

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Anatomía Patológica**



**Estudio secuencial morfológico e inmunohistoquímico del  
hígado trasplantado en pacientes HbsAG seropositivos**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Nuria Alberti Masgrau**

**Directores**

**Francisco Colina Ruiz-Delgado**

**Enrique Moreno González**

**Madrid, 2017**

**ISBN: 978-84-669-0013-3**

**© Nuria Alberti Masgrau, 1993**

18.345

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**HOSPITAL UNIVERSITARIO "DOCE DE OCTUBRE"**

**DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA**



\* 5 3 0 9 5 6 1 8 6 0 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**ESTUDIO SECUENCIAL MORFOLOGICO E  
INMUNOHISTOQUIMICO DEL HIGADO TRASPLANTADO EN  
PACIENTES HB<sub>s</sub>AG SEROPOSITIVOS.**

**TESIS DOCTORAL**

**NURIA ALBERTI MASGRAU**

**DIRECTORES:      PROF. DR. FRANCISCO COLINA RUIZDELGADO  
                         PROF. DR. ENRIQUE MORENO GONZALEZ**

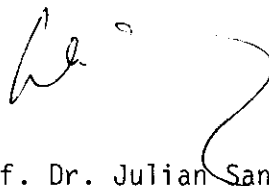
**Madrid, 1993.**

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

INFORMA: Que el trabajo "ESTUDIO SECUENCIAL MORFOLOGICO E INMUNOHISTOQUIMICO DEL HIGADO TRASPLANTADO EN PACIENTES HBsAG SEROPOSITIVOS" ha sido realizado por Dña. Nuria Alberti Masgrau, bajo la dirección del Prof. Dr. Francisco Colina Ruizdelgado y del Prof. Dr. Enrique Moreno González.

Este trabajo posee el rigor científico y las condiciones adecuadas para ser admitida su lectura con el fin de obtener el Grado de Doctor.

Lo que firmo en madrid, a 26 de Enero de 1993.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Julian Sanz Esponera', with a large, sweeping flourish at the end.

Fdo: Prof. Dr. Julian Sanz Esponera.

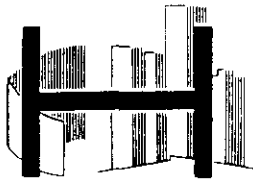


D. FRANCISCO COLINA RUIZDELGADO, PROFESOR ASOCIADO DEL  
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA  
DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA: Que Dña. NURIA ALBERTI MASGRAU ha realizado en  
este Departamento y bajo mi dirección el trabajo "ESTUDIO SECUENCIAL  
MORFOLOGICO E INMUNOHISTOQUIMICO DEL HIGADO TRASPLANTADO EN PACIENTES  
HBsAG SEROPOSITIVOS". Considero que dicho trabajo aporta datos de  
interés asistencial y científico respecto al curso evolutivo de  
pacientes HBsAg seropositivos sometidos a trasplante hepático y, a  
mi juicio, posee el rigor y las condiciones adecuadas para optar al  
Grado de Doctor.

Y para que así conste firmo el presente en Madrid, a 25 de  
Enero de 1993.

Fdo: Prof. Francisco Colina Ruizdelgado.



HOSPITAL UNIVERSITARIO "12 DE OCTUBRE"  
SERVICIO DE CIRUGIA GENERAL, APARATO DIGESTIVO Y  
TRASPLANTE DE ORGANOS ABDOMINALES  
*Dr. E. MORENO GONZALEZ*



Carretera de Andalucía, Km. 5,400  
Telf.: 390 82 94 - 390 83 29  
Fax: 390 85 23  
28041 - MADRID

D. ENRIQUE MORENO GONZALEZ, CATEDRATICO DE CIRUGIA DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA: Que Dña. NURIA ALBERTI MASGRAU ha realizado el  
trabajo titulado "ESTUDIO SECUENCIAL MORFOLOGICO E INMUNOHISTOQUIMICO  
DEL HIGADO TRASPLANTADO EN PACIENTES HBsAG SEROPOSITIVOS" bajo la  
codirección del Prof. Francisco Colina Ruizdelgado y mía. Considero  
que dicho trabajo ofrece datos relevantes respecto al seguimiento y  
control de pacientes infectados por el virus de la hepatitis B,  
sometidos a trasplante hepático por hepatopatía terminal, y que  
posee el rigor científico y las condiciones adecuadas para optar  
al Grado de Doctor.

Y para que así conste firmo el presente en Madrid, a 25 de  
Enero de 1993.

HOSPITAL UNIVERSITARIO "12 DE OCTUBRE"  
SERVICIO DE CIRUGIA GENERAL, APARATO DIGESTIVO  
Y TRASPLANTE DE ORGANOS ABDOMINALES  
Cátedra de Cirugía  
*Prof. E. Moreno González*

A la memoria de mi padre,  
a mi madre y hermanas.

A Miguel Angel.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento y gratitud a todas aquellas personas que, que un modo u otro, han colaborado y hecho posible la realización de este trabajo.

- . Al **Dr. Francisco Colina Ruizdelgado**, Director de esta Tesis y Jefe de Sección del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital "12 de Octubre" de Madrid, por su constante orientación, dedicación y entrega en la realización y Dirección de esta Tesis y por lo mucho que de él he aprendido trabajando a su lado.
- . Al **Dr. Enrique Moreno González**, Director de esta Tesis y Jefe de Servicio de Cirugía General, Aparato Digestivo y Trasplante de Organos del Hospital "12 de Octubre" de Madrid, por su asesoramiento, su labor crítica y el haberme brindado la oportunidad de profundizar en el estudio y conocimiento de las hepatitis virales postrasplante hepático.
- . Al **Dr. Pedro Patricio de Agustín de Agustín**, Jefe de Servicio del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital "12 de Octubre" de Madrid, por haberme prestado en todo momento apoyo, estímulo y amistad.
- . Al **Dr. Claudio Ballestín Carcavilla**, Médico Adjunto del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital "12 de Octubre" de Madrid, por haberme ofrecido sus conocimientos de inmunohistoquímica y orientado en la larga fase experimental de este trabajo.
- . Al **Dr. Miguel Bruguera**, Jefe de la Unidad de Hepatología del Hospital Clínico de Barcelona y a **todo su equipo**, por su gentileza al haberme cedido el antisuero específico anti-Delta y toda la información necesaria respecto al manejo de su técnica inmunohistoquímica.
- . Al **Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social**, por la relevante ayuda económica prestada.
- . A todos los miembros de los distintos Servicios del Hospital "12 de Octubre" de Madrid que colaboran en el programa de Trasplante hepático y en especial a los **Dres. Carmelo Loinaz, Carlos Lumbreras, Rafael Delgado y Javier Manzanares**, por toda la información que me han ofrecido en relación a los datos clínicos y serológicos de los pacientes.

- . A los Dres. **Trinidad Marchal, Manuel de la Mata y Carlos Pera**, pertenecientes respectivamente a los Servicios de Anatomía Patológica, Medicina del Aparato Digestivo, y Cirugía Digestivo del Hospital "Reina Sofía" de Córdoba, por su total colaboración en el suministro de todos los especímenes hepáticos y datos clínicos y virológicos de sus pacientes.
- . Al Dr. **Manuel Nevado**, Médico Residente del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital "12 de Octubre" de Madrid, por su paciencia y ayuda en la elaboración del manuscrito.
- . A Dña. **Belén Fernández Pérez**, Técnico Especialista en Anatomía Patológica del Hospital "12 de Octubre" de Madrid, por el hábil y laborioso trabajo que ha realizado en la ejecución de los numerosos cortes histológicos necesarios para el estudio inmunohistoquímico.
- . Y para finalizar, quisiera agradecer a todos mis compañeros del Departamento de Anatomía patológica del Hospital "12 de Octubre" de Madrid, y en su nombre, al Jefe de Departamento Prof. Dr. **Francisco José Martínez Tello** la ayuda y facilidades que me han otorgado y todos los conocimientos y experiencia que junto a ellos he adquirido en mis años de residencia y actividad profesional.

A todos ellos, de nuevo, gracias.

## INDICE

- INTRODUCCION . . . . .	1
I. INFECCION POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB) . . . . .	2
IA. Estructura del VHB e interacción con el hepatocito . . . . .	2
IB. Marcadores del VHB . . . . .	3
IB1. Marcadores serológicos . . . . .	3
IB2. Marcadores tisulares . . . . .	4
IC. Historia natural de la infección por el VHB . . . . .	7
ID. Inmunopatogenia . . . . .	9
IE. Inmunoprofilaxis . . . . .	10
IF. Terapéutica antiviral . . . . .	11
IG. Efecto de la inmunosupresión no relacionada con el TxH . . . . .	12
II. INFECCION POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS DELTA (VHD) . . . . .	14
IIA. Estructura y replicación . . . . .	14
IIB. Marcadores del VHD . . . . .	15
IIB1. Marcadores serológicos . . . . .	15
IIB2. Marcadores tisulares . . . . .	16
IIC. Historia natural de la infección por el VHD y su relación con el VHB . . . . .	17
IID. Patogenia de la lesión hepatítica . . . . .	20
IIE. Tratamiento antiviral . . . . .	21
III. TRASPLANTE HEPATICO (TxH) . . . . .	22
IIIA. Evolución histórica y estado actual . . . . .	22
IIIB. Indicaciones y selección de pacientes . . . . .	25
IIIC. Utilidad de la histopatología en el TxH . . . . .	27
IV. SITUACION PECULIAR: INJERTO HEPATICO-INMUNOSUPRESION- INFECCION POR EL VHB . . . . .	31
- OBJETIVOS . . . . .	37

- PACIENTES, MATERIAL Y METODOS . . . . .	39
I. PACIENTES . . . . .	40
IA. Indicación del trasplante . . . . .	41
IB. Técnica quirúrgica . . . . .	42
IC. Protocolo de inmunosupresión . . . . .	42
ID. Bioquímica hepática . . . . .	44
IE. Inmunoprofilaxis . . . . .	44
IF. Tratamiento antiviral . . . . .	46
II. MATERIAL . . . . .	49
IIA. Material serológico . . . . .	49
IIA1. Serología del VHB . . . . .	49
IIA2. Serología del VHD . . . . .	49
IIA3. Serología del VHC . . . . .	50
IIB. Material tisular . . . . .	50
III. METODOS . . . . .	54
IIIA. Estudio serológico . . . . .	54
IIIA1. Antígenos y/o ac. del VHB, VHD y VHC . . . . .	54
IIIA2. ADN del VHB y ARN del VHD . . . . .	55
IIIB. Estudio histopatológico . . . . .	55
IIIB1. Técnicas realizadas . . . . .	55
IIIB2. Interpretación diagnóstica en hígados nativos . . . . .	56
IIIB3. Interpretación diagnóstica en injertos hepáticos . . . . .	56
IIIC. Estudio inmunohistoquímico . . . . .	58
IIIC1. Técnicas realizadas . . . . .	59
IIIC2. Valoración e interpretación diagnóstica . . . . .	64
IIID. Estudio estadístico . . . . .	65
- RESULTADOS . . . . .	66
I. ESTADO CLINICOPATOLOGICO EN EL MOMENTO DEL TxH . . . . .	68
IA. Estudio histopatológico de los hígados nativos . . . . .	68
IB. Estado virológico del VHB . . . . .	68
IC. Estado virológico del VHD . . . . .	70
ID. Estado virológico del VHC . . . . .	71

II. EVOLUCION POST-TxH: A. RESULTADOS GENERALES . . .	72
A1. Pacientes con recurrencia de la infección por el VHB . . . . .	76
A1a. Evolución morfológica de los injertos hepáticos . . . . .	76
A1b. Evolución virológica de la reinfección por el VHB . . . . .	77
A1c. Reinfección por el VHD en pacientes con infección recurrente por el VHB . . . .	83
A1d. Infección por el VHC en pacientes con infección recurrente por el VHB . . . .	87
A2. Pacientes sin recurrencia de la infección por el VHB . . . . .	87
II. EVOLUCION POS-TxH: B. DISTRIBUCION DE LOS ESPECIMENES SEGUN DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO (DAP) . . . .	92
B1. DAP: Estado de portador del VHB sin hepatitis	92
B2. DAP: Hepatitis lobulillar . . . . .	94
B3. DAP: Hepatitis crónica . . . . .	96
B4. DAP: Cirrosis . . . . .	98
B5. DAP: Cambios mínimos . . . . .	100
B6. DAP: Disfunciones hepáticas no relacionadas con la infección por VHB, VHD o VHC . . . .	102
<b>- DISCUSION . . . . .</b>	<b>103</b>
I. RECURRENCIA DE LA INFECCIÓN POR EL VHB . . . . .	105
IA. Factores de riesgo y terapias preventivas	105
IB. Evolución morfológica de los injertos . .	109
IB1. Posibilidades evolutivas . . . . .	109
IB2. Características de las hepatitis recurrentes . . . . .	110
IB3. Correlación clínico-patológica . . .	112
IC. Evolución serológica e inmunohistoquímica	113
ID. Correlación virológico-morfológica . . . .	118
II. RECURRENCIA DE LA INFECCIÓN POR EL VHD . . . . .	122
IIA. Evolución virológica . . . . .	122
IIB. Correlación virológico-morfológica . . . .	125
III. INFECCION POR EL VHC . . . . .	127

- CONCLUSIONES . . . . .	128
- FIGURAS . . . . .	131
- BIBLIOGRAFIA . . . . .	144

## ABREVIATURAS

**ALT=** Alaninoaminotransferasa

**Anti-HBs=** Anticuerpo anti-antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

**Anti-HBc=** Anticuerpo anti-antígeno core del virus de la hepatitis B.

**Anti-HBe=** Anticuerpo anti-antígeno "e" del virus de la hepatitis B.

**Anti-HD=** Anticuerpo anti-antígeno delta.

**Anti-VHC=** Anticuerpo anti virus de la hepatitis C.

**ATG=** Globulina antitimocítica.

**Bil=** Bilirrubina total.

**DAP=** Diagnóstico anatomopatológico.

**EIA=** Enzimoimmunoanálisis.

**FA=** Fosfatasa alcalina.

**HBsAg=** Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

**HBcAg=** Antígeno core del virus de la hepatitis B.

**HBeAg=** Antígeno "e" del virus de la hepatitis B.

**HDAg=** Antígeno delta.

**RIA=** Radioimmunoanálisis.

**TxH=** Trasplante hepático.

**VHB=** Virus de la hepatitis B.

**VHD=** Virus de la hepatitis Delta.

**VHC=** Virus de la hepatitis C.

## **INTRODUCCION**

## I. INFECCION POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB).

La hepatitis B es una enfermedad de difusión mundial y de gran repercusión sociosanitaria por ser la causa más frecuente de enfermedad hepática del mundo (216). Actualmente se calcula que existen en el mundo más de 300 millones de personas portadoras del virus de la hepatitis B (VHB) y que 2 millones de ellas fallecen cada año a consecuencia de las complicaciones de la enfermedad (216, 259).

Desde el descubrimiento del antígeno Australia por Blumberg y col. en 1965 (16) hasta nuestros días, la aplicación clínica de los conocimientos adquiridos respecto a la estructura viral, la expresión sérica e inmunohistoquímica de sus marcadores de infección y los cuadros histopatológicos que produce han permitido perfilar la metodología diagnóstica de la infección, conocer su evolución y patogenia y establecer medidas terapéuticas y profilácticas contra la misma.

### I.A. ESTRUCTURA DEL VHB E INTERACCION CON EL HEPATOCITO.

El VHB es un virus ADN hepatotropo o hepadnavirus (201). La forma completa del virus o partícula DANE (44) tiene un diámetro aproximado de 42 nm y está constituido por una cubierta externa glicolipoproteica que contiene el HBsAg (200) y una envoltura interna o nucleocápside que expresa los otros dos antígenos virales, el HBeAg (4) y el HBcAg (233). En el interior de la nucleocápside se encuentran el genoma viral (199) (ADN circular de doble cadena incompleta) unido covalentemente a un polipéptido (76), la ADN polimerasa (112) y

la protein-quinasa (2).

En el interior del hepatocito, el VHB puede encontrarse de dos formas distintas, frecuentemente exclusivas (73, 215):

a) **Forma libre replicativa o episomal o extracromosómica:** Es la forma infectiva, caracterizada por la libre replicación del virus con completa transcripción del genoma viral y producción de viriones infecciosos intactos, ADN polimerasa, HBeAg, HBcAg y HBsAg; b) **Forma integrada o cromosómica:** En esta forma de interacción de carácter no infectivo el ADN viral se integra al propio genoma hepatocitario y existe solamente síntesis de HBsAg.

#### I.B. MARCADORES DEL VHB.

##### I.B.1. MARCADORES SEROLOGICOS

Los principales marcadores séricos del VHB corresponden a la mayoría de los antígenos virales y sus respectivos anticuerpos (detectables por técnicas comerciales de radioinmunoanálisis [RIA] o enzimoimmunoanálisis [EIA]) y al ADN viral (detectable por técnica de hibridación molecular [13, 247] o por reacción en cadena de la polimerasa o PCR [113]).

El significado virológico de seropositividad de cada uno de los distintos marcadores es el siguiente:

. **HBsAg:** Indica infección actual por el VHB. El HBsAg por sí mismo no es infectivo ni patógeno, correspondiendo únicamente a la cubierta externa viral vacía del virus (200, 237).

. **Anti-HBs:** Indica curación e inmunidad contra el VHB y aparece en suero cuando el HBsAg se negativiza, permaneciendo positivo durante años (117).

- . **HBeAg:** Marcador indicativo de replicación activa del VHB (51, 63).
- . **Anti-HBe:** La seroconversión a anti-HBe que sigue a la pérdida de expresión serológica de HBeAg habitualmente indica relativa baja infectividad (216). Este marcador persiste positivo en el suero uno o varios años después de la curación de la infección viral (118).
- . **Anti-HBc:** Indica que ha existido contacto con el VHB, siendo positivo en todos los sujetos con infección actual o pasada por el virus (63).
- . **Anti-HBc IgM:** Indicativo de infección activa por el VHB y considerado un buen marcador de respuesta inmunológica a la replicación viral (9, 219) y actividad de la lesión morfológica hepática (9, 31, 218). El anti-HBc IgM se negativiza con la curación de la infección, pero puede persistir positivo de forma residual durante dos o más años después de una infección aguda autolimitada (31, 75).
- . **ADN polimerasa:** marcador indicativo de replicación viral activa (51).
- . **ADN viral:** El aislamiento del ADN del VHB en el suero es indicativo de replicación activa del virus (18, 86, 155).

#### I.B.2. MARCADORES TISULARES.

Los tres antígenos estructurales (HBsAg, HBcAg y HBeAg) y el ADN del virus constituyen los marcadores de infección del VHB en el tejido hepático, siendo el HBsAg y el HBcAg los más frecuentemente utilizados en el estudio de la infección viral.

La demostración tisular de los antígenos del VHB puede realizarse mediante estudio inmunoultraestructural (104, 256) o inmunohistológico con técnica de inmunofluorescencia (84, 181) o inmunohistoquímica (84, 105, 256). La distribución intrahepatocitaria y significado virológico de cada antígeno es:

. **HBsAg:** Se expresa solamente en el citoplasma y/o membrana celular del hepatocito (104, 180). Se describen 5 patrones básicos de tinción (100): a) Homogéneo (tinción que abarca difusamente todo el citoplasma\_ de tipo fuerte o débil según la intensidad de la tinción [102]\_), b) globular (tinción focal de morfología esférica que suele desplazar al núcleo hepatocitario), c) moteado (tinción focal ovoidea o irregular generalmente múltiple), d) marginal o submembranoso (tinción en forma de banda homogénea debajo de la membrana celular) y e) membranoso (tinción limitada a la membrana del hepatocito). Aunque el HBsAg no constituye en sí mismo un marcador indicativo del estado virológico, en los pacientes crónicamente infectados por el virus el patrón de tinción de tipo submembranoso se describe asociado al estado no replicativo del VHB (102) el homogéneo (84, 102, 103) y membranoso (35, 102, 104) a replicación viral activa.

. **HBcAg:** Se puede expresar tanto en el núcleo como en el citoplasma del hepatocito (104, 180, 256). La localización nuclear es indicativa de actividad replicativa viral (71, 101, 102, 154, 179) y la citoplasmática se asocia a signos histológicos de actividad necroinflamatoria (35, 71, 101, 103, 104) en la infección crónica por el VHB.

En la expresión tisular de HBsAg y HBeAg se han descrito distintos tipos de combinación de patrones, siendo generalmente un punto en común la relación inversamente proporcional que existe entre ambos (extensa expresión de HBsAg cuando el HBeAg es escaso y tinción focal del primero cuando el HBeAg es difuso) (14, 35, 154, 180, 234).

. **HBeAg:** La distribución topográfica de este antígeno es similar a la del HBeAg, pudiendo localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma del hepatocito (154).

La demostración tisular del **ADN viral** puede realizarse mediante técnica de PCR (32, 122) o de hibridación molecular "in situ" (81, 82), permitiendo esta última técnica establecer si éste se encuentra de forma libre o integrado al genoma celular cuando se realiza sobre material congelado (22).

En relación a su utilidad en el estudio y diagnóstico de la infección viral, los distintos marcadores del VHB se pueden clasificar en:

- **Marcadores diagnósticos de infección:** HBsAg (sérico y tisular) y Anti-HBeIgM.
- **Marcadores de replicación viral activa:** HBeAg y ADN séricos y HBeAg tisular, siendo los más sensibles para determinarla el ADN sérico y el HBeAg en tejido (80, 86, 155).
- **Marcadores de inmunidad:** Anti-HBs y Anti-HBe.

### I.C. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCION POR EL VHB.

El curso evolutivo que sigue a la primoinfección por el VHB (caracterizada por instauración de actividad replicativa viral seguida de cuadro clínico o subclínico de hepatitis aguda [216] con nula o mínima expresión antigénica tisular [73, 74, 168, 225]) puede ser (95):

. **Curación**, definida como normalidad clínica y morfológica, pérdida de todos los marcadores de infección activa y aparición sérica del anti-HBs antes de los 6 meses de seguimiento (63). Esta es la evolución más frecuente en la población adulta inmunocompetente, aconteciendo aproximadamente en el 90% de los casos.

. **Instauración de hepatitis aguda fulminante B**, cifrada en torno al 1% de los casos clínicos. Las principales características del curso fulminante son a) la instauración de necrosis hepática masiva del hígado (58, 108), b) precoz clarificación de los marcadores de replicación viral (en los casos en que ésta está presente, el HBeAg es generalmente el único marcador positivo [24]) y del HBsAg sérico (24, 77, 239), c) temprana síntesis de Anti-HBs, Anti-HBe y, muy especialmente, de altos títulos de Anti-HBcIgM (77, 239) y d) frecuente ausencia de antígenos virales en el hígado (10, 73, 225).

