

A EXPRESSÃO INTRA-HEPÁTICA DO VÍRUS DA HEPATITE B NA HEPATITE CRÓNICA DELTA

F. RAMALHO, J. VELOSA, A. COSTA, A. BAPTISTA, M.C. DE MOURA

Unidade de Hepatologia do Serviço de Medicina 2 e Instituto de Anatomia Patológica. Hospital de Santa Maria. Lisboa.

RESUMO

Para avaliar a interferência do Vírus da Hepatite Delta (VHD) na expressão intra-hepática das partículas víricas do Vírus da Hepatite B (VHB), foi estudada a localização e expressão dos antígenos do core (AgHBc) e de superfície (AgHBs) em fragmentos de biópsias hepáticas de 39 doentes com infecção crónica Delta (anti-HD positivos) e 31 portadores do VHB sem infecção associada ao VHD (anti-HD negativos). O AgHBc foi positivo em 16.7% dos doentes AgHBe positivos com infecção Delta e em 91.4% dos casos apenas infectados com o VHB. Em contraste nos doentes AgHBe negativos, anti-HD negativos, o AgHBc intra-hepático foi apenas demonstrado em 32.6%. A expressão do AgHBc está significativamente associada à presença no soro do AgHBe ($p < 0.00001$) nos portadores do AgHBs não infectados com o VHD. A distribuição do AgHBc foi exclusivamente citoplasmática em 30% dos doentes com Hepatite Delta e nuclear e citoplasmática em 38,3% dos casos apenas com infecção crónica B. A localização nuclear estava diminuída na infecção associada ao VHD comparativamente aos portadores crónicos do VHB não infectados com aquele vírus. O AgHBs no fígado foi detectado em 70.3% e 82.3% dos doentes com e sem infecção Delta, respectivamente. A expressão membranosa do AgHBs associou-se significativamente ao AgHBe no soro ($p < 0.00001$) dos doentes sem infecção Delta, enquanto que este padrão foi menos observado na hepatite Delta ($p < 0.05$). A prevalência e a expressão do AgHBs no citoplasma não foi significativamente diferente entre os portadores do VHB infectados ou não com o VHD. Os nossos resultados demonstram: 1) diminuição da expressão intra-hepática do AgHBc e membranosa do AgHBs nos portadores do VHB superinfectados com o VHD, sugerindo redução da replicação do VHB. 2) a modificação da expressão do AgHBc e do AgHBs nos doentes infectados com o VHD parece demonstrar, mais do que um efeito inibitório, um efeito modelador do VHD na síntese dos produtos genéticos do VHB.

SUMMARY

The intrahepatic expression of the hepatitis B virus in chronic Delta hepatitis

In order to evaluate the interference of hepatitis Delta Virus (HDV) in hepatitis B viral particle (HBsAg, HBcAg) expression in the liver of chronic HDV patients, 39 and 81 liver biopsies of HBsAg carriers seropositive for anti-HDV and anti-HDV negative controls, respectively, were studied. HBcAg was positive in 16.7% of the HBeAg positive patients with HDV in the liver and in 91.4% of controls. In contrast, in HBeAg and anti-HDV negative patients the intrahepatic expression of HBcAg was detected in 32.6%. In anti-HDV negative patients the HBcAg liver expression correlated significantly with the HBeAg in serum ($p < 0.00001$). The distribution of HBcAg was exclusively cytoplasmatic in 30% of HDV-infected patients but mixed nuclear and cytoplasmic in 38.3% of the controls. The nuclear expression of HBcAg was decreased in chronic HDV infection. HBsAg was positive in 70.3% of patients who were anti-HDV positive and in 82.3% of controls. The membranous expression of HBsAg was detected less frequently in HDV-infected patients ($p < 0.05$) than in controls, while associated with HBeAg in serum of HBV carriers without HDV superinfection ($p < 0.00001$). The prevalence and the HBsAg cytoplasmic expression was not different for the chronic HDV infection or controls. Our results show: 1) decreased intrahepatic expression of HBcAg and membranous HBsAg in HBV carriers superinfected with HDV, suggesting decreased HBV replication in the liver of these patients. 2) the changing of HBcAg and HBsAg expression in the liver of HDV-infected patients, suggests not so much a decrease but rather a modulation in HBV replication.

