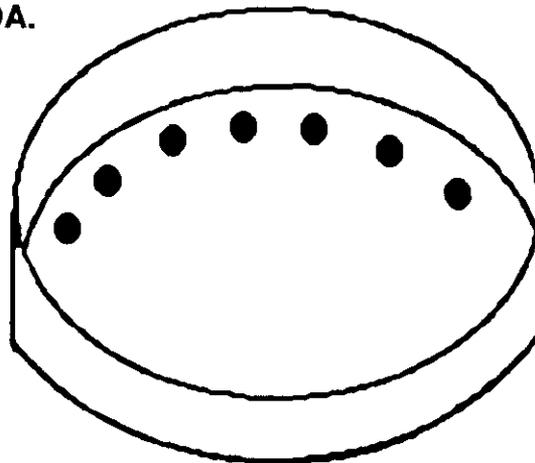
Para que la sonda pueda hibridar con los ácidos nucleicos nativos es necesario liberar los mismos y desnaturalizarlos.

La liberación de los ácidos nucleicos se consigue por digestión con enzimas que liberan el ADN y ARN nativos, con la precaución de que no estén contaminados por nucleasas que destruirían los ácidos nucleicos. Se suele añadir ácido etilén

3. INSERCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO EN LA BACTERIA HUESPED POR EL PROCESO NORMAL ( ADSORCIÓN DEL FAGO E INYECCIÓN DEL ADN )



4. FASE DE PRODUCCIÓN DE LA Sonda.

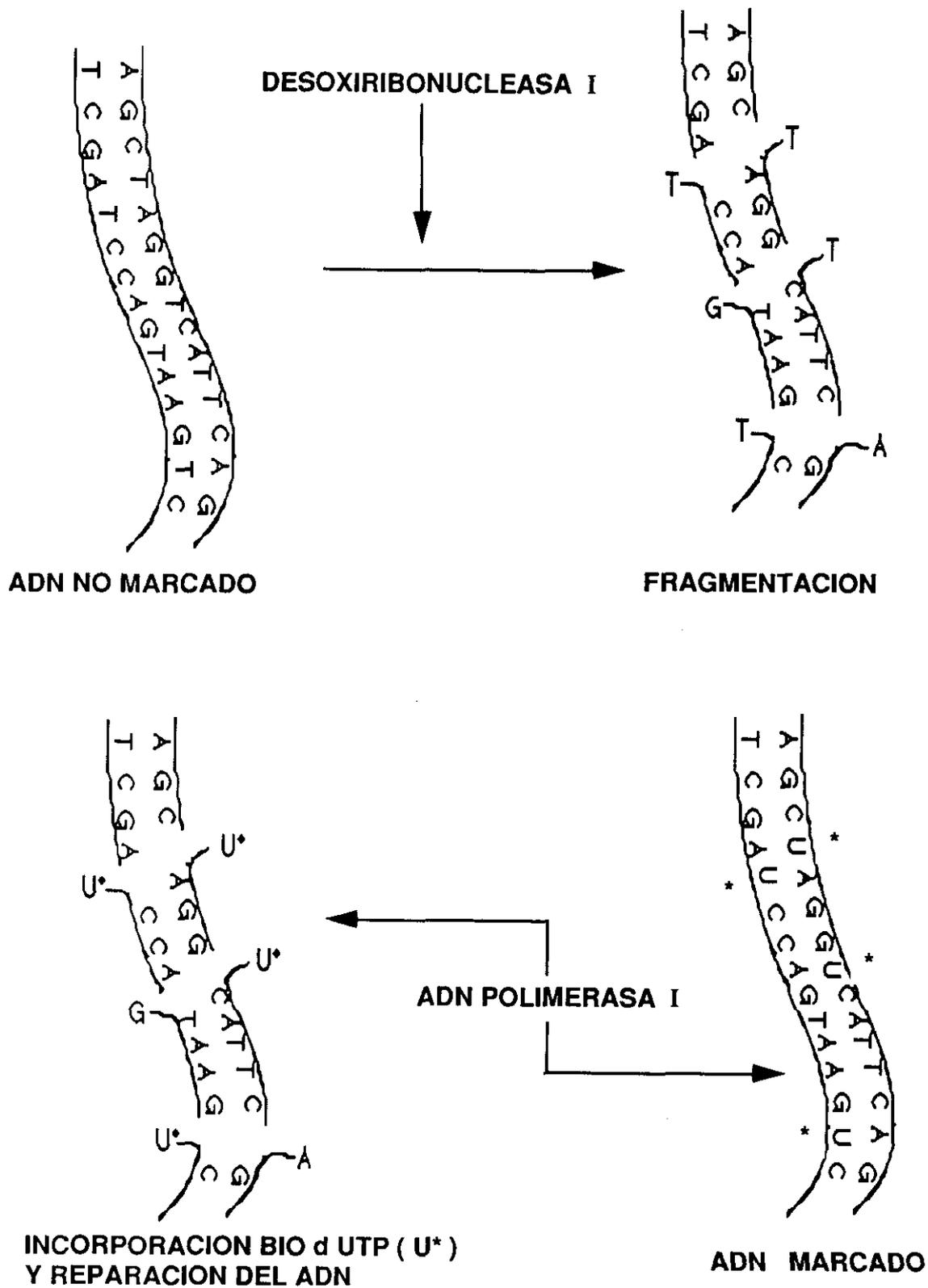


CULTIVO BACTERIANO

FILTRADO Y LISIS DE COLONIAS BACTERIANAS

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN

FIGURA 12. FASES DE FABRICACIÓN DE LA Sonda



**FIGURA 13. MARCAJE DE LA SONDA POR EL METODO NICK TRANSLATION CON BIO - 11 - d UTP**

diamino tetra-acético (EDTA) a altas concentraciones con el fin de bloquear el magnesio iónico necesario para la actuación de posibles endonucleasas contaminantes.

La sonda se añade a continuación a la muestra de tejido y se procede con la desnaturalización de los ácidos nucleicos (Fig. 14).

Es posible realizar la desnaturalización usando temperaturas que rondan los 95° c (123,127,129).

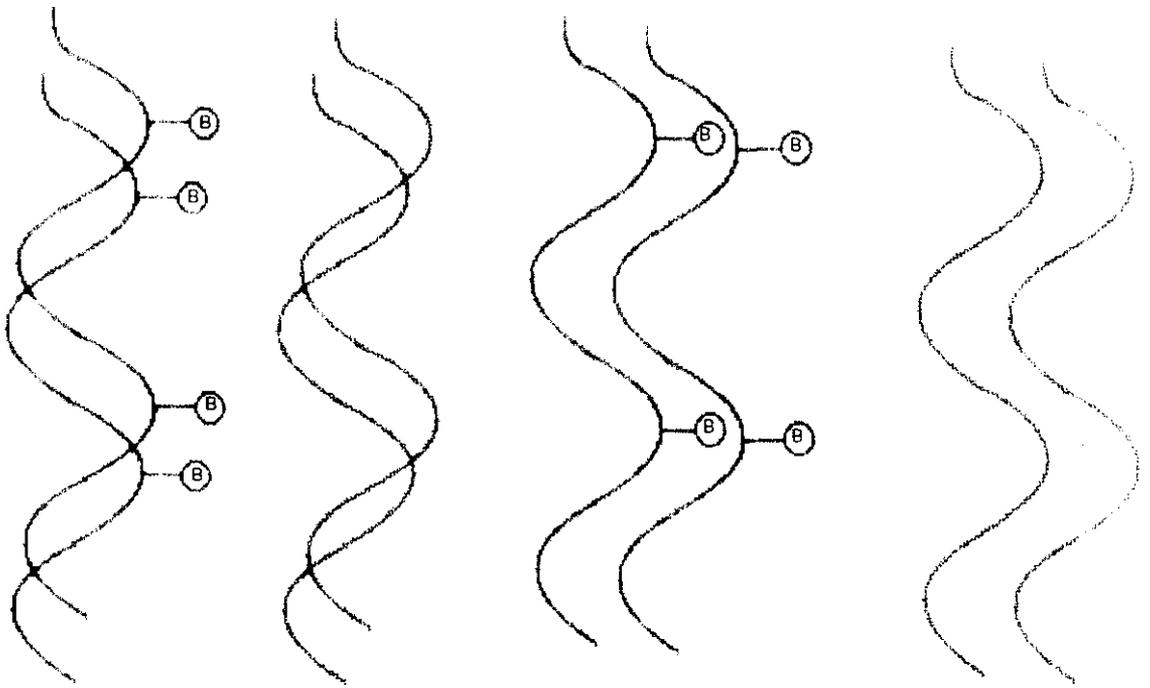
A partir de este momento comienza el proceso de la hibridación, siendo la temperatura óptima para su realización 25°c por debajo de la temperatura de desnaturalización, permitiendo así la formación de complejos híbridos complementados y estables (Fig. 14).

Una vez terminado el proceso de hibridación se añade el complejo de detección que, en el caso de los métodos biológicos se trata de un complejo Avidina-Biotina (ABC), cuya acción se apoya en la gran afinidad que espontáneamente tiene la Avidina por la vitamina Biotina, y que se unirá a la Biotina que marca al dUTP (Fig. 15).

A continuación, tras la adición del cromógeno y su reacción con la peroxidasa, se produce un precipitado coloreado visible al microscopio (Figs. 15 y 16) que se utilizará para la evaluación del

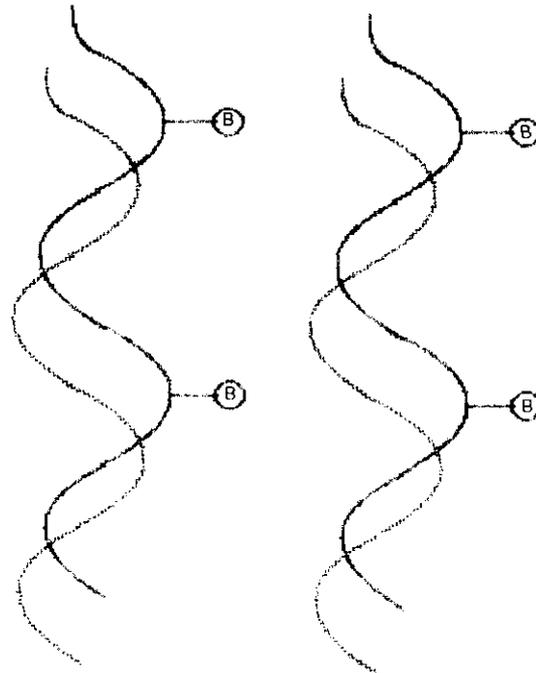
SONDA MARCADA CON  
BIO 11 d UTP  
( — (B) BIOTINA )

MUESTRA A ANALIZAR



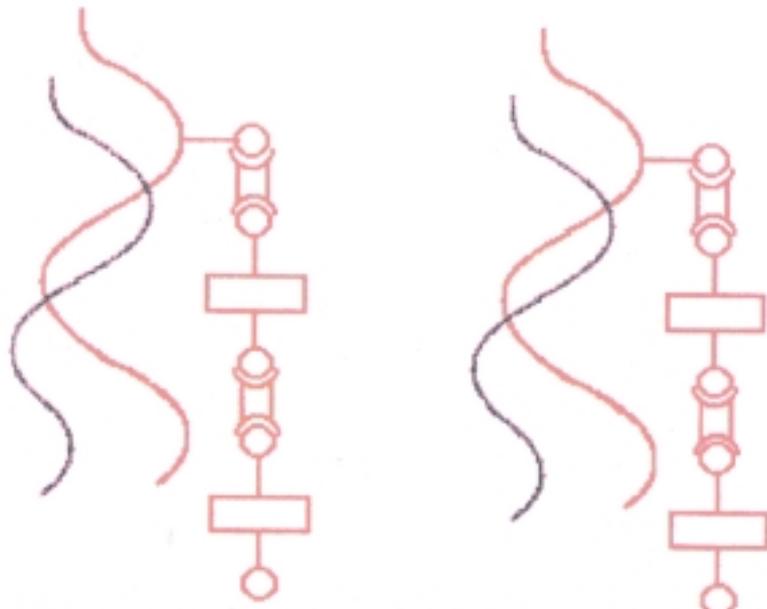
I. ADICION DE LA Sonda  
A LA MUESTRA

II. DESNATURALIZACION

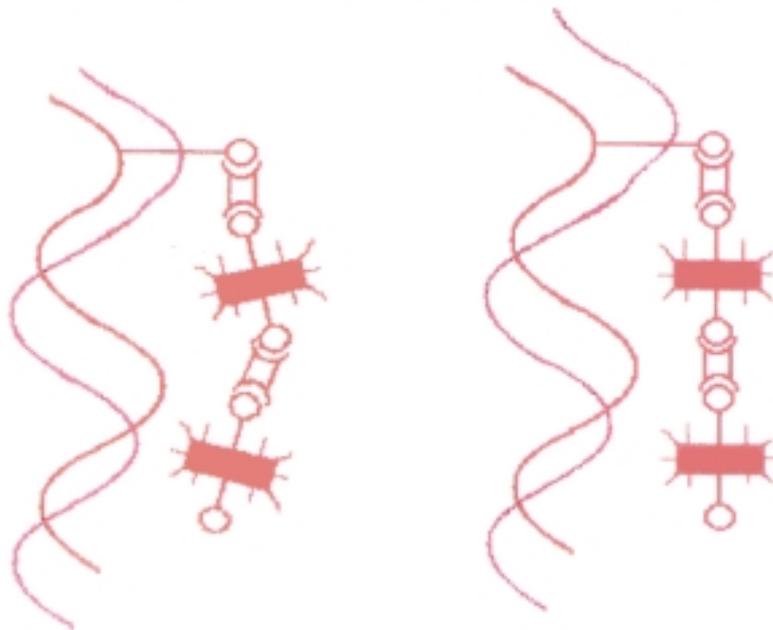


III. HIBRIDACION ENTRE EL ADN DE LA Sonda Y EL ADN DE LA MUESTRA

FIGURA 14. PROCESO DEHIBRIDACION



IV INCORPORACION DEL COMPLEJO DE DETECCION



V REVELADO DE LA PEROXIDASA

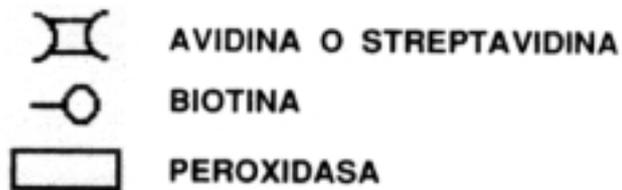
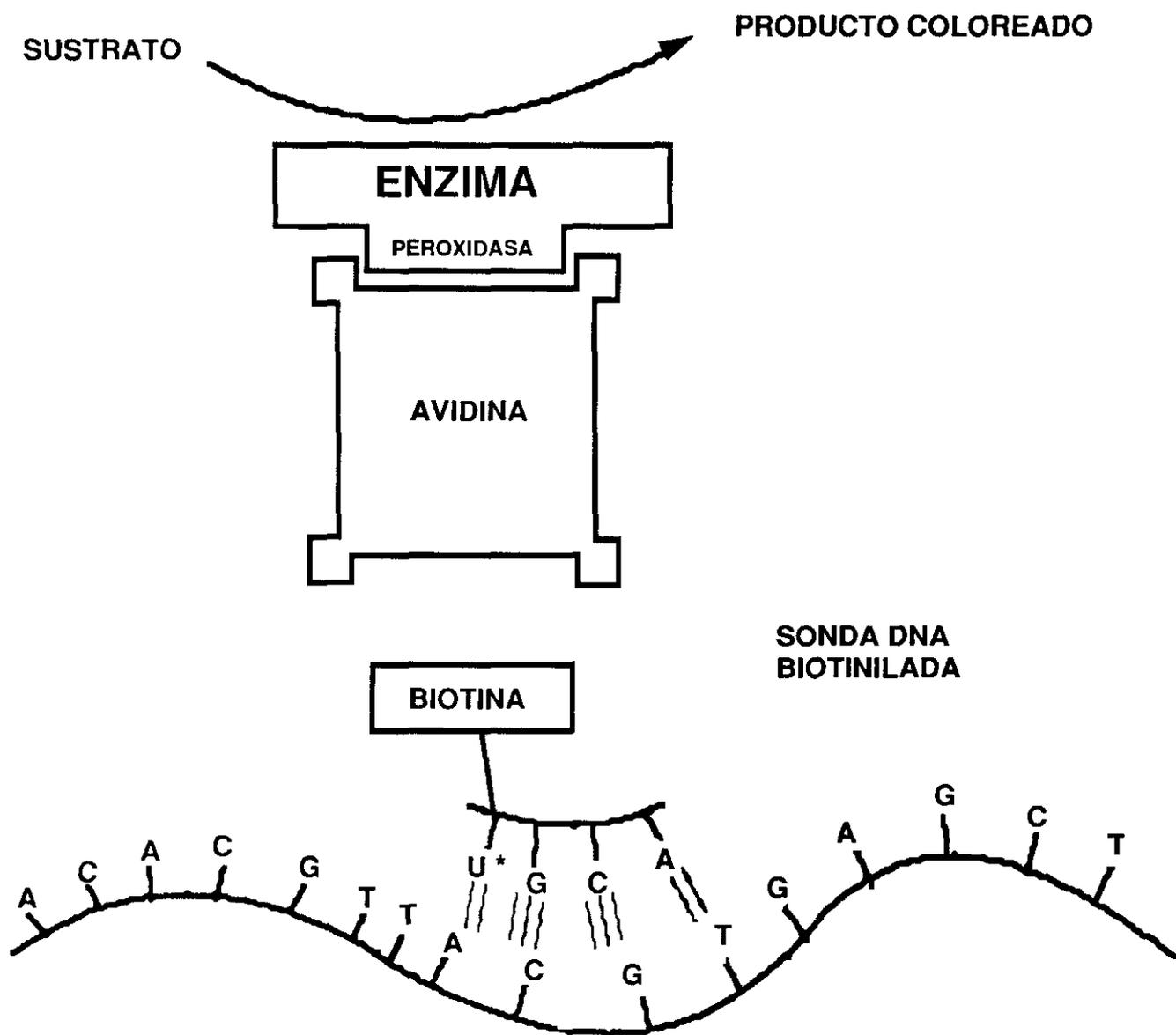


FIGURA 15. PROCESO DE HIBRIDACION:  
INCORPORACION DEL COMPLEJO DE DETECCION POR  
AFINIDAD BIOLOGICA ENTRE BIOTINA Y STREPTAVIDINA



**FIGURA 16. MECANISMO DE HIBRIDACION Y DETECCION CON SONDA ADN BIOTINILADA Y PEROXIDASA**

conjunto de la reacción.

Variaciones en la temperatura durante la reacción de hibridación, así como cambios en las concentraciones de los reactivos posthibridación y en la cantidad de lavados con los tampones, hacen que varíe la especificidad de las uniones complementarias entre los ácidos nucleicos. Este fenómeno se denomina estringencia.

Jugar con dichas variables posibilita estudiar familias de genes o familias de virus que comparten genes, ya que si con alta estringencia la homología entre los pares de bases es próxima al 100%, en condiciones de baja estringencia dicha homología varía del 70% al 90% (130).

#### 1.6.4 ASPECTOS ESPECIFICOS DE LA HIBRIDACION DEL VBH

En el caso particular de la sonda del VBH, el ADN viral se ha obtenido por clonación en *Escherichia Coli* logrando así una sonda de hasta 3.2 kilobases (Kb) (inicialmente marcada con fósforo radiactivo) que hibridaba con ADN extraído del suero o de tejidos infectados. Con la técnica de hibridación de Southern blot se observan dos bandas de hibridación: una de 3.2 Kb, del mismo tamaño que la sonda, que indica ADN viral libre, y otra de mayor extensión

indicadora de ADN viral integrado (131-134).

Cuando se aplica la sonda a tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, la desnaturalización requiere una mayor temperatura que la empleada en los medios líquidos, además de requerir más tiempo. Incluso así, la gran proximidad de los helicoides de ácidos nucleicos en medio sólido favorece que vuelvan a unirse entre ellos en vez de hibridar con la sonda. Con el objeto de evitar ésto, se requiere aumentar aún más la temperatura para favorecer, por un lado una más extensa desnaturalización del ADN in situ, y por otro, la penetración de la sonda en los tejidos (121).