. **Desarrollo de infección crónica por el VHB**, cifrada en aproximadamente el 10% de los casos y determinada por la persistencia serológica del HBsAg durante más de 6 meses, casi siempre de forma permanente. Este estado de portador crónico de HBsAg cursa habitualmente (70-90% de los casos)

con mínima o ausente lesión morfológica hepática (situación denominada estado de portador crónico "sano" del virus) y solamente en un 10-30% de los casos produce hepatitis crónica activa con progresión a la cirrosis. En la historia natural de la infección crónica por el VHB se han establecido 3 fases evolutivas distintas (34, 101):

**-Fase inicial con alta actividad replicativa y tolerancia inmunológica,** caracterizada por presencia en el suero de altos títulos de ADN y de HBeAg, generalizada expresión de HBcAg nuclear en el tejido hepático y leve o nula lesión morfológica hepática. Este período tiene una duración muy prolongada, durando generalmente varios años, con un límite de años habitualmente comprendido entre 1 y 10 (49).

**-Fase intermedia con baja actividad replicativa y respuesta inmune,** caracterizada por bajos títulos de ADN sérico, frecuente seroconversión a anti-HBe, expresión sólo focal de HBcAg nuclear y aparición de relevante actividad necroinflamatoria en el hígado (hepatitis crónica activa). Su duración es más corta que el de la primera fase, abarcando desde varias semanas a uno o dos años (49).

**-Fase final no replicativa,** en la que el ADN viral se suele integrar al genoma del hepatocito, existiendo negatividad de los 3 marcadores de replicación viral y ausencia de actividad histológica (espectro bipolar de la infección por el VHB: hígado normal o con leves alteraciones vs. cirrosis inactiva, hepatocarcinoma).

I.D. INMUNOPATOGENIA.

En el estudio de la hepatitis B del hígado no trasplantado, a pesar de que los mecanismos responsables de la lesión morfológica hepática todavía no están completamente establecidos (259), actualmente se acepta que ésta no depende de la acción citotóxica directa del virus sobre la célula (73, 144, 145, 243) sino del ataque inmune de los linfocitos contra los hepatocitos que albergan este virus (73, 144, 145, 242, 243). Entre las principales razones que justifican este principio están:

1º) La relación inversamente proporcional existente entre lesión hepatocelular y nivel de replicación viral o de antígenos en tejido, observada tanto en a) **la infección aguda viral** en donde, especialmente en su forma fulminante, la severa necrosis hepatocelular acontece coincidiendo con la disminución o cese de la replicación viral (23, 77, 239) y ausencia o sólo escasa expresión antigénica tisular (10, 73, 225), como en b) **la infección crónica del virus** en donde el grado de actividad necroinflamatoria es inversamente proporcional con la cantidad tisular de HBsAg (los mayores acúmulos de este antígeno se observan en portadores "sanos" del virus [95, 159, 180, 234]) y con el nivel de replicación viral (ya que, aunque para el establecimiento y progresión de la lesión hepática es necesario que exista persistencia de actividad replicativa [34, 73, 86, 101] su agresividad histológica no acontece paralelamente con altos niveles de replicación viral -1ª fase- sino coincidiendo con el descenso a un bajo nivel de infectividad -2ª fase- [34, 35, 71, 80, 101, 144, 154]).

2º) La nula o mínima lesión degenerativa en los hepatocitos infectados por el virus (73) al estudio óptico y ultraestructural.

3º) La yuxtaposición morfológica existente entre necrosis hepatocelular e infiltrado inflamatorio mononuclear a nivel del lobulillo hepático (146).

4º) La relación directa entre recuperación de la competencia inmunológica y desarrollo de severa hepatitis: En pacientes portadores crónicos del VHB sometidos a tratamiento inmunosupresor o quimioterápico se describe (15, 88, 93, 236) posible instauración de hepatitis aguda fulminante cuando el paciente recupera su competencia inmune por brusca interrupción del tratamiento.

#### I.E. INMUNOPROFILAXIS.

Existen dos tipos de inmunoprofilaxis contra la hepatitis B, que pueden administrarse de forma aislada o en combinación:

- **Inmunoprofilaxis activa:** basada en la administración de vacunas específicas contra el VHB (tanto derivadas del plasma humano como de tipo recombinante [141]) que producen protección duradera contra la infección mediante la inducción de síntesis de anticuerpos dirigidos contra el HBsAg (anti-HBs). Aunque la respuesta individual a la vacuna es muy variable, para la adecuada protección antiviral son necesarios niveles séricos de anti-HBs superiores a 100 mUI/ml (207).

- **Inmunoprofilaxis pasiva:** basada en la administración de inmunoglobulinas standar (IG Standar) o hiperinmunes especí-

ficas anti-HBs (IGHB) que producen una protección transitoria (de 20-30 días aproximadamente) contra la infección viral.

#### I.F. TERAPEUTICA ANTIVIRAL.

La administración de tratamiento antiviral se utiliza en pacientes crónicamente infectados por el VHB que muestran signos de actividad replicativa del virus, con el objetivo de inhibir la replicación y, a ser posible, erradicar el VHB del organismo (49).

Entre los fármacos antivirales utilizados destacan:

. **Alfa-Interferon**, proteína producida por los linfocitos B y monocitos de doble acción: antiviral (inhibiendo la replicación del virus) e inmunorreguladora (estimulando la respuesta inmune del huésped) (49). En la actualidad, es el fármaco que ha conseguido mejores resultados en el tratamiento de la hepatitis crónica B (57), habiéndose impuesto a las anteriores terapias antivirales utilizadas (Arabinósido de Adenina [94] y aciclovir [3]). Aunque su efectividad no ha sido demostrada de forma definitiva y concluyente, su administración prolongada (superior a un mes) consigue negativización de los marcadores serológicos de replicación viral con seroconversiones estables a anti-HBe y remisión clínica e histológica de la enfermedad en un 30-50% de los casos (47, 96). El efecto del alfa-interferon sobre la replicación viral en el tejido hepático es poco conocida, habiéndose descrito (126) persistencia de la infectividad en tejido post-tratamiento.

. **Foscarnet**, conocido también como trisodium fosfonofornato, es un nuevo agente antiviral que inhibe selectivamente un número determinado de polimerasas virales (la ADN polimerasa del VHB entre ellas [7]) y que es utilizado especialmente en el tratamiento de la infección por citomegalovirus (8). Su uso terapéutico en la infección crónica por el VHB todavía es escaso, si bien los resultados obtenidos hasta el momento han sido poco alentadores por el efecto sólo parcial y transitorio que el tratamiento ha producido en la inhibición de la replicación del virus (7).

#### I.G. EFECTO DE LA INMUNOSUPRESION NO RELACIONADA CON EL TxH.

Cuando un paciente desarrolla una infección aguda por el VHB o es portador crónico del virus, la evolución natural de la infección viral sufre modificaciones si éste es sometido a un prolongado estado de inmunosupresión como un trasplante renal (50, 62, 89, 106, 163, 164), administración continuada de quimioterapia (73) o de fármacos inmunosupresores (205, 214) o instauración de infección por HIV (144). Los efectos de la inmunosupresión sobre la infección por el VHB son a nivel:

- **Viroológico**, produciendo un marcado incremento de la replicación viral que se manifiesta tanto a nivel serológico con aparición de altos títulos de ADN-VHB y HBeAg en suero (49, 62, 89, 106, 144, 205) como tisular con generalizado incremento de HBcAg (73, 84, 144, 256, 257). Las consecuencias de este aumento de infectividad son a) frecuente evolución a la cronicidad con antigenemia mantenida si el cuadro desarrolla-

do en estado de inmunosupresión es una primoinfección aguda por el VHB (50, 62, 255) y b) reactivación y mantenimiento de la replicación viral si el paciente es ya un portador crónico del virus (50, 62, 89, 106, 205).

- **Morfológico**, efecto todavía poco definido en la actualidad, existiendo amplia controversia en la literatura respecto a si la inmunosupresión es beneficiosa o perjudicial para la lesión hepática. Mientras varios estudios describen, bajo este estado, frecuente ausencia o sólo leve actividad histológica hepática (18, 73, 84, 95, 144, 159, 204, 225), otros trabajos refieren, por el contrario, prevalente instauración de severa y progresiva hepatopatía (49, 89, 106, 163, 164) la cual, por otra parte, en pacientes con trasplante renal se ha descrito que puede cursar con perfil bioquímico prácticamente normal (89, 163, 164).

## II. INFECCION POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS DELTA (VHD).

La infección por el virus de la hepatitis Delta (VHD) es menos frecuente que la del VHB. En la actualidad se estima que existen en todo el mundo unos 15 millones de personas crónicamente infectadas por este virus (197).

El VHD fué descubierto por Rizzetto en el año 1977 (188). Desde su detección hasta el momento actual, todos los estudios clínicos y epidemiológicos realizados en la población normal así como los trabajos experimentales efectuados con animales han detectado infección por este virus solamente en presencia de concomitante infección por el VHB (140, 173). En consecuencia, el VHD es considerado un virus de carácter "defectivo", en el sentido de que necesita de la colaboración del VHB para poder replicar y expresarse (110, 139, 140, 189, 190).

Sin embargo, hoy por hoy se desconoce con exactitud cual es la naturaleza, extensión y grado de esta dependencia del VHD para con el VHB (139).

### II.A. ESTRUCTURA Y REPLICACION.

El VHD es un pequeño virus ARN hepatotropo cuyo único reservorio conocido es el hígado, no habiéndose aislado hasta el momento en ningún órgano extrahepático (19).

La partícula completa o virión tiene un diámetro aproximado de 38 nm y está constituida por una envoltura externa que contiene el HBsAg del VHB, interiormente a la cual se encuentran el genoma viral (una sola cadena circular de ARN)

y el HDAG, único antígeno estructural del virus (139).

A pesar de los progresivos avances realizados en el conocimiento de la biología molecular del VHD, gran parte de las características de su ciclo replicativo completo siguen siendo una incógnita (19). El papel del HDAG en dicho ciclo está poco definido (139, 223) pero se acepta que el antígeno está íntimamente relacionado con la replicación del genoma viral (78, 119, 139). Respecto a la función que el VHB pueda desempeñar en la replicación del VHD, aunque ésta está poco establecida, parece que su papel podría limitarse al ensamblaje final del virión delta y a la entrada y salida del virus del hepatocito (19, 139, 223).

## II.B. MARCADORES DEL VHD.

Los marcadores del VHD corresponden al ARN viral, al HDAG (detectables ambos en suero y tejido) y a los anticuerpos séricos que la antigenicidad del HDAG determina (56).

### II.B.1. MARCADORES SEROLOGICOS.

La detección del ARN del VHD en el suero se realiza mediante técnica de hibridación molecular (222) y la del HDAG y sus anticuerpos mediante técnicas convencionales de EIA o de RIA (56). El HDAG sérico también puede determinarse con Western blot (inmunoblot) analisis (12).

El significado biológico de la seropositividad de dichos marcadores virales es:

- **RNA viral:** su aislamiento en el suero indica replicación activa del VHD (25, 26, 222).

- **HDAg:** marcador indicativo también de replicación viral activa (191). Su seropositividad se limita frecuentemente a un breve período de la primoinfección viral cuando es detectado con técnicas convencionales (56).
- **Anti-HD:** marcador indicativo de exposición al virus y positivo tanto en una infección actual como pasada (191, 240). Su positividad después de la curación de la infección solamente es transitoria (197).
- **Anti-HD IgM:** este marcador indica infección activa por el VHD (110).

Hasta el momento actual no se ha detectado un anticuerpo marcador de la existencia de inmunidad y protección contra la infección por el VHD como existe en la del por el VHB (anti-HBs) (197).

#### II.B.2. MARCADORES TISULARES.

La demostración intrahepática del ARN viral se realiza mediante técnica de hibridación molecular "in situ" (156), y la del HDAg puede efectuarse mediante inmunofluorescencia (188) o inmunohistoquímica (79, 232).

El **HDAg** tisular, marcador indicativo de replicación viral activa (26, 41, 191, 156), puede localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma del hepatocito, siendo la localización más frecuente la nuclear (188, 191, 232).

El **ARN viral** intrahepático es generalmente positivo a nivel de los hepatocitos inmunoteñidos para HDAg (56).

El diagnóstico de infección por el VHD se basa en la detección directa del virus, estableciéndose cuando el HDAG y/o el ARN viral son positivos en suero y/o en tejido (19). Los marcadores más comunmente utilizados son el HDAG tisular y el ARN sérico viral, existiendo generalmente buena correlación entre ellos (26, 56). El aislamiento del ARN del VHD a nivel del tejido hepático mediante técnica de hibridación molecular "in situ" es complejo y de difícil realización y no ha resultado ser más sensible que el estudio inmunohistoquímico del HDAG tisular para la detección del virus (56).

Respecto a la determinación sérica de los dos anticuerpos (anti-HD y anti-HD IgM), si bien ambos son de gran utilidad en el diagnóstico de la infección viral (19), su información sobre estado de la infección es solamente indirecta (245) y ninguno resulta realmente válido para conocer el curso de la misma (191).

## II.C HISTORIA NATURAL DE LA INFECCION POR EL VHD Y SU RELACION CON EL VHB.

El período de incubación del VHD en el hombre es poco conocido y difícil de establecer (185). Los estudios experimentales realizados con chimpancés refieren que en estos animales oscila entre 4 y 20 semanas (185), y que cuando se efectúan inoculaciones seriadas del virus a los chimpancés susceptibles el tiempo de incubación suele reducirse a 7-14 días (240).

En base a la referida dependencia del VHD para con el

VHB, se conocen 2 tipos distintos de primoinfección (infección aguda) por el VHD (97, 110, 191):

- **Coinfección** o infección simultánea de este virus y del VHB en un paciente sano: A pesar de la simultaneidad de la doble infección viral, la replicación del VHB precede a la del VHD (158, 193, 240). La evolución natural es muy similar a la de la infección aguda aislada por el VHB (191), siendo lo más frecuente (90% de los casos) que, después del cuadro de hepatitis aguda, se instaure la curación y clarificación de ambos virus (97).

- **Superinfección por el VHD** en un paciente crónicamente infectado por el VHB: Es el tipo más frecuente de infección (185). Habitualmente, la nueva infección viral agrava las lesiones histológicas debidas al VHB y precipita la evolución a severa enfermedad hepática (174, 240). En consecuencia, el posterior curso evolutivo suele ser (97, 185) la instauración de un cuadro de hepatitis fulminante o, más frecuentemente, la cronificación de la infección por el VHD acompañada de severa hepatitis crónica activa (con progresión a la cirrosis en el 60-70% de los casos). La posibilidad de que la sobreinfección por el VHD produzca un cuadro autolimitado de reaguización de la previa hepatopatía o de hepatitis aguda autolimitada seguido de la posterior clarificación de este virus es excepcional (221).

Durante este compartido curso infectivo entre el VHB y VHD, ambos virus establecen una particular relación de simbiosis e interacción molecular (19) que se traduce en una

mútua y recíproca modulación virológica:

. **Efecto modulador del VHB sobre el VHD**, expresado fundamentalmente en dos hechos: a) la duración de la infección del VHB condiciona la del VHD (110), fenómeno que explica que el curso habitual de la infección por el VHD en la "coinfeción" sea la clarificación del virus (la corta duración de la infección por el VHB limita también la del VHD [191]), y en la "superinfección" sea la cronicidad (el estado basal de portador crónico del VHB permite y facilita el mantenimiento del VHD en el hígado [19, 244]); b) la actividad replicativa del VHB favorece y potencia la replicación y diseminación del VHD en el tejido hepático (223, 240), circunstancia observada en ambos tipos de infección aguda por el VHD (191) y muy especialmente en el de la "superinfección viral", en donde tras la instauración de la primoinfección de este virus se detecta una masiva explosión de la expresión tisular del HDAG facilitada por la previa y prolongada actividad replicativa del VHB (240).

. **Efecto modulador del VHD sobre el VHB**, basado en la ampliamente referida inhibición que el VHD ejerce sobre la actividad replicativa del VHB: el expansivo incremento de la replicación del VHD durante la infección aguda de este virus produce a su vez una inhibición de la replicación del VHB (41, 87, 110, 191, 240, 255). En los casos en que la infección por el VHD cronifica, dicho efecto inhibitorio puede persistir prolongadamente o producirse posteriormente espontánea reaparición de significativa actividad replicativa del VHB coexistiendo con la del VHD (255).

## II.D. PATOGENIA DE LA LESION HEPATITICA.

En la infección sincrónica o metacrónica de un paciente por el VHB y VHD, aunque los mecanismos responsables de la lesión hepática todavía están poco definidos (19) clásicamente se ha considerado que ésta dependía fundamentalmente del VHD (192, 195, 221).

Esta máxima responsabilidad del VHD en el establecimiento de la lesión morfológica hepática se ha basado en las dos características ampliamente atribuidas a este virus:

- **Elevada patogenicidad** (140, 185, 190, 191, 195): El carácter altamente patógeno del VHD se ha fundamentado en que la infección viral (sobretudo cuando se establece en pacientes crónicamente infectados por el VHB) conlleva casi invariablemente severa enfermedad hepática (97, 185, 240).

- **Directa citotoxicidad** (110, 190, 191, 240): los principales rasgos clinicopatológicos que han establecido el carácter citopático del VHD (cualidad que indica producción de lisis celular por toxicidad viral directa [130]) han sido:

a) el desarrollo casi constante de hepatitis clínica e histológica tras la instauración de la infección viral (66, 191, 240).

b) la presencia de HDAg tisular cursando invariablemente con lesión hepatocelular (188, 190, 191, 232).

c) la directa relación existente entre máxima actividad de la hepatopatía y máxima detección de HDAg en el tejido hepático (173, 192) y de ARN viral en el suero (222).

d) la falta de yuxtaposición morfológica entre degeneración hepatocelular e infiltrado inflamatorio mononuclear

(114, 128, 156, 191, 240).

e) la frecuente presencia de cambios "citopáticos" (esteatosis microvacuolar) en la hepatitis histológica (19, 173).

#### II.E. TRATAMIENTO ANTIVIRAL.

El único agente antiviral que ha resultado parcialmente eficaz en el tratamiento de la infección por el VHD ha sido el alfa-interferón (194). Su administración a pacientes crónicamente infectados por el VHD suele producir inhibición de la actividad replicativa del virus (expresada por una marcada disminución o total negativización del ARN sérico y HDAg tisular) y notable mejoría o completa resolución de la lesión hepática (57, 67, 235). Sin embargo, generalmente este efecto sólo es transitorio, siendo frecuente que tanto la replicación viral como la actividad de la hepatopatía reaparezcan de nuevo una vez suprimido el tratamiento (57, 67, 97).

### III. TRASPLANTE HEPATICO (TxH).

El trasplante hepático (TxH), último eslabón terapéutico en el tratamiento de la enfermedad hepática terminal, consiste en implantar un hígado donante en un organismo con o sin resección del hígado nativo. Se denomina **trasplante hepático auxiliar** cuando el hígado enfermo es conservado y el injerto hepático se implanta en una localización ectópica, y **trasplante hepático ortotópico** cuando el hígado nativo es resecado y reemplazado por el injerto mediante una reconstrucción anatómica normal (241).

#### III.A. EVOLUCION HISTORICA Y ESTADO ACTUAL.

La fase experimental del TxH en animales fué simultánea e independientemente iniciada en 1958 por dos importantes figuras del mundo de la cirugía, los Dres. Moore (de Boston) y Starzl (de Denver) (252).

El primer trasplante ortotópico de hígado practicado a un ser humano lo realizó el Dr. Thomas Starzl en el año 1963 (226). Aunque él y su equipo fueron virtualmente los pioneros del TxH en el mundo, otros centros también pioneros en este tipo de procedimiento terapéutico han sido el grupo de Cambridge (Dr. Calne), el de Hannover (Dr. Pichlmayr) y el de Groningen (Dr. Krom).

Durante los primeros años (décadas de 1960 y 1970), los resultados obtenidos con la práctica del TxH fueron muy poco alentadores. A pesar de las continuas mejoras en el perfeccionamiento de la técnica quirúrgica y preservación del

órgano donante y a pesar de que el rechazo del injerto hepático se comprobó que era menos grave que el del injerto renal, la mortalidad era muy elevada y la supervivencia al año de seguimiento nunca superaba el 35% (228). Estos malos resultados iniciales se debían fundamentalmente a dos causas: 1ª) la selección de los pacientes, ya que durante estos años la técnica estaba fundamentalmente reservada para enfermos terminales afectos generalmente de hepatocarcinoma y cirrosis complicada, y 2ª) y más importante el tipo de tratamiento inmunosupresor utilizado: La inmunosupresión (una de las áreas de máxima prioridad en la realización del trasplante de órganos) para que sea efectiva debe conseguir un nivel de tolerancia inmunológica lo suficientemente eficaz como para prevenir y controlar el rechazo del injerto y lo suficientemente selectiva como para evitar la instauración de complicaciones tales como infecciones agudas letales. Durante estos primeros años el régimen inmunosupresor consistía únicamente en azatioprina y prednisona. Con este tratamiento los pacientes fallecían a consecuencia de fallo en la cicatrización de las heridas y de las severas infecciones agudas producidas por la intensa disfunción granulocítica que este tratamiento provocaba en el sistema inmune (252).

El acontecimiento decisivo que revolucionó por completo las expectativas de futuro del trasplante hepático fué la incorporación de la ciclosporina en los ensayos clínicos en 1979 (27). La ciclosporina, potente agente inmunosupresor, no interfiere en la curación de las heridas ni tampoco en la función granulocítica (252). Su aplicación al TxH fué inicia-

da por el Dr. Calne (27). Pero el enorme efecto beneficioso de esta nueva droga en la supervivencia postrasplante la demostraron en 1981 Starzl y su equipo (228) cuando combinaron el nuevo fármaco con los esteroides. A partir de entonces, el establecimiento de la triple terapia (azatioprina, prednisona y ciclosporina) permitió un mejor control en la prevención y manejo del rechazo, y gracias a ello el nivel de supervivencia al año de seguimiento incrementó de forma espectacular, pasando del anterior 30% a más del 70% (252).

Aunque es indudable que la principal razón de este impactante cambio en la evolución del TxH se ha debido esencialmente a la ciclosporina, han existido también otros avances paralelos que han contribuido notablemente a su éxito. Entre estos acontecimientos cabe destacar: a) el empleo del bypass veno-venoso durante el acto quirúrgico (252), b) la introducción del trasplante hepático como nueva opción terapéutica al fracaso del injerto (241) y c) la incorporación de la biopsia hepática en el control del estado del injerto (252).

El conjunto de todos estos hechos ha condicionado que, a partir de 1980, el trasplante hepático dejara de ser un procedimiento curativo experimental sostenido por su valor teórico y de investigación y se convirtiera ineludiblemente en una real y eficaz opción terapéutica en el manejo del fallo hepático terminal, practicado en numerosos hospitales del mundo (252).

En España, el primer trasplante hepático fué realizado

en el año 1984 por los Dres. Margarit y Jaurrieta del Hospital de Bellvitge de Barcelona. Desde entonces el número de centros hospitalarios españoles con programas de trasplante hepático ha ido en aumento.

En la actualidad, la serie del Hospital 12 de Octubre de Madrid es la más amplia de las existentes en nuestro país. Desde el inicio del programa de TxH en 1986 hasta el momento actual, el Servicio de Cirugía Digestivo II (Prof.Dr. E. Moreno González) ha efectuado un total de 303 TxH a 247 pacientes. Los resultados en cuanto a morbi-mortalidad han sido hasta el momento excelentes, con una supervivencia actuarial al año del 74,6% y a los 3 años del 62,2% (37).