INTRODUÇÃO

Vários trabalhos sugerem que o Vírus da Hepatite Delta (VHD) tem a capacidade de inibir a replicação

do Vírus da Hepatite B (VHB). Esta evidência vem desde os trabalhos iniciais de Mario Rizzetto, Purcell e

colaboradores^{1,2} em chimpanzés com infecção crónica Delta, nos quais foi observada uma diminuição transitória da expressão do antigénio do core (AgHBc) e de superfície (AgHBs) no fígado e no soro, contemporâneo ao aparecimento do antigénio Delta (AgHD) no fígado, passando pelos trabalhos de Caredda, Saraco, Ramalho e colaboradores³⁻⁵, que mostraram uma seroconversão do antigénio e do VHB (AgHBe) significativamente mais marcada nos portadores crónicos do VHB após a superinfecção pelo VHD. Nesta infecção, a maioria dos doentes têm baixos índices de replicação do VHB^{6,7} e por outro lado, estudos de Gonvindarajan, Ramalho, Hadziyannis e colaboradores⁸⁻¹⁰, mostram que a prevalência no soro do Ácido Desóxi-ribonucleico do VHB (ADN-VHB) e de AgHBc no fígado é significativamente menor nos portadores crónicos do VHB com infecção Delta associada. Contudo um trabalho recente de Bas e colaboradores¹¹ parece contradizer estes resultados, ao mostrar índices de viremia semelhante nos doentes AgHBe positivos independentemente de terem ou não infecção associada pelo VHD. Os achados prévios de que a prevalência da expressão do AgHBc no fígado e do ADN-VHB no soro é menor nos portadores anti-HBe positivos com infecção Delta, em contraste com aqueles não infectados^{9,10}, talvez traduza diferentes etiologias da doença hepática crónica entre estes dois tipos de doentes (como por exemplo a superinfecção pelo vírus da hepatite C; mutantes do VHB, etc), embora não se possa excluir a possibilidade da inibição da replicação exercida pelo VHD sobre o VHB¹². Todavia a inibição significa apenas terminar a replicação ou modelar a expressão do VHB? A distribuição e expressão intra-hepática dos produtos genéticos do VHB, nomeadamente o AgHBc, é um bom índice de replicação do VHB⁸. Com o intuito de avaliar a interferência da expressão das proteínas do VHB pelo VHD, estudamos a expressão do AgHBs e do AgHBc no fígado de doentes portadores do VHB com e sem infecção associada ao VHD.

MATERIAL E MÉTODOS

Doentes — O material de estudo compreendeu a análise imunocitoquímica de 120 biópsias hepáticas para o AgHBc, AgHBs e AgHD, das quais 39 pertenciam a doentes com infecção crónica Delta (anti-HD positivos) e 81 eram de portadores do VHB sem infecção associada pelo VHD (anti-HD negativos). Nos 81 doentes anti-HD negativos, 35 eram AgHBe positivos e 46 negativos para o AgHBe. Em 39 doentes anti-HD positivos, 12 eram positivos para o AgHBe e 27 anti-HBe positivos. A classificação histológica foi efectuada de acordo com os critérios Internacionais³. Nenhum doente foi previamente submetido a terapêutica imunossupressora ou anti-vírica. Todos eram negativos para o Vírus da Imunodeficiência Humana. As características clínicas e laboratoriais estão indicadas no Quadro 1.

Deteção dos Marcadores do VHB e VHD — O AgHBs, AgHBe e anti-HBe foram determinados por *Kits* comerciais de radioimunoensaio, e o anti-HD foi inicialmente determinado por um método imunoenzi-

QUADRO 1 — Dados clínicos e laboratoriais dos doentes estudados

	Anti-HD + vos	Anti-HD - vos	
N.º casos	39	81	
Idade média (anos)	27.1 (9-70)	33.5 (8-72)	
H/M	32/7	70/11	
AgHBc + / AgHBe -	12/27	35/46	
HCA +/- C	75.5*	35.3	P < 0.00001
ALT. (UI/L-média)	508.3**	231	P < 0.02

mático modificado⁵ e posteriormente por um método comercial.