La especificidad de la detección in situ del ADN del VBH con sonda biotinilada ha sido demostrada en estudios doble ciego y correlacionada con métodos de extracción del ADN y posterior electroforesis en gel, encontrándose genoma viral incluso en enfermos con serología negativa para el VBH (135).

Se conjuntan así una serie de factores, como rapidez, sensibilidad y especificidad, que hacen de la HIS uno de los mejores métodos para la detección de la infección por el VBH, llegando a detectarse ADN viral además de en los hepatocitos, en otras células del parénquima hepático, tanto de los ductos biliares como del sistema reticuloendotelial (136-139).

Una de las más importantes características distintivas de la

HIS para el estudio de la infección por el VBH, es que mediante esta técnica se detectan ácidos nucleicos virales en el citoplasma de los hepatocitos, lo que es debido a la formación de híbridos tanto de ADN-ADN como de ADN-ARNm, no pudiendo distinguirse si el ADN está integrado o libre (140).

Ya que la replicación del ADN de los hepadnavirus se hace de forma asimétrica por transcripción reversa de un ARN intermedio, se produce una acumulación grande de la cadena L o (-) en el lugar de la replicación, que sirve de molde para que la ADNp viral fabrique la rama S o (+) (31,116,141).

Son pues más fáciles de detectar los ácidos nucleicos episómicos en replicación, ya que existen en gran número. En cambio la detección de ácidos nucleicos integrados requiere métodos muy sensitivos capaces de detectar un número escaso de copias del genoma viral (142).

La positividad se observa en un número variable de células y la tinción citoplásmica tiene acentuación ocasional en áreas perimembranasas (107).

Dentro del lobulillo hepático se han distinguido dos patrones de distribución (ambos independientes del número de células positivas). Uno focal y en parte periportal que se correlaciona con mayores cambios inflamatorios, y otro de distribución difusa

(107,135).

La aplicación clínica de este método puede tener varias vertientes, según se sugiere en los diferentes estudios mencionados (31,110,111,116,123-125,141,142).

Su sensibilidad y especificidad parecen ser mayores que los métodos inmunohistoquímicos habituales.

La morfología puede evaluarse simultáneamente a la reacción de detección, pudiendo relacionarse el grado de lesión y los cambios histopatológicos del tejido y dentro de los cambios histopatológicos, la localización celular e incluso subcelular de la tinción.

Permite la diferenciación entre posibles clones de células afectadas y no afectadas por el VBH.

Utilización de pequeños fragmentos de tejido, por lo que se puede aplicar a las biopsias hepáticas sometidas previamente a los procedimientos diagnósticos de rutina, sin necesidad de exploraciones o molestias adicionales para el paciente.

Posibilidad de usar tejido fijado en formol e incluido en parafina, permitiendo el uso de material de archivo.

## 2. OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

1. Caracterizar o definir si los enfermos con serología positiva para el VBH tienen o no lesión en la biopsia.

2. Montaje, puesta a punto y reproductibilidad de la técnica de "Hibridación in situ".

3. Definición de los patrones de tinción.

4. Correlación de la tinción tisular del ADN con los marcadores serológicos y tisulares del VBH.

5. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la técnica de hibridación in situ en relación con los métodos actualmente disponibles.

Definir la eficacia de las HIS para detectar infección por el VBH en hepatopatías crónicas con marcadores serológicos dudosos.

7. Evaluación de la utilidad de la técnica en la valoración del papel del VBH en el desarrollo del carcinoma hepatocelular.

### 3. MATERIAL Y METODOS

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 SELECCION DE ENFERMOS

Se han elegido para este estudio 142 biopsias hepáticas procedentes de 136 pacientes (6 con doble biopsia) que se estudiaron en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Comarcal San Agustín de Linares entre los años 1980 y 1991.

Los pacientes acudieron unos por sintomatología de enfermedad hepática, otros procedentes de revisiones de empresa con transaminasas elevadas o del Servicio de Donantes de Sangre y que presentaban hipertransaminasemia o algún marcador serológico positivo de infección por VBH.

Ocasionalmente, el paciente provenía del Servicio de Cirugía donde se encontró accidentalmente patología hepática a raíz de una laparotomía exploradora de urgencias.

En algunos casos, el tejido procedió de autopsias, en su mayoría de enfermos fallecidos por causa de carcinoma hepatocelular.

De estos pacientes, 101 se eligieron por tener evidencia serológica de contacto con el VBH, 25 por tener marcadores totalmente negativos para el VBH en suero y que se utilizaron como controles durante la realización de la técnica, y 16 que tenían algunos marcadores séricos negativos y el resto parcialmente determinados.

De los 136 pacientes, 81 (59.56%) eran varones y 55 (40.44%) mujeres y su edad estaba comprendida entre los 20 y los 84 años (media 52 años).

### 3.2 ESTUDIOS BIOQUIMICOS E HISTOLOGICOS

Aparte de la evaluación clínica, se hizo una evaluación bioquímica que incluyó los parámetros habituales que realizan los analizadores automáticos y que aunque variaron a lo largo de los años, siempre incluyeron determinaciones de urea, glucosa, ácido úrico, bilirrubina, proteínas totales, albúmina, SGOT, SGPT, Fosfatasa alcalina, LDH,  $\gamma$ GT, colesterol y triglicéridos, además de realizar en los casos clínicamente indicados Antígeno Carcinoembrionario (CEA) y  $\alpha$ -Feto Proteína.

Los marcadores serológicos del VBH realizados fueron HBsAg,

Anti-HBc y Anti-HBs, si bien no se hicieron completos en todos los casos por no disponer de medios apropiados en los primeros años de funcionamiento del Hospital. Hay que tener en cuenta además que el método de detección ha cambiado desde los primeros a los últimos tiempos, pasando de los métodos mediante radioinmunoensayo en fase sólida tipo "sandwich", como AUSTRIA II y AUSAB de los Laboratorios Abbott, a métodos de Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) tipo Enzignost de Behring o de Abbott Diagnostica.

No se dispuso en ningún momento de la capacidad para evaluar las fracciones IgG o IgM del anti-HBc ni para detectar el HBeAg, el anti-HBe ni para la VBH ADNp o el ADN del VBH.

Las biopsias hepáticas se obtuvieron bien por el método de biopsia ciega con aguja de Menghini o Thru-cut, bien en el curso de una exploración laparoscópica o bien en cuña en los casos que procedían de una intervención quirúrgica.

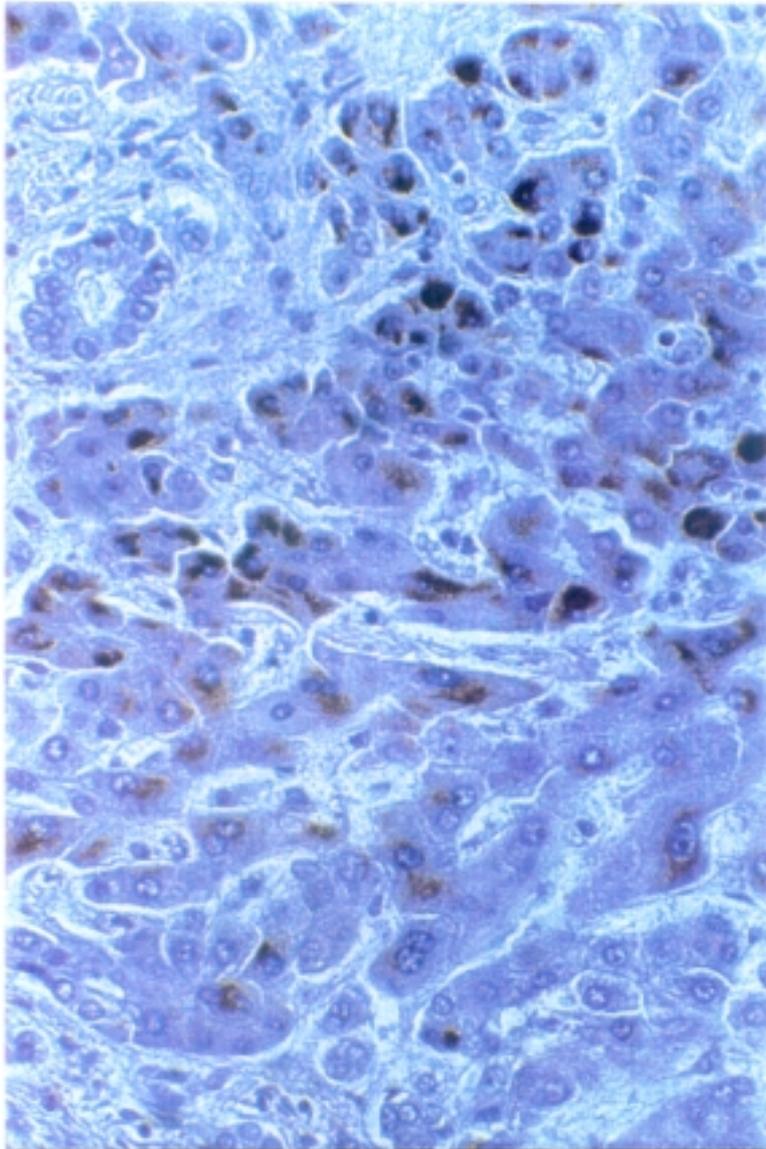
Todas las biopsias hepáticas fueron fijadas en formol neutro tamponado al 10% e incluidas en parafina, para después ser procesadas de forma habitual con cortes a 5µ para tinciones de Hematoxilina y Eosina (H&E), Periodic Acid Schiff (PAS), Hierro, Reticulina y Tricrómico, con el conjunto de los cuales se procedió a emitir el diagnóstico Anatomopatológico de la enfermedad hepática, el cual se acogió a las normativas y acuerdos internacionales.

### 3.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO

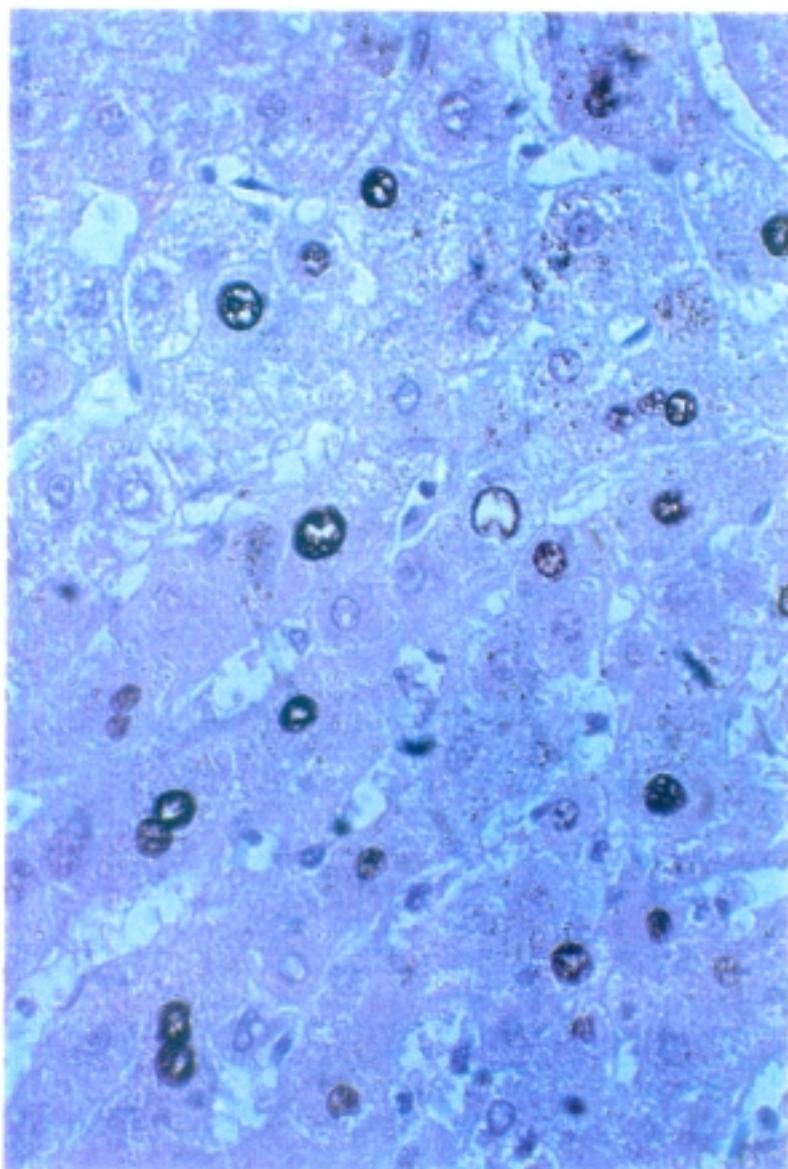
Una vez elegidos los casos para realizar el estudio, se procedió a cortar las secciones extra necesarias de cada bloque de parafina para la hibridación in situ y para los marcadores tisulares del VBH.

Para los antígenos tisulares del VBH (HBsAg y HBcAg) se aplicó un método inmunohistoquímico supersensitivo, variación de la habitual peroxidasa-antiperoxidasa, usando anticuerpos primarios monoclonales y anticuerpos secundarios de ratón y la streptavidina-biotina como complejo marcador por sus características de alta sensibilidad y escasa tinción de fondo (BIO GENEX. USA).

El revelado enzimático se realizó con 3'3 Diamino-benzidina seguido de contratinción con Hematoxilina de Harris para después lavar, deshidratar y montar con medio permanente (DPX) (Figs. 17-19).



**Fig. 17** Expresión del HBsAg tisular (DAB/H 250 x).



**Fig. 18** Expresión nuclear del HBcAg tisular (DAB/H 400 x)

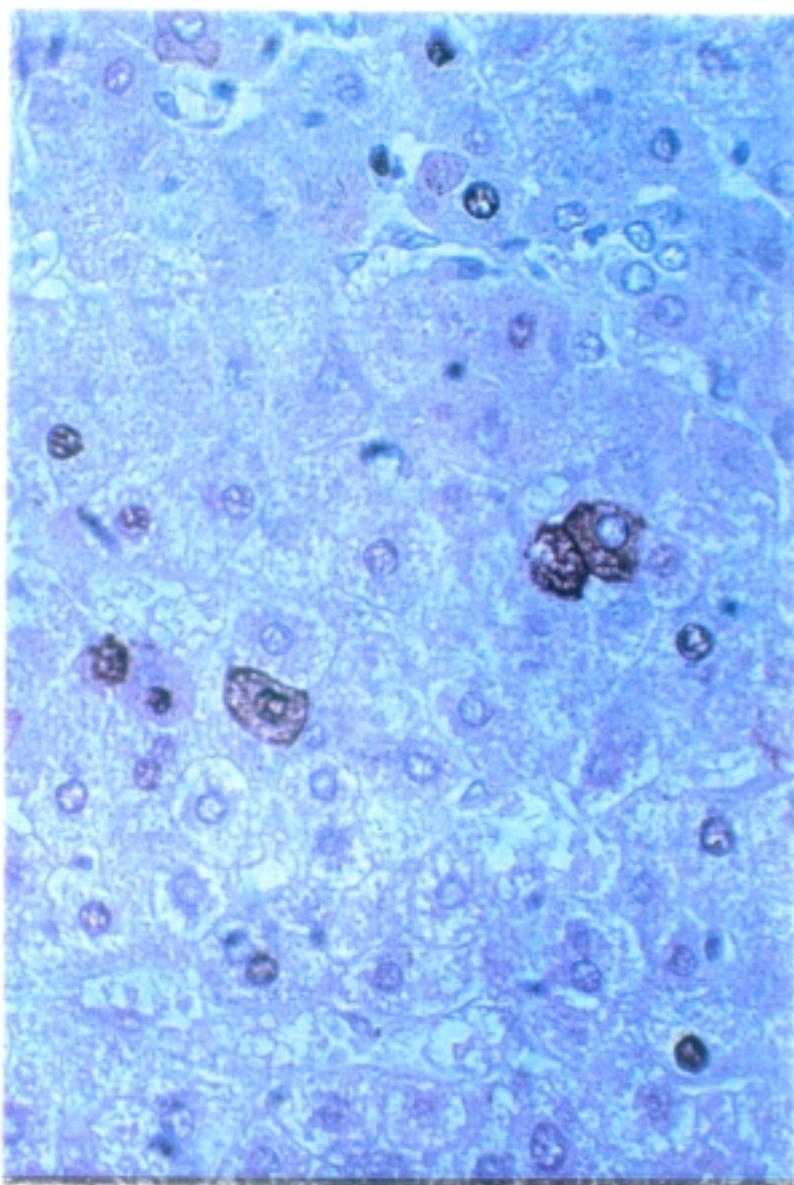


Fig. 19 Expresión nuclear y citoplásmica del HBeAg tisular (DAB/H 400 x).

### 3.4 HIBRIDACION IN SITU

#### 3.4.1 SONDA

La sonda utilizada (PG-874) es la proporcionada por Enzo Diagnostic Inc. NY, compuesta por un agregado de fragmentos que miden entre 100 y 1000 pares de bases.

La secuencia de ADN usada está marcada de forma covalente con biotina y es complementaria al ADN del virus B de la hepatitis, al que reconocerá y con el que hibridará formándose una bicatenaria híbrida entre el ADN viral y el ADN de la sonda.

Esta sonda viene probada para especificidad, reacción cruzada y sensibilidad a lo largo del proceso de producción y crecimiento, y ha sido sometida a una prueba final de hibridación.

La fabricación de la sonda ha supuesto una extensa búsqueda hasta encontrar una secuencia específica.

Después de la creación de un plásmido y su crecimiento en cultivo bacteriano, el ADN plásmido es extraído y purificado verificando su especificidad por análisis de restricción y electroforesis en gel de agarosa.

El clon purificado es marcado con dUTP con el método de "nick translation" (Biotina-11-dUTP reemplaza a TTP) a la vez que se fragmenta. La distribución de los fragmentos se verifica con electroforesis en gel de agarosa.

Si la incorporación del nucleótido biotinilado y la fragmentación es adecuada, se procede a comprobar la hibridación como prueba final (143).

El reactivo post hibridación, el complejo avidina-biotina y el cromógeno (AEC) se incluyen en el equipo (Kit PG 874) proporcionado por Enzo Diagnostic Inc., y como la sonda, se han usado siguiendo las especificaciones del fabricante y que se reseñan a continuación.

#### 3.4.2 PROTEINASA K

Para la digestión enzimática se ha usado Proteinasa K de *Tritirachium album* (Serva # 33752) exenta de ribonucleasa y desoxiribonucleasa (144).

Para valorar su actividad y elegir la concentración óptima, se preparó una solución madre en PBS 10 mM con 5 mM de EDTA de 2.5 mg/ml que se alicuotó y congeló a -40°C.

De una de las alícuotas se prepararon diluciones progresivas

conteniendo 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0.62 mg/ml, 0.31 mg/ml, 0.15 mg/ml y 0.07 mg/ml, que se aplicaron respectivamente sobre seis secciones de tejido hepático muy positivo para HBsAg tisular (que se usa como control en las tinciones de inmunohistoquímica) incubándose 35 minutos en cámara húmeda a 37°C.

Se procedió a continuación a realizar la técnica de hibridación in situ y terminada la misma, se evaluaron microscópicamente las secciones, eligiéndose 0.15 mg/ml como la menor concentración que sin destruir el tejido ofrecía una señal clara.

#### 3.4.3 ADHESIVO

Para evitar que el tejido se desprenda del portaobjetos, lo cual se facilita por el tratamiento enzimático con Proteinasa K, los portaobjetos fueron previamente tratados con una inmersión de 5 minutos en una solución al 2% volumen/volumen de 3 aminopropyltriethoxysilano (APTS SIGMA) en acetona, lavándolos a continuación en agua destilada y dejándolos secar en estufa a 37°C. Este método es simple, eficaz y duradero (145).

#### 3.4.4 CROMOGENO

Se probaron dos cromógenos para detectar la sonda. El aminoetilcarbazol (AEC) que colorea rojo, y la diaminobenzidina

(DAB) que colorea pardo. Preferimos usar AEC ya que el color pardo de la DAB podría dar lugar a que pigmentos tales como el férrico, biliar y ceroides que son de coloración parecida a la producida por la DAB, nos indujeran a error en la interpretación.