### III.B. INDICACIONES Y SELECCION DE PACIENTES.

Actualmente, ante casi cualquier paciente con evidencia de hepatopatía terminal se considera la posibilidad de realizar trasplante hepático como medida terapéutica (91).

La adecuada selección de pacientes es, sin embargo, difícil e inexacta, a pesar de que los criterios de selección de candidatos han ido aumentando en amplitud y uniformidad a medida que incrementaban también los conocimientos y experiencia de este procedimiento terapéutico. En la mayoría de los centros, la selección y clasificación de los candidatos a TxH la realiza un comité. Dicho comité también estructura la llamada "lista de espera", en función de la prioridad y urgencia de los potenciales candidatos. La urgencia del trasplante está fundamentalmente determinada por el grado de descompensación hepática y las expectativas de supervivencia

a corto plazo (132).

Las indicaciones actuales de TxH se dividen en 4 grandes grupos: a) Hepatopatías crónicas severas e irreversibles, que incluyen las de origen colestásico, hepatocelular (especialmente cirrosis postnecrótica y etílica) y vascular, b) fallo hepático fulminante, c) neoplasias hepáticas malignas irresecables confinadas al hígado, y d) enfermedades metabólicas (132).

Hoy por hoy, el principal y más numeroso grupo de hepatopatías terminales tributarias a trasplante hepático son las producidas por el VHB (cirrosis postnecrótica fundamentalmente) (206, 229). El problema de someter a TxH a pacientes infectados por el VHB es que con frecuencia se establece recidiva de la infección y hepatitis en el injerto (121). El elevado riesgo de recurrencia de la enfermedad hepática ha provocado el que en muchos centros siga siendo actual motivo de debate y controversia el si debe incluirse o no a los pacientes HBsAg seropositivos en la lista de espera de candidatos a trasplante hepático (132, 198).

Por otra parte, aproximadamente un 5% de los pacientes infectados por el VHB con severa enfermedad hepática muestran concomitante infección por el VHD (198). Este relativo bajo porcentaje de pacientes con hepatitis B y D justifica el que la experiencia que hasta el momento existe respecto a su curso evolutivo postrasplante sea todavía muy limitada (132) y el número de series publicadas en la literatura que estudian aspectos específicos del mismo escaso (1, 45, 46, 133, 136, 162, 187, 196).

### III.C. UTILIDAD DE LA HISTOPATOLOGIA EN EL TxH.

El patólogo, al asumir su participación en un programa de trasplante hepático, se ve implicado en las siguientes actividades hospitalarias (38):

- **Protocolización:** Es precisa la sistematización prospectiva de los datos morfológicos orientada a la obtención de experiencia y al diseño de futuros trabajos de revisión e investigación. Un modelo de protocolización recomendable incluye estudios histopatológicos sistematizados del a) hígado nativo y b) injerto hepático, tras su revascularización (biopsia de tiempo "0"), a la 1ª-2ª semana postrasplante, en los episodios de disfunción del injerto, y anualmente.

- **Selección de pacientes:** Es exigible que exista diagnóstico biopsico de la hepatopatía crónica terminal del paciente propuesto previamente al TxH. En algunos hospitales se practica la biopsia de selección del paciente incluso en las hepatitis fulminantes, obteniéndola por vía transyugular. Respecto a la biopsia preoperatoria del órgano donante (realizada antes de su implantación, en el momento de su "recolecta") habitualmente no se incluye en los protocolos de los equipos dedicados a esta actividad debido a que la permanente disponibilidad del patólogo no viene compensada por la información obtenida en el estudio del tejido congelado. Por tanto, la viabilidad del hígado donante depende generalmente del juicio macroscópico que realiza el cirujano al resecarlo.

- **Diagnóstico de la disfunción del injerto hepático:** El síndrome de disfunción del injerto hepático viene definido como la alteración clínica o bioquímica en la función hepática de

grado moderado o severo mantenida durante más de 48 horas. Las causas que producen disfunción del hígado trasplantado son múltiples y las alteraciones clínicas que originan no suelen ser de suficiente especificidad, por lo que se precisa la colaboración de la histopatología para su diagnóstico. La mayor, aunque no la única, aportación de la biopsia es el diagnóstico del rechazo (28, 227), cuya evidencia morfológica exige reconsiderar la intensidad del tratamiento inmunosupresor.

- **Control de calidad del programa:** Los índices de supervivencia postrasplante y el grado de calidad de vida son los métodos adecuados para valorar el grado de éxito de un programa de trasplante hepático. Al patólogo le corresponde tabular las causas morfológicas del fallo del injerto para descubrir desviaciones de los criterios de indicación, oportunidad de variaciones en el tratamiento inmunosupresor e idoneidad de las técnicas quirúrgicas. El estudio de las piezas hepáticas, obtenidas tras autopsia o tras hepatectomía del injerto en los retrasplantes debe ser reglado. Es recomendable un corte seriado del hilio, donde las lesiones secundarias a complicaciones quirúrgicas y a rechazo crónico son más objetivables.

Junto a las actividades anteriormente mencionadas, la participación del patólogo en un programa de TxH tiene otra vertiente adicional: la de intentar identificar y definir cuales son las causas y mecanismos responsables de los distintos tipos de hepatopatías establecidas en el injerto (241).

Específicamente, los centros de trasplante hepático se están convirtiendo, en un sentido amplio, en centros de la enfermedad hepática por excelencia al agrupar los más variados tipos de hepatopatías terminales, varias de ellas pobremente definidas.

Cuando el paciente es sometido a TxH, la particular situación que se establece entre el propio organismo, el nuevo hígado, y la inmunosupresión, conlleva el que el injerto pueda desarrollar hepatopatías totalmente nuevas (íntimamente relacionadas con el trasplante) o producir recidiva de la enfermedad con posibles nuevas caras (241).

La obtención protocolizada de biopsias hepáticas sucesivas y piezas de hepatectomía del injerto (obtenidas por re-trasplante o estudio autopsico) proporciona un amplio y rico material que permite estudiar de forma secuencial el curso de las enfermedades en él desarrolladas. La posibilidad de poder realizar sobre dicho material, en concomitancia con el convencional estudio morfológico óptico, pruebas complementarias como ultraestructura, inmunohistoquímica, hibridación molecular y técnica de reacción en cadena de la polimerasa, ofrece la oportunidad de identificar determinadas estructuras celulares y virales a las que la histopatología convencional no tiene acceso. El ulterior análisis comparativo entre los cambios morfológicos presentes en el injerto y los datos obtenidos con las pruebas complementarias puede ayudar a comprender y definir algunas de las características biológicas de las hepatopatías establecidas.

Por consiguiente, es también misión del patólogo el intentar, en colaboración con los restantes servicios pertenecientes al programa de TxH, establecer mejores definiciones de algunas enfermedades hepáticas e identificar qué mecanismos las producen (241).

#### **IV. SITUACION PECULIAR: INJERTO HEPATICO-INMUNOSUPRESION-INFECION POR EL VHB.**

Desde que Starzl y su grupo realizaron en 1970 el primer trasplante hepático a un paciente HBsAg seropositivo (42) y durante los primeros tiempos en la práctica de este procedimiento quirúrgico como tratamiento de la hepatitis terminal producida por el VHB, se esperaba que con la extracción del hígado nativo y depuración del virus circulante por el masivo reemplazamiento sanguíneo realizado durante la cirugía la infección viral podría ser erradicada (61, 121). Sin embargo, la clarificación o marcada disminución sérica postoperatoria de HBsAg sólo fué un hecho transitorio, siendo frecuente que éste reapareciera o su nivel incrementara posteriormente de nuevo (42, 176, 254) con la frecuente aparición posterior de signos de replicación viral activa (53).

En la actualidad, el conocimiento de la existencia de numerosos reservorios extrahepáticos del virus tales como células sanguíneas mononucleadas, bazo, páncreas, gónadas, tiroides, suprarrenales y riñones (23, 48, 172, 258) ha inducido a considerar que la persistente síntesis extrahepática de partículas virales representa la principal causa del establecimiento de la infección recurrente en el injerto (60, 69, 121, 152, 186, 207, 208, 260). El conocimiento de este hecho, sumado a que un número relativamente pequeño de partículas víricas es ya suficiente para infectar el hígado puede explicar la gran dificultad que existe en erradicar el virus

del organismo y la elevada incidencia de infección recurrente en el injerto (121).

En la mayoría de series publicadas de pacientes HBsAg seropositivos sometidos a trasplante hepático (17, 46, 53, 54, 72, 90, 98, 123, 142, 160, 161, 169, 230, 238) el riesgo de recidiva de la infección viral ha sido de al menos un 50%, con un porcentaje medio de recurrencias cifrado en el 80%.

A pesar de este alto riesgo de recidiva, ésta no siempre se establece, existiendo un porcentaje de pacientes que después de la cirugía consiguen clarificar de forma mantenida todos los marcadores de infección activa del VHB (53, 170, 176).

En un intento de poder predecir, antes del trasplante, el riesgo de recurrencia de la infección viral, varios autores han estudiado si existe relación entre su desarrollo y las siguientes características virológico-morfológicas pre-trasplante:

- **Replicación viral:** La existencia de signos de replicación activa del VHB pre-TxH se ha descrito (11, 54, 152, 169, 207, 208, 238) que representa un importante factor de riesgo de recidiva de la infección viral.

- **Tipo de hepatopatía terminal:** La relación entre el tipo de hepatopatía terminal indicativa del trasplante hepático (hepatitis fulminante, cirrosis) y el desarrollo o no de reinfección es un tema algo controvertido. La controversia radica en si los pacientes trasplantados por hepatitis fulminante representan un grupo de menor riesgo con respecto al

de los cirróticos. Mientras varios estudios demuestran este hecho (11, 109, 166, 176, 207, 208) existen otros que, por el contrario, refieren un similar porcentaje de recidivas entre las formas agudas y crónicas de infección (121, 169, 238).

El elevado porcentaje de casos recurrentes ha conducido a intentar prevenir la infección viral del injerto hepático utilizando las siguientes medidas terapéuticas:

- **Alfa interferon:** La experiencia que existe con este tipo de tratamiento antiviral en pacientes HBsAg seropositivos sometidos a TxH es relativamente escasa. Ello se debe a que su aplicación se ha visto muy limitada por los problemas que puede ocasionar cuando se administra a) en el período preoperatorio, por ser frecuentemente mal tolerado en pacientes con severa hepatopatía (121, 137) y b) después del trasplante hepático, debido al referido riesgo de incremento de la incidencia y severidad del rechazo (115, 116) por el aumento que el alfa-interferon produce en la expresión de antígenos del sistema HLA en las células hepáticas (134, 171). Los escasos trabajos publicados (98, 157, 178, 238, 248) coinciden, sin embargo, en que su uso pre- y/o postoperatorio no ha resultado eficaz en la prevención de la reinfección viral. Respecto a su utilidad como medida terapéutica de la recurrencia ya establecida, los pocos estudios realizados (98, 157, 253) refieren asimismo la frecuente ausencia de respuesta al tratamiento, incapaz de prevenir o reducir el nivel de replicación del VHB (98, 157) y de suprimir la actividad de la

hepatitis (253). Esta falta de respuesta al alfa-interferon postrasplante hepático se ha atribuido al efecto de la inmunosupresión (98, 238).

- **Inmunoprofilaxis activa:** La activa inmunización del paciente mediante pauta de vacunación del VHB tampoco ha conseguido, según los estudios publicados (30, 54, 90, 123, 196, 211, 238) evitar la reinfección viral, siendo escasa o nula la respuesta inmunológica y síntesis de anticuerpos anti-HBs, hecho que también se ha atribuido al estado de inmunosupresión (30).

- **Inmunoprofilaxis pasiva:** La administración prolongada de inmunoglobulina específica hiperinmune anti-HBs a dosis suficientes para mantener sus niveles séricos por encima de 100 UI/L ha sido, hasta el momento, el tratamiento que ha obtenido mejores resultados en la prevención de la reinfección por el VHB. En la mayoría de los trabajos realizados (40, 70, 124, 152, 157, 187, 207, 208) se ha conseguido, con su aplicación, reducir el porcentaje de recurrencias por debajo del 50%. El mecanismo por el cual la inmunización pasiva prolongada del paciente puede evitar la infección del injerto hepático, aunque es poco conocido, se ha atribuido (207, 208) a la posible capacidad de la inmunoglobulina de bloquear la síntesis de partículas virales extrahepáticas. A pesar de los alentadores resultados obtenidos, su eficacia está siendo actualmente cuestionada (11, 121, 198) debido al referido retraso que frecuentemente produce en el establecimiento de la reinfección viral (29, 124, 152, 207, 208) hecho que puede acontecer incluso a los dos años de seguimiento (152, 207,

208). En base a ello, se cuestiona (121) si es posible que, más que evitar de forma definitiva la recidiva, su efecto sea solamente postergarla.

Cuando la pasiva inmunización del paciente no se ha efectuado de forma prolongada, limitándose a un determinado período de tiempo postoperatorio, ésta no ha conseguido prevenir la infección del injerto en los estudios realizados (53, 54, 98, 123, 147, 161, 207, 230, 238).

En relación al curso evolutivo que ha seguido la infección recurrente por el VHB, los estudios publicados refieren: a) una casi constante evolución a la cronicidad (17, 40, 46, 53, 54, 72, 98, 124, 131, 142, 147, 152, 161, 169, 207, 208, 238), b) la frecuente aparición de marcadores serológicos de replicación viral activa acompañando a la seropositividad para HBsAg (46, 53, 54, 72, 98, 131, 142, 161, 169, 207, 208, 238), y c) la instauración de hepatitis recurrente en el injerto en un elevado porcentaje de casos, cifrado entre un 65 y 100% según las series (16, 46, 53, 54, 98, 142, 152, 161, 169, 207, 208, 238).

Estas tres características representan, hoy por hoy, el aspecto más conocido del curso evolutivo que muestra la reinfección viral postrasplante hepático. Los restantes aspectos virológicos y morfológicos de la enfermedad recurrente están, por el contrario, poco definidos.

El implante de un hígado sano en forma de injerto en un paciente previamente infectado por el VHB crea una situación peculiar en la que el órgano diana del VHB es expuesto directamente al virión sin previa puerta de entrada externa fortuita en un paciente ya inmunodeprimido. La tolerancia inmunológica yatrogénicamente provocada y la exposición directa de hepatocitos sanos al VHB origina una situación peculiar que teóricamente podría ser clínica, evolutiva y morfológicamente distinta a la historia natural ya conocida de la enfermedad provocada por este virus.

## **OBJETIVOS**

- 1º. Determinar la incidencia de infección del injerto por el VHB y su relación con a) el estado infectivo viral pretrasplante hepático, b) el tipo de hepatopatía terminal indicativa del trasplante, y c) las medidas terapéuticas preventivas utilizadas.
- 2º. Describir el curso virológico y los cambios morfológicos de la infección recurrente por el VHB.
- 3º. Correlacionar los cambios histopatológicos con la expresión y extensión tisular de los antígenos virales.
- 4º. Establecer la incidencia de hepatitis B recurrente en el injerto hepático y detallar sus tipos anatomoclínicos.
- 5º. En los pacientes HBsAg y anti-HD seropositivos, definir la relación e interacción secuencial entre la recurrencia de la infección por el VHB y VHD postrasplante hepático.
- 6º. Confrontar las características virológico-patológicas descritas en la infección por el VHB y por el VHD del paciente no trasplantado con las objetivadas en el curso postrasplante.

## **PACIENTES, MATERIAL Y METODOS**

## I. PACIENTES.

Este trabajo incluye 26 pacientes sometidos a TxH por hepatopatía terminal, todos ellos portadores del VHB (HBsAg positivo en suero) en el momento del trasplante. Todos los casos cumplen los siguientes criterios de inclusión: 1) Haber sobrevivido durante un período superior a 60 días post-TxH, 2) Ser receptor de un injerto hepático sin patología previa y, 3) Poseer seguimiento histológico (de un espécimen hepático como mínimo, excluyendo la biopsia del tiempo "0") post-TxH.

Diecinueve de estos pacientes proceden del Hospital "12 de Octubre" de Madrid, cuyo programa de TxH se inició el 16 de Abril de 1986. Desde esta fecha hasta el 15 de Diciembre de 1990 (abarcando un período de 5 años y 8 meses), el Servicio de Cirugía Digestivo II (Jefe de Servicio Prof.Dr. E. Moreno González) ha realizado 169 TxH a 143 pacientes. Veintiuno de estos enfermos (14,6%) mostraban, en el momento del trasplante, positividad serológica para HBsAg, si bien dos de ellos no han sido incluidos en este estudio (por carecer de seguimiento histológico en un caso y por sobrevivir menos de 60 días post-TxH en el otro).

Los 7 casos restantes proceden del Servicio de Cirugía Digestivo (Jefe de Servicio Prof.Dr. C. Pera) del Hospital "Reina Sofía" de Córdoba. En este Centro, el programa de TxH se inició el 15 de Julio de 1989 y, desde esta fecha hasta el 15 de Diciembre de 1990 (abarcando un período de 1 año y 6 meses) se han realizado 35 TxH a 34 pacientes, 8 de los

cuales (23.5%) fueron serológicamente positivos para el HBsAg en el momento del TxH. El caso no incluido en este trabajo correspondía a un receptor que recibió un hígado donante portador de una hepatopatía crónica no filiada. El Servicio de Medicina del Aparato Digestivo (Dr. M. de la Mata) nos ha facilitado los datos bioquímicos y serológicos de los 7 pacientes, y el Servicio de Anatomía Patológica (Dra. T. Marchal) nos ha suministrado material tisular representativo de los 7 hígados nativos y de todos los especímenes post-TxH de cada uno de los casos.

El estudio del seguimiento clínico, serológico e histopatológico de los pacientes vivos se ha detenido el 15 de Junio de 1991. El seguimiento de los pacientes ha sido superior a 5 meses en todos los casos, excepto en dos pacientes en que fué menor de 5 meses.

Al realizar este trabajo se ha valorado en cada paciente, además de los datos de filiación (edad y sexo, detallados en la tabla 1), las siguientes características:

#### I.A. INDICACION DEL TRASPLANTE.

La selección del receptor se efectuó, tras el estudio de cada caso en particular, en sesión conjunta por las comisiones de TxH de los respectivos centros hospitalarios. Todos los miembros firmaron su acuerdo con la indicación del TxH como la única o mejor terapéutica posible. La selección del donante se realizó según las características del protocolo existente en ambos centros.

El tipo de hepatopatía terminal (detallada en tabla 1) que determinó la indicación del TxH fué:

- . Hepatitis fulminante B en 7 pacientes.
- . Cirrosis posthepatitis B en 15 pacientes.
- . Cirrosis posthepatitis B-Delta en 4 pacientes.

#### I.B. TECNICA QUIRURGICA.

Los 26 receptores fueron sometidos a homotrasplante ortotópico total de hígado y la reconstrucción biliar se efectuó mediante coledoco-coledocostomía termino-terminal o mediante hepato-yeyunostomía (148-151).

En seis pacientes, el estudio de su seguimiento post-trasplante finalizó coincidiendo con la realización de un retransplante hepático (ReTxH). La ausencia de un seguimiento post-ReTxH se debió, en tres de ellos, a que habían sobrevivido menos de 60 días al ReTxH y, en los tres restantes, a que éste se había efectuado escasos días antes del cese de esta recogida de datos y de material de seguimiento.

#### I.C. PROTOCOLO DE INMUNOSUPRESION.

El tratamiento inmunosupresor se ha protocolizado como se describe a continuación.

- Protocolo inicial de inmunosupresión basal, que incluyó la administración simultánea de :

- . **Ciclosporina A**, hasta alcanzar niveles de 300-500 ngrs/ml, administrada inicialmente por vía endovenosa y posteriormente por vía oral cada 12 horas, controlándose su dosificación mediante determinaciones diarias de sus niveles plasmá-

ticos por R.I.A. o, alternativamente, **Globulina antitimocítica** (ATG) a dosis de 8-10 mgrs/kg/día durante 8 días. La elección de uno de los dos fármacos dependió del estado de la función renal y del número de plaquetas o de leucocitos circulantes.

. **Metilprednisolona**, a dosis de 10 mgrs/kg/día por vía endovenosa, continuando durante los dos primeros días postoperatorios con dosis de 2 mgrs/kg/día, disminuyendo posteriormente la dosis de forma progresiva hasta 0,2 mgrs/kg/día por vía oral.

. **Azatioprina**, a dosis de 2 mgrs/kg/día tanto en la administración endovenosa (inicial) como en la oral.

- **Protocolo de inmunosupresión en los episodios de rechazo**, constituido por la administración de un máximo de tres bolos de metilprednisolona por vía endovenosa a una dosis de 10 mgrs/Kg/día. Si el rechazo no respondía a los corticoides, se procedía a la administración de ATG a dosis de 8 mgrs/Kg/día durante 10-15 días. En caso de que el rechazo fuera también resistente al tratamiento con ATG, o bien se sustituía la terapia anterior por la administración de OKT3 a dosis de 5 mgrs/Kg/día durante 10 días o bien se recurría al ReTxH.

- **Protocolo de inmunosupresión basal permanente**, aplicada a los pacientes una vez dados de alta del hospital, de forma permanente y sin haberse suprimido ante ninguna circunstancia. El tratamiento en este período consistió en la triple terapia con Ciclosporina A, Metilprednisolona y Azatioprina a dosis basales estandar.

#### I.D. BIOQUIMICA HEPATICA

Del estudio analítico periódico efectuado para el control del paciente (que incluía hemograma completo, analítica básica sanguínea, estudios de coagulación y bioquímica hepática), en el presente estudio se han valorado exclusivamente los siguientes parámetros del perfil bioquímico hepático: Alanina Aminotransferasa (ALT), Fosfatasa Alcalina (FA) y Bilirrubina total.

El control de los mismos se efectuó : a) intraoperatoriamente, b) durante la estancia hospitalaria, al principio 2 veces al día y posteriormente cada 2-3 días, y c) una vez dados de alta del hospital, a una frecuencia de 2 veces/semana durante las 3 primeras semanas y, posteriormente, de 1 vez/semana hasta la normalización de la función hepática. A partir de entonces los períodos de control se fueron prolongando hasta llegar a controles trimestrales.

El perfil bioquímico hepático se efectuó mediante un autoanalizador bioquímico modelo HITACHI 704, utilizando reactivos Boehringer Mannheim.

#### I.E. INMUNOPROFILAXIS

Los 26 pacientes que constituyen este trabajo han quedado distribuidos en tres grupos distintos en relación con la aplicación o no de inmunización contra el VHB y con el tipo de profilaxis utilizada (datos detallados en tabla 1).

- **Grupo de pacientes tratados con INMUNOPROFILAXIS PASIVA** de forma prolongada a lo largo de todo el seguimiento posttrasplante (sin administración de inmunoprofilaxis activa):

Este tipo de profilaxis se efectuó en 7 pacientes. La dosis de Ig anti-HBs (Laboratorios Abbott, North Chicago, IL, USA) fué de 5.000 UI y se aplicó según la siguiente pauta de administración: a) durante el período intraoperatorio, dos dosis endovenosas consecutivas (la primera en la fase anhepática y la segunda al finalizar la intervención), b) a lo largo de los dos primeros meses post-TxH, una dosis intramuscular diaria durante la primera semana y, posteriormente, dosis intramusculares a los 14º, 21º, 28º, 45º y 60º días, y c) a partir del tercer mes y de forma permanente, una dosis intramuscular mensual, con objeto de mantener niveles séricos de Ig anti-HBs superiores a 100 UI/L.