Deteção dos Antigénios víricos no Fígado — As biópsias hepáticas foram obtidas por punção percutânea com agulha de Menghini e processadas e examinadas segundo os métodos *standard*. O AgHBc foi determinado pelo método da imunoperoxidase indirecta e o AgHBs pela técnica da peroxidase-anti-peroxidase como anteriormente descrito⁸. O AgHD foi inicialmente determinado por imunofluorescência e posteriormente por imunoperoxidase directa⁵. A relação topográfica entre o AgHBc, o AgHBs e a distribuição do AgHD no fígado foi determinada pela avaliação das mesmas áreas nas secções seriadas do material de biópsia.

Análise Estatística — Para analisar a significância estatística das associações entre as diferentes variáveis, aplicaram-se os testes não paramétricos do X² com correcção de Yates e o teste exacto de Fisher. A avaliação do grau de associação entre as variáveis foi determinada pelo coeficiente de Contingência em tabelas Kx2 ou 2xK. A verificação das variações e da interdependência foi realizada pelos coeficientes da correlação linear Gama ou de Kendall.

RESULTADOS

O AgHD foi detectado no núcleo dos hepatócitos em 12 portadores crónicos do VHB positivo para o AgHBe e em 27 anti-HBe positivos. A expressão do VHD no fígado e seu perfil serológico, mostra uma associação altamente significativa com os portadores negativos para o AgHBe ($p < 0.00001$; coeficiente Gama + 1). Em nenhum dos casos anti-HD negativos foi observada expressão intra-hepática do AgHD. A distribuição do AgHBc e do AgHBs em relação com a expressão do AgHD é mostrada nos quadros 2 e 3. Da análise de 120 fragmentos de biópsias hepáticas, verifica-se que o AgHBc foi detectado em 57, das quais 47 (39.2%) eram doentes sem infecção Delta e 10 (8.3%) de portadores do VHB com superinfecção pelo VHD ($p < 0.01$). Nestes, a distribuição do AgHBc foi exclusivamente nuclear em 4 casos (40%), citoplasmática em 3 (30%) e nos restantes simultaneamente no núcleo e no citoplasma. Nos doentes anti-HD negativos, o AgHBc localizou-se apenas no núcleo dos hepa-

QUADRO 2 — Padrões de distribuição do AgHBc intra-hepático e a sua relação com a infecção pelo VHD

	AgHBc Intra-Hepático		Negativo	Total
	Citoplasma	Núcleo		
Anti-HD + vo	6 (3)	4	29	39
Anti-HD - vo	29 (8)	18	34	81

() Indica localização exclusivamente citoplasmática

QUADRO 3 — Padrões de distribuição do AgHBs intra-hepático e a sua relação com a infecção pelo VHD

	AgHBs Intra-Hepático		Negativo	Total
	Citoplasma	Núcleo		
Anti-HD + vo	19	8	12	39
Anti-HD - vo	35	31	15	81