Para contratinción, se usaron dos colorantes. El suministrado por la casa Enzo, que colorea de verde, y la hematoxilina de Mayer. Nosotros hemos prefiriendo trabajar con ésta por permitir una mayor transparencia y detalle tisular y por producir menor enmascaramiento de la tinción específica.

#### 3.4.5 OTROS REACTIVOS

Xilol.

Alcoholes absoluto, de 96°, de 80° y de 50°.

Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 3%.

Tampón fosfato salino 10 mM con 5mM de EDTA, pH 7.2 (PBS-EDTA)

$Na_2 H PO_4$  1.48 g.

$K H_2 PO_4$  0.43 g.

$Na Cl$  7.20 g.

EDTA 1.46 g.

Agua destilada hasta completar 1000 ml.

Este reactivo se ha usado indistintamente con el que ya viene

preparado por la casa ENZO y que acompaña al equipo PG 874.

Tampón fosfato salino concentrado 20 veces (20x PBS)

NaCl	152.10 g.
Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	20.45 g.
Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.72 g.

Agua destilada hasta completar 1000 ml.

Fosfato salino estándar con EDTA concentrado 20 veces (20x SSPE)

NaCl	210.40 g.
Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	23.57 g.
Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.69 g.
EDTA	5.80 g.

Agua destilada hasta completar 1000 ml.

TRIS-HCl 0.1 M pH 7.4 con 0.2 M de Glicina

TRIS-HCl	1.57 g.
Glicina	1.50 g.

Agua destilada hasta completar 100 ml.

Paraformaldehído al 4%, que se preparó fresco cada vez que se tuvo que usar de la siguiente manera:

Paraformaldehído	2.00 g.
------------------	---------

Na OH 1 N	0.20 ml.
20x PBS	2.50 ml.
Cl <sub>2</sub> Mg 1 M	0.25 ml.
Agua destilada hasta 50 ml.	

Se preparó calentando 40 ml. de agua destilada a 60°C donde se disolvió el paraformaldehído, aclarando la solución con Na OH y añadiendo la cantidad mencionada de 20x PBS. Una vez enfriada la mezcla, se agregaron 0.25 ml de la solución de Cloruro Magnésico y se completaron con agua destilada hasta los 50 ml.

Formamida desionizada al 50% en 2x SSPE

Formamida desionizada	2.50 ml.
20x SSPE	0.50 ml.
Agua destilada	2.00 ml.

Para desionizar la formamida se mezclaron 100 ml. de ésta con 5 g. de Resina de lecho mixto (RG 501-X8 de BioRad) en un matraz de Erlemmeyer y se agitó durante 30 minutos, pasados los cuales se filtró a través de papel de filtro Whatman del nº 1. Del filtrado, se hicieron alícuotas de 2,5 ml., que se congelaron a -40°C.

Medio de montaje acuoso GelTol (Immunon. MI. USA).

#### 3.4.6 TECNICA DE LA HIBRIDACION IN SITU

Para la hibridación in situ, las secciones de tejido hepático se montaron sobre portas síalinados dejándose secar al aire, para posteriormente desparafinarlos en estufa a 60°C. durante 30 minutos y someterlos a dos pasos de xilol de 10 minutos cada uno.

Se hidrataron en pases sucesivos de alcohol absoluto, 96%, 80%, 50% y agua durante 5 minutos cada paso.

Como es costumbre en las técnicas de inmunohistoquímica, se dibujó con lápiz de diamante un círculo alrededor del tejido y se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 5 minutos, lavándose a continuación con agua destilada.

Se procedió luego a la digestión con Proteinasa K a una concentración de 0.15 mg/ml y en cámara húmeda a 37°C. durante 35 minutos.

A continuación, se lavó con PBS-EDTA durante 15 segundos, se limpió el exceso de líquido y se postfijaron los tejidos, recubriéndolos con Paraformaldehído al 4% durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de un lavado de 10 segundos con PBS-EDTA.

Se continuó con el bloqueo de los grupos aldehídos por medio de TRIS-HCl 0.1 M pH 7.4 con 0.2 M de Glicina a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Después de lavar las secciones con PBS-EDTA durante 10 segundos, se incubaron con este mismo tampón durante 30 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

Se quitó el exceso de líquido y se cubrieron las secciones con formamida desionizada al 50% en 20x SSPE y se incubó esta reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos, quitando a continuación el exceso de líquido y secando alrededor del tejido evitando que se secase el mismo.

Se aplicó una gota de la sonda a cada sección y se cubrió con un cubreobjetos sin que quedasen atrapadas burbujas de aire, procediéndose entonces a desnaturalizar el ADN en una estufa a 95°C. durante 15 minutos, pasados los cuales se traspasaron las muestras a una cámara húmeda dentro de una estufa a 37°C., durante 60 minutos, para que la reacción de hibridación tuviese lugar.

Pasado este tiempo, se quitaron los cubreobjetos y se añadieron dos gotas del reactivo posthibridación a las secciones tisulares que se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Se lavaron luego durante 10 segundos con PBS-EDTA, se quitó el exceso de líquido y se añadieron tres gotas del reactivo de detección (complejo Streptavidina-Biotina), incubándose esta reacción durante 30 minutos a 37°C. en cámara húmeda.

Se volvió a lavar con PBS-EDTA y una vez quitado el exceso de líquido se cubrieron los tejidos con el cromógeno (AEC) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Después de volver a lavar con PBS-EDTA, se procedió a contrateñir con Hematoxilina de Mayer durante tres minutos y tras lavado en agua corriente, se montaron con medio de montaje acuoso, quedando así listos para la observación microscópica.

Se usaron controles positivos conocidos en cada una de las técnicas empleadas y cada vez que se realizaron éstas. Además se incluyeron varios controles negativos sin sonda así como se incluyeron varios casos con serología negativa para el VBH cuyo tejido hepático provenía de hepatopatías de etiología probablemente distinta al VBH y de hígados normales de pacientes que habían sufrido biopsia hepática con motivo de estadiaje de procesos linfomatosos.

#### 3.4.7 VALORACION DE LA TECNICA

Para valorar el resultado se usó un método semicuantitativo que se aplicó a tres parámetros estructurales distintos: tinción celular, tinción tisular y distribución lobular.

La evaluación de la positividad de la técnica tiene dos extremos: por uno, la total negatividad de los controles negativos y por el otro, la positividad máxima donde además de estar todas los hepatocitos teñidos, la tinción de cada uno de ellos es completa.

Dicho de otra forma, la ausencia de señal es equivalente a negatividad, y la positividad se valora en cada parámetro como se indica a continuación.

En el hepatocito, si la señal se observa en menos de la tercera parte del citoplasma, es una señal débil o (+) (Fig. 20); si la misma ocupa de 1/3 a 2/3 del citoplasma la denominamos moderada o (++) (Fig. 21); y si ocupa más de 2/3 del citoplasma entonces tendremos una señal intensa o (+++) (Fig. 22).

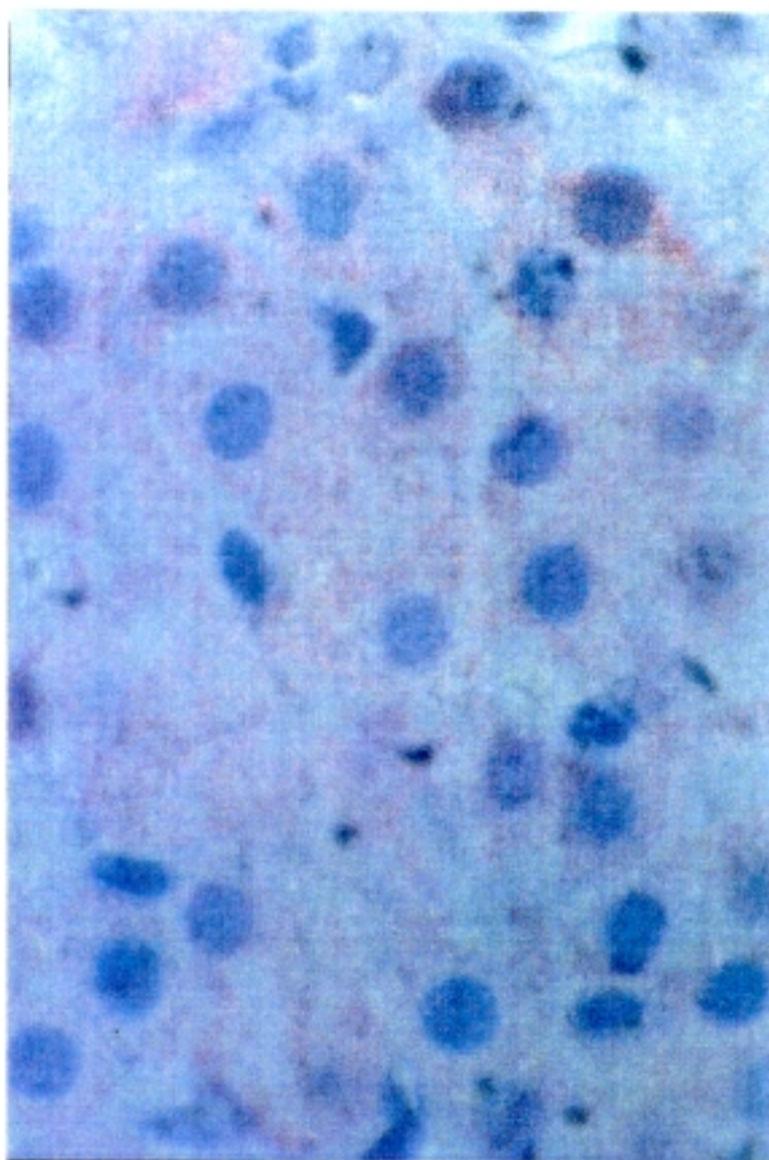


Fig. 20 Cantidad de tinción leve en las células con la HIS  
(AEC/H 1000 x)

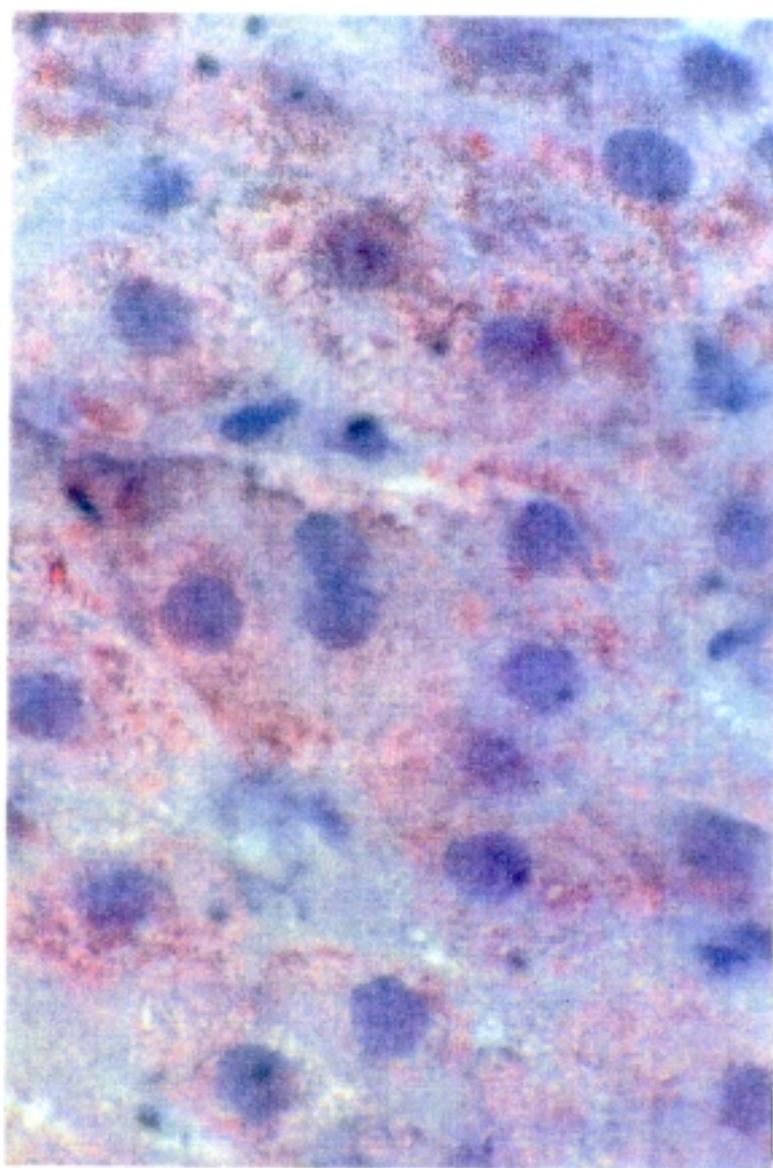
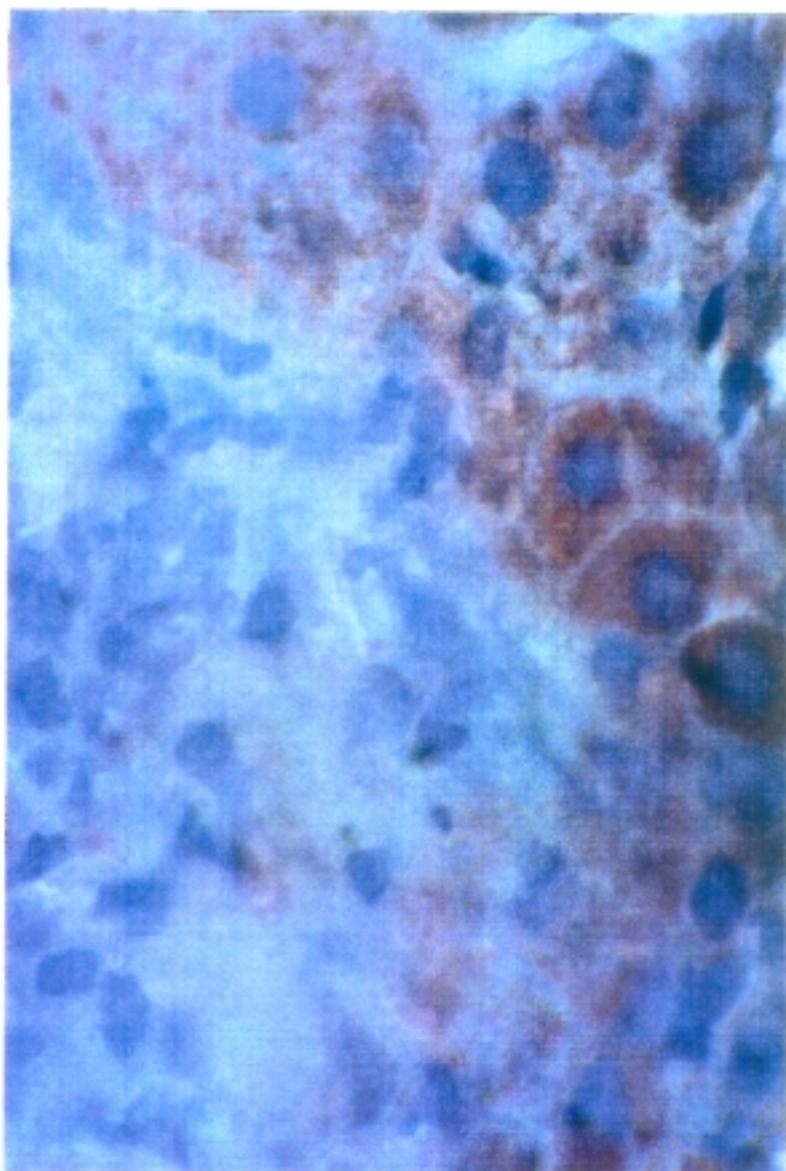


Fig. 21 Cantidad de tinción moderada en las células con la HIS (AEC/H 1000 x).



**Fig. 22** Cantidad de tinción intensa en las células con la HIS  
(AEC/H 1000 x).

En el tejido hepático, si la tinción positiva se observa en menos de 1/3 del tejido analizado la denominamos débil o (+) (Fig. 23); si se observa entre 1/3 y 2/3 del tejido analizado se denomina moderada o (++) (Fig. 24); y si su extensión es mayor que 2/3 del tejido analizado entonces se denomina intensa o (+++) (Fig. 25).

También se ha valorado la distribución de la tinción específica en relación con la arquitectura hepática, observando si la distribución de la positividad tendía a ser periportal (Fig. 26) o si era difusa en el lobulillo (Fig. 27) (107).

En la valoración estadística se ha usado la Prueba del Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para comprobar relaciones, y la Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher. Esta última para comparar las proporciones cuando las cantidades a comparar eran pequeñas.

Estos métodos se han efectuado con el programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS).

Se ha utilizado como límite de significación el valor de 0.05, significando que toda relación cuyo valor de probabilidad (P) sea inferior a 0.05 supone una relación no debida al azar.

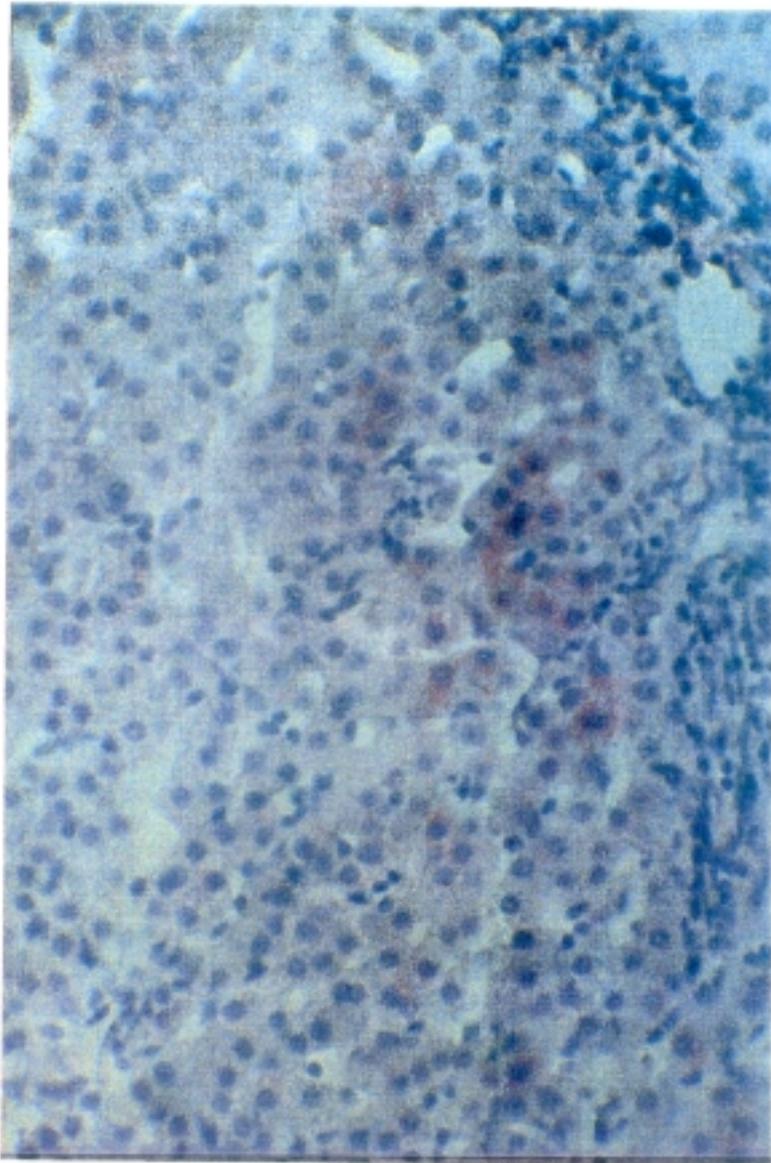


Fig. 23 Cantidad leve de células teñidas con la HIS (AEC/H 250x).