- **Grupo de pacientes tratados con INMUNOPROFILAXIS ACTIVA** (sin administración de inmunoprofilaxis pasiva prolongada): La aplicación de la vacuna contra el VHB se realizó en 16 pacientes. Debido a modificaciones en el protocolo de vacunación a lo largo del período de programa de TxH, su pauta no fué homogénea. La inmunización se efectuó mediante vacuna recombinante (Laboratorios Smith Kline & French, Madrid). Los 16 pacientes recibieron la vacuna a lo largo del primer año postransplante, aplicada en un máximo de tres dosis intramusculares de 20 o 40  $\mu$ grs y a intervalos irregulares. En 5 pacientes se administró además inmunización activa durante el período preoperatorio (un máximo de dos dosis intramusculares de 20  $\mu$ grs) y en otros 3 durante la fase anhepática del período intraoperatorio (una dosis de 20  $\mu$ grs).

Si bien ninguno de estos pacientes recibió inmunoprofilaxis pasiva de forma prolongada a lo largo del seguimiento

post-TxH, en 3 casos (nº1, 12 y 16) se administró inmunoglobulina específica pero su aplicación quedó limitada al período intraoperatorio (2 pacientes, que recibieron 40.000 UI en este período) o al del postoperatorio inmediato (1 paciente, que recibió 10.000 UI durante la fase anhepática y 15.000 UI a lo largo de las dos primeras semanas postransplante).

- **Grupo de pacientes en los que no se realizó NINGUN TIPO DE INMUNOPROFILAXIS:** En los restantes 3 pacientes no se empleó ningún tipo de inmunoprofilaxis antiviral (activa o pasiva).

#### I.F. TRATAMIENTO ANTIVIRAL.

Se realizó tratamiento antiviral en los pacientes con marcadores serológicos de replicación activa del VHB y/o VHD (HBeAg y/o DNA del VHB y/o RNA del VHD positivos en suero), aplicándose en el período pretransplante con el propósito de inhibir la replicación viral para evitar la reinfección del injerto o en el período postransplante como tratamiento de la recidiva de la infección. Se utilizó:

- **Alfa-interferón:** El tratamiento con alfa-interferón se efectuó durante el período a) pre-TxH, a todos los pacientes con infección crónica por el VHB (cirrosis posthepatitis B o cirrosis posthepatitis B-Delta) y marcadores serológicos de replicación viral activa (datos detallados en tabla 1) y b) post-TxH, a 2 de entre los pacientes reinfectados por VHB y VHD con marcadores serológicos de replicación viral positivos en suero (casos nº1 y 2). El producto utilizado fué alfa Interferón 2a (Roféron-A, F.Hoffmann-La Roche, Basilea,

Suiza) o alfa Interferón 2b (Intrón A, Schering Corporation, Kenilworth, NJ, USA), según la disponibilidad del medicamento. Se administraron dosis de  $3 \times 10^6$  UI o de  $18 \times 10^6$  UI (la dosis fué variable según cada caso) 3 veces/semana, desde el inicio de la detección de la replicación viral hasta su total negativización.

- **Foscarnet:** El tratamiento con Foscarnet (Foscabil, Astra, Suecia) se efectuó solamente en el período post-TxH en 1 paciente (caso nº4) con signos de replicación viral activa del VHB a lo largo del seguimiento. La pauta administrada consistió en tres ciclos de 21 días (separados por intervalos de 1 mes) con dosis endovenosas de 200 mgrs/Kg/día y bajo control periódico del metabolismo del calcio.

TABLA 1. DATOS CLINICOPATOLOGICOS Y MARCADORES DEL VHB, VHD, Y VHC PRETRASPLANTE HEPATICO.

Caso	Sexo	Edad (años)	HT	Serología del VHB, VHD y VHC.					Inmunohistoquímica			Inmunopr
				Estado HBs	ADN-VHB	Anti-HD	ARN-VHD	Anti-VHC	HBsAg	HBcAg nuc/cit	HDAg	
nº 1	V	27	CI	anti-HBe	-	+	-	nr	+	-/-	-	activa
nº 2	V	28	CI	anti-HBe	-	+	-	nr	++	-/-	++	activa
nº 3	M	30	CI	anti-HBe	-	+	-	nr	+	-/-	+	activa
nº 4	V	24	CI	anti-HBe	--*	+	-	-	+++	-/-	+	activa
nº 5	V	49	CI	anti-HBe	-	-	nr	-	+	-/-	-	activa
nº 6	M	21	HF	HBsAg	-	-	nr	nr	-	-/-	-	ninguna
nº 7	V	36	CI	anti-HBe	-	-	nr	nr	+	+/-	-	activa
nº 8	V	43	CI	anti-HBe	-	-	nr	nr	+	-/-	-	activa
nº 9	V	50	CI	anti-HBe	--*	-	nr	nr	-	-/-	-	activa
nº 10	V	48	CI	anti-HBe	-	-	nr	nr	++	-/-	-	activa
nº 11	M	15	HF	HBsAg	-	-	nr	nr	-	+/-	-	ninguna
nº 12	V	46	CI	anti-HBe	nr	-	nr	nr	++	++/++	-	activa
nº 13	V	26	HF	HBsAg	nr	-	nr	-	-	-/-	-	activa
nº 14	V	36	CI	anti-HBe	-	-	nr	nr	+	-/-	-	activa
nº 15	V	56	CI	anti-HBe	nr	-	nr	-	+	+ / ++	-	activa
nº 16	V	32	CI	anti-HBe	--*	-	nr	-	++	+ / ++	-	activa
nº 17	V	61	CI	anti-HBe	--*	-	nr	-	++++	++++ / ++++	-	activa
nº 18	V	60	CI	anti-HBe	-	-	nr	-	++	+/-	-	activa
nº 19	V	38	CI	anti-HBe	-	-	nr	-	++	-/-	-	pasiva
nº 20	V	26	HF	anti-HBe	-	-	nr	-	++	+/-	-	pasiva
nº 21	M	32	HF	anti-HBe	-	-	nr	-	-	-/-	-	pasiva
nº 22	M	26	HF	anti-HBe	-	-	nr	-	-	-/-	-	pasiva
nº 23	V	27	CI	anti-HBe	-	-	nr	+	-	-/-	-	pasiva
nº 24	V	31	CI	anti-HBe	-	-	nr	-	++	-/-	-	pasiva
nº 25	V	44	HF	anti-HBe	-	-	nr	-	-	-/-	-	pasiva
nº 26	M	14	CI	anti-HBe	-	-	nr	nr	-	-/-	-	ninguna

HT=hepatopatía terminal; CI=cirrosis; HF=hepatitis fulminante; nr=no realizado; Inmunopr=inmunoprofilaxis; --postratamiento con alfa interferon; Gradiente de hepatocitos positivos: +, ocasional; ++, leve; +++, moderado; +++++, elevado.

## II. MATERIAL

### II.A. MATERIAL SEROLOGICO.

El protocolo virológico ha incluido determinaciones de marcadores virales efectuadas en los períodos a) pre-TxH, habiéndose realizado un mínimo de dos controles (el primero antes de la selección del paciente como candidato a TxH, y el último en el preoperatorio inmediato), y b) post-TxH, efectuándose los controles cada 1-3 meses. Los marcadores virales explorados han correspondido a:

#### II.A.1. SEROLOGIA DEL VHB

. **Antígenos y anticuerpos:** El perfil virológico ha incluido la determinación en suero de HBsAg, Anti-HBs, HBeAg, Anti-HBe, Anti-HBc y Anti-HBc IgM. El estudio de estos marcadores se ha efectuado en todos los pacientes.

. **ADN viral:** La determinación del ADN del VHB en suero se ha realizado en 23 pacientes durante el período pre-TxH (detallados en tabla 1) y en 24 a lo largo del seguimiento postrasplante (los únicos dos pacientes en los que no se determinó fueron los casos nº2 y nº12).

#### II.A.2. SEROLOGIA DEL VHD.

. **Anticuerpos:** Se ha determinado Anti-HD en todos los pacientes.

. **ARN Viral:** El estudio del ARN del VHD en suero solamente se ha realizado a los 4 pacientes trasplantados por cirrosis posthepatitis B-Delta, no habiéndose efectuado a los 22 res-

tantes por ser anti-HD seronegativos. La determinación del ARN viral se ha practicado, en todos ellos, tanto en el período pre-TxH como a lo largo del seguimiento postrasplante.

### II.A.3. SEROLOGIA DEL VHC.

El anticuerpo específico del VHC (Anti-VHC) ha podido estudiarse en 22 pacientes. En 14 de ellos se ha efectuado la pauta de control establecida (determinaciones en los períodos pre-TxH y post-TxH) debido a que todos ellos fueron trasplantados cuando se dispuso de las recientes técnicas de estudio del Anti-VHC (Julio de 1989) entre los marcadores serológicos de virus hepatotropos. Los controles, en los 8 restantes pacientes, se limitaron exclusivamente al período post-TxH (abarcando todo el tiempo de seguimiento o bien la última etapa del mismo). La positividad del anti-VHC ha sido el único marcador viral utilizado para determinar la infección por el VHC (120).

### II.B. MATERIAL TISULAR.

El material tisular de este estudio lo constituyen todos los especímenes obtenidos de cada acto quirúrgico de TxH (hígados nativos y piezas de ReTxH) y todos los especímenes obtenidos para el estudio histológico de seguimiento postrasplante (biopsias hepáticas e hígados de autopsia).

Las biopsias hepáticas post-TxH se han realizado de forma protocolizada, obteniéndose:

- en el "tiempo 0", con el propósito de valorar el grado de lesión histológica sufrida durante la fase de isquemia fría así como de evidenciar la existencia de previas hepatopatías no conocidas en el hígado donante.
- En el período entre el octavo y decimoquinto día del trasplante, practicadas fundamentalmente como control del estado inmunológico del injerto y del grado de respuesta al tratamiento inmunosupresor.
- En todos los episodios de disfunción del injerto en los que se sospechaba rechazo o cualquiera de las otras complicaciones post-TxH, para diagnosticar o sugerir la patología hepática responsable del mismo.
- Anuales, como control evolutivo del injerto.

La obtención de la biopsia del "tiempo 0" se ha efectuado durante el acto quirúrgico, después de la revascularización del injerto, mediante cuña hepática y/o aguja de Menghini. El resto de las biopsias post-TxH se han realizado de forma percutánea con aguja de Menghini.

La totalidad del material hepático de este trabajo está constituido por 161 especímenes hepáticos, distribuidos en: a) 26 hígados nativos resecados procedentes de los 26 pacientes trasplantados, b) 11 piezas de hepatectomía de injertos hepáticos procedentes de los 6 pacientes retrasplantados y de 5 pacientes fallecidos a los que se les practicó autopsia y c) 124 biopsias post-TxH, distribuidas en 20 cilindros y 6 cuñas hepáticas de "tiempo 0" y en 98 biopsias percutáneas

de seguimiento.

Por lo tanto, el número total de especímenes obtenidos para el estudio de los 26 injertos realizados (excluyendo las biopsias de "tiempo 0") es de 109. La tabla 2 muestra el número de muestras por paciente y el tiempo postrasplante en que éstas fueron tomadas.

**TABLA 2 . DISTRIBUCION CRONOLOGICA DE LOS ESPECIMENES**

<b>Nº de especímenes</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>Días postrasplante Intervalo (media±DS)</b>
1	2	363-400 (382±19)
2	6	7-551 (212±190)
3	5	7-768 (174±208)
4	4	5-827 (177±242)
6	3	6-584 (136±145)
7	3	7-539 (186±183)
8	2	8-729 (330±250)
9	1	8-834

El muestreo de los tejidos hepáticos se ha efectuado :  
a) incluyendo todo el tejido remitido, si eran biopsias hepáticas, y b) realizando 4 cortes representativos de 1 x 1 x 0,1 cms (dos en el lóbulo hepático derecho y dos en el izquierdo), si los tejidos a estudio eran piezas de hepatectomía, efectuándose además seriación completa del hilio en el caso de que se tratara de un injerto hepático resecado. Todos los especímenes fueron fijados en formol tamponado al 10% durante 12 o 24 horas según el grosor de la pieza e incluidos posteriormente en parafina por el procesamiento habitual.

En cada una de las muestras se efectuaron un mínimo de 16 cortes histológicos de 4-5 micras de grosor (excepto en las procedentes del hilio hepático en las que se limitó a 7), destinándose 7 de ellos para realizar el ESTUDIO HISTOPATOLOGICO y las 9 restantes para la determinación tisular de HBsAg, HBcAg y HDAg mediante ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO.

### III. METODOS.

#### III.A. ESTUDIO SEROLOGICO.

##### III.A.1. ANTIGENOS Y/O ANTICUERPOS DEL VHB, VHD Y VHC.

La detección, en suero o plasma, de los respectivos antígenos y/o anticuerpos específicos del VHB, VHD y VHC se ha efectuado mediante método de enzimoanálisis (EIA) con anticuerpos monoclonales, habiéndose utilizado reactivos de Laboratorios Abbott (Chicago, IL, USA) para la determinación de Anti-HBs, HBeAg y Anti-HBe, reactivos de los laboratorios Sorin Biomedica (Saluggia, VC, Italia) para la determinación de HBsAg, anti-HBc IgG, anti-HBc IgM y anti-HD, y reactivos de los laboratorios Ortho Diagnostics (Raritan, NJ, USA) para la determinación del anti-VHC.

El tipo de método enzimático empleado respectivamente para cada uno de los marcadores ha sido:

- a) directo no competitivo, para la determinación de HBsAg y HBeAg.
- b) indirecto competitivo, para Anti-HBs, Anti-HBe, Anti-HBc, Anti-HD y Anti-VHC.
- c) indirecto de captura para Anti-HBc IgM.

En el estudio del anti-VHC, los resultados positivos fueron confirmados por un nuevo ensayo con inmunoblot utilizando antígeno recombinante (4-RIBA), habiéndose empleado un total de 4 antígenos (5-1-1, c100-3, c33c, c22-3, SOD).

### III.A.2. ADN DEL VHB Y ARN DEL VHD.

La detección del ADN del VHB en suero se efectuó mediante técnica de hibridación molecular de test simplificado tipo "Dot-blot hybridization" (13), utilizando una sonda de ADN específico (obtenida del plásmido pBH 20-HBV) marcada radiactivamente con  $P^{32}$  ( $P^{32}$ -DNA-VHB) por el método nick-translation. El revelado posterior se realizó por autorradiografía, a  $-70^{\circ}C$  y durante un período mínimo de 24 horas.

La determinación en suero del ARN del VHD se efectuó mediante técnica de hibridación molecular tipo "Slot-blot hybridization" (222). La sonda de ARN específico se obtuvo del plásmido recombinante pGBD3 y ésta estaba marcada por la actividad de la ARN polimerasa T7 (Promega, Biotec, Madison, WI). El revelado posterior se efectuó mediante autorradiografía, a  $-70^{\circ}C$  y durante un período de 4-7 días.

Ambas técnicas se efectuaron con controles de calidad positivo y negativo. La interpretación de los resultados fué: positivo=impresión de la placa; negativo=no impresión de la placa.

### III.B. ESTUDIO HISTOPATOLOGICO.

#### III.B.1. TECNICAS REALIZADAS.

Los 7 cortes de cada espécimen destinados al diagnóstico histopatológico se tiñeron respectivamente con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson, tinción de Wilder para fibras de reticulina, ácido periódico de Schiff (PAS) previa digestión con diastasa y azul de prusia de Perls.

### III.B.2. INTERPRETACION DIAGNOSTICA EN HIGADOS NATIVOS.

El estudio histopatológico de la hepatopatía terminal del hígado nativo (Necrosis hepática submasiva o masiva Hepatitis Fulminante o Cirrosis), determinante de la indicación al TxH, se efectuó en base a los signos morfológicos clásicos, especificados más adelante.

### III.B.3. INTERPRETACION DIAGNOSTICA EN INJERTOS HEPATICOS.

Los criterios morfológicos utilizados en el diagnóstico anatomopatológico (DAP) de las distintas causas de disfunción del injerto hepático en cada muestra histológica estudiada fueron (36):

- . **Rechazo agudo o celular:** Infiltrado portal mixto (frecuentemente con eosinófilos) acompañado de lesión ductal y/o endotelitis (52) graduado según la metodología de Snover y col. (224, 249).
- . **Rechazo crónico o vascular:** Endarteriopatía fibroobliterativa con o sin macrófagos espumosos, lesiones de ductos (ductopenia del 50% y cambios epiteliales), colestasis y atrofia centrolobulillar (83, 175, 249, 250).
- . **Patología por alteración de la perfusión sanguínea:** Objetivación de áreas infárticas focales, de necrosis isquémica centrolobulillar (zonal) o de estasis venoso (21, 213).
- . **Patología biliar:** signos parenquimatosos morfológicos característicos de obstrucción biliar extrahepática y/o colangitis (55, 127, 175).
- . **Colestasis funcional, inespecífica o inexplicada:** pigmento biliar lobulillar con o sin cambio hidrópico hepatocitario

centrolobulillar, sin infiltrado inflamatorio asociado (182, 251).

. **Virasis oportunistas:** presencia de inclusiones nucleares y/o citoplasmáticas (diagnósticas) o de acúmulos inflamatorios mixtos focales o diseminados sin preferencia por una zona lobulillar determinada "sugestivos" de virasis oportunista (203).

. **Recurrencia de la infección por virus hepatotropos:** Se ha definido reinfección por el VHB a la presencia, además del HBsAg sérico, de algún antígeno del VHB (HBsAg y/o HBeAg) en el injerto hepático y/o a la existencia de signos de replicación viral en el curso postrasplante (53, 162). Se ha considerado que existía replicación del VHB cuando HBeAg y/o DNA séricos y/o HBeAg tisular eran positivos (18, 86, 102). Se ha definido recurrencia de la infección por el VHD cuando el ARN sérico y/o el HDAg tisular hepático eran positivos en algún momento del curso postrasplante (162). Los tipos de expresión morfológica hepática de la infección viral en cada espécimen estudiado han sido: a) **Estado de portador sin hepatitis:** demostración de algún antígeno del VHB o del VHD en el injerto hepático sin que existiera lesión necroinflamatoria o fibrosante atribuible a la infección viral (168); b) **Hepatitis lobulillar:** lesión preferente del lobulillo (trabéculas irregulares, frecuentes cuerpos acidófilos e inflamación lobulillar), sin o con necrosis confluyente submasiva o masiva (**Necrosis hepática submasiva o masiva**) (108); c) **Hepatitis crónica:** lesión portal con infiltrado inflamatorio de linfocitos y células plasmáticas acompañada de escasa

(**Hepatitis crónica persistente**) o relevante (**Hepatitis crónica activa**) necrosis erosiva (107). Se denominó **Hepatitis Subaguda** cuando se añadía necrosis confluyente evolucionando a la fibrosis (20). Se denominó **Hepatitis colestásica fibrosante** (46) cuando existía fibrosis perisinusoidal con pérdida de hepatocitos, trabéculas irregulares de epitelio ductal y abundante pigmento biliar; d) Cirrosis: nódulos regenerativos de hepatocitos hiperplásicos rodeados por septos fibrosos. En los casos en que el espécimen a estudio correspondía a una pieza de hepatectomía se ha especificado el tipo morfológico desarrollado (macronodular, macromicronodular o micronodular (6). Estos DAPs se han aplicado a cada espécimen independientemente de que el injerto haya evolucionado de uno a otro.

. Cambios mínimos o ausencia de lesiones.

. Reacciones a fármacos y tóxicos: Presencia de los inespecíficos cambios morfológicos que se han descrito asociados a hepatotoxicidad por ciclosporina A (colestasis) (111) o por Azatioprina (hemorragia centrolobulillar y micropeliosis) (143).

. Cuadros plurietiológicos: Presencia de uno o más de los patrones histológicos anteriores (182).

### III.C. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

La determinación tisular de HBsAg, HBCAg y HDAG se efectuó en todos los especímenes, utilizándose (de los 9 cortes histológicos/muestra que se destinaron para este fin), 2

cortes para la detección de cada uno de los tres antígenos y los tres cortes restantes para sus respectivos controles negativos.

### III.C.1. TECNICAS REALIZADAS.

El estudio inmunohistoquímico de los tres antígenos se ha efectuado mediante técnica de inmunoperoxidasa.

El método empleado para la detección de HBsAg y HBCAg ha sido el de Avidina-Biotina peroxidasa complex (ABC) de Hsu (99). Los anticuerpos específicos primarios utilizados fueron de tipo policlonal, empleándose ac. prediluido de cabra como Anti-HBs (Biogenex, San Ramón, CA, USA), y ac. prediluido de conejo como Anti-HBc (Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

Para la determinación de HDAg se utilizó un método de inmunoperoxidasa indirecto (209) utilizando como ac. específico primario IgG humana purificada del suero de un paciente con elevado título de Anti-HD (gentilmente cedido por el Dr. Bruguera, Unidad de Hepatología del Hospital Clínico de Barcelona).

#### **. Procesamiento previo del material.**

Todos los portaobjetos destinados a sujetar material para estudio inmunohistoquímico fueron pretratados con un baño de 5 minutos de gelatina crómica para facilitar la adherencia tisular a los mismos. Tras el montaje de las secciones, para incrementar la adherencia se dejaron secar en una estufa durante toda la noche a 37°C o bien durante 2

horas a 55°C si se iba a realizar la inmunotinción el mismo día.

Antes de iniciar la reacción de inmunoperoxidasa para cada uno de los tres antígenos, los cortes histológicos fueron sometidos a un proceso de desparafinización mediante un baño de 30 minutos de Xileno puro, seguido de posterior rehidratación con alcoholes etílicos consecutivos de 100°, 96° y 70° y de ulterior inhibición de la peroxidasa endógena mediante un baño de 10 minutos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3% en metanol absoluto. Posteriormente se efectuaron lavados consecutivos con buffer fosfato salino (PBS: 0.01M a ph 7.4), sin permitir ya que las secciones se secaran durante el resto del proceso.

Para la detección de HDAg se realizó a continuación proteólisis enzimática del tejido mediante un baño de 5 minutos con solución de proteasa VII (Sigma, St.Louis, MO, USA) al 0.5% en PBS, seguido de otros 10 minutos de lavados consecutivos con PBS, no efectuándose dicho tratamiento enzimático en la determinación de los otros dos antígenos.