tócitos em 18 (38.3%), em 21 (44.7%) no citoplasma e núcleo e em 8 (17%) foi de localização apenas no citoplasma. Nos portadores anti-HD negativos e AgHBe positivos (quadro 4), a expressão intra-hepática do AgHBc foi observada em 32 doentes (91.4%). Em contraste, nos doentes negativos para o AgHBe, o AgHBc foi apenas detectado em 15 de 46 (32.6%) casos. A expressão do AgHBc no fígado, nos portadores anti-HD negativos, está significativamente associada à presença no soro do AgHBe ($p < 0.00001$; coeficiente Gama + 0.92). Nos doentes com infecção crónica Delta, em 74.4% dos casos (29 de 39) não foi encontrada expressão hepática do AgHBc. Destes, 10 eram AgHBe positivos e 19 tinham anticorpos, anti-HBe. Em contraste com os portadores do VHB sem infecção Delta, não foi observada associação significativa da expressão do AgHBc com o AgHBe no soro ($p = 1$). O AgHBs intra-hepático foi positivo em 27 de 39 doentes anti-HD positivos (69.2%) e estava ausente em apenas 18.5% dos portadores do VHB sem infecção Delta. A expressão membranosa do AgHBs foi menos frequentemente observada nos doentes infectados com o VHD, do que nos doentes anti-HD negativos (8/27 vs 31/66; $p < 0.05$). Este tipo de expressão do AgHBs, nestes últimos doentes, associou-se de uma forma significativa com o AgHBe sérico, pois foi encontrado em 24 de 35 (68.8%) portadores com este marcador ($p < 0.00001$; coeficiente Gama + 0.84). A expressão membranosa do AgHBs correlacionou-se com a presença do AgHBc no fígado, dado que 31 de 47 doentes com AgHBc tinham expressão membranosa do

QUADRO 4 — Correlação da distribuição intra-hepática do AgHBc e AgHBs com o perfil serológico do VHB com e sem infecção Delta

	AgHBc Intra-Hepático		AgHBs Intra-Hepático	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Anti-HD + vo				
AgHBe +	2	10	9	3
AgHBe -	8	19	18	9
Anti-HD - vo				
AgHBe +	32	3	33	2
AgHBe -	15	31	33	13

AgHBs, enquanto que os casos sem AgHBc, nenhum tinha este tipo de expressão e 21 (61.8%) apresentavam AgHBs no citoplasma ($p < 0.0008$).

DISCUSSÃO

Os estudos iniciais da infecção Delta em animais^{1,2}, mostram que esta uma vez estabelecida, parece inibir a síntese dos produtos genéticos do VHB, traduzida pelo desaparecimento ou declínio do AgHBs no soro e do AgHBc do fígado. Os primeiros estudos no homem^{14,15} mais vieram reforçar este conceito da interferência do VHD com o VHB. Contudo outros mostram, ao invés, evidência de replicação do VHB na infecção crónica Delta^{4,16,17}. Estes factos vêm levantar a questão do verdadeiro significado da relação da replicação do VHD com o VHB. Um método simples e que não envolve tecnologia sofisticada para o estudo da relação do VHD com o VHB⁸ aquele que passa pelo estudo imunohistoquímico da expressão de partículas víricas do VHB e nomeadamente o AgHBc e do AgHD do VHD, nos portadores crónicos do AgHBs com infecção associada a este último vírus.

Os nossos resultados ao mostrarem uma redução significativa da expressão do AgHBc (8.3%) nos doentes infectados com o VHD em contraste com os portadores do VHB sem esta infecção (39.2%), confirmam os achados prévios^{1,6,10,18-20} nos quais se observou uma diminuição franca da replicação do VHB nos portadores superinfectados com o VHD. Por outro lado os nossos dados, como de outros^{18,21}, ao mostrarem diferenças significativas quanto à expressão do AgHBs (quadro 3) nos portadores do VHB, independentemente da associação ou não à infecção pelo VHD, sugere que apenas uma fracção do genoma do VHB, a que codifica o AgHBs, é necessária para a expressão patogénica do VHD. Poderá também explicar, em parte, o porquê de muitos doentes infectados com o VHD não apresentarem formas livres do VHB, quer no fígado quer no soro. Todavia a observação em 20.5% (8/39) dos doentes com infecção crónica Delta e anti-HBe positivos, de que havia simultaneamente expressão do AgHBc e AgHD, pode sugerir que em certos doentes a replicação dos dois vírus possa coexistir sem inibição mútua. Por outro lado, o exame dos fragmentos de biópsias hepáticas revelam que o AgHBc e o AgHD estão na maioria dos casos distribuídos em áreas separadas, sugerindo que os dois vírus raramente se multiplicam na mesma célula. Se a localização dos dois vírus é mutuamente exclusiva é uma questão que necessita de estudos posteriores. Os nossos resultados mostram claramente e reforçam os nossos trabalhos prévios^{8,22} de que a expressão do AgHBc no fígado dos portadores do VHB sem infecção associada com o VHD, está intimamente ligada ao AgHBe no soro ($p < 0.00001$) e que é um marcador muito útil para o diagnóstico das fases iniciais de replicação do VHB. Talvez o achado mais interessante deste estudo, seja que a distribuição do AgHBc foi mais vezes de localização exclusiva ao citoplasma dos hepatócitos dos doentes com infecção crónica Delta, enquanto que, como em observações anteriores^{8,23-25}, a expressão nuclear em conjunto com a do citoplasma ocorre