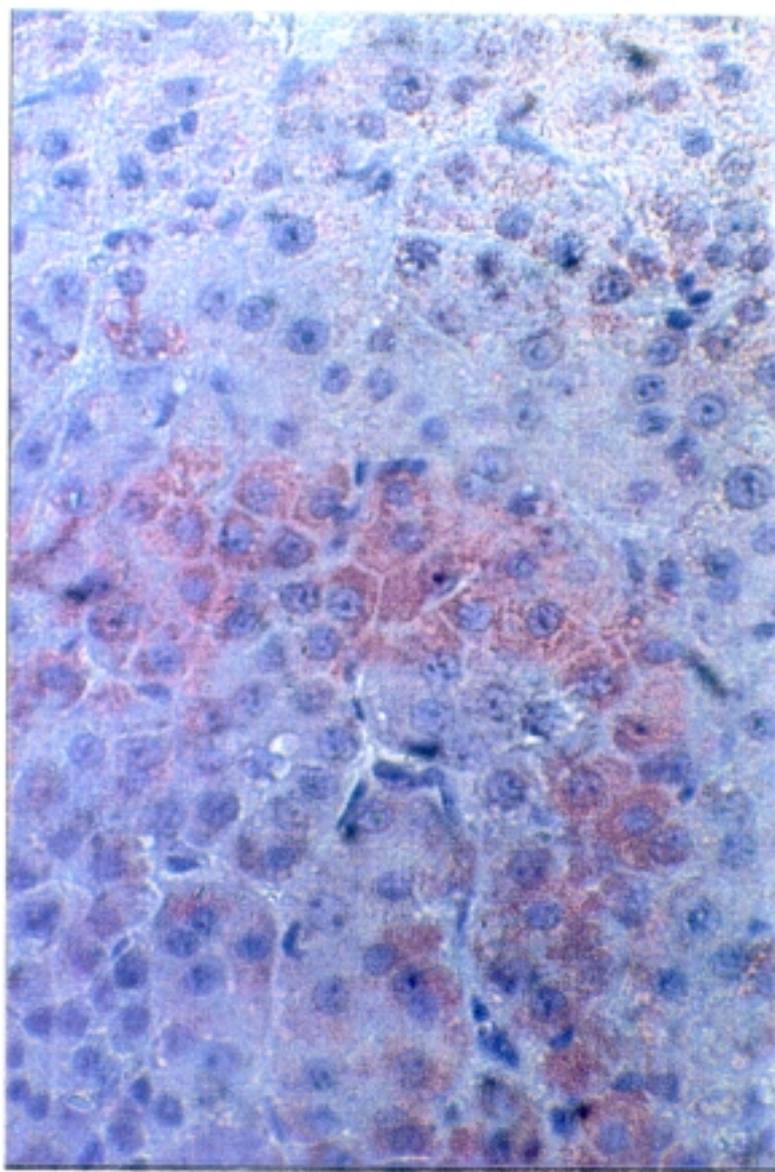
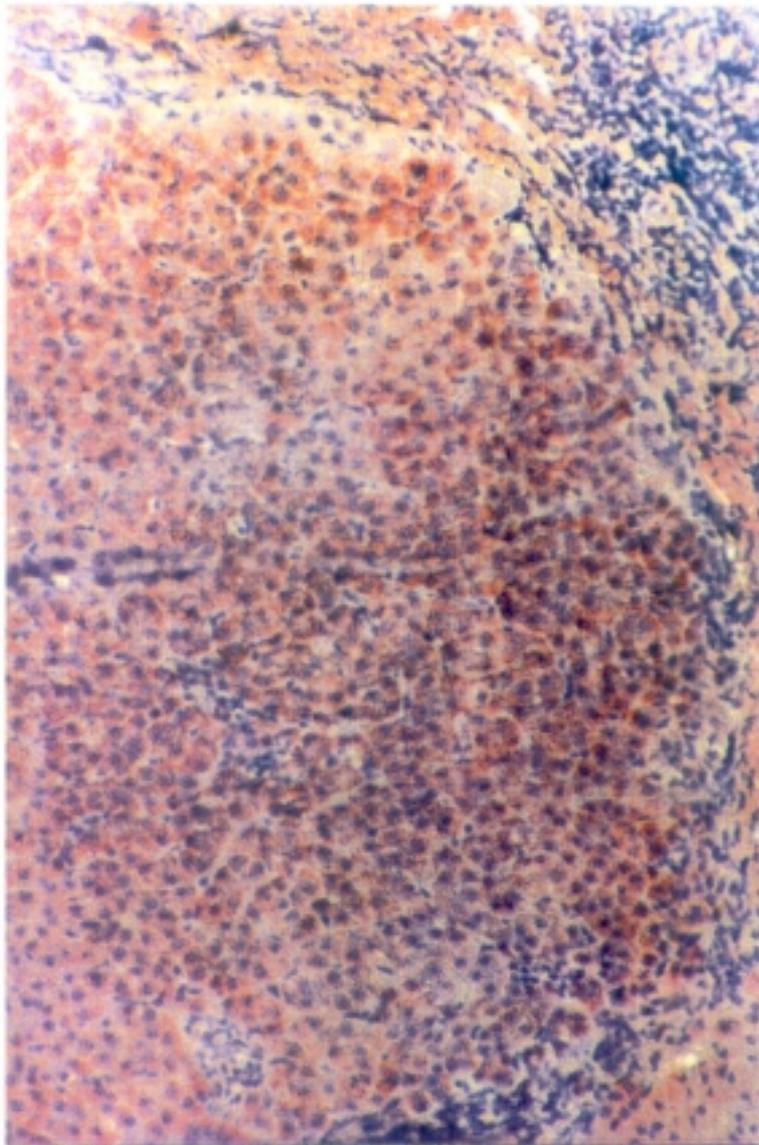
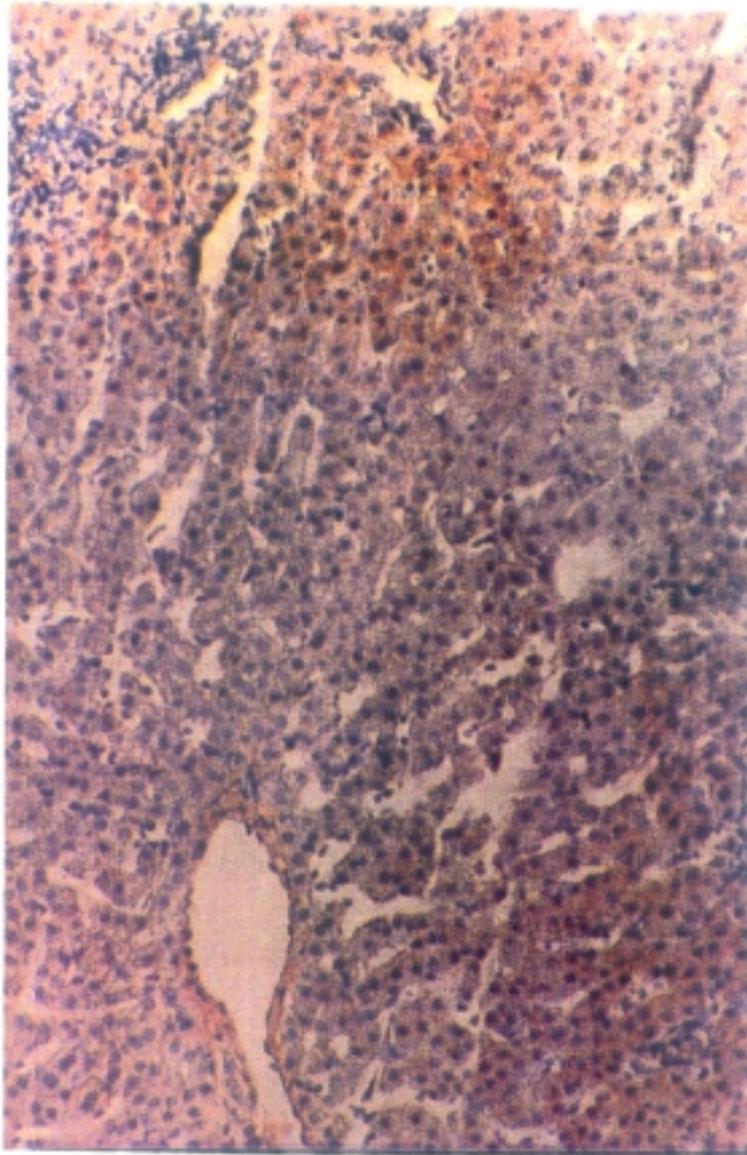


Fig. 24 Cantidad moderada de células teñidas con la HIS (AEC/H 400 x).



**Fig. 25 Cantidad intensa de células teñidas con la HIS (AEC/H 100 x).**



**Fig. 26 Distribución periportal de la tinción con la HIS (AEC/H 100 x).**

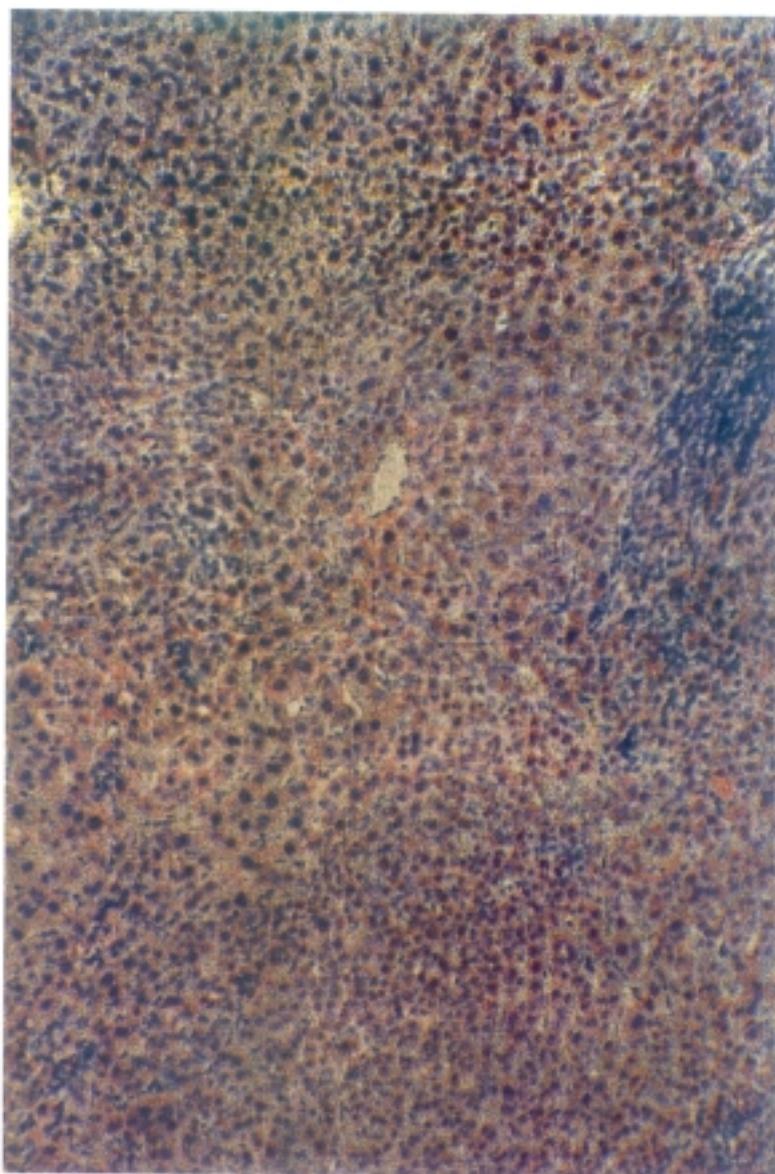


Fig. 27 Distribución difusa en el lobulillo hepático de la tinción con la HIS (AEC/H 100 x).

#### 4. RESULTADOS

## 4 RESULTADOS

### 4.1 LESIONES HEPATICAS OBSERVADAS

Se revisaron 142 biopsias correspondientes a 136 enfermos y se reevaluaron sus diagnósticos anatomopatológicos, confirmándose todos los diagnósticos previos efectuados.

Se observaron 2 tejidos normales (N) correspondientes a dos biopsias hepáticas realizadas para estadiar dos enfermos con linfoma maligno, 2 hepatitis agudas (HA), 2 hepatitis residuales (HR), 2 hepatitis crónicas lobulillares (HCL), 18 hepatitis crónicas persistentes (HCP), 37 hepatitis crónicas activas (HCA), 63 cirrosis (C) y 16 carcinomas hepatocelulares (CHC). Todos estos datos se expresan en la Tabla II.

### 4.2 SEROLOGIA DE LOS CASOS

Basándonos en los resultados de los marcadores serológicos agrupamos todos los casos en distintos grupos con el fin de homogeneizar y poder comparar los resultados obtenidos (Tabla III).

Tabla II. CARACTERIZACION HISTOLOGICA DE LAS LESIONES HEPATICAS

DIAGNOSTICO	CANTIDAD	PORCENTAJE
N	2	1.4
HA	2	1.4
HR	2	1.4
HCL	2	1.4
HCP	18	12.7
HCA	37	26.1
C	63	44.4
CHC	16	11.3
TOTAL	142	100.0

TABLA III. DISTRIBUCION DE LOS ENFERMOS EN GRUPOS SEGUN:

A) SEROLOGIA PARA EL VBH

DESCRIPCION	CANTIDAD	PORCENTAJE
Negativos ciertos	25	17.6
Negativos dudosos	16	11.3
Evidencia contacto	101	71.1
TOTAL	142	100.0

B) EVIDENCIA DE CONTACTO CON EL VBH

DESCRIPCION	CANTIDAD	PORCENTAJE
HBsAg positivo	30	29.7
Anti-HBs positivo	38	37.6
Anti-HBc positivo	33	32.7
TOTAL	101	100.0

Enfermos que se consideraron negativos ciertos por no presentar positividad a ninguno de los marcadores en suero, 25 casos.

Enfermos cuya relación o contacto con el VBH era dudosa, por tener únicamente determinaciones aisladas e incompletas con resultado negativo, y que en su mayor parte correspondían a los primeros años de vida del hospital donde se ha realizado el trabajo, 16 casos.

Enfermos que mostraron evidencia de contacto con el VBH al presentar positividad para alguno de los marcadores serológicos realizados, 101 casos.

Estos 101 casos fueron aún segregados en tres grupos como también se muestra en la Tabla III y cuyas características se exponen a continuación:

a. Enfermos con patrón serológico de infección por VBH, que presentaban positividad para el HBsAg, 30 casos.

b. Enfermos que tenían patrón serológico de inmunidad al VBH, que mostraban positividad para el anti-HBs, 38 casos.

c. Enfermos con patrón serológico de contacto antiguo con el VBH, que presentaban positividad para el anti-HBc, 33 casos.

### 4.3 INMUNOHISTOQUIMICA

No en todos los casos se pudo realizar la técnica para detectar marcadores del VBH en el tejido hepático, ya que muchos de los bloques estaban muy agotados y las secciones que se obtuvieron se usaron en las diferentes pruebas de la técnica de hibridación in situ hasta que ésta fue depurada y puesta a punto.

En las Tablas IV a VIII se exponen, en relación con los cinco grupos de trabajo previamente indicados, las lesiones hepáticas así como la inmunohistoquímica obtenida en cada grupo.

Llama la atención la escasa positividad observada a los marcadores tisulares. Esto puede estar relacionado tanto con una menor sensibilidad de la técnica de la inmunohistoquímica, como con una menor especificidad de la serología.

En el grupo de patrón de infección (HBsAg +) se observa que un 13.3% tienen marcador inmunológico de replicación viral activa (HBcAg +) en el tejido, lo que hace pensar que quizás sea en estos enfermos donde la enfermedad progresa o se reactiva.

En el grupo de patrón de inmunidad (Anti-HBs +) se observa que existe positividad del HBsAg tisular, lo que puede indicar una menor sensibilidad de la técnica que detecta dicho antígeno en el

TABLA IV. PATRON SEROLOGICO INFECCION Y RELACION CON:

LESIONES HEPATICAS

DIAGNOSTICO	CANTIDAD	PORCENTAJE
HA	1	3.3
HCP	3	10.0
HCA	13	43.3
C	12	40.0
CHC	1	3.3
TOTAL	30	100.0

HBsAg TISULAR

DESCRIPCION	CANTIDAD	PORCENTAJE
Indeterminado	5	16.7
Positivo	9	30.0
Negativo	16	53.3
TOTAL	30	100.0

HBcAg TISULAR

DESCRIPCION	CANTIDAD	PORCENTAJE
Indeterminado	6	20.0
Positivo	4	13.3
Negativo	20	66.7
TOTAL	30	100.0

TABLA V. PATRON SEROLOGICO INMUNIDAD Y RELACION CON:

LESIONES HEPATICAS

DIAGNOSTICO	CANTIDAD	PORCENTAJE
HA	1	2.6
HR	2	5.3
HCL	2	5.3
HCP	6	15.8
HCA	8	21.1
C	16	42.1
CHC	3	7.9
TOTAL	38	100.0

HBsAg TISULAR

DESCRIPCION	CANTIDAD	PORCENTAJE
Indeterminado	5	13.2
Positivo	6	15.8
Negativo	27	71.1
TOTAL	38	100.0

HBcAg TISULAR

DESCRIPCION	CANTIDAD	PORCENTAJE
Indeterminado	11	28.9
Positivo	4	10.5
Negativo	23	60.5
TOTAL	38	100.0

TABLA VI. PATRON SEROLOGICO CONTACTO ANTIGUO Y RELACION CON:

LESIONES HEPATICAS

DIAGNOSTICO	CANTIDAD	PORCENTAJE
HCP	3	9.1
HCA	4	12.1
C	21	63.6
CHC	5	15.2
TOTAL	33	100.0

HBsAg TISULAR

DESCRIPCION	CANTIDAD	PORCENTAJE
Indeterminado	7	21.2
Positivo	2	6.1
Negativo	24	72.7
TOTAL	33	100.0

HBcAg TISULAR

DESCRIPCION	CANTIDAD	PORCENTAJE
Indeterminado	6	18.2
Positivo	1	3.0
Negativo	26	78.8
TOTAL	33	100.0

TABLA VII. PATRON SEROLOGICO NEGATIVO CIERTO Y RELACION CON:

LESIONES HEPATICAS

DIAGNOSTICO	CANTIDAD	PORCENTAJE
N	2	8.0
HCP	3	12.0
HCA	6	24.0
C	8	32.0
CHC	6	24.0
TOTAL	25	100.0

HBsAg TISULAR

DESCRIPCION	CANTIDAD	PORCENTAJE
Indeterminado	3	12.0
Positivo	0	0.0
Negativo	22	88.0
TOTAL	25	100.0

HBcAg TISULAR

DESCRIPCION	CANTIDAD	PORCENTAJE
Indeterminado	3	12.0
Positivo	0	0.0
Negativo	22	88.0
TOTAL	25	100.0

TABLA VIII. PATRON SEROLOGICO NEGATIVO DUDOSO Y RELACION CON:

LESIONES HEPATICAS

DIAGNOSTICO	CANTIDAD	PORCENTAJE
HCP	3	18.8
HCA	6	37.5
C	6	37.5
CHC	1	6.2
TOTAL	16	100.0

HBsAg TISULAR

DESCRIPCION	CANTIDAD	PORCENTAJE
Indeterminado	2	12.5
Positivo	0	0.0
Negativo	14	87.5
TOTAL	16	100.0

HBcAg TISULAR

DESCRIPCION	CANTIDAD	PORCENTAJE
Indeterminado	2	12.5
Positivo	0	0.0
Negativo	14	87.5
TOTAL	16	100.0

suero, observándose también indicios de replicación viral activa (HBcAg +).

En el grupo de patrón de contacto antiguo (Anti-HBc +) se observan bajos porcentajes de positividad en los marcadores tisulares, sugiriendo que a mayor tiempo de infección aumenta el aclaramiento de los marcadores inmunohistoquímicos, a la vez que aumenta el porcentaje de carcinomas hepatocelulares.