#### **. Detección de HBsAg**

Los especímenes se preincubaron durante 20 minutos con suero normal de conejo (Vector, Burlingame, CA, USA) diluído a 1/100 en PBS. Inmediatamente después, tras decantamiento de los portaobjetos, se procedió a la incubación con el ac. específico primario Anti-HBs prediluído de cabra, administrando 100 microL sobre cada espécimen durante un período de tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizada esta

fase y tras 10 minutos de lavados consecutivos con PBS, se procedió a incubar el material durante 30 minutos con el ac. secundario biotinado, constituido por una solución de ac. purificado de conejo anti IgG de cabra (Vector, Burlingame, CA, USA) diluido 1/200 en una solución de suero normal de conejo al 1% en PBS. Posteriormente, tras 10-15 minutos de lavados con PBS, para la reacción histoquímica final de la peroxidasa los tejidos fueron incubados 30 minutos con solución Avidina-Biotina-Peroxidasa-Complex (Vector, Burlingame, CA, USA), estando diluidos a 1/100 en PBS cada uno de sus dos componentes (A: Avidina; B: Biotina conjugada con peroxidasa) y habiéndose preparado la solución 30 minutos antes de realizar la incubación. La detección de dicha reacción se efectuó, previo nuevo lavado con PBS, con el sustrato cromógeno de Diaminobenzidina (solución de 10 mgrs. de diaminobenzidina en 20 ml de TrisClH 0.05 M a ph 7.6, al que se añaden 0.2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1%).

Una vez finalizada la reacción, el material se lavó abundantemente con agua y se contratiñó 1-2 minutos con Hematoxilina, siendo a continuación sometido inmediatamente a un proceso de deshidratación con alcoholes crecientes (70<sup>a</sup>, 96<sup>a</sup>, 100<sup>a</sup>/ Xilol) y ulterior montaje.

#### **. Detección de HBcAg**

La preincubación se efectuó con suero normal de cabra (Vector, Burlingame, CA, USA) diluido a 1/100 en PBS durante 20 minutos. Tras decantación y eliminación del exceso de líquido, se procedió a la incubación con el ac. específico

anti-HBc prediluido de conejo aplicándose una cantidad de 100 microL sobre cada espécimen, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La incubación de los tejidos con el ac. secundario biotinado (previo lavado con PBS) se realizó mediante una solución purificada de ac. de cabra anti IgG de conejo (Vector, Burlingame, CA, USA) diluido 1/200 en solución de suero normal de cabra al 1%. Los pasos siguientes corresponden a los mismos que los descritos ya anteriormente para la reacción de detección de HBsAg (aplicación del complejo Avidina-Biotina-peroxidasa-complex, detección de la reacción con el sustrato cromógeno diaminobenzidina, contratinción con hematoxilina, deshidratación y montaje).

. **Detección de HDAg**

Tras el proceso de proteólisis enzimática y posterior lavado en PBS, se efectuó preincubación del material mediante un baño de 30 minutos con suero fetal de ternera diluido a 1/5 en PBS, a temperatura ambiente. Posteriormente, previa eliminación del exceso de líquido, los especímenes fueron incubados con el ac. específico primario anti-HD mediante la aplicación de 100/200 microL/especimen de IgG humana purificada diluida a 1/5000 en PBS. Finalizada la incubación con el ac. primario y tras nuevos lavados con PBS, se procedió a la aplicación del ac. secundario (de conejo) anti IgG humana conjugado con peroxidasa (Laboratorios Dako, Glostrup, Dinamarca) diluido a 1/100 en una solución de suero fetal de ternera al 10% en PBS. Los siguientes pasos son los mismos que los utilizados en la detección de los otros dos antígenos

( aplicación de diaminobenzidina, contratinción, deshidratación y montaje).

**- Control de calidad.**

La técnica de inmunoperoxidasa para la determinación tisular de cualquiera de los tres antígenos se ha efectuado siempre con controles biológicos positivo y negativo, es decir, con un corte histológico de un caso en el que existía seguridad absoluta de presencia tisular del antígeno a estudio (control biológico positivo) y de otro caso con certeza absoluta de ausencia del mismo (control biológico negativo). El sentido de efectuar la reacción con ambos controles ha sido en base a confirmar la funcionalidad y especificidad de los anticuerpos específicos empleados y/o la corrección de la técnica realizada.

Además de los controles biológicos generales (positivo y negativo), la reacción de inmunoperoxidasa para cada uno de los tres antígenos se ha realizado con los respectivos controles negativos de calidad particulares de cada espécimen hepático a estudio. Estos controles negativos para cada uno de los casos problema se han efectuado sustituyendo la aplicación del ac. específico por PBS. El sentido de realizar un control negativo para cada caso concreto se ha hecho en base a descartar la existencia de posibles uniones inespecíficas entre los distintos componentes tisulares y los anticuerpos "no específicos" utilizados.

### III.C.2. VALORACION E INTERPRETACION DIAGNOSTICA.

#### - Porcentual:

En base al número de hepatocitos con inmunotinción positiva para HBsAg, HbcAg o HDag, se han establecido distintos grados porcentuales de afectación:

- . ausente, cuando no hay ningún hepatocito teñido.
- . ocasional, cuando el número de hepatocitos positivos es inferior al 5%.
- . leve, cuando el número de hepatocitos positivos oscila entre un 5% - 30%.
- . moderado, cuando el número de hepatocitos positivos oscila entre un 30% -70%.
- . elevado, cuando el número de hepatocitos positivos es superior al 70%.

#### - De distribución intrahepatocitaria:

. **De HBsAg:** La valoración de los patrones de tinción celular del HBsAg ha sido realizada según la establecida por Hsu y col. (102), con algunas modificaciones. En base al tipo de distribución intracitoplasmática y a su grado de intensidad, los tipos de patrones valorados han sido cuatro:

- . Homogeneo intenso, cuando la tinción abarcaba la totalidad del citoplasma de forma difusa e intensa.
- . Homogeneo debil, cuando abarcaba la totalidad del citoplasma de forma difusa pero débil.
- . Focal, cuando abarcaba sólo parte del citoplasma del hepatocito, existiendo zonas del mismo respetadas (están incluidos en este tipo los clásicos patrones de tinción globular, moteada y marginal).

. Membranoso, cuando la tinción estaba limitada a la membrana celular.

. **De HBcAg y HDAg:** La localización intracelular de ambos antígenos se valoró como a) nuclear (tinción a nivel del núcleo) y/o b) citoplasmática (tinción a nivel del citoplasma del hepatocito).

### III.D. ESTUDIO ESTADISTICO.

Todos los resultados se han presentado con media  $\pm$  desviación estándar ( $m \pm ds$ ). Para valorar la dependencia de las variables cualitativas se ha utilizado la prueba exacta de Fisher. El análisis actuarial del periodo de tiempo entre infección del injerto por el VHB y desarrollo de hepatitis ha sido calculado utilizando el método de Kaplan-Meier.

## **RESULTADOS**

El análisis de los múltiples datos obtenidos ha producido la estructuración jerárquica de los resultados en dos grandes grupos:

I. Estado clinicopatológico en el momento del TxH.

II. Evolución postrasplante hepático.

A.- Resultados generales: seguimiento secuencial global (clínico, virológico y morfológico) de los pacientes.

B.- Distribución de los especímenes según diagnósticos anatomopatológicos: seguimiento secuencial de los tejidos hepáticos ordenados según progresiva alteración morfológica.

En cada grupo, los resultados obtenidos se han reportado con el conveniente encabezamiento:

- Datos morfológicos
- Datos serológicos
- Datos inmunohistoquímicos

## I. ESTADO CLINICOPATOLOGICO EN EL MOMENTO DEL TxH.

Los 26 pacientes trasplantados corresponden a 20 varones y 6 mujeres, con una edad (media  $\pm$  desviación estandar) de  $35 \pm 12$  años (intervalo: 14-60 años).

Los principales marcadores serológicos y tisulares de infección del VHB, VHD y VHC pre-TxH están detallados en la tabla 1.

### I.A. ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DE LOS HIGADOS NATIVOS.

El estudio histopatológico de los hígados nativos procedentes de los 7 pacientes trasplantados por hepatitis fulminante mostraba un cuadro morfológico de necrosis hepática masiva en 6 casos y de necrosis hepática submasiva en el otro. El DAP de los restantes 19 casos fué de cirrosis post-necrótica, de tipo macronodular en 11 casos y de tipo macromicronodular en los 8 restantes.

### I.B. ESTADO VIROLOGICO DEL VHB.

- **Estudio serológico:** En el momento del TxH, todos los pacientes eran HBsAg y anti-HBc seropositivos. El anti-HBc IgM fué positivo en los 7 pacientes trasplantados por hepatitis fulminante, y negativo en los restantes 19 casos trasplantados por cirrosis. Los marcadores serológicos de replicación del VHB fueron negativos en 23 pacientes (todos mostraban positividad para anti-HBe y el DNA sérico fué negativo en los 21 casos testados). Están incluidos en este grupo los 4 pacientes (casos nº4, nº9, nº16 y nº17) que fueron

tratados con alfa-interferon en el período pretrasplante. Todos ellos eran HBeAg y DNA seropositivos antes de iniciar el tratamiento y los cuatro desarrollaron, tras la terapia antiviral, seroconversión a anti-HBe y aclaramiento del DNA viral. En el momento del TxH, solamente 3 pacientes (trasplantados por hepatitis fulminante) mostraban signos serológicos de replicación, siendo el HBeAg el único marcador positivo.

**-Estudio inmunohistoquímico:** El estudio inmunohistoquímico mostró presencia de algún antígeno del VHB en 18 hígados nativos (69,2%), correspondientes a 16 casos con cirrosis y 2 con necrosis hepática (submasiva y masiva respectivamente). El **HBsAg** estaba presente en todos ellos excepto en el que mostraba un cuadro morfológico de necrosis hepática masiva. El porcentaje de hepatocitos positivos fué variable, predominando un gradiente de afectación ocasional o leve (15 casos) sobre uno moderado o elevado (2 casos). En todos los casos se observaron dos o más patrones de tinción asociados, existiendo generalmente predominio de un patrón sobre otro. Los tipos de inmunotinción dominantes fueron el citoplasmático difuso débil y el focal (especialmente en sus formas marginal y globular [figura 1]), adoptando ambos patrones frecuente disposición en grupos. No se observó, en ningún caso, expresión de tipo membranoso. El **HBcAg** se detectó en 8 de los hígados nativos inmunopositivos para algún antígeno, pertenecientes a los 2 casos con cuadro morfológico de necrosis hepática (submasiva y masiva) y a 6 de los hígados con cirrosis. Excepto un caso que mostró un elevado gradiente

de inmunotinción hepatocitaria, el resto presentaban un porcentaje ocasional o leve de hepatocitos positivos. La expresión antigénica fué de constante localización nuclear y en el 50% de ellos existía además un componente citoplasmático asociado.

**-Estudio global:** El estudio global (serológico e inmunohistoquímico) de los marcadores de infección viral ha demostrado que 10 pacientes (38,5%) fueron trasplantados en estado replicativo del VHB. Pertenecían a este grupo 6 de los 15 casos trasplantados por cirrosis posthepatitis B y 4 de los 7 trasplantados por hepatitis fulminante. En los 6 pacientes con cirrosis posthepatitis B el HBcAg tisular fué el único marcador positivo de replicación viral. La existencia de replicación pre-TxH en los 4 pacientes con hepatitis fulminante vino determinada por HBeAg sérico positivo aislado (2 casos), HBcAg tisular aislado (1 caso) o por la presencia de ambos marcadores (1 caso). Los restantes 16 pacientes fueron sometidos a TxH sin signos de actividad replicativa del VHB, perteneciendo a este grupo los 4 casos trasplantados por cirrosis posthepatitis B-Delta (datos representados en el gráfico 1).

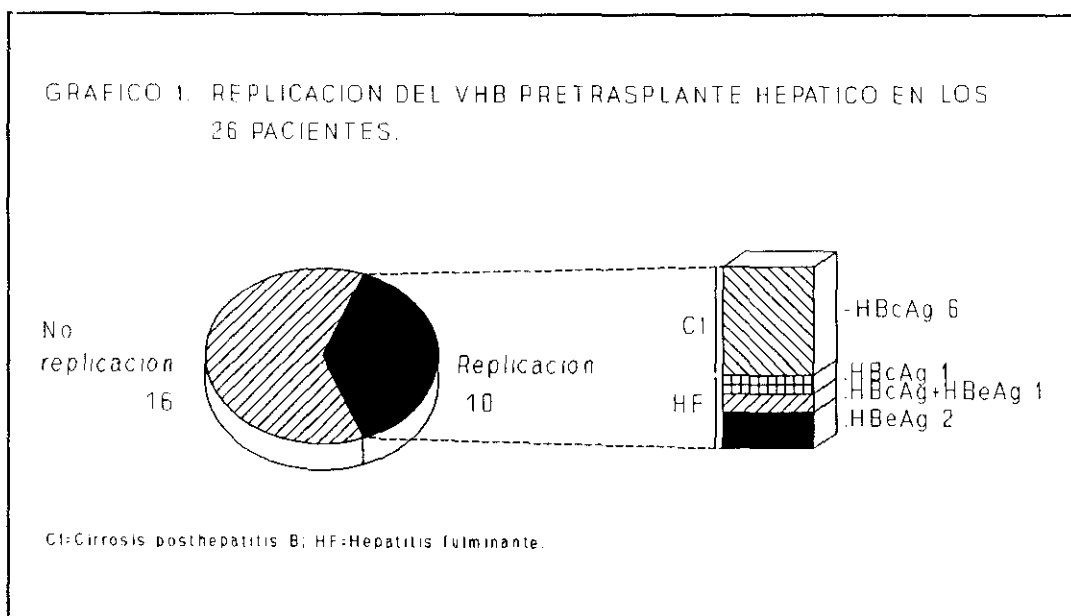
#### I.C. ESTADO VIROLOGICO DEL VHD.

**-Estudio serológico:** Los 4 pacientes trasplantados por cirrosis posthepatitis B-Delta eran anti-HD positivos en el momento del trasplante y el ARN sérico era negativo en todos ellos. El anti-HD era negativo en todos los casos restantes.

**-Estudio inmunohistoquímico:** El HDAg se detectó en 3 de los 4 hígados nativos procedentes de los pacientes anti-HD positivos. Todos ellos mostraron un gradiente ocasional o leve de hepatocitos HDAg-positivos y el patrón de tinción fué exclusivamente nuclear en los 3 casos. Ningún paciente anti-HD negativo mostró HDAg tisular.

**I.D. ESTADO VIROLOGICO DEL VHC.**

En el momento del TxH, el anti-VHC fué positivo exclusivamente en un paciente cirrótico (caso nº23), siendo éste negativo en los restantes 13 casos testados.



**II. EVOLUCION POST-TxH: A. RESULTADOS GENERALES.**

El HBsAg sérico permaneció positivo postrasplante en 13 (50%) de los 26 pacientes trasplantados y el estudio inmunohistoquímico demostró en todos ellos la infección recurrente en el injerto. Los restantes 13 pacientes negativizaron todos los marcadores de infección viral activa en el curso postrasplante y en ningún caso se demostró infección del injerto por el VHB.

El tiempo medio de seguimiento postrasplante ha sido de  $532 \pm 296$  días (68-1215), y tanto en el grupo de pacientes reinfectados por el VHB como en el de los no reinfectados ha superado el año de seguimiento, habiendo sido incluso más prolongado en los pacientes sin recurrencia de la infección viral ( $620 \pm 257$  días) que en los que desarrollaron la infección del injerto ( $443 \pm 306$  días).

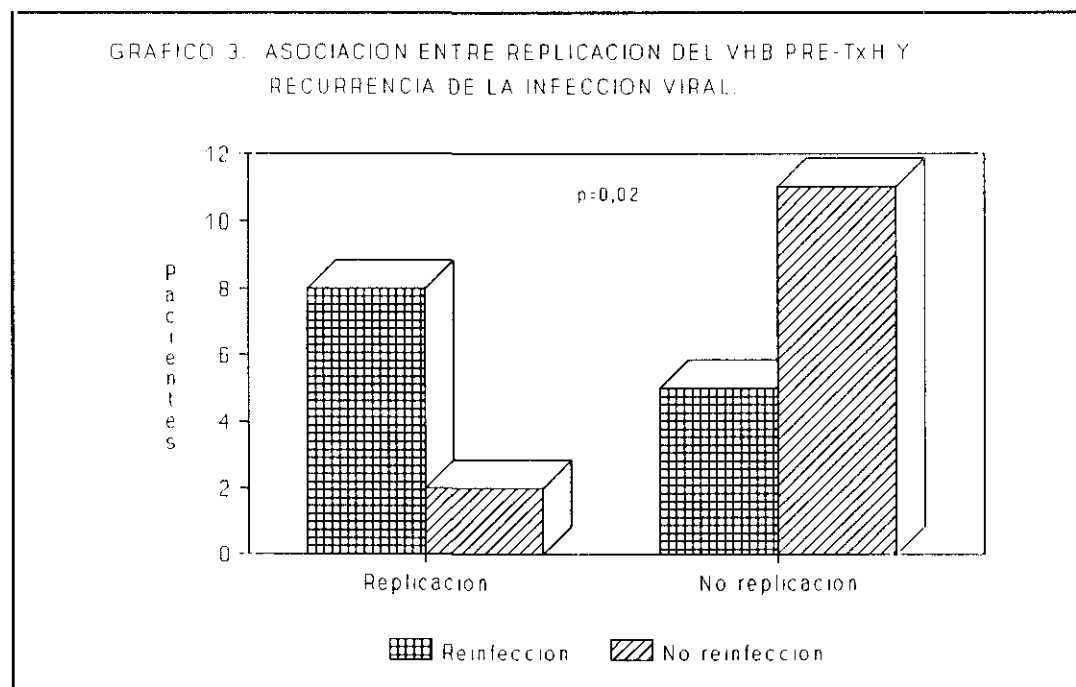
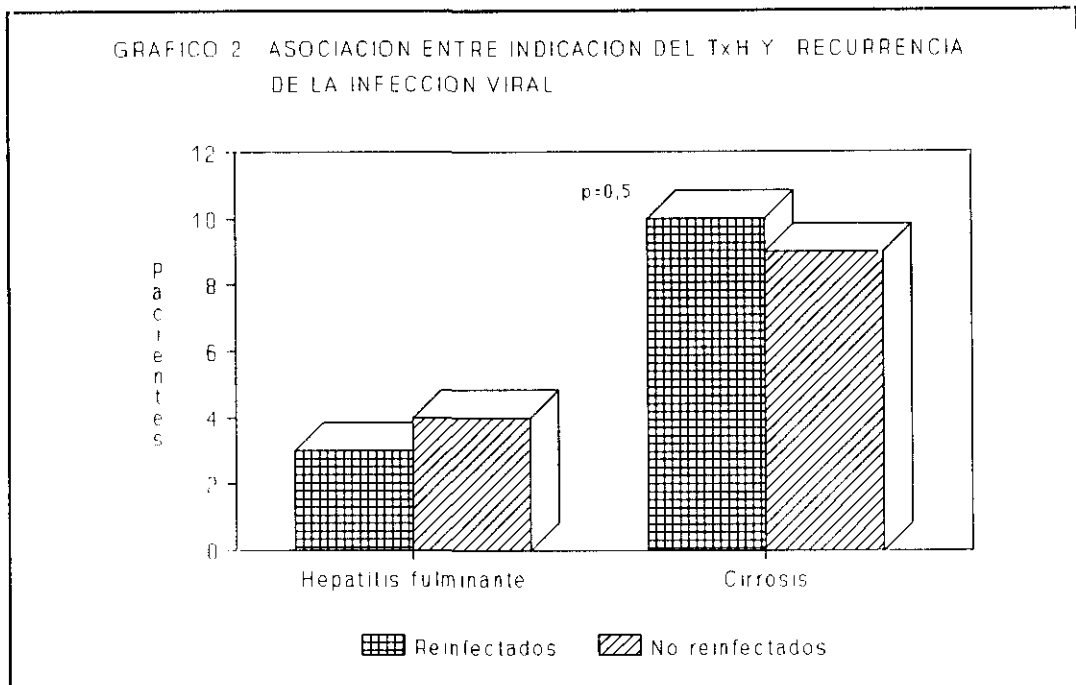
De las asociaciones establecidas entre recurrencia de la infección por el VHB y 1º) indicación del trasplante, 2º) replicación viral pre-TxH y 3º) tipo de inmunoprofilaxis utilizada, se han obtenido los siguientes resultados:

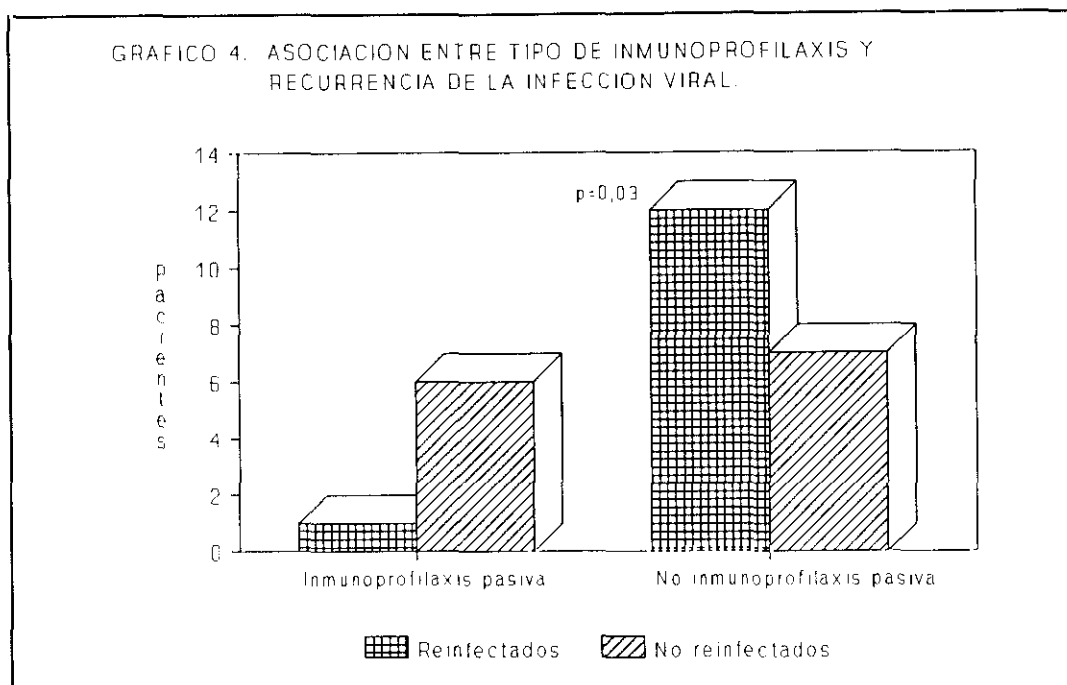
**-Asociación entre indicación del TxH y recurrencia de la infección viral:** La infección del injerto por el VHB no se ha asociado de forma significativa con un tipo determinado de hepatopatía terminal indicativa del TxH. Se observó recurrencia de la infección en 3 de los 7 pacientes trasplantados por hepatitis fulminante así como en 10 de los 19 trasplantados por cirrosis ( $p=0,5$ ). (Datos expresados en

gráfico 2).

**-Asociación entre replicación del VHB pre-TxH y recurrencia de la infección viral:** Se ha demostrado que existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de replicación del VHB pre-TxH y la recurrencia de la infección viral. La infección del injerto ocurrió en 8 de los 10 pacientes con algún marcador de replicación viral positivo pre-TxH y sólo en 5 de los 16 que fueron trasplantados con los marcadores de replicación negativos ( $p=0,02$ ) (datos expresados en el gráfico 3). En relación al estudio individual de los marcadores de replicación viral activa utilizados, el HBCAg ha sido el más sensible para detectar la presencia de un estado replicativo del VHB pre-TxH (estaba presente en 8 de los 10 casos replicantes mientras solo 3 pacientes mostraron HBeAg sérico positivo y ninguno seropositividad para el ADN viral). Los 6 pacientes trasplantados por cirrosis posthepatitis B tenían HBCAg tisular como único marcador positivo de replicación viral antes del TxH y todos ellos infectaron el injerto.