na maioria dos portadores sem infecção pelo VHD. Igualmente o nosso estudo mostra o efeito modelador e inibitório do VHD sobre o VHB, ao demonstrar a perda da relação do AgHBc e do seu tipo de expressão nuclear no fígado com o AgHBe no soro de doentes infectados com o VHD. Naqueles com anticorpos para o AgHBe, há uma tendência significativa para a expressão do AgHBc no citoplasma. A implicação clínica da diminuição da expressão do AgHBc no núcleo dos hepatócitos de doentes com infecção Delta é uma incógnita. Num outro trabalho de Ramalho e colaboradores⁸, foi mostrado que a distribuição intra-hepática do AgHBc na infecção crónica B se correlaciona de uma forma muito estreita com os níveis de replicação do VHB. Aos valores mais elevados de ADN-VHB no soro corresponde uma expressão do AgHBc predominantemente no núcleo dos hepatócitos e aos mais baixos uma localização no citoplasma. Portanto, teoricamente, a diminuição da expressão nuclear do AgHBc na infecção crónica Delta, pode sugerir uma diminuição da replicação do VHB. Esta hipótese necessita de ser confirmada, embora os nossos resultados anteriores⁵ pareçam confirmá-la. De facto 77.8% dos doentes com infecção Delta perderam o ADN-VHB sérico durante o seu *follow-up*, em contraste com apenas 35.7% daqueles que tinham apenas infecção crónica associada ao VHB e num tempo médio mais reduzido (15.4 meses vs 27 meses, respectivamente). Isto é, o VHD não só parece inibir a replicação do VHB como a suprime.

É bem possível que a modelação da replicação do VHB, mais do que a sua inibição, seja um passo determinante para a sobrevivência do VHD. O AgHD localiza-se na matrix citoplasmática sob a forma livre ou aderente aos ribossomos²⁶. Aparentemente migra destes para a matrix citoplasmática e esta fase parece representar a transferência de parte do material genético do VHD destinado à incooperação na partícula Delta. Poder-se-ia especular que na fase de migração do AgHD, este necessitaria da presença simultânea do AgHBs para a formação da partícula vírica completa. Os nossos dados, ao demonstrarem na infecção crónica Delta a expressão do AgHBs no fígado de 70.3% dos doentes e de que esta ocorre em 69.2% no citoplasma, é um argumento compatível com a hipótese formulada anteriormente.

A expressão membranosa do AgHBs está significativamente suprimida na infecção crónica Delta, comparativamente aos portadores do VHB não superinfectados com o VHD. Foi demonstrado que na infecção crónica B, a localização membranosa do AgHBs se correlaciona estreitamente com os níveis mais elevados de ADN-VHB no soro^{8,23-25}. A significativa diminuição da expressão do AgHBs na membrana dos hepatócitos dos doentes com infecção Delta, sugere igualmente um efeito inibitório na replicação do VHB exercida pelo VHD. Finalmente a demonstração da associação muito significativa ($p < 0.0001$) da expressão do AgHD no tecido hepático com os anticorpos, anti-HBe, no soro dos doentes com infecção crónica Delta, equaciona a questão de que estaríamos na presença, não tanto da inibição do VHB, mas provavelmente na associação com mutantes deste vírus, induzi-