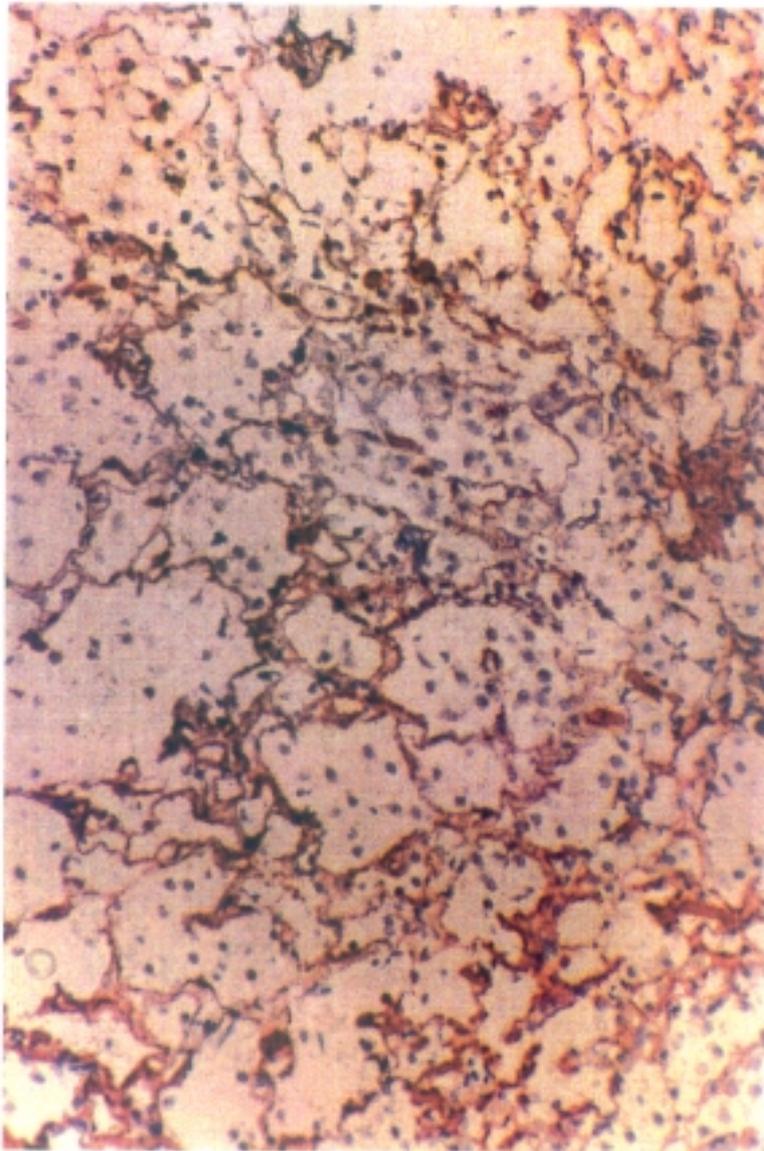
En el grupo de patrón negativo cierto, sin evidencia serológica de contacto con el VBH, llama la atención el alto porcentaje de CHC, haciendo suponer la posible actuación de otros factores patogénicos en nuestro medio.

#### 4.4 HIBRIDACION IN SITU

##### 4.4.1 CASOS DIGERIDOS

Cuatro de los 142 casos en los que se realizó la técnica de hibridación in situ mostraron una casi total destrucción del tejido debido a la acción de la Proteinasa K (Fig. 28), hecho que sucedió a pesar de realizar la técnica varias veces.

La fijación y procesado del tejido afecta poco a la conservación de los ácidos nucleicos, pero sí puede tener



**Fig. 28** Transparencia de los citoplasmas hepatocitarios resultado de la excesiva digestión por la Proteínasa K (AEC/H 100 x).

consecuencias adversas en la conservación del tejido (124). Dado que en estos casos, repetidamente, se observó digestión tisular, es evidente que la fijación o el procesado afectaron al tejido que soporta a los ácidos nucleicos de tal forma que fue poco resistente a la acción de la Proteínasa K y su destrucción produjo una pérdida irreversible de ADN y ARN.

Estos 4 casos no han podido ser valorados y, por tanto, no se incluyen en los cálculos estadísticos y porcentuales realizados.

A continuación se analizan los resultados de la HIS en los diferentes grupos de trabajo discriminados anteriormente.

#### 4.4.2 CASOS CON SEROLOGIA POSITIVA PARA EL VBH

En la Tabla IX se establece la relación entre la tinción tisular del ADN y los tres grupos serológicos con patrón de contagio por el VBH.

##### 4.4.2.1 Patrón de infección (HBsAg +).

Al relacionar los casos con patrón serológico de infección, se observa, por un lado, una alta positividad en la detección de genoma viral (92.8%) y por otro, dos discrepancias con la serología.

TABLA IX. RELACION ENTRE SEROLOGIA POSITIVA  
PARA EL VBH Y ADN TISULAR

A. PATRON DE INFECCION (HBsAg +)

ADN TISULAR	CANTIDAD	PORCENTAJE (28 CASOS)
Positivo	26	92.8
Negativo	2	7.2
Digerido	2	0.0
TOTAL	30	100.0

B. PATRON DE INMUNIDAD (anti-HBs +)

ADN TISULAR	CANTIDAD	PORCENTAJE (37 CASOS)
Positivo	34	91.9
Negativo	3	8.1
Digerido	1	0.0
TOTAL	38	100.0

C. PATRON DE CONTACTO ANTIGUO (anti-HBc +)

ADN TISULAR	CANTIDAD	PORCENTAJE (32 CASOS)
Positivo	25	78.2
Negativo	7	21.8
Digerido	1	0.0
TOTAL	33	100.0

Al revisar estos casos se observa que uno de ellos corresponde a un CHC el cual puede haber sufrido una mutación genética de tal forma que no contenga genoma viral replicante.

El otro caso corresponde a una HCA. La discrepancia en este caso puede ser debida tanto a una falsa positividad serológica (no existe tampoco positividad tisular a los antígenos virales) como a un error de muestreo (110).

Si excluimos estos casos por las razones mencionadas, la positividad es del 100 %, similar a la encontrada por otros autores (135).

Recordamos aquí que los casos en que la excesiva acción de la proteinasa K destruyó el tejido, no se usan en los cálculos porcentuales ni estadísticos).

#### 4.4.2.2 Patrón de inmunidad (Anti-HBs +).

En el grupo con patrón de inmunidad, se observa una positividad alta en la expresión de genoma viral en los hepatocitos (91.9%), existiendo un pequeño porcentaje de negatividad que pudiera corresponder a una curación real con eliminación del virus y que la patología hepática fuese de otra etiología coincidente.

Pero es conveniente observar que también puede deberse a una

detección inadecuada, en parte debida a error de muestreo en la HCP y en parte a las mutaciones genéticas que sufren los tumores como sucedería en el caso de los dos CHC.

#### 4.4.2.3 Patrón de contacto antiguo (Anti-HBc).

El grupo con patrón de contacto antiguo mostró una positividad menor para el genoma viral (78.2%), quizás debido al mayor porcentaje de CHC presente en este grupo (15.6%), que fueron negativos. Dicha negatividad para el ADN viral en los CHC puede ser debida a la existencia de una mutación genética en el tejido tumoral transcurso de la carcinogénesis.

Al realizar la Prueba del Chi-cuadrado para comprobar la relación entre los resultados de la serología positiva y la presencia de ADN tisular, tanto de los grupos por separado como del conjunto con marcadores serológicos positivos, se obtuvieron valores de probabilidad (P) entre  $8.173 * 10^{-4}$  y  $7.972 * 10^{-11}$ , ambos inferiores a 0.05 considerado como límite de significación estadística ( $P < 0.05$ ).

La misma diferencia estadísticamente significativa ocurrió al comparar los marcadores tisulares del VBH con el ADN tisular, donde los valores de P oscilaron entre 0.042 y 0.014.

#### 4.4.3 CASOS CON SEROLOGIA NEGATIVA

En la Tabla X se relacionan los grupos con serología de contagio por el VBH negativa, cierta y dudosa, con la tinción del ADN tisular.

##### 4.4.3.1 Patrón negativo cierto.

El grupo con negativos ciertos, con serología completamente negativa para el VBH, sirvió de control a lo largo de las diferentes ocasiones en que se realizó la técnica, incluyendo varios casos en cada ocasión.

En este grupo, se observan cuatro discrepancias entre la serología y el ADN tisular.

Aparte de las consideraciones sobre la especificidad y sensibilidad de la técnica, las historias clínicas fueron revisadas y llamó la atención que en el caso de la HCA, se había realizado una nueva determinación serológica dos años después de la toma de la biopsia, demostrándose en el segundo estudio que el enfermo presentaba un patrón de inmunidad contra el VBH (Anti-HBs +).

Los tres casos restantes, correspondientes a tres valoraciones relativas a dos cirrosis y a un hepatocarcinoma sobreañadido a una de ellas, sólo tenían hecha una determinación serológica aislada y

TABLA X. RELACION ENTRE SEROLOGIA NEGATIVA PARA EL VBH  
Y EL ADN TISULAR:

A. PATRON NEGATIVO CIERTO

ADN TISULAR	CANTIDAD	PORCENTAJE
Positivo	4	16.0
Negativo	21	84.0
TOTAL	25	100.0

B. PATRON NEGATIVO DUDOSO

ADN TISULAR	CANTIDAD	PORCENTAJE
Positivo	12	75.0
Negativo	4	25.0
TOTAL	16	100.0

podiera existir un error del laboratorio de inmunología, siendo quizás falsos negativos serológicos por técnica poco sensible, intercambio de sueros, preservación inadecuada de la muestra etc.

#### 4.4.3.2 Patrón negativo dudoso.

Estos casos, con determinaciones de marcadores séricos aisladas e incompletas cuyo resultado era negativo, pertenecían a pacientes de la primera época del estudio.

Se observó una positividad en la detección de genoma viral parecida a los casos con patrón de contacto antiguo (75%), de donde puede inferirse que, de haber tenido todos los marcadores serológicos realizados, posiblemente la gran mayoría podrían englobarse en este grupo.

### 4.5 PATRONES DE TINCIÓN

#### 4.5.1 PATRON DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

Los ácidos nucleicos en los hepatocitos pueden mostrar dos morfologías distintas al ser observados al microscopio.

La forma granular (Fig. 29), cuando en el citoplasma del

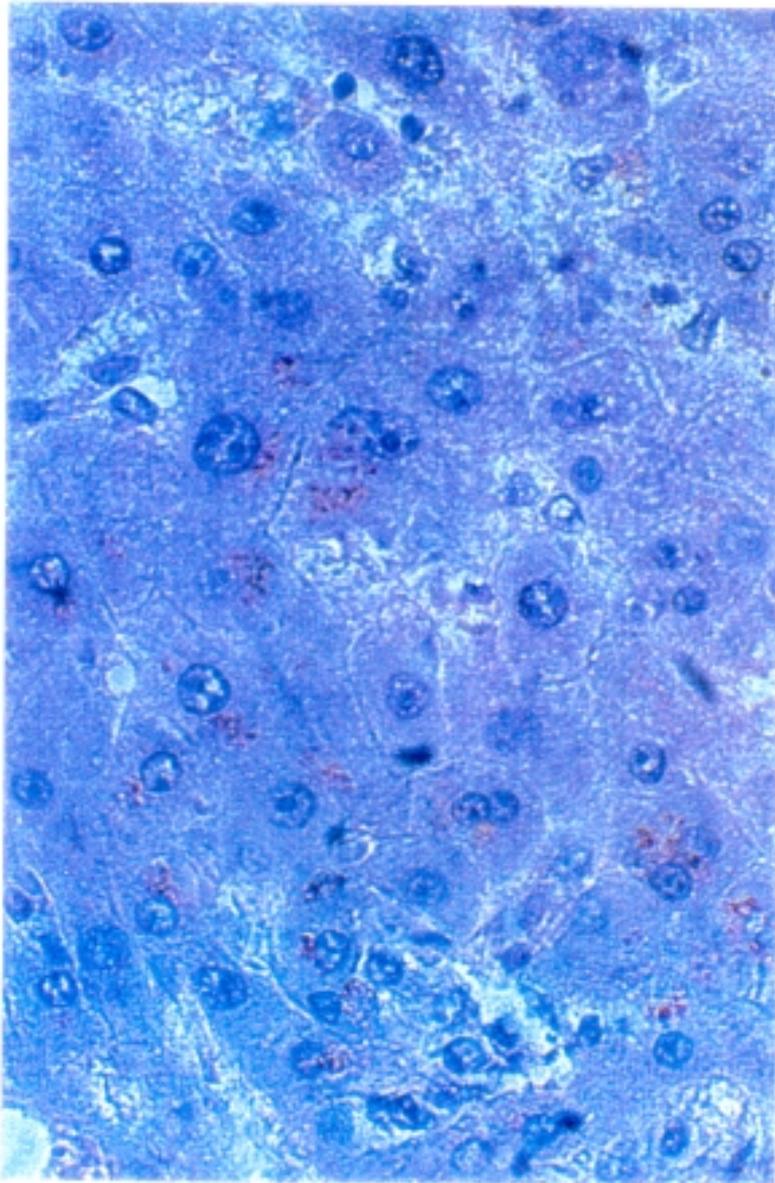


Fig. 29 Patrón granular de la tinción del genoma viral (AEC/H 400 x).

hepatocito se distinguían granulaciones rojizas a pequeño aumento (100 y 250 aumentos).

La forma homogénea (Fig. 30), que aparece como una tinción difusa a los aumentos anteriormente mencionados y que sólo aumentos mayores, del orden de 400 o 1000 aumentos, permiten reconocer el fino punteado que la constituye.

Los cálculos porcentuales realizados comparando este patrón de tinción con las diferentes lesiones hepáticas, muestran un predominio del patrón homogéneo en la HCP y HCA (81.8% y 72.4% respectivamente), siendo los porcentajes en el resto de las patologías más equilibrados.

#### 4.5.2 PATRON DE LA TINCION CELULAR

Dentro del hepatocito, la coloración rojiza expresada por los ácidos nucleicos a través del AEC, tiene una distribución equilibrada por todo el citoplasma, con acentuación ocasional en las áreas de localización sub-membrana citoplásmica. Hemos denominado tal distribución patrón citoplásmico (Fig. 31).

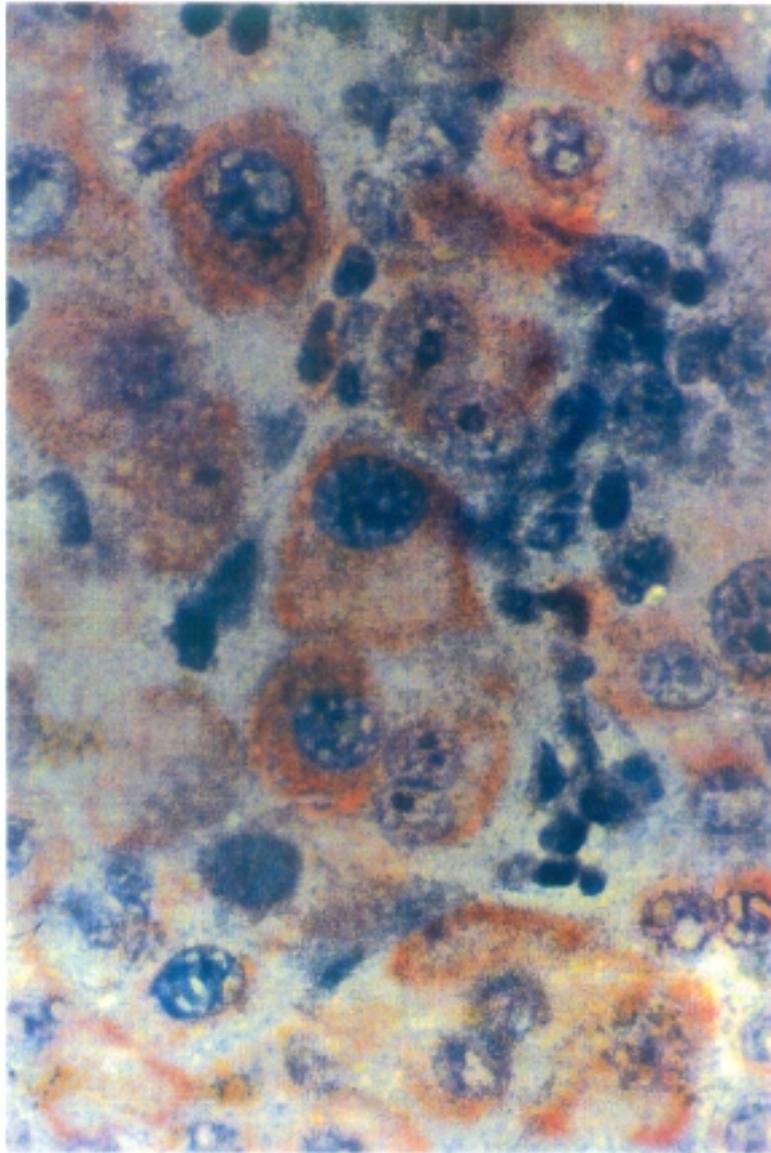
En algunas ocasiones, la distribución del colorante ha sido exclusivamente del tipo de acentuación por dentro de la membrana citoplásmica, y la hemos denominado submembranosa (Fig. 32).



Fig. 30 Patrón homogéneo de la tinción del genoma viral con la HIS (AEC/H 250 x).



Fig 31 Patrón de tinción citoplásmica del hepatocito con la HIS (AEC/H 400 x).



**Fig. 32 Patrón de tinción submembranoso del hepatocito con la HIS (AEC/H 1000 x).**

Los cálculos porcentuales dan como resultado un franco predominio del patrón citoplásmico en todos los casos, siendo únicamente 5 HCA y 5 C las que mostraron patrón submembranoso, no observándose en ninguno de estos casos expresión tisular del HBcAg.

#### 4.5.3 PATRON DE TINCION LOBULILLAR

A nivel de la arquitectura hepática, y como ya se ha descrito anteriormente (107), la coloración rojiza correspondiente a positividad tiende a distribuirse de dos formas distintas.

Esta distribución es independiente de la cantidad de células que muestren positividad para los ácidos nucleicos, las cuales en ambos casos pueden ser escasas o abundantes.

El patrón periportal, que muestra una agrupación en torno al espacio porta de los hepatocitos con tinción positiva (Fig. 26), y el patrón difuso donde los hepatocitos con tinción positiva se distribuyen irregularmente por todo el lobulillo hepático (Fig. 27).

En los cálculos porcentuales previos, se observa un predominio del patrón difuso sobre el periportal en todas las lesiones excepto en la HR y la HCP, donde el porcentaje de ambos tipos de patrones es más similar.

#### 4.6 CANTIDAD DE TINCIÓN

##### 4.6.1 CANTIDAD DE TINCIÓN CELULAR

La gran mayoría de los casos mostraron una cantidad de tinción leve (60.5%) y menores proporciones de cantidad de tinción moderada (25.7%) e intensa (13.8%), no observándose ninguna alteración porcentual llamativa en las diferentes lesiones hepáticas ni se observó relación con la actividad enzimática.

##### 4.6.2 CANTIDAD DE CELULAS TEÑIDAS

La mayoría de los casos mostraron una cantidad leve de células teñidas (54.5%) y los casos con cantidad moderada (32.7%) e intensa (12.8%) de células teñidas se presentaron en menor proporción, no observándose diferencias llamativas entre las diferentes lesiones hepáticas ni con la actividad de las transaminasas.

#### 4.7 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA HCP Y LA HCA

Se escoge este grupo por ser más representativo de la citolisis y por ser grupos con efectivos suficientes para establecer comparaciones y relaciones entre los cambios observados.

Si bien se observó en estos grupos, y en consonancia con el resto de las lesiones hepáticas un alto porcentaje del patrón homogéneo de tinción del ADN tisular así como un predominio del patrón citoplásmico sobre el submembranoso, no hubo diferencia estadísticamente significativa al comparar los patrones de tinción entre ambos tipos de hepatitis (Tabla XI).

Se observó en cambio una diferencia estadísticamente significativa entre ambos tipos de hepatitis al relacionar el patrón de distribución lobular de la tinción, siendo más abundante la forma difusa que la periportal en la hepatitis crónica activa ( $P < 0.05$ ).

Otros parámetros que se compararon y relacionaron en el grupo de las hepatitis crónicas fueron la actividad de la transaminasa GPT, la cantidad de células teñidas y la cantidad de tinción por célula, no observándose diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.8 DISCREPANCIA ENTRE SEROLOGIA POSITIVA Y ADN NEGATIVO

Se examinan a continuación y con más detalle los casos que, teniendo serología de contacto con el VBH, resultaron negativos para los ácidos nucleicos tisulares (Tabla XII) y de los que excluimos los CHC que se comentan posteriormente.