**-Asociación entre tipo de inmunoprofilaxis utilizada y recurrencia de la infección viral:** La recurrencia de la infección por el VHB fué significativamente ( $p=0,03$ ) menos frecuente en los pacientes tratados con inmunoprofilaxis pasiva prolongada (reinfectó 1 de 7) que en los que no recibieron este tratamiento, estando incluidos en este último grupo tanto los pacientes tratados con inmunoprofilaxis activa como los que no recibieron ningún tipo de tratamiento (reinfectaron 12 de 19) (datos expresados en gráfico 4).





Los 4 pacientes anti-HD positivos pre-TxH desarrollaron recurrencia de la infección por el VHD. Ningún paciente anti-HD negativo pretrasplante mostró infección del injerto por el VHD.

En el curso postrasplante se demostró infección por el VHC en 10 (45,5%) de los 22 pacientes de esta serie en los que el anti-HC pudo ser determinado. Uno de ellos (caso nº23) correspondía al paciente que era ya anti-VHC positivo antes del trasplante, el cual permaneció seropositivo para este marcador a lo largo de todo el seguimiento. En los otros 9 casos el anti-VHC fué negativo durante un período del seguimiento, detectándose la seroconversión a anti-VHC en la etapa más tardía del mismo (a los 607±330 días). Los restantes 11 pacientes fueron anti-VHC negativos durante todo el curso postrasplante.

### A.1. PACIENTES CON RECURRENCIA DE LA INFECCION POR EL VHB.

El diagnóstico de la recurrencia de la infección por el VHB vino determinada: a) en los 13 casos (100%), por la demostración inmunohistoquímica de la infección en el injerto, y b) en 11 pacientes (84,6%) por presentar además signos de replicación viral activa post-TxH.

En este grupo de pacientes con infección recurrente por el VHB están incluidos: a) tres de los 4 pacientes anti-HD positivos re infectados también por el VHD, y b) cuatro de los 10 pacientes que mostraron infección por el VHC en el curso postrasplante.

Los marcadores de infección del VHB, VHD y VHC post-TxH así como los DAPs al final del seguimiento vienen detallados en la tabla 3.

#### A.1.a. EVOLUCION MORFOLOGICA DE LOS INJERTOS HEPATICOS

El desarrollo de hepatopatía en el injerto se observó en 10 (76,9%) de los 13 pacientes re infectados, con un tiempo de seguimiento histológico (media  $\pm$  desviación estándar) de  $389 \pm 252$  días (intervalo: 17<sup>o</sup>-827<sup>o</sup> día). El primer DAP de hepatitis se realizó a los  $200 \pm 169$  días post-TxH (intervalo: 40<sup>o</sup>-671<sup>o</sup> día). Este primer DAP fué de hepatitis lobulillar en 5 injertos y de hepatitis crónica (portal) en los otros 5. El seguimiento de los 5 injertos con hepatitis lobulillar mostró: en un caso, la resolución espontánea del primer cuadro de hepatitis; en otro, el desarrollo de una necrosis hepática masiva; y en los 3 restantes el establecimiento de

una hepatitis crónica. Los 8 injertos con hepatitis crónica expresaron distintos tipos de lesión morfológica hepática. En 6 de ellos el cuadro histológico fué el de una hepatitis crónica activa, en otro el de una hepatitis subaguda (con puentes de necrosis) y en el restante el de una hepatitis colestásica fibrosante. El seguimiento biopsico posterior de estas hepatitis crónicas documentó una progresión hacia la cirrosis en 3 casos y la completa resolución de la previa lesión hepática en otro.

Los 3 injertos infectados por el VHB que no desarrollaron hepatitis en el curso postrasplante permanecieron en estado de portador no agresivo durante todo el período de seguimiento.

Así pues, el estudio histopatológico de los 13 injertos al final del seguimiento documentó 8 (61,5%) hepatopatías (una necrosis hepática masiva, 4 hepatitis crónicas y 3 cirrosis) y 5 injertos portadores del VHB sin hepatitis (2 de ellos con previa hepatitis morfológicamente resuelta).

El estudio estadístico de análisis actuarial ha demostrado que la probabilidad de que un injerto infectado por el VHB desarrolle hepatopatía durante los 12 primeros meses postrasplante es del 75%.

#### A.1.b. EVOLUCION VIROLOGICA DE LA REINFECCION POR EL VHB

El estudio serológico e inmunohistoquímico realizado a lo largo de todo el período de seguimiento ha permitido conocer la evolución de los marcadores de infección del VHB en los 13 pacientes reinfectados.

**TABLA 3. PACIENTES CON INFECCION RECURRENTE POR EL VHB: DAPs FINALES Y MARCADORES VIRALES POST-TxH.**

Caso	Serología VHB				Inmunohistoquímica			DAPs	Seguimiento (días)
	HBsAg	ADN	ARN-VHD	Anti-VHC	HBsAg	HBcAg	HDAg		
n° 1 <sup>a</sup>	-	+	+	nr	+	+	+	Portador VHB-VHD/Rechazo crónico	V 263 <sup>b</sup>
n° 2 <sup>a</sup>	-	+	+	nr	+	+	+	Portador VHB-VHD/Rechazo crónico	E 690
n° 4 <sup>a</sup>	-	-	-	+	+	+	+	Cirrosis	V 729 <sup>b</sup>
n° 6	-	-	nr	nr	+	+	-	Portador VHB/Isquemia	V 68 <sup>b</sup>
n° 7	+	+	nr	nr	+	+	-	Cirrosis	E 519
n° 8	-	-	nr	+	+	-	-	Hepatitis crónica activa	V 1157
n° 11	+	+	nr	+	+	+	-	Cirrosis	V 750
n° 12	-	nr	nr	nr	-	+	-	Portador VHB/Colestasia funcional	E 90
n° 15	+	+	nr	-	+	+	-	Portador VHB/Cambios mínimos	V 584
n° 16	+	+	nr	-	+	+	-	Hepatitis colestásica fibrosante	E 195
n° 17	-	+	nr	+	+	+	-	Hepatitis crónica activa	V 285
n° 18	-	+	nr	-	+	+	-	Hepatitis subaguda	E 216
n° 25	-	-	nr	-	+	-	-	Necrosis hepática masiva	V 270 <sup>b</sup>
<b>Total*:</b>	<b>4</b>	<b>8</b>			<b>12</b>	<b>11</b>			

HBsAg sérico positivo en los 13 pacientes.

a=anti-HD positivo pre y post-TxH; b=retrasplante en este momento; V=vivo; E=exitus.

- Estudio serológico.

En este grupo de pacientes el tiempo de seguimiento serológico (media  $\pm$  desviación standar) fué de  $443 \pm 306$  días (intervalo: 68-1157).

El curso evolutivo postrasplante de los distintos marcadores serológicos de infección por el VHB ha sido el siguiente:

. **HBsAg:** Los 13 pacientes desarrollaron positividad para el HBsAg sérico. La seropositividad se detectó ya desde el primer mes post-TxH en todos los casos excepto en un paciente (caso nº25) que la mostró tardíamente, el día 260º postrasplante. Una vez detectado, el HBsAg permaneció positivo hasta el final del seguimiento en todos los casos salvo en el nº4 (tratado con Foscarnet) que lo clarificó al 200º día del TxH, permaneciendo desde entonces HBsAg seronegativo.

. **Anti-HBs:** Los 13 pacientes mostraron negatividad para el anti-HBs post-TxH. La seronegatividad se detectó también desde el primer mes post-TxH en todos ellos excepto en el mismo paciente que positivizó tardíamente el HBsAg sérico (caso nº25) que coincidiendo con ello negativizó el marcador de inmunidad. El anti-HBs se mantuvo negativo desde su detección hasta el final del seguimiento en todos los casos.

. **Anti-HBc:** Este marcador fué permanentemente positivo post-TxH en los 13 pacientes.

. **Anti-HBc IgM:** Desde el inicio al final del seguimiento el anti-HBc IgM se mantuvo negativo en los 10 pacientes que ya eran anti-HBc IgM negativos en el momento del trasplante (casos trasplantados por cirrosis) y positivo en 2 de los 3

pacientes que eran positivos pre-TxH para este marcador (casos trasplantados por hepatitis fulminante). El otro paciente trasplantado por hepatitis fulminante y anti-HBc IgM positivo pre-TxH (caso nº25) fué el único que positivizó el marcador post-TxH coincidiendo con el establecimiento de la infección del injerto por el VHB y reaparición sérica de HBsAg.

**. Marcadores serológicos de replicación viral activa (HBeAg y DNA-VHB séricos):** En todos los pacientes se demostró, después del TxH, al menos un período de negatividad serológica para ambos marcadores de replicación viral. Durante este período, solamente el paciente de menor seguimiento serológico (68 días) fué también negativo para el anti-HBe, siendo todos los demás anti-HBe positivos. A los  $157 \pm 108$  días del trasplante hepático, 8 pacientes mostraron signos serológicos de replicación viral activa, determinada en los 8 por seropositividad del DNA viral y en 4 de ellos por mostrar además el HBeAg sérico positivo (en los otros 4 se mantuvo el estado anti-HBe). Una vez detectados, tanto uno como otro permanecieron positivos a lo largo del restante curso postrasplante en todos los casos con evolución espontánea de la reinfección viral (ausencia de tratamiento antiviral).

La evolución de los marcadores serológicos de replicación del VHB en los pacientes sometidos a tratamiento antiviral durante el curso postrasplante viene detallada más adelante.

- Estudio inmunohistoquímico.

Los 13 injertos infectados expresaron uno o ambos antígenos del VHB. Se detectó HBsAg y HBeAg en 10 casos, HBsAg aislado en 2 casos y HBeAg aislado en uno. La infección del injerto (detección inicial de HBsAg y/o HBeAg) se observó a los 179±199 días del seguimiento postrasplante (intervalo: 17º-827º día).

El curso evolutivo de los antígenos virales en los 13 injertos infectados ha sido el siguiente:

. **HBeAg:** El HBeAg estaba presente en 11 injertos. Este fué el antígeno del VHB que apareció más precozmente, habiendo sido detectado ya durante el primer mes postrasplante. Su demostración en el injerto siempre precedió o coincidió con la del HBsAg y en ningún caso se detectó posteriormente a éste. Respecto a su propio curso evolutivo, el porcentaje de hepatocitos HBeAg-positivos varió en función de la etapa del seguimiento. En las biopsias más tempranas (realizadas durante los 3 primeros meses post-TxH) el HBeAg fué siempre escaso, siendo el porcentaje de núcleos hepatocitarios inmunotendidos inferior al 5%. El estudio inmunohistoquímico posterior en los injertos con evolución espontánea de la reinfección viral mostró un progresivo incremento del número de núcleos positivos, incremento que no dependió de la presencia o ausencia de hepatopatía en el injerto. El porcentaje de hepatocitos HBeAg-positivos que expresaron todos ellos al final del seguimiento fué superior al 65%, siendo el gradiente de inmunotinción moderado (inferior al 70%) o, más frecuentemente, elevado (superior al 70%) (figura 2).

. **HBsAg:** El HBsAg se detectó en 12 injertos. Excepto uno que mostró expresión tisular temprana (día 68 post-TxH), en los restantes injertos la primera detección del antígeno se observó pasados ya los 3 primeros meses del trasplante hepático. El curso evolutivo que se describe a continuación ha sido común a todos los casos. En el momento de la detección inicial de HBsAg el porcentaje de hepatocitos positivos fué variable. Asimismo, en esta primera demostración antigénica, el patrón básico de tinción era de tipo citoplasmático homogéneo débil. En las biopsias posteriores de los pacientes con evolución espontánea de la reinfección viral se observó un progresivo incremento del número de hepatocitos positivos, incremento que adoptó un patrón de tinción distinto en función del desarrollo o no de hepatopatía en el injerto. Al final del seguimiento el gradiente de inmunotinción abarcó al menos el 65% de los hepatocitos en todos los casos excepto en el que desarrolló una necrosis hepática masiva. En éste, la hepatopatía terminal (establecida pocos días después de la detección tisular inicial de HBsAg) cursó con pérdida de dicha expresión antigénica.

La evolución del HBsAg y del HBCAg en los injertos de los pacientes que fueron sometidos a tratamiento antiviral en el curso postrasplante viene detallada más adelante.

- **Estudio global.**

El estudio global (serológico e inmunohistoquímico) de los marcadores de infección del VHB ha demostrado que:

1º) La detección del HBsAg sérico precedió a la infección del injerto en todos los casos excepto en el que positivizó tardíamente el HBsAg sérico (caso nº23) el cual mostró simultáneamente la positividad antigénica en suero y en tejido.

2º) Once pacientes (84,6%) desarrollaron signos de replicación viral activa en el curso postrasplante. El HBcAg tisular fué positivo en todos ellos y 8 casos expresaron además signos serológicos de replicación viral. En ausencia de tratamiento antiviral, el ADN sérico fué positivo siempre y solamente cuando existía en el injerto hepático un gradiente de positividad para HBcAg nuclear superior al 5% de los hepatocitos.

#### A.1.c. LA REINFECCION POR EL VHD EN PACIENTES CON INFECCION RECURRENTE POR EL VHB.

Tres de los 4 pacientes trasplantados por cirrosis post-hepatitis B-Delta (casos nº1, nº2 y nº4) desarrollaron, en el curso postrasplante, recurrencia de la infección por ambos virus hepatotropos (VHB y VHD). La secuencia evolutiva con respecto a la doble reinfección viral ha sido la misma en los tres casos y ha presentado dos períodos infectivos:

##### **. Primer período: Reinfección aislada por el VHD**

En esta etapa inicial de al menos 3 meses de duración los tres pacientes desarrollaron exclusivamente reinfección por el VHD, no evidenciándose en ningún momento signos de infección recurrente por el VHB. En todos los casos este

hecho vino demostrado por: a) permanente negatividad de los marcadores serológicos de actividad replicativa del VHB, b) ausencia de expresión tisular de HBsAg y HBeAg y c) presencia constante de HDAg en el injerto. El otro común denominador durante todo este período infectivo fué la ausencia de hepatitis en el injerto.

Respecto a la evolución de los marcadores de infección del VHD, el HDAg se demostró muy precozmente en los tres injertos (a los  $17 \pm 7$  días post-TxH) y en esta primera detección antigénica tisular el porcentaje de hepatocitos HDAg positivos fué siempre ocasional (inferior al 5%) y de localización exclusivamente nuclear (figura 3). En biopsias posteriores de este período, dicho porcentaje no se modificó (2 casos) o sólo se incrementó levemente (1 caso, cuyo índice final de tinción hepatocitaria fué inferior al 30%). Durante toda esta etapa no se detectó ARN sérico del VHD en los dos pacientes que mantuvieron un gradiente ocasional de HDAg tisular. En el otro caso se detectó seropositividad para el ARN viral coincidiendo con el incremento de HDAg en el injerto. Se demostró, por tanto, una mayor sensibilidad del método inmunohistoquímico frente al método de hibridación molecular del ARN viral sérico para detectar replicación del VHD.

• **Segundo período: Infección recurrente por el VHB**

Después de la etapa inicial de reinfección aislada por el VHD los 3 pacientes entraron en el segundo período infectivo: el de la reinfección por el VHB. Dicha sobreinfección viral se detectó a los  $125 \pm 10$  días post-TxH y en los 3 casos

vino expresada por la aparición de HBcAg tisular (en este momento sólo 2 de ellos mostraron HBsAg en el tejido hepático). La expresión inmunohistoquímica de los antígenos del VHB en esta primera demostración fué la común a todos los casos de recurrencia de la infección por el VHB en su etapa inicial.

En este segundo período infectivo y coincidiendo con la aparición de HBcAg en el tejido hepático se observaron los 2 siguientes cambios: a) un marcado incremento en la expresión tisular de HDAg en los 3 injertos (de localización nuclear con ocasional positividad citoplasmática), alcanzando los tres un porcentaje de hepatocitos HDAg-positivos superior al 70%, y b) la presencia de signos histológicos de hepatitis en 2 de ellos (casos nº2 y 4, cuya lesión morfológica fué una hepatitis aguda lobulillar y una hepatitis crónica activa respectivamente) (figura 4).

Los marcadores tisulares de replicación activa del VHB y VHD (HBcAg y HDAg) se acompañaron de los respectivos signos serológicos de replicación viral en 2 pacientes (nº1 y 2). Ambos casos mostraron el ADN-VHB y ARN-VHD positivos en suero.

Una vez establecida la doble infección en el injerto los 3 pacientes fueron sometidos a tratamiento antiviral, siendo ellos los únicos de esta serie que lo recibieron en el curso postrasplante. Se administró alfa-interferón a los 2 casos seropositivos para el ADN-VHB y ARN-VHD, y foscarnet al paciente con ambos marcadores serológicos de replicación negativos.

La evolución virológica y morfológica que mostraron con el tratamiento fué:

- **Pacientes tratados con alfa-interferón (nº1 y 2):** Los dos pacientes: a) negativizaron el ADN y ARN séricos antes de finalizar el período de seguimiento, permaneciendo desde entonces seronegativos para los dos marcadores; b) mantuvieron positivos los antígenos virales en tejido pero, a diferencia de los pacientes con una evolución espontánea, no mostraron el progresivo incremento antigénico tisular; por el contrario, el gradiente inicial se mantuvo estable respecto a los antígenos del VHB y disminuyó hasta un grado de tinción ocasional en el HDAG; c) el estado histológico final de sus injertos fué un rechazo crónico, tanto en el que nunca mostró signos de hepatitis (nº1) como en el que había desarrollado una hepatitis aguda lobulillar pretratamiento, cuadro que después de progresar a hepatitis crónica activa se acabó finalmente resolviendo (nº2).

- **Paciente tratado con foscarnet (nº4):** Este paciente: a) permaneció seronegativo para el ADN del VHB y el ARN del VHD hasta el final del seguimiento y el día 200 post-TxH clarificó además el HBsAg sérico, marcador que mantuvo desde entonces negativo; b) negativizó los 3 antígenos virales en tejido el 455º día de seguimiento y los mantuvo negativos el restante curso postrasplante; c) el cuadro de hepatitis crónica activa que desarrolló antes de iniciar el tratamiento evolucionó a la cirrosis.

A.1.d. LA INFECCION POR EL VHC EN PACIENTES CON INFECCION RECURRENTE POR EL VHB.

Cuatro de los pacientes que mostraron infección por el VHC post-TxH al final del seguimiento eran casos con infección recurrente por el VHB (aislada en 3 pacientes y asociada a reinfección por el VHD en uno). En todos ellos el estudio histológico documentó desarrollo de hepatopatía en el injerto (hepatitis crónica en dos casos y cirrosis en los otros dos).

Se demostró un período postrasplante en el que los 4 pacientes fueron anti-VHC negativos. La positividad para el anti-HC se detectó pasados un mínimo de 9 meses de seguimiento, cuando todos ellos habían expresado ya la reinfección por el VHB y la hepatopatía en el injerto.

A.2. PACIENTES SIN RECURRENCIA DE LA INFECCION POR EL VHB.

Los 13 pacientes que no desarrollaron infección recurrente por el VHB fueron seguidos serológicamente durante (media±desviación estándar) 620±257 días post-TxH (intervalo: 155º-1215º día), e histológicamente durante 454±174 días (intervalo: 155º-834º día).

Los marcadores de infección del VHB, VHD y VHC post-TxH y los DAPs finales de estos pacientes vienen detallados en la tabla 4.

El estudio histológico de los 13 injertos no infectados por el VHB documentó desarrollo de hepatitis en 4 pacientes con infección por el VHC. El primer DAP de hepatitis se

realizó a los 321±210 días post-TxH (intervalo: 105º-624º día), y fué de hepatitis aguda lobulillar en un injerto y de hepatitis crónica en los otros tres. El injerto con hepatitis aguda lobulillar desarrolló también, en el seguimiento posterior, una hepatitis crónica. Las hepatitis crónicas instauradas correspondían a 1 hepatitis crónica persistente que se mantuvo histológicamente estable y a 3 hepatitis crónicas activas, dos de las cuales evolucionaron a la cirrosis.

Los restantes 9 injertos no mostraron signos morfológicos de hepatitis en ningún momento del curso postrasplante. El cuadro morfológico al final del seguimiento fué de cambios mínimos en 7 casos, patología biliar en uno, y rechazo crónico en otro injerto.

Los 13 pacientes negativizaron post-TxH todos los **marcadores serológicos de infección activa del VHB: HBsAg, HBeAg, DNA viral y anti-HBcIgM**. La evolución serológica de cada uno de ellos fué la siguiente: El **HBsAg** fué negativo desde el primer mes post-TxH en todos los casos excepto en el paciente anti-HD positivo (nº3) que lo clarificó a los 2,5 años de seguimiento; el **HBeAg** y el **DNA viral** fueron permanentemente negativos en todos los pacientes; el **anti-HBcIgM** fué también negativo desde el primer mes post-TxH en todos los pacientes salvo en un caso anti-HBcIgM positivo pre-TxH (nº13) el cual mantuvo positivo el marcador durante todo el primer año de seguimiento, clarificándolo posteriormente.

Los otros 2 marcadores serológicos del VHB mostraron el siguiente curso evolutivo: El **anti-HBc** permaneció positivo

durante todo el seguimiento en los 13 pacientes; el **anti-HBs** solamente lo expresaron espontáneamente 3 pacientes, uno de ellos desde el primer mes post-TxH (caso nº9) y los otros dos pasado el primer año de seguimiento (casos nº3 y nº13). En los restantes casos la positividad para el marcador de inmunidad sólo se objetivó si éste había sido administrado previamente (aplicación de inmunoprofilaxis pasiva).

Los **marcadores tisulares de infección del VHB** (HBsAg y HBcAg) fueron permanentemente negativos en los 13 injertos hepáticos.

El **paciente anti-HD positivo pre-TxH** que no desarrolló reinfección por el VHB en el curso postrasplante (caso nº3) sí mostró recurrencia de la infección por el VHD. Igual que los otros 3 pacientes anti-HD positivos, en este caso se observó también una fase inicial de al menos 3 meses de duración de aislada infección del injerto por el VHD. Durante todo este período el gradiente de hepatocitos HDAg-positivos fué solamente ocasional (inferior al 5%) y el ARN sérico negativo. En el seguimiento posterior el paciente negativizó la expresión tisular de HDAg y no se detectó en ningún momento positividad para el ARN viral.

Los 6 pacientes no reinfectados por el VHB que mostraron **infección por el VHC post-TxH** correspondieron: a) uno de ellos al que ya era positivo pre-TxH y que permaneció anti-VHC positivo durante todo el seguimiento postrasplante, y b) los 5 restantes a los que positivizaron el marcador de infec-

ción viral durante el curso post-TxH, cuya detección se objetivó en los 5 después del primer año de seguimiento.

El desarrollo de hepatitis en 4 de estos casos se objetivó en el paciente previamente seropositivo y en 3 de los que seroconvirtieron post-TxH, los cuales expresaron siempre antes la hepatopatía en el injerto que la seroconversión a anti-VHC.