dos no momento da superinfecção dos portadores crónicos do AgHBs pelo VHD. Na realidade, estudos de biologia molecular mostram que o genoma do VHB é altamente variável e de que a *pressão imunológica* é um mecanismo responsável pela indução espontânea da mutação na região do pré-core do VHB²⁷. Não é difícil de aceitar que gravidade de infecção crónica Delta não esteja só ligada ao VHD, como anteriormente demonstrado⁵, mas tão somente à infecção simultânea com mutantes do VHB, nos quais se tem demonstrado um maior poder patogénico que o atribuído ao vírus selvagem²⁸. Estudos nesta área são necessários para clarificar esta questão.

CONCLUSÃO

Os nossos resultados mostram um aumento da expressão do AgHBc nos portadores crónicos do VHB, comparativamente a aqueles infectados com o VHD. A reversibilidade da expressão do AgHBc, passando de um predomínio citoplasmático a um predomínio membranoso na infecção crónica B sem infecção associada ao VHD, vem reforçar e apoiar os estudos quer no animal quer no homem, que parecem demonstrar um efeito inibitório, talvez modelador, do VHD na síntese dos produtos genéticos do VHB. Os mecanismos subjacentes que regulam a expressão do AgHBc e do AgHBs no fígado dos doentes com infecção crónica associada ao vírus da hepatite Delta permanecem por esclarecer.

BIBLIOGRAFIA

1. RIZZETTO M., CANESE M.G., GERIN J.L., et al.: Transmission of the hepatitis D virus associated delta antigen to chimpanzees. *J Inf Dis*, 1980; 141: 590-602.
2. PURCELL R.H., GERIN J.L., RIZZETTO M., et al.: Experimental transmission of the Delta agent to chimpanzees. In: Verme G., Bonino F., Rizzetto M. (eds). *Viral Hepatitis and Delta Infection*. Alan R Liss, New York, 1983: 79-89.
3. CAREDDA F., ROSSI E., RONFORTE A.A., et al.: Hepatitis B virus associated infection a superinfection with Delta agent: an indistinguishable disease with different outcome. *J Inf Dis*, 1985; 151: 925-928.
4. SARACCO G., ROSINA F., BRUNETTO M.R., et al.: Rapidly progressive HBsAg positive hepatitis in Italy. The role of HDV infection. *J Hepatol*, 1987; 5: 274-281.
5. RAMALHO F.: O vírus da Hepatite Delta. Significado epidemiológico, clínico e prognóstico da infecção pelo VHD em portadores crónicos do AgHBs. Tese de Doutoramento, 1988.
6. RIZZETTO M., VERME G., RECCHIA S., et al.: Chronic HBsAg hepatitis with intrahepatic expression of delta antigen. An active and progressive disease unresponsive to immunosuppressive treatment. *Ann Int Med*, 1983; 98: 431-441.
7. COLOMBO M., CAMBIERI R., REUMI M.G., et al.: Long term delta superinfection in hepatitis B surface antigen carriers and its relationship to the course of chronic hepatitis. *Gastroenterology*, 1983; 85: 235-239.
8. RAMALHO F., BRUNETTO M.R., ROCCA G., et al.: Serum markers of Hepatitis B virus replication, liver his-