Tabla XI. COMPARACIONES ENTRE HCA Y HCP

		HCA	HCP	PROBABILIDAD EXACTA DE FISHER
<u>SUERO</u>				
HBsAg	-	24	15	0.2967
	+	11	3	
Anti-HBs	-	17	6	0.2424
	+	8	6	
Anti-HBc	-	31	15	0.4446
	+	4	3	
GPT	normal	1	1	0.5769
	alta	33	17	
<u>TEJIDO</u>				
ADN	+	29	11	0.0817
	-	6	7	
Patrón Tinción	honog	21	9	0.4321
	granu	8	2	
Patrón Celular	citopl	24	11	0.1805
	submem	5	0	
Patrón Lobular	difuso	26	6	0.0245 *
	peripo	3	5	

\* P < 0.05

TABLA XII. RELACION SEROLOGIA POSITIVA / ADN NEGATIVO

DIAG	No	SUERO			TEJIDO	
		HBsAg	Anti -HBs	Anti -HBc	HBsAg	HBcAg
HCP	1	-	+	-	-	-
C	1	-	-	+	-	-
HCP	1	-	+	-	nd	nd
HCA	1	+	-	+	-	-

(nd = no determinado)

A pesar de ser una cantidad pequeña de casos, observamos que los marcadores tisulares del VBH son también negativos, y aunque la inmunihistoquímica no es un método de gran sensibilidad, sí tiene una gran especificidad. Si a ésto añadimos que la hibridación in situ es una técnica de alta sensibilidad y especificidad (107,135), cabe la posibilidad de que sean posibles falsos positivos serológicos.

#### 4.9 DISCREPANCIA SEROLOGIA NEGATIVA Y ADN POSITIVO

Sólamente cuatro casos se encontraban en este grupo, que se relacionan con detalle en la Tabla XIII.

Tanto los marcadores serológicos como tisulares para el VBH son negativos, lo que induce a pensar en una posible falsa positividad de la HIS.

De todas formas, y como hemos mencionado antes, uno de los casos presentó un patrón de inmunidad (Anti-HBs +) en un control serológico dos años después de la toma de la biopsia, y los otros tres casos (dos cirrosis y un carcinoma hepatocelular sobreañadido a una de las cirrosis) sóloamente tenían realizada determinación serológica en una ocasión y cabe pensar en error de manipulación, preservación o técnica en el procesado del suero.

El hecho de que los marcadores tisulares sean negativos se

TABLA XIII. DISCREPANCIAS SEROLOGIA NEGATIVA / ADN POSITIVO

DIAG	SUERO			TEJIDO	
	HBsAg	Anti -HBs	Anti -HBc	HBsAg	HBcAg
HCA	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-
CHC	-	-	-	-	-

explica por el hecho de que son poco sensibles y que aunque afirman si son positivos, no niegan si son negativos.

Por ello, consideramos a estos enfermos como falsos negativos serológicos a la vista de lo expuesto y a la alta sensibilidad y especificidad de la técnica de HIS que en casos de serología negativa para el HBsAg es capaz de detectar genoma viral (135).

#### 4.10 LOS HEPATOCARCINOMAS

Esta serie cuenta con 16 casos de CHC, de los cuales 7 (43.8%) no presentan positividad a los marcadores serológicos del VBH y 9 (56.2%) sí la muestran, siendo éstos por tanto candidatos a la posible acción carcinogénica del VBH.

En principio, y aunque excluyésemos el caso de ADN positivo del grupo con serología negativa, quedarían 6 casos (37.5%) sin evidencia de contacto con el VBH, lo que nos hace pensar que aunque el VBH sea un factor patogénico importante en el desarrollo del CHC, en nuestro medio hay todavía un grupo importante de CHC no relacionados con el VBH.

#### 4.10.1 CARCINOMAS HEPATOCELULARES CON SEROLOGIA NEGATIVA

En el grupo de CHC con serología negativa de contacto para el VBH (Tabla XIV), un solo caso mostró positividad para genoma viral con HIS, y el tejido cirrótico que le acompañaba mostraba también positividad con la HIS.

Como hemos comentado antes, puede tratarse de un falso negativo serológico.

#### 4.10.2 CARCINOMAS HEPATOCELULARES CON SEROLOGIA POSITIVA

En el grupo de CHC con serología de contacto con el VBH (Tabla XV), únicamente un caso mostró positividad tisular para genoma viral con la HIS (Fig. 33).

Merece la pena destacar que la mayoría presenta un patrón serológico de contacto antiguo que pudiera sugerir una integración de genoma viral en el lugar adecuado para producir una transformación tumoral. El genoma viral estaría integrado en tan pequeña cantidad que ni él ni las proteínas que codifica serían detectables.

Los tres casos que se acompañaban de tejido cirrótico, éste era positivo con la HIS para genoma viral, lo que sugiere que, aunque el hígado está infectado, la integración transforma al

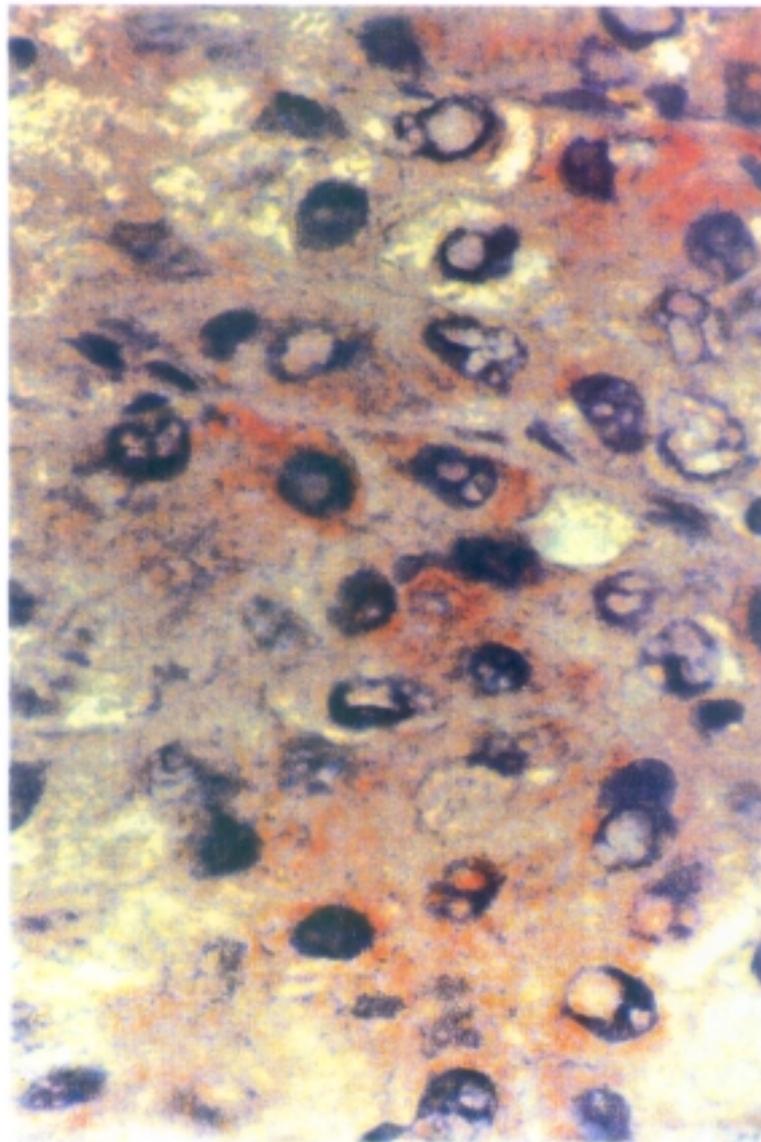
TABLA XIV. CARCINOMA HEPATOCELULAR CON SEROLOGIA NEGATIVA

CASO	HBsAg	Anti -HBs	Anti -HBc	ADN en CHC	Marcadores Tisulares		Tejido Cirrotico Acompañante	ADN en Tej Cirr
					HBsAg	HBcAg		
1	-	nd	-	-	-	-	no	
2	-	-	-	-	-	-	no	
3	-	-	-	-	-	-	no	
4	-	-	-	+	-	-	si	+
5	-	-	-	-	-	-	no	
6	-	-	-	-	-	-	si	-
7	-	-	-	-	-	-	si	-

(nd= no determinado)

TABLA XV. CARCINOMA HEPATOCELULAR CON SEROLOGIA POSITIVA

CASO	HBsAg	Anti -HBs	Anti -HBc	ADN en CHC	Marcadores Tisulares		Tejido Cirrotico Acompañante	ADN en Tej Cirr
					HBsAg	HBcAg		
1	-	+	+	+	-	-	no	
2	-	+	+	-	-	-	si	+
3	-	+	+	-	-	-	no	
4	-	-	+	-	-	-	no	
5	-	-	+	-	-	-	no	
6	-	-	+	-	-	-	no	
7	-	-	+	-	-	-	si	+
8	-	-	+	-	-	-	no	
9	+	-	+	-	-	-	si	+



**Fig. 33 Positividad de un carcinoma hepatocelular con la HIS (AEC/H 1000 x).**

hepatocito de tal modo que induce la tumoración y no permite reinfección, y además, la cantidad de genoma viral integrado es tan pequeña como para que no exista ARN pregenómico.

#### 4.11 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA HIS

Al establecer concordancias entre los marcadores serológicos y tisulares del VBH con el ADN tisular detectado por medio de la HIS (Tabla XVI) observamos que la mayor concordancia de los marcadores serológicos corresponde al HBsAg y anti-HBs.

La concordancia del HBsAg y HBcAg en tejido es aún mayor que con los marcadores serológicos.

Es decir que cuando el HBsAg o el anti-HBs en suero son positivos, existe una alta probabilidad de que el ADN tisular sea positivo, alcanzando dicha probabilidad el 100% si el HBsAg o el HBcAg tisulares son positivos.

En cambio, cuando dichos marcadores, tanto en suero como en tejido, son negativos, todavía la HIS detecta genoma viral y por tanto casos con evidencia de infección por el VBH.

En conjunto indica una alta sensibilidad de la técnica de HIS así como una alta especificidad.

Tabla XVI. CORRELACION ENTRE MARCADORES DEL VBH Y ADN TISULAR

		ADN+	ADN-	TOTAL	%ADN+	%ADN-
<b>SEROLOGICOS</b>						
HBsAg	+	26	2	28	92.9	7.1
	-	75	35	110	68.2	31.8
Anti -HBc	+	78	11	89	87.6	12.4
	-	14	23	37	37.8	62.2
Anti -HBs	+	34	3	37	91.9	8.1
	-	43	30	73	58.9	41.1
Alguna Serologia	+	85	12	97	87.6	12.4
<b>TISULARES</b>						
HBsAg	+	17	0	17	100.0	0.0
	-	68	32	100	68.0	32.0
HBcAg	+	9	0	9	100.0	0.0
	-	71	32	103	68.9	31.1

Si tomamos como base la HIS y la comparamos con los diferentes marcadores del VBH en suero tanto por separado como en conjunto, se observa que los marcadores serológicos más específicos son el HBsAg y el anti-HBs, si bien son de baja sensibilidad (Tabla XVII).

La sensibilidad de los marcadores serológicos es mayor cuando se valoran todos ellos en conjunto. En cambio cuando todos los marcadores el suero son negativos lo más probable es que la HIS resulte negativa. Si ésta aparece positiva será posiblemente debido a su alta sensibilidad.

Tabla XVII. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD  
DE LOS DIFERENTES MEDIOS USADOS

TIPOS DE MARACADORES EN SUERO

ADN	Marcador	HBsAg		Sólo Anti-HBc		Anti-HBs		Algún Marcador Positivo		Todos Marcadores Negativos	
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
-	+	2	1.4	7	5.1	3	2.7	12	8.7	16	11.6
-	-	35	25.4	30	21.7	30	27.3	25	18.1	21	15.2
+	+	26	18.8	25	18.1	34	30.9	85	61.6	97	70.3
+	-	75	54.3	76	55.1	43	39.1	16	11.6	4	2.9
TOTAL		138		138		110		138		138	
SENSIBILIDAD		0.26		0.25		0.44		0.84		0.96	
ESPECIFICIDAD		0.95		0.81		0.91		0.68		0.57	

## 5. DISCUSSION

## 5. DISCUSION

### 5.1 PATOLOGIA HEPATICA DE LOS ENFERMOS ESTUDIADOS

La primera señal de infección por el VBH suele ser la aparición de sintomatología o de alteraciones enzimáticas que motivan la consulta del enfermo.

Los enfermos investigados en este estudio fueron todos biopsiados y el estudio anatomopatológico demostró en todos ellos patología hepática, dentro del espectro de la hepatopatía inducida por el VBH.

La patología hepática inducida por el VBH es de una gravedad progresivamente creciente en relación con el tiempo transcurrido desde el momento de la infección (36,40,41,43).

El tiempo de evolución de la infección por VBH conlleva una secuencia de sucesos que tiene su inicio en la hepatitis aguda, progresando hacia hepatitis crónica (persistente y activa) y terminando en cirrosis y, si las condiciones son favorables, en carcinoma hepatocelular (69).

La secuencia completa es, pues, la consecuencia de la infección prolongada, más o menos latente, por el VBH.

La infección viral en los enfermos de nuestro estudio, se ha mantenido, bien en estado latente, bien en estado clínico evidente, independientemente del patrón de inmunidad (anti-HBs +) o contacto antiguo (anti-HBc +), según hemos definido anteriormente.

Por medio de diferentes estudios clínicos y experimentales (30,33,42,43,60) se ha demostrado que el hecho de que la infección viral permanezca en estado de latencia depende, por una parte, del estado inmunológico del enfermo y, por otra, de los niveles de replicación que presente el virus en un momento dado.

La infección activa por el VBH supone, en cualquier fase de su evolución, que puede existir replicación viral. Períodos de exacerbación clínica coinciden con los mayores niveles de replicación del virus, por lo que se infecta una mayor cantidad de hepatocitos que, a su vez, son diana de los mecanismos inmunológicos del huésped, con necrosis hepatocelular como resultado final (30,36,41,44,83,91,106).

Esta secuencia repetitiva de inflamación y necrosis, unida a la capacidad de regeneración del hepatocito se traduce, tanto clínica como histopatológicamente, en los diferentes tipos de hepatopatías crónicas inducidas por el VBH.

La historia de la infección, desde la primoinfección hasta el posible desarrollo de un CHC, con una secuencia de lesiones que incluyen las diferentes hepatitis crónicas y cirrosis, implica pues una serie alternante de exacerbaciones y remisiones clínicas que son la expresión de los distintos niveles de replicación que sufre el virus (146).

Estudios experimentales (147) demuestran que el genoma viral permanece en el hepatocito, no sólo después de desaparecer la sintomatología clínica de infección sino también tras la normalización serológica de los marcadores de infección y de la aparición del estado serológico de inmunidad (anti-HBs +).

Por lo tanto, la persistencia del genoma viral a nivel del hepatocito es considerada como la secuela natural de la infección por el VBH. La integración de secuencias de su genoma al del hepatocito será así mismo una consecuencia, aunque más tardía, de dicha infección (40,80,153).

Ello, consecuentemente, implica tanto la permanencia del virus en estado de latencia como la posibilidad de su reactivación (147).

Los pacientes que hemos agrupado con un patrón de inmunidad (anti-HBs+) confirman la permanencia del virus, tanto por mostrar una lesión histopatológica con trascendencia clínica como por

mostrar positividad con la HIS, lo cual indica la existencia de replicación viral.

## 5.2 ASPECTOS TECNICOS DE LA HIBRIDACION IN SITU

La HIS aplicada al VBH es una técnica laboriosa si se compara con la mayoría de las técnicas habituales de histoquímica e inmunohistoquímica.

Uno de los pasos más críticos es la digestión con la Proteinasa K para liberar los ácidos nucleicos. Un exceso de acción de dicha enzima conduce a la desaparición de la mayoría del esqueleto citoplásmico, con lo que se pierden los ácidos nucleicos existentes en el citoplasma y la reacción de hibridación es imposible de realizar.

Una cuidadosa selección de la dilución apropiada de la Proteinasa K en relación con los medios de fijación que hemos usado en nuestro servicio, así como del tiempo de incubación de la misma, han sido fundamentales para la obtención de resultados valorables.

Así mismo, ha sido muy importante el uso de controles, tanto positivos como negativos. Unos y otros nos han asegurado la validez y reproductibilidad de la técnica al ser introducidos ambos y de forma repetida durante las múltiples realizaciones de la técnica, especialmente hasta lograr su puesta a punto.

Otro aspecto importante ha sido la fase de desnaturalización de los ácidos nucleicos.

Dado que trabajábamos con material fijado en formol e incluido en parafina, los tiempos y temperaturas de la desnaturalización han podido ser aumentadas hasta 15 minutos y 95° respectivamente, sin reacciones adversas.

Con el ajuste de estos pasos y siguiendo la pauta general de la técnica, cada vez que se ha realizado ésta se han obtenido los resultados previstos no sólo en las muestras de control sino también en las muestras que se iban a analizar. Las discrepancias surgidas se comentan en los resultados así como en esta discusión.

### 5.3 PATRONES DE TINCIÓN DE LA HIS

Nuestra experiencia con la HIS nos ha permitido definir unos patrones de tinción de la misma y que se refieren, bien a la forma que tiene de mostrarse la positividad de la tinción (granular u homogéneo), bien a la forma que tiene de distribuirse dicha tinción en el citoplasma del hepatocito (citoplásmico o submembranoso).

Otra forma de valorar la positividad de la HIS es por su distribución en el lobulillo hepático, donde se distingue la forma periportal y la forma difusa. Estas formas de tinción ya han sido

descritas en la literatura (107) y nuestros hallazgos son coincidentes con estos datos.

En las diferentes correlaciones efectuadas se observa que el patrón de tinción homogéneo predomina en las HCP y HCA, el patrón de distribución citoplásmica es predominante en todas las lesiones y que el patrón de distribución lobulillar en su forma difusa predomina sobre el patrón de distribución periportal en la HCA.

#### 5.4 CORRELACION DE LA HIS CON LOS MARCADORES DEL VBH

Los métodos recientemente desarrollados para la detección de la infección por el VBH muestran no sólo mayor especificidad sino también mayor sensibilidad que los métodos clásicos.

Así, los métodos de hibridación del genoma viral por medio del Southern blot y dot blot (61,146,148) y las técnicas de ampliación genética como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) (149,150,166) han demostrado ser más eficaces que los métodos serológicos para la detección de infección por el VBH, donde se han observado falsas positividades en la detección del HBsAg así como deficiente especificidad y sensibilidad en la detección del anti-HBc (62,63).

A pesar pues del perfeccionamiento de los medios de detección

inmunológicos, tanto en suero como en tejido, su eficacia no alcanza la obtenida por los medios de hibridación o PCR (57,135).

La HIS, como técnica derivada de la hibridación de los ácidos nucleicos, consigue demostrar presencia de genoma viral incluso en los casos en que el HBsAg en suero es negativo, lo cual ha sido confirmado por estudios doble ciego basados en la determinación simultánea de genoma viral con la técnica de Southern blot (135).

En nuestros estudios experimentales se demuestra que secuencias del genoma viral son detectables en prácticamente todos los casos con serología de contacto con el VBH, lo que indica una apreciable correlación entre los marcadores serológicos y la HIS.

Las discrepancias existentes pueden ser atribuidas a la menor especificidad y sensibilidad de los marcadores serológicos y tisulares (como lo demuestra el caso en que a los dos años de realizar la biopsia hepática el enfermo presentaba anti-HBs+ en suero, lo que indica un falso negativo serológico en el primer examen).

Así mismo se deriva de nuestra experiencia que los marcadores tisulares, aunque específicos, son poco sensibles, de tal forma que cuando son positivos la HIS resulta positiva. En cambio si su resultado es negativo, ello no excluye una posible positividad de la HIS (mayor sensibilidad de la HIS).

## 5.5 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA HIS

El genoma del VBH se expresa, tanto en el suero como en el tejido, a través de proteínas, siendo la primera conocida el HBsAg o antígeno Australia (11) con posterior reconocimiento del HBcAg y HBeAg (16,20,21).

Más recientemente se ha identificado también la proteína X o HBxAg (23).

También son formas de expresión del genoma viral y que se relacionan con replicación viral activa, el hallazgo de VBH-ADN en suero y de actividad de la ADN polimerasa del VBH (14,15).

Las proteínas que tienen propiedades antigénicas producen en el huésped una respuesta inmunológica. La reacción antígeno-anticuerpo que ello produce puede ser la causa de que los métodos de laboratorio convencionales no detecten estas proteínas, al no permitir la existencia de proteínas virales libres en cantidad suficiente para ser detectadas (84).