**TABLA 4. PACIENTES SIN INFECCION RECURRENTE POR EL VHB: DAPs FINALES Y MARCADORES VIRALES POST-TxH.**

Caso	Serología				Inmunohistoquímica			DAPs	Seguimiento (días)
	HBeAg	Anti-HBs	Anti-HD	Anti-VHC	HBeAg	HBcAg	HDAg		
nº 3	-	+	+	-	-	-	+	Cambios mínimos	V 1215
nº 5	-	-	-	-	-	-	-	Rechazo crónico	V 390
nº 9	-	+	-	-	-	-	-	Cambios mínimos	E 665
nº 10	-	-	-	+	-	-	-	Cambios mínimos	V 825
nº 13	-	+	-	+	-	-	-	Cirrosis	V 404 <sup>b</sup>
nº 14	-	-	-	+	-	-	-	Hepatitis crónica persistente	V 855
nº 19	-	+ <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	Patología biliar	E 150
nº 20	-	+ <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	Cambios mínimos	V 492
nº 21	-	+ <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	Cambios mínimos	V 500
nº 22	-	+ <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	Cambios mínimos	V 510
nº 23	-	+ <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	Hepatitis crónica activa	V 670
nº 24	-	+ <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	Cambios mínimos	V 600
nº 26	-	-	-	+	-	-	-	Cirrosis	V 834 <sup>b</sup>

HBeAg y DNA-VHB negativos en los 13 pacientes.

a=tratamiento con inmunoprofilaxis pasiva prolongada; b=retroplanta en este momento.

**ABRIR EVOLUCIÓN POST - TxH: B**





**ABRIR EVOLUCIÓN POST - TxH: A**

## II. EVOLUCION POST-TxH: B. DISTRIBUCION DE LOS ESPECIMENES SEGUN DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO (DAP).

Los 109 especímenes que permitieron evaluar los acontecimientos morfológicos descritos se han reagrupado según sus DAPs con la finalidad de describir la evolución histopatológica y establecer una correlación clinicopatológica.

### B.1. DAP: ESTADO DE PORTADOR DEL VHB SIN HEPATITIS (12 especímenes, 6 pacientes) ( Datos en tabla 5).

Estos especímenes hepáticos portadores del VHB sin hepatitis corresponden a los de los 5 pacientes que lo fueron durante todo el seguimiento o en su último período, y al de otro caso (nº17) que sólo lo fué al principio del mismo.

En estos tejidos fué más frecuentemente positivo el HBcAg (100%) que el HBsAg (75%). El HBcAg siempre mostró una tinción exclusivamente de tipo nuclear. El HBsAg, en las biopsias tempranas, fué escaso y mostró el característico patrón citoplasmático homogéneo anteriormente descrito en el apartado general. El incremento antigénico progresivo objetivado en el injerto de largo seguimiento (caso 15) fué a expensas de un patrón de tinción de tipo membranoso (figura 5). En estos tejidos hepáticos se realizaron otros DAPs en relación con complicaciones propias del curso postrasplante. Las alteraciones de los tests de función hepática se atribuyeron a estas complicaciones.

TABLA 5. DAP: ESTADO DE PORTADOR DEL VHB SIN HEPATITIS

Caso	T*	DAPs	Bioquímica hepática			Inmunohistoquímica			Serología							
			ALT	FA	BIL	HBsAg	HBcAg nuc/cit	HDAg	VHB			VHD		VHC		
									sAg	as	eAg	ae	ADN	sHD	ARN	sHC
n° 1	114	CM	740	594	10,9	+	+/-	++++	+	-	-	+	-	+	+	nr
	184#	RC	200	900	20	+	+/-	++	+	-	-	+	+	+	+	nr
	263#	RC	221	935	25	-	+/-	+	+	-	-	+	-	+	-	nr
n° 2	549#	RC	326	842	43	++	++/-	++	+	-	-	+	-	+	-	nr
	601#	RC	546	1835	42	++	++/-	++	+	-	-	+	-	+	-	nr
	690#	RC	273	1080	52	++	++/-	+	+	-	-	+	-	+	-	nr
n° 6	68	I	200	300	4	+	+/-	-	+	-	-	-	-	-	nr	nr
n° 12	17	CF	193	309	4,9	-	+/-	-	+	-	-	+	-	-	nr	nr
n° 15	176	CM	230	587	1,8	++	++/-	-	+	-	+	-	+	-	nr	-
	288	CM	79	90	2	+++	+++/-	-	+	-	+	-	+	-	nr	-
	584	CM	225	152	1,9	+++	++++/-	-	+	-	+	-	+	-	nr	-
n° 17	27	CM	238	58	1	-	+/-	-	+	-	-	+	-	-	nr	**

CM=cambios mínimos; RC=rechazo crónico; I=iaqueamia; CF=colestasia funcional; #=en tto con alfa interferon; T\*=días post-TxH; ALT=alanina transferasa (normal <40 U/L); FA=fosfatasa alcalina (normal <110 U/L); BIL=bilirrubina (normal <1 mg/100ml); sAg=HBsAg; as=anti-HBs; eAg=HBeAg; ae=anti-HBe; sHD=anti-HD; sHC=anti-VHC; nr=no realizado; \*\*=positiviza más tarde; Gradiente de hepatocitos positivos: +=ocasional, ++=leve, +++=moderado, ++++=elevado.

B.2. DAP: HEPATITIS LOBULILLAR (7 especímenes, 6 pacientes)  
(datos detallados en la tabla 6).

El diagnóstico de hepatitis lobulillar se realizó el día 148±82 post-TxH (intervalo: 40º-260º día). Las alteraciones microscópicas más características fueron desorden trabecular debido a anisocitosis y anisocariosis de los hepatocitos y a frecuentes cuerpos acidófilos, y escaso infiltrado inflamatorio interhepatocitario (figura 6).

Las 6 hepatitis lobulillares desarrolladas en pacientes con infección recurrente del VHB cursaron con una variable expresión antigénica tisular. El estudio inmunohistoquímico mostró en tejido tanto HBcAg aislado (2 casos), como HBsAg aislado (1 caso), presencia de ambos antígenos virales (1 caso) o ausencia de los dos (2 casos). La negatividad antigénica en estas dos últimas hepatitis agudas se debió, en una de ellas a que el desarrollo de la misma precedió a la demostración de los antígenos virales en el injerto (caso nº6), y en la otra a que el cuadro instaurado fué una necrosis hepática masiva que cursó con pérdida de la previa antigenicidad tisular (caso nº25).

La hepatitis lobulillar del injerto no infectado por el VHB pertenecía a un paciente anti-VHC positivo en este momento, correspondiendo al único que lo fué permanentemente durante todo el seguimiento.

Los test de función hepática realizados durante estas tomas biópsicas mostraron preferente hepatocitolisis y moderada colestasis.

**TABLA 6. DAP: HEPATITIS LOBULILLAR**

Caso	Tª	DAPs	Bioquímica hepática			Inmunohistoquímica			Serología							
			ALT	FA	BIL	HBsAg	HBcAg nuc/cit	HDAg	VHB				VHD		VHC	
									eAg	ee	eAg	ee	ADN	eHD	ARN	eHC
nº 2	140	HL	2325	177	10	-	+/-	++++	+	-	-	+	-	+	-	nr
nº 6	40	HL	289	309	4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	nr	nr
nº 7	70	HL	170	61	1,4	-	+/-	-	+	-	-	+	-	-	nr	nr
nº 18	150	HL	745	147	1,1	++	++/-	-	+	-	-	+	+	-	nr	-
nº 23	105	HL	133	159	2,6	-	-/-	-	-	+	-	+	-	-	nr	+
nº 25	260	HL	542	176	6,4	+	-/-	-	+	-	-	+	-	-	nr	-
	270	NHM	1300	320	25,3	-	-/-	-	+	-	-	+	-	-	nr	-
media:	148		786	193	7,3											
SD:	82		730	85	7,9											

HL=hepatitis lobulillar; NHM=necrosis hepática masiva. Otras abreviaturas referidas en la Tabla 5.

B.3. DAP: HEPATITIS CRONICA (22 especímenes, 12 pacientes)  
(datos detallados en la tabla 7).

El DAP más inicial de hepatitis crónica se hizo a los  $310 \pm 192$  días pos-TxH (intervalo:  $102^{\circ}$ - $671^{\circ}$  día).

Los especímenes con hepatitis crónica activa mostraron necrosis erosiva periportal con relevante infiltrado inflamatorio plasmocelular en la perifería de los espacios porta (figura 7A). Frecuentemente se observó además un componente de necrosis multifocal a nivel del lobulillo con escaso infiltrado inflamatorio interhepatocitario. El estudio histológico en biopsias sucesivas mostró una progresiva ampliación fibrosa porto-portal que evolucionó hasta la formación de septos fibrosos porto-portales (figura 7B).

Se observaron variaciones de este cuadro morfológico característico de hepatitis crónica activa. En un injerto la necrosis erosiva era escasa y se mantuvo estable 4 meses por lo que se consideró una hepatitis crónica persistente. En otro injerto el cuadro histológico fué de hepatitis crónica activa con necrosis en puentes (hepatitis subaguda) (figura 8). Finalmente, en otro el progresivo cuadro desestructurante fué el de una hepatitis colestásica fibrosante (figura 9).

Entre los 8 injertos infectados por el VHB, 7 mostraron HBSAg y HBcAg y el otro (caso n°8) que expresó solamente HBSAg. La tinción del HBcAg fué constantemente nuclear y citoplasmática y en todos los tejidos hepáticos sin efecto antiviral se observó un gradiente moderado o extenso de hepatocitos inmunopositivos (figura 10).

TABLA 7. DAP: HEPATITIS CRONICA

Caso	T*	DAPs	Bioquímica hepática			Inmunohistoquímica			Serología							
			ALT	FA	BIL	HBsAg	HBeAg nuc/cit	HDag	VHB			VHD		VHC		
									sAg	as	eAg	as	ADN	sHD	ARN	sHC
n° 2	475#	HCA	1011	322	9,5	++	++/+	+++	+	-	-	+	+	+	+	nr
	489#	HCA	953	327	9,8	++	++/+	+++	+	-	-	+	-	+	-	nr
n° 4	123	HCA	1877	191	30	+	++/+	++++	+	-	-	+	-	+	-	-*
n° 7	102	HCA	48	38	1	++	++/++	-	+	-	+	+	+	-	nr	nr
	169	HCA	243	43	1,1	+++	++++/++++	-	+	-	+	-	+	-	nr	nr
n° 8	671	HCA	60	86	1,2	-	-	-	+	-	-	+	-	-	nr	-
	827	HCA	62	90	1,1	+++	-	-	+	-	-	-	-	-	nr	-*
n° 11	236	HCA	276	400	1,5	+++	+++/**	-	+	-	+	-	+	-	nr	-*
n° 13	147	HCA	126	77	1,6	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	nr	-
	287	HCA	140	90	2	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	nr	-
	323	HCA	273	136	1,6	-	-/-	-	-	+	-	-	-	-	nr	-*
n° 14	410	HCP	31	126	1,5	-	-/-	-	-	-	-	+	-	-	nr	-
	661	HCP	36	120	1	-	-/-	-	-	-	-	+	-	-	nr	-*
n° 16	127	HCF	336	296	6,5	+++	+++/**	-	+	-	+	-	+	-	nr	-
	172	HCF	384	304	13	+++	++++/++++	-	+	-	+	-	+	-	nr	-
	196	HCF	106	171	24	++++	++++/++++	-	+	-	+	-	+	-	nr	-
n° 17	193	HCA	482	101	2,2	++++	++++/**	-	+	-	-	+	+	-	nr	-*
n° 18	204	HS	120	190	8	+++	+++/**	-	+	-	-	+	+	-	nr	-
	216	HS	110	186	9,4	++++	++++/**	-	+	-	-	+	+	-	nr	-
n° 23	410	HCA	70	80	3	-	-/-	-	-	+	-	+	-	-	nr	+
n° 26	624	HCA	520	418	1,3	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	nr	-
	643	HCA	656	334	32	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	nr	-*
media:	310		369	187	7,3											
SD:	192		431	116	9,3											

HCA-hepatitis crónica activa; HCP-hepatitis crónica persistente; HCF-hepatitis colestásica fibrosante; HS-hepatitis subaguda; #-en tratamiento con alfa-interferon; Otras abreviaturas referidas en la Tabla 5.

El HBsAg mostró un grado moderado o elevado de hepatocitos inmunoteñidos y el patrón de tinción fué constantemente de tipo citoplasmático homogéneo (figura 11).

Los 4 injertos no infectados por el VHB pertenecían a pacientes que mostraron infección por el VHC en el curso postrasplante, pero en este momento el anti-VHC fué positivo solamente en el caso que lo fué durante todo el seguimiento.

Coincidiendo con estas tomas biópsicas, los test de función hepática mostraron un cuadro de hepatocitolisis con una tasa media de ALT moderadamente aumentada. Sin embargo, en el 50% de los especímenes el estudio bioquímico paralelo mostró solamente discreta elevación enzimática, con niveles de ALT inferiores a 3 veces el valor normal.

B.4. DAP: CIRROSIS (12 especímenes, 5 pacientes) (datos detallados en la tabla 8).

Los primeros especímenes que documentaron la cirrosis fueron obtenidos el día 475±201 post-TxH, si bien una de ellas se diagnosticó el día 180º.

Tres de las 5 cirrosis mostraron un patrón morfológico micronodular (figura 12). En 4 casos se estudiaron las piezas de resección del injerto y 2 de ellas asociaban ductopenia mayor del 50% y estenosis lumbinales de arterias hiliares por acúmulos de macrófagos espumosos subendoteliales (rechazo crónico).

**TABLA 8. DAP: CIRROSIS**

Caso	Tº	DAPs	Bioquímica hepática			Inmunohistoquímica			Serología							
			ALT	FA	BIL	HBsAg	HBcAg nuc/cit	HDAg	VHB			VHD		VHC		
									sAg	se	eAg	se	ADN	sHD	ARN	sHC
nº 4	180 #	CI	153	211	9,5	+	+/-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
	200 #	CI	146	214	8,9	-	-/-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
	455	CI	389	173	3,8	-	-/-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
	594	CI	372	283	4,1	-	-/-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
	729	CI	172	133	7	-	-/-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
nº 7	497	CI	180	105	7,5	++++	+++ / ++	-	+	-	+	-	+	-	nr	nr
	519	CI	138	112	14,3	++++	+++ / ++	-	+	-	+	-	+	-	nr	nr
nº 11	539	CI	132	117	0,5	++++	+++ / ++	-	+	-	+	-	+	-	nr	-*
nº 13	371	CI	119	956	46,5	-	-/-	-	-	+	-	-	-	-	nr	-
	404	CI/RC	125	850	40	-	-/-	-	-	+	-	-	-	-	nr	+
nº 26	791	CI	322	504	29	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	nr	+
	834	CI/RC	328	229	7	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	nr	+
media:			475													
DS:			201													
			215	324	14,8											
			100	280	14,5											

CI=cirrosis; RC=rechazo crónico; Otras abreviaturas referidas en la Tabla 5.

Los 3 injertos cirróticos infectados por el VHB expresaron ambos antígenos tisulares (HBsAg y HBCAg). El gradiente antigénico tisular fué elevado y mantenido excepto en el paciente antiHD positivo tratado con foscarnet (caso nº4). El HBsAg mostró el característico patrón citoplasmático difuso propio de los especímenes con hepatitis crónica existiendo además con frecuencia un componente membranoso y marginal asociado (figura 13). La tinción del HBCAg fué, igual que en los tejidos hepáticos con hepatitis crónica, de tipo nuclear y citoplasmático.

Las 2 cirrosis desarrolladas en injertos no infectados por el VHB pertenecían a pacientes anti-VHC positivos.

Los test de función hepática mostraron una bioquímica hepatocitolítica y muy colestásica.

**B.5. DAP: CAMBIOS MINIMOS** (8 especímenes, 8 pacientes)  
(datos detallados en la tabla 9).

Mínimas alteraciones microscópicas se observaron en los 8 especímenes de los 8 pacientes asintomáticos no reinfectados por el VHB ni por el VHD que autorizaron biopsias tardías protocolizadas (445±138 días postrasplante). En 7 casos éste fué el cuadro morfológico del injerto al final del seguimiento, mientras que en el restante paciente (caso nº26) constituyó solamente la etapa evolutiva previa al posterior desarrollo de hepatopatía en el injerto. Los test de función hepática paralelos al momento de la toma biopsica fueron casi normales.

**TABLA 9. DAP: CAMBIOS MINIMOS**

Caso	T*	DAPs	Bioquímica hepática			Inmunohistoquímica			Serología							
			ALT	FA	BIL	HBsAg	HBcAg	HDag	VHB			VHD		VHC		
									sAg	es	eAg	ee	ADN	sHD	ARN	sHC
n° 3	768	CM	21	51	0,5	-	-	-	+s	-	-	+	-	+	-	-
n° 9	463	CM	40	90	1,2	-	-	-	-	+	-	+	-	-	nr	-
n° 10	326	CM	36	179	1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	nr	-*
n° 20	492	CM	39	102	0,8	-	-	-	-	+	-	+	-	-	nr	+
n° 21	400	CM	21	100	1	-	-	-	-	+	-	+	-	-	nr	-
n° 22	363	CM	29	104	1,3	-	-	-	-	+	-	+	-	-	nr	-
n° 24	365	CM	21	75	1,7	-	-	-	-	+	-	+	-	-	nr	-
n° 26	433	CM	162	165	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nr	-*
media:	451		46	108	1											
SD:	130		44	40	0,3											

CM=cambios mínimos; s=negativiza espontáneamente 80 días después; Otras abreviaturas referidas en la Tabla 5.

B.6. DAPs: DISFUNCIONES HEPATICAS NO RELACIONADAS CON LA INFECCION DEL INJERTO POR VHB, VHD O VHC (datos detallados en la tabla 10).

Los hallazgos histopatológicos identificaron también variadas causas de disfunción del injerto en períodos previos a la hepatopatía atribuible al VHB, VHD y/o VHC. Los diagnósticos microscópicos realizados fueron los habituales en el curso de cualquier serie de pacientes trasplantados.

TABLA 10. DISFUNCIONES HEPATICAS NO RELACIONADAS CON LA INFECCION DEL INJERTO POR VHB, VHD O VHC.

DAP	Nº de pacientes	Nº de especímenes	Días post-TxH mids (intervalo)
Rechazo agudo	11	18	26±27 (7-96)
Patología biliar	4	8	56±57 (6-155)
Colestasis func.	4	7	50±28 (8-86)
Isquemia	2	2	21±4 (17-25)
Hepatitis CMV	2	2	41±1 (40-41)
Rechazo crónico	1	1	336
Esteatosis	1	1	5

## **DISCUSSION**

Los resultados han mostrado que algunos de los pacientes re infectados por el VHB durante el curso postrasplante han sufrido coinfección o superinfección por otros virus hepatotropos (VHD, VHC). Con el fin de comentar ordenadamente estos resultados y de poder valorar la interrelación que ha existido entre estas infecciones y el curso clinicopatológico, los comentarios se han distribuído en tres apartados:

- I. Recurrencia de la infección por el VHB.
- II. Recurrencia de la infección por el VHD.
- III. Infección por el VHC.

## I. RECURRENCIA DE LA INFECCION POR EL VHB

La indicación del trasplante hepático como terapéutica de las hepatopatías terminales HBsAg-seropositivas es cuestionada por el alto porcentaje de recurrencia de reinfección y de hepatitis en el injerto. En ésta y en otras series (17, 46, 53, 54, 72, 90, 98, 123, 142, 160, 161, 169, 230, 238) se ha observado recidiva en al menos la mitad de los pacientes. Sin embargo, los porcentajes de reinfección se reportan también más bajos (40, 124, 152, 157, 187, 207, 208). Esta variabilidad en la prevalencia de la recidiva puede estar condicionada por aquellos factores a los que se ha atribuido capacidad de influir en la reinfección viral: 1) el estado replicativo del VHB pre-TxH, cuyo conocimiento depende de los tests empleados para valorarlo, 2) el uso de inmunoprofilaxis y/o de otras terapéuticas antivirales y 3) el tipo de hepatopatía terminal indicativa del TxH.

### I.A. FACTORES DE RIESGO Y TERAPIAS PREVENTIVAS.

La existencia de **replicación del VHB pre-TxH** se ha referido que constituye un importante factor de riesgo de recidiva de la infección viral (121, 137, 152, 198). En el presente estudio este hecho ha sido también observado. En nuestros pacientes, la infección del injerto por el VHB se ha asociado significativamente con la presencia de un estado replicativo del VHB en el momento del trasplante. Pero aunque este resultado ha sido concordante con el de la mayoría de los estudios publicados que especifican esta asociación (11, 54, 152, 169,

207, 208, 238), nuestro estudio difiere en el número de marcadores virales utilizados para determinar la replicación del VHB pretrasplante hepático. En dichas series, los únicos marcadores de replicación que se han valorado para conocer el estado infectivo pre-TxH han sido los serológicos (HBeAg y/o DNA viral séricos), sin considerar la positividad o negatividad del HBcAg tisular en el hígado nativo. Sus resultados muestran que la recidiva de la infección viral acontece en la práctica totalidad de los pacientes HBeAg y/o ADN-VHB seropositivos pretrasplante, pero también en un relevante porcentaje (oscilante entre un 29 y un 75%) de casos trasplantados con estos marcadores negativos. En el presente trabajo, además de los marcadores serológicos, también se ha valorado el HBcAg en el hígado nativo para determinar la actividad replicativa del VHB pre-TxH. La incorporación de este marcador ha resultado ser de gran utilidad en el estudio de la replicación pretrasplante, y por consiguiente, muy útil también en la predicción de un mayor riesgo de recidiva. Seis de nuestros 10 pacientes replicantes eran casos con cirrosis cuyo único marcador positivo de replicación del VHB fué el HBcAg en el hígado nativo. A pesar de su estado anti-HBe y de la negatividad del ADN viral en suero pre-TxH, todos ellos infectaron el injerto. Estos resultados indicarían que la ausencia preoperatoria de HBeAg y del ADN del VHB en el suero no siempre significa replicación viral inactiva o ausente y por tanto bajo riesgo de recidiva, ya que puede existir en el hígado nativo actividad replicativa del VHB serologicamente silente. Por lo tanto,

creemos que es importante valorar el HBcAg tisular en el estudio preoperatorio de la replicación viral, especialmente en aquellos pacientes cirróticos HBsAg-seropositivos que son propuestos para trasplante por tener los marcadores serológicos de replicación viral negativos.