- tology and intrahepatic expression of Hepatitis core antigen. *J Hepatol*, 1988; 7: 14-20.
9. GONVINDARAJAN S., VALINLUCK B.: Serum hepatitis B virus-DNA in chronic hepatitis B and delta infection. *Arch Pathol Lab Med*, 1985; 109: 398-399.
 10. HADZIYANNIS S.J., SHERMAN M., LIEBERMAN H.M., SHAFRITZ D.O.: Liver disease activity and hepatitis virus replication in chronic delta antigen-positive hepatitis B virus carriers. *Hepatology*, 1985; 5: 544-547.
 11. BAS C., BARTOLOME J., LAVANDA F., et al.: Assessment of hepatitis B virus DNA levels in chronic HBs Ag carriers with or without Hepatitis Delta virus superinfection. *J Hepatol*, 1989; 6: 208-213.
 12. LIAW Y.F., DONG J.T., CHIU K.W., SHEEN I.S., CHU C.M.: Why most patients with hepatitis delta virus infection are seronegative for hepatitis B e antigen. A prospective controlled study. *J Hepatol*, 1990; 12: 106-119.
 13. International group. Acute and chronic hepatitis revisited. *Lancet*, 1977; II: 914-915.
 14. RIZZETTO M., GOCKE D.J., VERME G., et al.: Incidence and significance of antibodies to delta antigen in hepatitis B virus infection. *Lancet*, 1979; 2: 986-990.
 15. RIZZETTO M., PURCELL R.H., GERIN J.L.: Epidemiology of HBV associated Delta antigen: Geographical distribution and prevalence in polytransfused HBsAg carriers. *Lancet*, 1980; 1: 1215-1218.
 16. RIZZETTO M., GERIN J.L., PURCELL R.H.: Delta antigen: evidence for a variant of HBV or Non-A, Non-B hepatitis Agent. In: Pollard M. (ed). *Perspectives in virology*. XI, Alan R. Liss, New York, 1981: 195-217.
 17. STOECKLIN E., GUDAT F., KREY G., et al.: Delta antigen in hepatitis B immunohistology of frozen and paraffin-embedded liver biopsies and relation to HBV infection. *Hepatology*, 1981; 1: 238-242.
 18. BONINO F., HOYER B., NELSON J., et al.: Hepatitis B virus DNA in the sera of HBsAg carriers: a marker of active hepatitis B virus replication in the liver. *Hepatology*, 1981; 1: 386-391.
 19. PICCIOTTO A., CROVARI P., CUNEO-CROVARI P., et al.: Interplay of cell and serum immunologic markers in chronic persistent or active hepatitis B. *J Med Virol*, 1981; 8: 195-200.
 20. HANSSON B.G., LINDH G., WEILAND O., et al.: Long term follow-up of 60 patients with chronic hepatitis B. II: Hepatitis B virus DNA in serum correlated to the hepatitis B e system and presence of Delta superinfection. *Liver*, 1986; 6: 292-296.
 21. CAPORASO M., DI SAPIO M., DEL VECHIO-BLANCO C., COLTORTI M.: Correlation of serum anti-Delta with intrahepatic HBV and HDV antigens in patients with chronic active hepatitis. In: Rizzetto M., Gerin J.L., Purcell R.H. (eds). *The Hepatitis Delta virus and its infection*. Alan R. Liss, New York, 1987; 137-144.
 22. RAMALHO F., CARVALHO G., BONINO F., et al.: Expressão intra-hepática do antígeno do core do vírus da Hepatite B (AgHBc): um marcador de activa replicação do VHB no fígado. *Revista de Gastroenterologia*, 1986; 13: 21-28.
 23. CHU C.M., LIAW Y.F.: Intrahepatic expression of Hepatitis B surface and core antigens in chronic Hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*, 1987; 92: 220-225.
 24. RAY M.B., DESMET V.J., BRADBURNE A.F., et al.: Differential distribution of Hepatitis B surface antigen and Hepatitis B core antigen in Liver of Hepatitis B patients. *Gastroenterology*, 1976; 71: 642-647.
 25. MONTANO L., MIESCHER G.C., GOOD HALL A.H., et al.: Hepatitis B virus and HLA antigen display in the Liver during chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 1982; 2: 557-561.
 26. KOJIMA T., CALLEA F., DESMYTER J., DESMET V.J.: Immuno electron microscopy of hepatitis Delta antigen in hepatocytes. *Lab Invest*, 1986; 55: 217-225.
 27. FOSTER G.R., THOMAS H.C.: Recent advances in molecular biology of HBV: mutant virus and the host response. *Gut*, 1993; 34: 1-3.
 28. BRUNETTO M.R., GIARIN M.M., OLIVERI F., et al.: Wild type and e antigen minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci*, 1991; 88: 4186-4190.