En caso de que la infección viral persista en estado de latencia, algunas de esas proteínas pueden dejar de expresarse. Ello puede ser debido primero a que, en la evolución de la infección, el genoma viral sufra mutaciones cuya consecuencia sería

la expresión de proteínas anómalas o diferentes, y segundo, incluso a la ausencia real de las mismas, lo que, en cualquier caso, hace que no sean detectables por los métodos habituales (151,152,153).

Por lo tanto la ausencia de detección de las proteínas expresadas por el genoma viral no significa en ningún caso ni la curación de la enfermedad ni el aclaramiento del virus, sino, simplemente, variaciones en la expresión de su genoma. En algunos casos, ello significa incluso la aparición de formas clínicas de infección más graves que las habituales (154-156).

De todo ello se deduce, teniendo en cuenta además los artefactos secundarios al procesamiento de las muestras, como la expresión de proteínas y su detección es mucho más lábil que la de los ácidos nucleicos.

En el proceso de síntesis de antígenos o marcadores del VBH, existe una fase intermedia hasta la expresión de estas proteínas. Son los ARN mensajeros encargados de traducirlas. Estos ARNm sirven de intermediarios en la expresión viral y son identificados cada vez en mayor número debido a la presencia de las modernas técnicas de diagnóstico (151,152,157-159).

Estos ARNm pueden ser detectados por la sonda usada en la HIS. El ARNm se unirá a la sonda en caso de que, en condiciones de baja estringencia, el 70% de las bases sean complementarias, mientras

que si las condiciones son de alta estringencia, deberán ser complementarias del 90% al 100% de las bases (130).

En nuestro estudio, observamos un alto porcentaje de positividad de la HIS que es más llamativo en los grupos con patrón de infección (HBsAg+) (92.8%) y con patrón de inmunidad (anti-HBs+) (91.9%), reflejando una mayor actividad replicativa en estos casos.

La positividad es porcentualmente mayor cuando se compara la HIS con los marcadores tisulares del VBH, lo cual es indicativo de los siguientes hechos:

Por un lado, de la facilidad con que se degradan las proteínas durante la fijación y procesado del tejido, siendo especialmente perjudicial para éstas las altas temperaturas necesarias para la inclusión en parafina.

Por otro lado, de que mientras la inmunohistoquímica detecta sólo una proteína, la HIS detecta varios ARNm que codifican varias proteínas además de detectar ARN pregenómico y la cadena L del VBH-ADN, que se acumula en el citoplasma de los hepatocitos (17,116,140,141), lo cual explica la alta sensibilidad de la técnica.

La menor positividad (78.2%) en el grupo de contacto antiguo con el VBH (anti-HBc+) observada en este estudio indicaría

aclaramiento viral con el paso del tiempo, si bien el alto porcentaje de CHC en este grupo (15.2%) también puede significar que, con el paso del tiempo, las posibilidades de integración de secuencias del genoma del VBH aumentan y ello conduce eventualmente al proceso de carcinogénesis.

De hecho, el desarrollo del CHC siempre va asociado a una infección de larga duración por el VBH (69,78) excepto en la infancia, donde la posible transmisión vertical de la infección condiciona una aceleración de los mecanismos patogénicos (101-103).

La sensibilidad y especificidad de la técnica de la HIS son además corroboradas por estudios comparativos con otros medios de hibridación con electroforesis como el dot blot y el Southern blot (135).

De nuestros estudios experimentales se deduce que la HIS es una técnica especialmente sensible en pacientes con HBsAg + en suero (92.8%) y en pacientes con anti-HBs+ en suero (91.9%), siendo su sensibilidad baja cuando se aplica a patología tumoral (CHC).

#### 5.6 LA HIS Y CASOS DE SEROLOGIA DUDOSA PARA EL VBH

En el presente estudio se incluyeron 16 casos con patología hepática cuyos marcadores serológicos para el VBH estaban

incompletos, siendo negativos los que se habían realizado.

Estos casos fueron todos ellos HBsAg negativos, aunque carecemos del resultado del anti-HBs o del anti-HBc.

Un alto porcentaje de estos casos mostró existencia de secuencias de genoma del VBH con la HIS, lo cual indica que, de haber tenido estos marcadores serológicos realizados, dichos casos podrían incluirse o bien en el grupo de patrón de inmunidad o bien en el grupo de contacto antiguo.

Este resultado, además de corroborar la gran sensibilidad de la técnica de HIS, indica la importancia de la investigación de la infección del VBH a través de este medio, para así detectar todos los casos susceptibles de ser beneficiados por los tratamientos actuales.

#### 5.7 LA HIBRIDACION IN SITU Y EL CARCINOMA HEPATOCELULAR

En nuestra serie se han estudiado 16 CHC, de los cuales el 62.4% tienen evidencia serológica o por HIS de estar relacionados con el VBH.

La relación entre CHC y VBH es menor por tanto en nuestro

medio que en las llamadas zonas endémicas como Oriente Medio, Asia suroriental, China, Japón y Africa sub-sahariana, donde llega al 90% el número de casos de CHC con determinaciones positivas relacionadas con el VBH (HBsAg + en suero) (67-71,160).

En otros países de la cuenca mediterránea, en cambio, se ha observado que apenas se detecta genoma viral en los casos de hepatocarcinoma y la zona sur de Europa es conocida por presentar una menor incidencia de CHC relacionado con el VBH (161,162). Datos epidemiológicos similares se han obtenido en USA (66), donde la incidencia de infección por el VBH es también baja.

Todas estas observaciones en conjunto indican que alguna otra etiología como alcohol, hemocromatosis, deficiencia de alfa-1-antitripsina etc., pueda influir directamente en el desarrollo de CHC en estas zonas, incluido nuestro medio.

Todavía hoy desconocemos cuál es el mecanismo patogénico que relaciona el VBH con el CHC. A pesar de los estudios realizados para conocer la estructura y función del genoma viral integrado, la variedad de hallazgos es tanta que no se encuentra una explicación común.

Parece que son muy escasos los CHC que muestran integración de la totalidad del genoma viral, siendo más frecuentes los casos en que sólo porciones o fragmentos del genoma se hallen integrados

(153).

A pesar de ello, en algunos estudios se ha observado que el 40% de los CHC continúan mostrando replicación viral activa (162,163).

Los fragmentos de genoma viral más frecuentemente integrados corresponden a los genes X y S, que codifican las proteínas HBxAg y HBsAg respectivamente (98,151,164).

Aún hoy sigue siendo desconocido el mecanismo por el cual el genoma viral integrado induce el desarrollo de CHC. El hecho de que el gen X así como las regiones S2 y Pre-S tengan una acción transactivadora sugiere que el genoma viral integrado podría activar a distancia tanto oncogenes como áreas receptoras de sustancias carcinogénicas tales como el ácido retinoico (84-86,164).

En un estudio de CHC recurrentes, se observó que no todas las recidivas pertenecían al mismo clon celular, sino que, por lo menos la mitad de ellas, correspondían al nacimiento de un nuevo clon hepatocelular neoplásico (165).

Entre los casos incluidos en este estudio, son pocos los CHC que muestren positividad para secuencias del genoma del VBH, y parece lógico atribuir este hecho a los cambios y mutaciones

existentes en el ADN del VBH secundarios o acompañantes a la transformación maligna.

Esto estaría en consonancia con el hecho de que, en el tejido cirrótico vecino a los tumores, en nuestra serie, se demuestra positividad para secuencias del genoma del VBH con la HIS.

Pensamos que al producirse una integración favorable del genoma viral a lo largo de la infección, se desarrolla el hepatocarcinoma, y a partir de este momento, el tumor podría evolucionar independientemente del resto del tejido hepático.

El clon celular independiente contiene una pequeña cantidad de genoma viral que, siendo insuficiente para ser detectada, es capaz de activar diferentes factores que condicionan el crecimiento celular e incluso de modificar la célula haciéndola más resistente a la reinfección o a la replicación del VBH (49,64), siendo el resultado una tumoración de crecimiento autóctono compuesta de células no permisivas para infección y replicación viral.

De hecho, es posible que sólo algunos tumores reúnan las condiciones características en cuanto a suficiente contenido de genoma viral y a permisividad celular para facilitar que prosiga la multiplicación del virus (146,163).

## 6. CONCLUSIONES

## 6. CONCLUSIONES

6.1 Las biopsias examinadas en los enfermos con serología de contacto con el VBH muestran una patología que varía entre hepatitis aguda y carcinoma hepatocelular, dentro del espectro previsible que induce el VBH.

6.2 La HIS es capaz de detectar genoma viral en todas las fases de la infección por el VBH, independientemente de la lesión histológica existente.

6.3 La HIS del VBH es una técnica que, aunque algo más compleja que la inmunohitoquímica, puede llevarse a cabo en el laboratorio de Anatomía Patológica dotado con los medios habituales, y su duración no alcanza las 6 horas.

6.4 Una vez montada y puesta a punto, la HIS puede quedar en manos del personal auxiliar del laboratorio, pudiendo realizarse como cualquier otra técnica, si bien es recomendable agrupar los casos cuando se vaya a realizar.

6.5 Los ácidos nucleicos virales se evidencian en el citoplasma de los hepatocitos tanto en forma granular como homogénea no observándose diferencias importantes entre ambas

formas de tinción en la mayoría de las lesiones hepáticas excepto en las HCP y HCA, donde predomina el patrón de tinción homogéneo.

6.6 En el citoplasma del hepatocito, la señal de los ácidos nucleicos virales puede ser difusa o submembranosa, mostrando nuestro estudio un importante predominio del patrón difuso citoplásmico en todas las lesiones hepáticas.

6.7 Se observan también, dentro del lobulillo hepático, dos patrones de distribución de la positividad de la HIS: el periportal y el difuso. En general se observa predominio del patrón difuso excepto en la HCP, donde ambos patrones se manifiestan en proporción similar.

6.8 Nuestro estudio no ha demostrado relación entre la cantidad de tinción por célula o cantidad de células teñidas y el tipo de lesión hepática, observándose predominio de las cantidades leves de ambas en todas las lesiones.

6.9 Entre la HCP y la HCA existen diferencias significativas desde el punto de vista estadístico entre los patrones de tinción periportal y difuso, con predominio del patrón difuso en la HCA ( $P < 0.05$ ).

6.10 A mayor tiempo de infección, aumenta el aclaramiento de los marcadores de los marcadores inmunohistoquímicos, tal como se

deduce de los bajos porcentajes de positividad de éstos en el grupo con patrón de contacto antiguo (anti-HBc +). Esta negatividad no se corresponde con un aclaramiento de genoma del virus detectado por la HIS.

6.11 Algunos casos con patrón de inmunidad (anti-HBs +) muestran negatividad con la HIS. Esto puede ser debido a tres causas:

- Curación real de la enfermedad con aclaramiento del virus.
- Lesión hepática de etiología ajena al VBH, contra el que el paciente presenta inmunidad.
- Error de muestreo en la toma de la biopsia, no obteniendo hepatocitos que alberguen secuencias del genoma del VBH.

6.12 El grupo de patrón de contagio antiguo muestra menor porcentaje de positividad con la HIS, probablemente debido al alto número de CHC incluidos en este grupo, susceptibles de sufrir mutaciones genéticas en el transcurso de la carcinogénesis que conllevan ausencia de replicación viral.

6.13 La positividad del HBsAg o del anti-HBs en suero indica alta probabilidad de existencia de ADN viral en el tejido, detectable con la HIS. Esta probabilidad alcanza el 100% si el HBsAg o el HBcAg tisulares son positivos.

6.14 La sensibilidad de la HIS es mayor que la de las

técnicas serológicas aplicables al VBH, puesto que es capaz de detectar casos de infección que no producen manifestaciones serológicas.

6.15 La HIS puede demostrar genoma viral incluso cuando todos los marcadores, tanto serológicos como tisulares, para el VBH son negativos. Esto es indicativo de la alta sensibilidad de la técnica.

6.16 La HIS puede ser una técnica eficaz y de utilidad clínica para definir con precisión la ausencia o potencial de infección por el VBH en casos con serología dudosa.

6.17 En nuestro estudio, los casos de CHC relacionados con el VBH son menos de los esperados si este virus fuera el único agente etiológico del CHC.

## 7. RESUMEN

## 7. RESUMEN

Se han investigado 142 biopsias hepáticas pertenecientes a 136 enfermos con el método de hibridación in situ (HIS) para observar la posible existencia de secuencias del genoma del virus B de la hepatitis (VBH) en los hepatocitos de estos enfermos afectados de diferentes formas de hepatopatía crónica.

Para el estudio, los casos se han clasificado en cinco grupos distintos según los resultados de los marcadores serológicos del VBH. De ellos, 101 mostraban evidencia de contacto con dicho virus.

La HIS demostró secuencias del genoma viral en un alto porcentaje de pacientes con evidencia serológica de contacto con el VBH. El porcentaje que alcanzó prácticamente la totalidad de los casos en los grupos con patrón de infección (HBsAg+) e inmunidad (anti-HBs). También se ha detectado genoma viral en algunos enfermos con marcadores serológicos negativos para el VBH.

Se ha valorado la especificidad y sensibilidad de la HIS para detectar infección por el VBH en pacientes con diferentes tipos de hepatopatía crónica, especialmente en aquellos casos con serología dudosa.

Igualmente, se han definido los distintos patrones de tinción celular y tisular.

Se exponen además diferentes consideraciones relativas a los resultados, haciendo hincapié en los casos de discrepancia entre marcadores serológicos e HIS, con especial referencia a los casos de carcinoma hepatocelular (CHC).

## 8. BIBLIOGRAFIA

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Zuckerman AJ.: The history and epidemiology of infectious and serum hepatitis. En Zuckerman AJ ed. Virus diseases of the liver. Londres. Butterworth 1970: 16-42.
2. Lürman E.: Eine icterus epidemie. Berliner Klinische Wochenschrift 1885; 22: 20.
3. Mc Donald S.: Acute yellow atrophy. Edimburgh Med J 1908; 15: 208.
4. Beeson PB.: Jaundice occurring one to four months after transfusion of blood or plasma. JAMA 1942; 121: 1332-1334.
5. Mac Callum FO, Bradley WH.: Transmission of infective hepatitis to human volunteers. Lancet 1944; 2: 2-9.
6. Mac Callum FO.: Early studies of viral hepatitis. Br Med Bull 1972; 28: 105-108.
7. Krugman S, Giles JP, Hammond J.: Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological

types of infection. JAMA 1967; 200: 365-373.

8. Blumberg BS, Alter HJ, Vinich S.: A "new" antigen in leukemia sera. JAMA 1965; 191: 541-546.

9. Blumberg BS, Gertsley BJS, Hungerford DA, et al.: A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. Ann Intern Med 1967; 66:924-930.

10. Levene C, Blumberg BS.: Additional specificities of Australia antigen and the possible identification of hepatitis carriers. Nature 1969; 221: 195-196.

11. Le Bouvier G.: Subtypes of hepatitis B antigen: clinical relevance?. Ann Int Med 1973; 79: 894-896.

12. Dane DS, Cameron CH, Moya B.: Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet 1970; 1: 695-698.

13. Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ.: New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. Lancet 1971; 2: 1225-1227.

14. Kaplan PM, Greenman RL, Gerin JL et al.: DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. J Virol 1973; 12:

995-1005.

15. Robinson WS, Clayton DA, Greenman RL.: DNA of a human hepatitis B virus candidate. J Virol 1974; 14: 384-391.

16. Robinson WS, Lutwick LI.: The virus of hepatitis type B (Part I). N Engl J Med 1976; 295: 1168-1175.

17. Gerber MA, Hadziyannis S, Vissoulis C, Schaffner F, Paronetto F, Popper H.: Electron microscopy and immunoelectronmicroscopy of cytoplasmic hepatitis B antigen in hepatocytes. Am J Pathol 1974; 75: 489-502.

18. Huang SN.: Hepatitis-associated antigen hepatitis. An electron microscopic study of virus-like particles in liver cells. Am J Pathol 1971; 64: 483-500.

19. Michalak T, Nowoslawski A.: Hepatitis B virus in nucleoli of liver cells. (Letter). N Engl J Med 1977; 297: 787-788.

20. Robinson WS, Lutwick LI.: The virus of hepatitis type B (Part II). N Engl J Med 1976; 295: 1232-1236.

21. Hoofnagle JH.: Chronic hepatitis B (Editorial). N Engl J Med 1990; 323: 337-339.

22. Miller R, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH.: Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1989; 9: 322-327.
23. 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.
24. Wu JY, Zhou ZY, Judd A, Cartwright CA, Robinson WS.: The hepatitis B virus-encoded transcriptional trans-activator hbx appears to be a novel protein serine/threonine kinase. *Cell* 1990; 63: 687-695.
25. Goodarzi G, Ohno H, Adams R et al.: Mutational analysis of enhancer domains responsive to transactivation by the X gene of human hepatitis B virus. *Arch Virol* 1990; 114: 237-242.
26. Molnar-Kimber K, Summers J, Mason W.: Mapping of the cohesive overlap of duck hepatitis B virus DNA and the site of initiation of reverse transcription. *J.Virol* 1984; 51: 181-191.
27. Michel M-L, Tiollais P.: Structure and expression of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1987; 7: 61-63s.
28. Dikstein R, Faktor O, Ben-Levy R, Shaul Y.: Functional organization of the hepatitis B virus enhancer. *Mol Cell Biol* 1990;

7: 3682-3689.

29. Will H, Reiser W, Weimer T et al.: Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* 1987; 61: 904-911.

30. 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.

31. Blum HE, Haase AT, Harris JD, Walker D, Vyas GN.: Asymmetric replication of hepatitis B virus DNA in human liver: Demonstration of cytoplasmic minus-strand DNA by blot analysis and in situ hybridization. *Virology* 1984; 139: 87-96.

32. Bruder S.: Pathogenic human retroviruses (Editorial). *N Engl J Med* 1988; 318: 243-245.

33. Haywood AM.: Patterns of persistent viral infections. *N Engl J Med* 1986; 315: 939-948.

34. Mahalingam R, Wellish M, Wolf W, et al.: Latent varicella-zoster viral DNA in human trigeminal and thoracic ganglia. *N Engl J Med* 1990; 323: 627-631.

35. Kulski JK, Norval M.: Nucleic acid probes in diagnosis of viral disease of man: brief review. *Arch Virol* 1985; 83: 3-15.

36. Southern P, Oldstone MBA.: Medical consequences of persistent viral infection. *N Engl J Med* 1986; 314: 359-368.
37. Green M.: Transformation and oncogenesis: DNA viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Melnick JL, Roizman B, Shope RE, eds.: *Virology*. New York. Raven Press 1985: 183-234.
38. Nishioka K.: Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma: Postulates for an etiological relationship. In Klein G. ed, *Advances in Viral Oncology* vol 5. New York: Raven Press 1985: 173-199.
39. Shafritz DA.: Integration of HBV-DNA into liver and hepatocellular carcinoma cells during persistent HBV infection. *J Cell Biochem* 1982; 20: 303-316.
40. Shafritz DA, Shouval D, Sherman HI, Hadziyannis SJ, Kew MC.: Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1981; 305: 1067-1073.
41. Moreno-Otero R, García-Monzón C, García-Sánchez A, García-Buey L, Pajares JM, Di Bisceglie AM.: Development of cirrhosis after chronic type B hepatitis: A clinicopathologic and follow-up study of 46 HBeAg-positive asymptomatic patients. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 560-564.

42. Hoofnagle JH, Gerety RJ, Ni LY, Barker LF.: Antibody to hepatitis B core antigen. A sensitive indicator of hepatitis B virus replication. *N Engl J Med* 1974; 209: 1336-1340.
43. Diengstag JL.: Immunologic mechanisms in chronic viral hepatitis. in Vyas GN, Diengstag JL, Hoofnagle JH. eds *Viral hepatitis and liver disease*. New York: Grune & Statton 1984: 135-166.
44. García-Monzón C, Moreno-Otero R, Pajares JM et al.: Expression of a novel activation antigen on intrahepatic CD8,T lymphocytes in viral chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1990; 98: 1029-1035.
45. Chu CM, Shyu WC, Kuo RW et al.: HLA class I antigen display on hepatocyte membrane in chronic hepatitis B virus infection: Its role in the pathogenesis of chronic type B hepatitis. *Hepatology* 1988; 8: 712-717.
46. Pinto PC, Hu E, Bernstein-Singer M, Pinter-Brown L, Govindarajan S.: Acute hepatic injury after withdrawal of immunosuppressive chemotherapy in patients with hepatitis B. *Cancer* 1990; 65: 878-884.
47. Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Schafer DF et al.: Reactivation of chronic hepatitis B virus infection by cancer therapy. *Ann Intern*

Med 1982; 96: 447-449.

48. Gocke DJ.: Extrahepatic manifestations of viral hepatitis. Am J Med Sci 1975; 270: 49-52.

49. Galle PR, Schlicht H-J, Kuhn C, Schaller H.: Replication of duck hepatitis B virus in primary duck hepatocytes and its dependence on the state of differentiation of the host cell. Hepatology 1989; 10: 459-465.

50. Hosada K, Omata M, Uchimi K et al.: Extrahepatic replication of duck hepatitis B virus: more than expected. Hepatology 1990; 11: 44-48.

51. Davidson F, Alexander GJM, Trowbridge R, Fagan EA, Williams R.: Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leukocytes of chronic HBsAg carriers. A lack of relationship with serum markers of replication. J Hepatol 1987; 4: 37-44.

52. Muñoz Calvo B.: Detección del DNA del virus de la hepatitis B en tejido nervioso: consideraciones mecanicistas. Med Clin (Barc) 1990; 95: 601-604.

53. Genescá J, Esteban R.: Localización extrahepatica del virus de la hepatitis B. Med Clin (Barc) 1990; 95: 612-614.

54. Robinson WS.: The genome of hepatitis B virus. *Ann Rev Microbiol* 1977; 31: 357-377.
55. Okubo K, Nakamura T, Tokino T, Matsubara K.: Different type of hepatitis B virus (HBV) DNA integrants that may reflect the integration process. *Gastroenterol Jpn* 1990; 25s: 23-30.
56. Tozuka S, Uchida T, Suzuki K, Esumi M, Shikata T.: State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with noncarcinomatous liver disease. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 20-25.
57. 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; 92:192-198.
58. Shafritz DA, Kew MC.: Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1981; 1:1-8.
59. Marion PL, Salazar FH, Alexander JJ, et al.: State of hepatitis B viral DNA in a human hepatoma cell line. *J Virol* 1979; 33:795-806.
60. Paterlini P, Gerken G, Nakajima E, et al.: Polymerase chain reaction to detect hepatitis B virus DNA and RNA sequences in

primary liver cancers from patients negative for hepatitis B surface antigen. N Engl J Med 1990; 323:80-85.

61. Sun C-F, Pao CC, Wu S-Y, Liaw Y-F.: Screening for hepatitis B virus in healthy blood donors by molecular DNA hybridization analysis. J Clin Microbiol 1988; 26: 1848-1852.

62. Ratnam S, Stead F, Head CB.: False positive results with third generation monoclonal Hepatitis B surface antigen enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 1989; 27: 2102-2104.

63. Caspari G, Beyer H-J, Elbert G et al.: Unsatisfactory specificities and sensitivities of six enzyme immunoassays for antibodies to hepatitis B core antigen. J Clin Microbiol 1989; 27: 2067-2072.

64. London WT.: Primary hepatocellular carcinoma: Etiology, pathogenesis and prevention. Human Pathol 1981; 12: 1085-1097.

65. Amano S, Yamamoto H.: Infectious hepatitis and cirrhosis as its sequela in Japan. Pathological investigation. Ann Rep Institute for Virus Research, Kyoto University 1960; 3: 185-334.

66. Higginson J.: The geographical pathology of primary liver cancer. Cancer Res 1963; 23:1624-1633.

67. Sumithran E, MacSween RN.: An appraisal of the relationship between primary hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Histopathology* 1979; 3: 447-458.
68. Blumberg BS, London WT.: Hepatitis B virus and the prevention of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1981; 304: 782-784.
69. Smith JB, Blumberg BS.: Viral hepatitis, postnecrotic cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Letter). *Lancet* 1969; 2: 953.
70. Szmuness W.: Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: Evidence for a causal association. *Prog Med Virol* 1978; 24: 40-69.
71. Hadziyannis SJ.: Hepatocellular carcinoma and type B hepatitis. *Clin Gastroenterol* 1980; 9: 117-134.
72. Furuta S, Nagata A, Kiyosawa K et al.: Anti-HBc titer in relation to the aetiological role of hepatitis B virus in primary hepatocellular carcinoma. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* 1977; 24: 3-6.
73. Maupas P, Werner B, Larouze B et al.: Antibody to Hepatitis-B core antigen in patients with primary hepatic carcinoma. *Lancet* 1975; 2: 9-11.

74. Palmer BR.: Hepatitis B virus as the etiologic agent in hepatocellular carcinoma - Epidemiologic considerations. *Hepatology* 1982; 2: 21s-26s.
75. Fourel G, Tepo C, Bougueleret L et al.: Frequent activation of N-myc genes by hepadnavirus insertion in woodchuck liver tumors. *Nature* 1990; 347: 294-298.
76. Hirohashi S, Shimosato Y, Ino Y, Kishi K.: Distribution of hepatitis B surface and core antigens in human liver carcinoma and surrounding nontumorous liver. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 565-568.
77. Noyak NC, Dhar A, Sachdera et al.: Association of hepatocellular carcinoma and cirrhosis with hepatitis B virus surface and core antigens in the liver. *Int J Cancer* 1977; 20: 643-654.
78. Ilardi CF, Ying YY, Ackerman LV, Elias YM.: Hepatitis B surface antigen and hepatocellular carcinoma in the People's Republic of China. *Cancer* 1980; 46: 1612-1616.
79. Chakraborty PR, Ruiz-Opazo N, Shouval D, Shafritz DA.: Identification of integrated hepatitis B virus DNA and expression of viral RNA in an HBsAg-producing human hepatocellular carcinoma cell line. *Nature* 1980; 286: 531-533.

80. Edman JC, Gray P, Valenzuela P, Rall LB, Rutter WJ.: Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell line. *Nature* 1980; 286: 535-538.
81. Chen DS, Hoyer BH, Nelson J, Purcell RH, Gerin JL.: Detection and properties of hepatitis B viral DNA in liver tissue from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1982; 2: 42s-45s.
82. Bréchet C.: Hepatitis B virus (HBV) and hepatocellular carcinoma: HBV DNA status and its implications. *J Hepatol* 1987; 4: 269-279.
83. Jensen DM, McFarlane IG, Portmann BS, Eddleston ALWF, Williams R.: Detection of antibodies against a liver-specific membrane lipoprotein in patients with acute and chronic active hepatitis. *N Engl J Med* 1978; 299: 1-7.
84. Bréchet 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.
85. Chen PJ, Chen DS, Lai MY et al.: Clonal origin of recurrent hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 1989; 96: 527-529.
86. Dejean A, de The H.: Hepatitis B virus as an insertional

mutagen in a human hepatocellular carcinoma. Mol Biol Med 1990; 7: 213-222.

87. Wang J, Chenivresse X, Heuglein B, Brechot C.: Hepatitis B virus integration in a cyclin A gen in a hepatocellular carcinoma. Nature 1990; 343: 555-557.

88. Blumberg BS, Larouze B, London WT, et al.: The relation of infection with hepatitis B agent to primary hepatic carcinoma. Am J Pathol 1975; 81: 669-682.

89. World Health Organization. Prevention of liver cancer. WHO Technical Report Series 1983; n<sup>o</sup> 691.

90. Teres J, Guardia J, Bruguera M, Rodes J.: Hepatitis-associated antigen and hepatocellular carcinoma. Lancet 1971; 2: 215.

91. Obata H, Hayashi N, Motoike Y et al.: A prospective study on the development of the hepatocellular carcinoma from liver cirrhosis with persistent hepatitis B virus infection. Int J Cancer 1980; 25: 741-747.

92. Nakashima T, Okuda K, Kojiro M et al.: Pathology of hepatocellular carcinoma in Japan. 232 consecutive cases autopsied in ten years. Cancer 1983;51: 863-877.

93. Cohen C, Berson SD, Geddes EW.: Liver cell dysplasia: Association with hepatocellular carcinoma, cirrhosis and hepatitis B antigen carrier status. *Cancer* 1979; 44: 1671-1676.
94. Anthony PP, Vogel CL, Barker LF.: Liver cell dysplasia: A premalignant condition. *J Clin Pathol* 1973; 26: 217-223.
95. Esumi M, Aritaka T, Arii M et al.: Clonal origin of human hepatoma determined by integration of hepatitis B virus DNA. *Cancer Res* 1986; 46: 5767-5771.
96. Govindarajan S, Craig JR, Valinluck B.: Clonal origin of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 1988; 19: 403-405.
97. Thé H de, Marchio A, Tiollais P, Dejean A.: A novel steroid thyroid hormone receptor-related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma. *Nature* 1987; 330: 667-670.
98. Spandau DF, Lee C.: Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol* 1988; 62: 427-434.
99. Suzuki K, Uchida T, Horiuchi R, Shikata T.: Localization of hepatitis B surface and core antigens in human hepatocellular carcinoma by immunoperoxidase methods. Replication of complete virions of carcinoma cells. *Cancer* 1985; 56: 321-327.

100. Chedid A, Chejfec G, Eichorst M et al.: Antigenic markers of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1990; 65: 84-87.
101. Wu TC, Tong MJ, Hwang B, Lee SD, Hu MM.: Primary hepatocellular carcinoma and hepatitis B infection during childhood. *Hepatology* 1987; 7: 46-48.
102. Shimoda T, Uchida T, Miyata H, et al.: A 6 year old boy having hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B surface antigenemia. *Am J Clin Pathol* 1980; 74: 827-831.
103. Cheah PL, Looi LM, Lin HP, Yap SF.: Childhood primary hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus infection. *Cancer* 1990; 65: 174-176.
104. Knodell EG, 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.
105. Ulich TR, Anders K, Layfield L, Cheng L, Lewin KJ.: Chronic active hepatitis of hepatitis B and non-A, non-B etiology. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109: 403-407.
106. Blum H, Haase A, Vyas G.: Molecular pathogenesis of hepatitis B virus infection: Simultaneous detection of viral DNA and antigens

in paraffin embedded sections. Lancet 1984; 2: 771-773.

107. Herrmann G, Hübner K.: In-situ hybridization with HBV-cDNA as a sensitive method for the diagnosis of hepatitis B infection in persistent acute hepatitis. Hepato-gastroenterol 1987; 34: 148-151.

108. Caselman WH, Eisenburg J, Hofschneider PH, Koshy R.: Beta and gamma-interferon in chronic active hepatitis B: A pilot trial of short-term combination therapy. Gastroenterology 1989; 96: 449-455.

109. Perrillo RP, Schiff ER, Davis GL et al.: A randomized controlled trial of interferon alfa-2b for the treatment of chronic hepatitis B. N Engl J Med 1990; 323: 295-301.

110. Fenoglio-Preiser CM, Williams CL.: Molecular biology and the pathologist. General principles and applications. Arch Pathol Lab Med 1987; 111: 601-619.

111. DeLellis RA, Wolfe HJ.: New techniques in gene product analysis. Arch Pathol Lab Med 1987; 111: 620-627.

112. Bornkamm GW, Desgranges C, Gissmann L.: Nucleic acid hybridization for the detection of viral genomes. Curr Top Microbiol Immunol 1983; 104: 287-298.

113. Watson JD, Tooze J, Kurtz D.: Recombinant DNA, a short course.

New York. Scientific American Books 1983.

114. Southern EM.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; 98: 503-517.

115. Ross D.: Surgical pathology and DNA probes. Arch Pathol Lab Med 1987; 111: 20-21.

116. Brahic M, Haase AT, Cash E.: Simultaneous in situ detection of viral RNA and antigens. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 5445-5448.

117. Pardue ML, Gall JG.: Molecular hybridization of radioactive DNA of cytological preparations. Proc Natl Acad Sci USA 1969; 64: 600-604.

118. Dudin G, Cremer T, Schardin M, Hausmann M, Bier F, Cremer C.: A method for nucleic acid hybridization to isolated chromosomes in suspension. Hum Genet 1987; 76: 290-292.

119. Pardue ML, Gall JC.: Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. Meth Cell Biol 1975; 10: 1-16.

120. Pardue ML, Gall JC.: Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science 1970; 168: 1356-1358.

121. Unger ER, Budgeon LR, Myerson D, Brigati DJ.: Viral diagnosis by in situ hybridization. Description of a rapid simplified colorimetric method. *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 1-8.
122. Brigati DJ, Myerson D, Leary JL et al.: Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin embedded tissue sections using biotin labelled hybridization probes. *Virology* 1983; 126: 32-50.
123. Grody WW, Cheng L, Lewin KJ.: In situ viral DNA hybridization in diagnostic surgical pathology. *Human Pathol* 1987; 18: 535-543.
124. Haase A, Brahic M, Stowring L, Blum H.: Detection of viral nucleic acids by in situ hybridization. *Methods in Virology*. New York Academic Press 1984; 7: 189-226.
125. Haase AT.: Analysis of viral infection by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1986; 34: 27-32.
126. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J.: Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Stenberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1989; 320: 502-506.
127. Lo CW.: Localization of low abundance DNA sequences in tissue sections by in situ hybridization. *J Cell Sci* 1986; 81: 143-162.

128. Singer RH, Lawrence JB, Villnave C.: Optimization of in situ hybridization using isotopic and non isotopic methods. *Biotechniques* 1986; 4: 230-249.
129. Brahic M, Naase AT.: Detection of viral sequences of low reiteration frequency by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 6125-6129.
130. Höfler H.: Principles of in situ hybridization. En Polak JM y McGee O'D, eds. *In situ hybridization. Principles and practice.* Oxford: Oxford University Press, 1990: 15-29.
131. Burrell CJ, MacKay P, Greenaway PJ, Hofschneider PH, Murray K.: Expression in *Escherichia Coli* of hepatitis B virus sequences cloned in plasmid pBR322. *Nature* 1979; 279: 43-47.
132. Charnay P, Pourcel C, Louise A, Fritz A, Tiollais P.: Cloning in *Escherichia Coli* and physical structure of hepatitis B virion DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 2222-2226.
133. Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P.: Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* 1980; 286: 533-535.
134. Brechot C, Hadchovel M, Scotto J, et al.: Detection of hepatitis B DNA in liver and serum: a direct appraisal of the

chronic carrier state. Lancet 1981; 2: 765-768.

135. Rijntjes PJM, Van Ditzhuijsen TJM, Van Loon AM, Van Haelst VJGM, Bronkhorst FB, Yap SH.: Hepatitis B virus DNA detected in formalin fixed lever specimens and its relation to serologic markers and histopathologic features in chronic liver disease. Am J Pathol 1985; 120: 411-418.

136. Lieberman HM, Shafritz D.: Persistent hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma. In: Popper H, Shaffner F, eds. Progress in liver diseases vol 8 New York: Grune & Stratton, 1986; 395-415.

137. Brambilla C, Tackney C, Hirschman SZ et al.: Varying nuclear staining intensity of hepatitis B virus DNA in human hepatocellular carcinoma. Lab Invest 1986; 55: 475-481.

138. Villari D, Raimondo G, Smedile V et al.: Hepatitis B-DNA replicative and histological patterns in liver biopsy specimens of chronic HBsAg positive patients with and without delta virus superinfection. J Clin Pathol 1989; 42: 689-693.

139. Blum HE, Stowring L, Figus A, et al.: Detection of hepatitis B virus in hepatocytes, bile duct epithelium, and vascular elements by in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80:6685-6690.

140. Teo CG.: In situ hibridization in virology. In: In situ hibridization. Principles and practice. Polak JM, McGee J O'D, eds. Oxford. Oxford University Press 1990: 125-248.
141. Mason WS.: Asymetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: free minus strand DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 3997-4001.
142. Herrington CS, Flannery MJ, McGee J O'D.: Single and simultaneous nucleic acid detection in archival human biopsies. In: In situ hibridization. Principles and practice. Polak JM, McGee J O'D eds. Oxford. Oxford University Press 1990: 187-209.
143. Enzo Diagnostic, Inc. Product Cataloge 1988.
144. Tourtelotte W, Verity AN, Schmid P, Martinez S, Shapshak P.: Covalent binding of formalin fixed paraffin embedded brain tissue sections to glass slides suitable for in situ hybridization. J Virol Methods 1986; 15: 87-99.
145. Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H.: Proteinase K from Tritirachium album limber. Eur J Biochem 1974; 47: 91-97.
146. Lok ASF, Ma OCK.: Hepatitis B virus replication in chinese patients with hepatocellular carcinoma. Hepatology 1990; 12:

582-588.

147. Liang TJ, Blum HE, Wands JR.: Characterization and biological properties of a hepatitis B virus isolated from a patient without hepatitis B virus serologic markers. *Hepatology* 1990; 12: 204-212.

148. Lai ME, Farci P, Puxeddu A, Figus A, Arnone M, Balestrieri A.: The presence of nucleotide sequences of the hepatitis B virus in the serum of HBsAg-negative blood donors in Sardinia. *Minerva Med* 1990; 81: 383-386.

149. Kaneko S, Miller RH, Di Bisceglie A, Feinstone SM, Hoofnagle JH, Pourcell RH.: Hepatitis B virus DNA detection and comparison with hepatitis B surface antigen. *Gastroenterol Jpn* 1990; 25s: 57-61.

150. Lampertico P, Malter JS, Colombo M, Gerber MA.: Detection of hepatitis B virus DNA in formalin-fixed paraffin-embedded liver tissue by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1990; 137: 253-258.

151. Zhou DX, Yen TS.: Differentiated regulation of the hepatitis B virus surface gene promoters by a second viral enhancer. *J Biol Chem* 1990; 265: 20731-20734.

152. Ou J, Rutter WJ.: Hybrid hepatitis B virus-host transcripts in

a human hepatoma cell. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 83-87.

153. Lai MY, Chen PJ, Yang PM, Sheu JC, Sung JL, Chen DS.: Identification and characterization of intrahepatic hepatitis B virus DNA in HBsAg seronegative patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Taiwan. Hepatology 1990; 12: 575-581.

154. Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosada K, Ohto m.: Mutation in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. N Engl J Med 1991; 324: 1699-1704.

155. Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR, Ben-Porath E.: A hepatitis B virus mutant associates with an epidemic of fulminant hepatitis. N Engl J Med 1991; 324: 1705-1709.

156. Shafritz DA.: Variants of hepatitis B virus associated with fulminant liver disease. (Editorial). N Engl J Med 1991; 324: 1737-1739.

157. Nassal M, JUnker-Niepmann M, Schaller H.: Translational inactivation of RNA function: discrimination against a subset of genomic transcripts during HBV nucleocapsid assambly. Cell 1990; 63: 1357-1363.

158. Suzuki T, Kajimo K, Masvi N, Saito I, Miyamura T.: Alternative

splicing of hepatitis B virus RNAs in HepG2 cells transfected with the viral DNA. *Virology* 1990; 179: 881-885.

159. Miller RH.: Organization of the X gene region of the hepatitis B virus genome. *Gastroenterol Jpn* 1990; 25s: 1-5.

160. Chang MH, Chen PJ, Chen JY et al.: Hepatitis B virus integration in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma in childhood. *Hepatology* 1991; 13: 316-320.

161. Pontisso P, Stenico D, Diodati G et al.: HBV-DNA sequences are rarely detected in the liver of patients with HBsAg-negative chronic active liver disease and with hepatocellular carcinoma in Italy. *Liver* 1987; 7: 211-215.

162. Karayiannis P, Fowler MJ, Lok AS, Greenfield C, Monjardino J, Thomas HC.: Detection of serum HBV-DNA by molecular hybridization. Correlation with HBeAg/anti-HBe status, racial origin, liver histology and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1985; 1: 99-106.

163. Loncarevic IF, Schranz P, Zentgraf H et al.: Replication of hepatitis B virus in a hepatocellular carcinoma. *Virology* 1990; 174: 158-168.

164. Kekule AS, Lauer V, Meyer M, Caselmann WH, Hofschneider PH, Koshy R.: The pre S2/S region of integrated hepatitis B virus DNA

encodes a transcriptional transactivator. *Nature* 1990; 343: 457-461.

165. Chen PJ, Chen DS, Lai MY et al.: Clonal origin of recurrent hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 1989; 96: 527-529.

166. Yokosuka O, Omata M, Hosada K, Tada M, Ehata T, Ohto M.: Detection of hepatitis B virus genome by DNA amplification method. *Gastroenterology* 1991; 100: 175-181.