**La inmunoprofilaxis pasiva** administrada de forma prolongada ha sido, hasta el momento, la medida terapéutica que ha obtenido mejores resultados en la prevención de la reinfección viral. La mayoría de los estudios realizados (40, 70, 124, 152, 157, 187, 207, 208) han conseguido, con este tratamiento, reducir el porcentaje de recurrencias hasta cifras que oscilan entre el 18 y el 36%. En nuestro trabajo, la administración prolongada de inmunoprofilaxis pasiva ha cursado también con un significativo menor número de recidivas. Solamente el 14% de los pacientes que la recibieron infectaron el injerto, frente al 63% de recurrencias que mostraron los que no la recibieron. Sin embargo, se describe que la inmunoprofilaxis pasiva puede retrasar el inicio de la reinfección viral (29, 124, 152, 207, 208), hecho que implica que se cuestione parcialmente su éxito (11, 121, 198). En general, casi todas las recidivas tardías que se han descrito con este tratamiento han ocurrido durante los primeros 15 meses de seguimiento, pero se refieren también casos aislados más tardíos, a los 2 años del trasplante (152, 207, 208). En nuestra serie, el único paciente reinfectado entre los tratados con inmunoprofilaxis pasiva prolongada desarrolló la infección del injerto tardíamente, a los 10

meses de la cirugía. El tiempo medio de seguimiento en los restantes casos así tratados fué de 16 meses. Este período de seguimiento ha sido similar o superior al de la mayoría de los estudios realizados que utilizan este tipo de modalidad terapéutica para prevenir la reinfección viral (17, 39, 40, 70, 124, 147), siendo la posibilidad de una recurrencia pasados 16 meses del trasplante ya muy baja (152). Por lo tanto, el presente trabajo apoya que este tipo de medida preventiva consigue reducir el número de recidivas, si bien son necesarios más estudios con largo seguimiento para poder determinar realmente su eficacia a muy largo plazo.

La influencia que puede ejercer el **tipo de hepatopatía terminal** en la reinfección viral es un tema actualmente controvertido. El alto riesgo de recidiva en el grupo de pacientes cirróticos HBsAg-seropositivos es un dato ampliamente demostrado (11, 46, 53, 152, 160, 161, 169, 208, 238). La controversia radica en si el grupo de pacientes trasplantados por hepatitis fulminante B muestran, con respecto a los cirróticos, menor riesgo de infección recurrente postrasplante. Mientras varios autores describen este hecho (11, 109, 166, 176, 207, 208), otros refieren, por el contrario, similares porcentajes de recurrencias entre unos pacientes y otros (121, 169, 238). Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con estos últimos. La incidencia de infección del injerto por el VHB no fué significativamente menos frecuente en los pacientes agudos urgentes que en los trasplantados por cirrosis. El bajo o nulo porcentaje de

recidivas observado en algunas series de pacientes trasplantados por hepatitis fulminante se ha atribuido a la ausencia de actividad replicativa viral que éstos mostraban pretrasplante (207, 208). Tanto en este trabajo como en el de Todo y col (238), existió un similar porcentaje de recurrencias objetivado en los dos grupos y ello coincide con que también el porcentaje de casos con replicación viral pretrasplante era similar en ambos. Todo ello apoya que el mayor o menor riesgo de recidiva en los pacientes trasplantados por hepatitis fulminante podría estar básicamente condicionado por el estado infectivo del VHB (replicativo, no replicativo) que éstos presentan en el momento del trasplante. Sin embargo, la incompleta e irregular información que sobre este factor se detalla en la literatura que ha estudiado la reinfección postrasplante en la hepatitis fulminante B (64, 109, 166, 176, 231) junto a la todavía limitada experiencia que hasta hoy existe en este campo, impiden descartar que en las discordancias deban ser considerados otros factores (protocolización previa, etc.)

## I.B. EVOLUCION MORFOLOGICA DE LOS INJERTOS

### I.B.1. Posibilidades evolutivas

El estudio morfológico secuencial de los 13 injertos hepáticos con infección recurrente por el VHB documentó el establecimiento de 4 tipos básicos de posibilidades evolutivas: 3 injertos permanecieron durante todo el seguimiento en estado de "portador no agresivo" del VHB, dos mostraron un cuadro de hepatitis autolimitada, uno instauró una

necrosis hepática masiva (hepatitis fulminante), y los 7 restantes (54%) desarrollaron una hepatitis crónica progresiva que en 3 casos evolucionó a la cirrosis.

La recurrencia de la infección ha provocado, en éste y en la mayoría de los estudios publicados que especifican la evolución morfológica de los injertos hepáticos re infectados por el VHB (45, 54, 121, 161, 207, 208, 238) el desarrollo de hepatitis crónica en más de la mitad de los casos, proporción netamente superior que las restantes posibilidades evolutivas.

#### **I.B.2. Características de las hepatitis recurrentes**

Histologicamente, las hepatopatías observadas en el injerto hepático han sido las descritas en la infección por virus hepatotropos del hígado no trasplantado (6, 107, 108) pero con peculiaridades morfológicas y patocrónicas.

En las **hepatitis lobulillares** iniciales y en el componente lobulillar de las hepatitis crónicas, el infiltrado inflamatorio que acompañaba a la necrosis hepatocelular fué escaso. Este signo histológico, descrito inicialmente por Demetris y col. (53, 54) y referido posteriormente por otros autores (46, 153) se ha atribuído al estado de inmunosupresión del paciente (53, 54).

En un caso, la lesión hepática estuvo caracterizada por una intensa fibrosis, proliferación ductulillar y colestasis, descripción morfológica detallada ya por Corman y col. (42) y definida posteriormente por Davies y col. (46) como **hepatitis colestásica fibrosante**, entidad clinicopatológica

observada únicamente en el hígado trasplantado.

Casi todos los cuadros histológicos con criterios de hepatitis crónica y también una de las tres cirrosis establecidas se diagnosticaron antes del año postrasplante. Este peculiar curso acelerado de la hepatitis recurrente, detallado también en otros estudios (46, 54, 125, 152, 207, 238) podría estar influenciado por el tratamiento inmunosupresor (49, 164). Sin embargo, dentro del controvertido efecto que la inmunosupresión ejerce sobre la lesión hepática producida por el VHB (59) incluso los más desalentadores estudios realizados en pacientes inmunodeprimidos por trasplante renal (106, 163) describen un curso morfológico menos agresivo, detallando evolución a la cirrosis generalmente no antes de los 3 años de seguimiento. Por lo tanto, la extrema rapidez y agresividad de la hepatopatía en el injerto hepático no parece explicable solamente por el estado de inmunosupresión y sugiere la participación de otros mecanismos asociados.

El otro hallazgo llamativo fué el frecuente patrón micronodular que expresaron estas cirrosis postrasplante, en contraste con el clásico patrón macronodular que habitualmente produce la infección crónica por virus hepatotropos en el hígado no trasplantado (108, 212). Este cambio morfológico sugiere una escasa regeneración hepatocelular del nódulo cirrótico.

Entre todas estas hepatopatías, la hepatitis crónica activa que se diagnostica en un período temprano postrasplante plantea frecuentemente problemas de diagnóstico diferencial con el rechazo celular. Además de la necrosis erosiva

y la ausencia de endotelitis como signos altamente sugestivos de hepatitis crónica activa (53), el alto componente inflamatorio de células plasmáticas en el infiltrado inflamatorio portal, presente en la mayoría de los especímenes con hepatitis crónica activa, ha sido también otro signo morfológico de gran utilidad para distinguir ambos procesos clinicopatológicos en su presentación.

### I.B.3. Correlación clínico-patológica.

Los test de función hepática en las distintas formas anatomoclínicas de hepatitis han mostrado un perfil preferentemente hepatocitolítico con variable intensidad del componente colestásico, cuadro bioquímico de características cualitativas habituales de las hepatitis en la población normal pero a veces cuantitativamente muy distinto en las hepatitis crónicas postrasplante. En los pacientes no inmunosuprimidos el grado de hepatocitolisis es generalmente concordante con el de la actividad de la hepatopatía (71, 165, 210). Por el contrario, en el presente estudio esta concordancia frecuentemente no se ha objetivado. En el 50% de los especímenes con DAP de hepatitis crónica, el estudio analítico de la función hepática obtenido simultáneamente a la toma biopsica mostraba discreta elevación enzimática (niveles de transaminasas sólo 2 o 3 veces superior a lo normal) a pesar de la severidad histológica de la lesión hepática. Esta escasa alteración bioquímica discordante con la agresividad de los cambios morfológicos es un hecho frecuentemente descrito en hepatitis de pacientes inmunodeprimidos por tras-

plante renal (89, 163, 164). En el trasplante hepático, Müller y col. (152), unos de los pocos autores que estudian la correlación entre la hepatopatía recurrente en el injerto y el perfil bioquímico hepático, descubren también escasa elevación enzimática en sus hepatitis recurrentes postrasplante. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, los de Müller y col., y lo observado durante el curso clínico de hepatitis en el contexto de pacientes con trasplante renal demuestra que los enzimas hepáticos son un marcador poco predictivo del grado de actividad de la hepatopatía en el paciente inmunosuprimido yatrogenicamente.

#### I.C. EVOLUCION SEROLOGICA E INMUNOHISTOQUIMICA

En este estudio, la seropositividad para HBsAg precedió a la detección de la infección viral en el injerto en casi todos los pacientes. El HBsAg sérico fué positivo desde el primer mes de la cirugía y, durante un período variable de tiempo su positividad cursó en ausencia inmunohistoquímica de antígenos del VHB en el injerto. La persistencia en el suero del HBsAg postrasplante sin demostrable infección hepática concomitante representa probablemente la expresión serológica de síntesis extrahepática del VHB (121, 131, 246). Por lo tanto, la observación de este hecho precediendo a la demostración de los antígenos virales en el injerto, hallazgo observado en éste y en otros estudios (53, 54, 238, 248) es concordante con la hipótesis actualmente más aceptada (60, 69, 121, 152, 186, 207, 208, 260) que atribuye a la síntesis extrahepática del VHB (23, 48, 172, 258) causa principal del

establecimiento de la infección en el injerto hepático.

Una vez instaurada la infección viral en el injerto, todos los pacientes permanecieron HBsAg seropositivos y la mayoría de ellos desarrollaron además signos de replicación activa del VHB. Paradójicamente, el anti-HBcIgM sérico estuvo ausente en casi todos ellos. Este anticuerpo, marcador serológico positivo en pacientes inmunocompetentes con hepatitis B aguda y crónica (9, 92, 129, 217), es considerado un buen indicador tanto de la actividad replicativa del virus (9, 219) como del grado de lesión morfológica hepática (9, 31, 218). En el presente estudio, sin embargo, este hecho (correlación negativa entre ausente expresión serológica de anti-HBcIgM y replicación viral / severidad de la hepatopatía) no se ha observado. El único paciente que positivizó este marcador coincidiendo con el inicio de la reinfección por el VHB fué el que desarrolló una hepatitis fulminante, entidad clinicopatológica constantemente asociada a un muy alto título de anti-HBcIgM en el suero (77, 239). En los restantes casos la recurrencia no se acompañó de la aparición serológica del mismo a pesar de la existencia de actividad replicativa e instauración, en varios de ellos, de severa hepatopatía en el injerto. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por O'Grady y col. (161), unos de los escasos autores que estudian la evolución de este marcador en la recurrencia de la infección por el VHB postrasplante hepático. En su trabajo, ellos describen también escasa expresión serológica del mismo a pesar de la intensa actividad replica-

tiva y severa lesión hepática que mostró la recurrencia de la infección viral. En pacientes no trasplantados con hepatitis B, la marcada disminución o pérdida del anti-HBcIgM que acontece tras la administración de tratamiento esteroideo se ha atribuído al efecto inhibidor que éste ejerce sobre la inmunidad humoral (220). En base a ello, la supresión de la inmunidad humoral que padece el paciente trasplantado (89) podría también justificar esta falta de respuesta inmunológica a la actividad de la infección viral recurrente postrasplante hepático.

En su prevalente evolución a la cronicidad, la reinfección viral mostró un progresivo y marcado incremento de la actividad replicativa del VHB. En las fases más iniciales de la recurrencia, el nivel de actividad replicativa todavía era muy bajo, como indica la expresión sólo ocasional del HBcAg nuclear en el tejido hepático y la ausencia del DNA sérico viral (210). Sin embargo, pasados los tres primeros meses de seguimiento el estudio inmunohistoquímico de los injertos documentó un intenso incremento de la expresión nuclear del HBcAg, incremento que persistió hasta alcanzar una expresión masiva y abarcar virtualmente la práctica totalidad de los núcleos hepatocitarios. Asimismo, paralelamente a esta intensa expresión inmunohistoquímica nuclear de HBcAg (localización topográfica del antígeno indicativa de replicación viral [71, 101, 102, 154, 179]) el ADN sérico del VHB fué constantemente positivo. Este incremento progresivo y severo del nivel de actividad replicativa en la cronificación de la

infección viral recurrente por el VHB post-TxH es un hecho que también han descrito otros autores. Demetris y col. (54), Davies y col. (45), Phillips y col. (169) y Hopf y col. (98) relatan, en sus trabajos, similar curso evolutivo del HBcAg nuclear en los injertos hepáticos, refiriendo también la progresión de un inicial patrón de expresión de tipo focal hacia un patrón de tinción de tipo difuso a medida que aumenta el tiempo de seguimiento. Por otra parte, O'Grady y col. (161) en su serie de pacientes HBsAg-seropositivos sometidos a trasplante hepático describen también, mediante estudio de cuantificación del ADN viral en suero, un masivo incremento del mismo en la práctica totalidad de los casos recurrentes que evolucionan a la cronicidad. Este patrón altamente infeccioso de la reinfección viral postrasplante hepático es congruente con el que se ha descrito en pacientes crónicamente infectados por el VHB sometidos a trasplante renal, donde tras el prolongado estado de inmunosupresión se describe también un marcado incremento de la replicación viral (50, 62, 89, 106).

Un hallazgo relevante ha sido el peculiar curso inmunohistoquímico que ha expresado el HBsAg en el injerto paralelamente al progresivo incremento de HBcAg nuclear. En el hígado no trasplantado, entre las distintas combinaciones descritas entre la expresión tisular de HBsAg y HBcAg, un punto generalmente en común es la relación inversamente proporcional que existe entre ambos antígenos virales (14, 35, 154, 180, 234), es decir, extensa expresión de HBsAg cuando

el HBcAg es escaso o ausente y, por el contrario, focal tinción del mismo cuando el HBcAg es difuso. En el presente trabajo, junto al progresivo incremento de HBcAg tisular se apreció también un paralelo incremento del HBsAg el cual, además, mostró preferentemente un patrón de tinción de tipo citoplasmático homogéneo. Esta sorprendente expresión tisular masiva y simultánea de ambos antígenos la relatan también otros autores. Davies y col. (46) en su definición de la hepatitis colestásica fibrosante, describen similar expresión antigénica en todos los injertos que desarrollan esta particular forma morfológica de hepatitis B. Aunque los autores no especifican la evolución y relación secuencial entre ambos antígenos a lo largo del seguimiento, detallan en estos injertos extensa positividad para HBcAg nuclear junto a una relevante y generalizada expresión citoplasmática homogénea de HBsAg. La similitud con nuestros resultados todavía es mayor en el recientemente publicado trabajo de Phillips y col. (169), ya que estos autores también estudian secuencialmente el curso de ambos antígenos. En su trabajo, ellos describen también un simultáneo, rápido y masivo incremento de HBsAg citoplasmático homogéneo paralelamente a HBcAg nuclear. Esta sobrecarga antigénica compartida entre HBcAg y HBsAg citoplasmático homogéneo, observado en éste y en los anteriormente citados estudios, no se ha descrito en la hepatitis B del hígado no trasplantado. Lo excepcional no es que en el tejido hepático el HBcAg nuclear coexista con un patrón citoplasmático homogéneo de HBsAg (asociación que sí se ha descrito con frecuencia en la hepatitis B del hígado

no trasplantado (35, 102, 103) sino que ambos antígenos se expresen con tanta intensidad. La razón de esta severa sobrecarga de antígenos se ha sugerido (169) que podría estar relacionada con la dosis de virus a que el injerto es expuesto bajo el ya establecido estado de inmunosupresión.

#### I.D. CORRELACION VIROLOGICO-MORFOLOGICA

Analizadas separadamente las características histopatológicas y las características virológicas que la infección recurrente por el VHB ha mostrado en el curso postrasplante, el otro importante punto a comentar es la correlación que ha existido entre ambas.

En el contexto de **la hepatitis B que se desarrolla en un hígado no trasplantado**, los mecanismos por los que se explican las lesiones hepatocelulares resultan de la combinación de un virus B infectivo pero no citopático y del ataque inmune contra los hepatocitos que albergan este virus (73, 144, 145, 242, 243). Algunas de las principales razones que apoyan este tipo de mecanismo son:

1ª) La yuxtaposición morfológica que en el lobulillo hepático existe entre necrosis hepatocelular y infiltrado inflamatorio mononuclear (143).

2ª) La relación inversamente proporcional existente entre el grado de actividad necroinflamatoria histológica y a) la cantidad de HBsAg en el tejido hepático: los mayores acúmulos de HBsAg se observan en portadores "sanos" del virus (95, 159, 180, 134) y b) nivel de expresión tisular de la actividad replicativa viral: mientras altos niveles de replicación

(abundantes núcleos hepatocitarios con positividad inmunohistoquímica del HBcAg) cursan frecuentemente sin o con sólo mínima lesión hepática, la agresividad de la hepatopatía y progresiva evolución a la cirrosis habitualmente acontece con bajo nivel de replicación viral (34, 35, 71, 80, 101, 144, 154).

En el contexto de la **hepatitis B que se desarrolla en un hígado trasplantado** las observaciones antedichas no están presentes:

1) En éste y en otros estudios (46, 53, 54, 153, 238) la extensa degeneración acidófila de los hepatocitos que mostró el lobulillo hepático contrastaba con un escaso o nulo componente inflamatorio adyacente.

2) Los intensos cambios histopatológicos documentados en este estudio en los diagnósticos de hepatitis crónica y su rápida progresión hacia la cirrosis coexistieron con un alto nivel inmunohistoquímico de replicación viral (patrón difuso de HBcAg nuclear) y abundante expresión inmunohistoquímica de HBsAg. Resultados muy similares describen los estudios postrasplante anteriormente citados, especialmente el de Phillips y col. (169) que también refiere una instauración y una progresión de la hepatopatía crónica paralelas a una masiva expresión tisular de ambos antígenos y, aunque en menor grado, el de Davies y col. (46), que refiere idéntico espectro inmunohistoquímico si bien situado en el subtipo de hepatopatía por ellos denominada hepatitis colestásica fibrosante.

Recientemente, estudios experimentales con distintos modelos de animales (33, 43, 167) han demostrado que un progresivo acúmulo intracitoplasmático de HBsAg producido tras la síntesis excesiva del mismo puede ser citotóxico para los hepatocitos. Es interesante resaltar que la masiva expresión tisular de HBsAg citoplasmático homogéneo fué exclusivo de los injertos que desarrollaron hepatitis crónica. También es oportuno destacar que el caso que permaneció en constante estado de portador sin hepatitis con largo seguimiento expresó un patrón HBsAg tisular del tipo membranoso, clásicamente descrito en pacientes inmunodeprimidos portadores no agresivos del VHB (14, 84, 180, 257).

Por otra parte, estudios clínicos (85, 101, 103) han sugerido que la localización citoplasmática del HBCAg podría tener efecto citopático para los hepatocitos y, muy recientemente, estudios experimentales con cultivos celulares (202) han demostrado el efecto citotóxico de este antígeno cuando se acumula a alto nivel intracelular. En este trabajo la práctica totalidad de los especímenes con hepatitis crónica expresaban extensa positividad inmunohistoquímica para HBCAg citoplasmático, a diferencia de la expresión exclusivamente nuclear que el antígeno mostró en los tejidos hepáticos portadores del VHB sin hepatitis.

Por lo tanto, la simultánea presencia de síntesis masiva intracelular de estos dos antígenos virales y severidad progresiva de las lesiones morfológicas junto con la disociación entre abundante daño celular y componente inflamatorio ausente no apoya un mecanismo patogénico inmunológico de la lesión

hepatocelular. Por el contrario, estas observaciones sugieren que en el injerto hepático el daño celular podría ser debido al supuesto potencial citopático del VHB.

En síntesis, en el presente estudio se ha demostrado que la infección crónica por el VHB del hígado trasplantado difiere con respecto a la descrita en el no trasplantado en: 1) una mayor prevalencia de hepatitis crónica, 2) un curso morfológico de la misma mucho más rápido, 3) una falta de yuxtaposición morfológica entre necrosis hepatocelular e infiltrado inflamatorio interhepatocitario y 4) una relación directamente proporcional entre la cantidad de antígenos virales intracelulares y la severidad de la lesión hepática. En base a estas diferencias, este trabajo apoya fuertemente la reciente propuesta de Lake y Wright (121) de que la hepatitis B recurrente postrasplante hepático es una enfermedad fisiopatologicamente distinta a la que se describe en el paciente no sometido a trasplante hepático.

## II. RECURRENCIA DE LA INFECCION POR EL VHD.

Los 4 pacientes cirróticos anti-HD positivos desarrollaron recurrencia de la infección por el VHD en el curso postrasplante. Este resultado confirma el alto riesgo de recidiva de la infección viral, referida entre el 70% y el 100% de los casos según las series (1, 45, 46, 135, 136, 162, 187, 196).

### II.A. EVOLUCION VIROLOGICA.

El concepto del VHD como "defectivo" está basado en las observaciones de que la infección por el VHD no puede instaurarse (es decir, éste no puede replicar ni expresarse) sin la ayuda de la infección activa del VHB (110, 139, 140, 189, 190). En consecuencia, hasta ahora se ha pensado que las dos únicas formas posibles de interacción entre ambos virus son: a) la **coinfección** simultánea por el VHB y VHD en un paciente sano, y b) la **superinfección por el VHD** en un paciente crónicamente infectado por el VHB (97, 110, 191).

En el presente trabajo, el estudio serológico e inmunohistoquímico postrasplante hepático ha demostrado, por el contrario:

1º) **Instauración de la infección recurrente por el VHD sin acompañante reactivación de la del VHB:** Durante al menos los 3 primeros meses postrasplante, se detectó una mantenida expresión tisular de actividad replicativa del VHD sin demostración simultánea de coinfección hepática ni replicación serológica del VHB. Estos resultados han sido también recién-

temente referidos por otros autores (45, 46, 133, 162, 196). La observación, en éste y en los previamente citados estudios, de establecimiento de la infección por el VHD en el injerto a pesar de la ausencia de signos de actividad del VHB apoya por tanto la sugerencia de Ottobrelli y col. (162) de que la infección por el VHD puede no ser necesariamente dependiente de la del VHB.

**2º) Desarrollo de la recurrencia de la infección por el VHB prosiguiendo a la del VHD:** En los 3 pacientes que desarrollaron recurrencia de la infección por el VHB, la expresión tisular de HBCAg fué posterior a la del HDAG. Esta instauración de la replicación del VHB después de la del VHD sólo ha sido descrita en el contexto del trasplante hepático (45, 46, 133, 162). En el hígado no trasplantado, incluso en la coinfección simultánea por el VHB y VHD, la actividad replicativa del VHB precede a la del VHD (158, 193, 240). Por consiguiente, esta particular relación virológica secuencial entre el VHB y el VHD observada postrasplante hepático traduce una posible tercera forma de interacción entre ambos virus: la **sobreinfección por el VHB.**

En el curso virológico postrasplante hepático, otros hallazgos de interés han sido:

**3º) La precocidad con que fué detectada la reinfección por el VHD:** El HDAG fué demostrado muy tempranamente, a los 17±7 días de la cirugía. Este breve espacio de tiempo entre el implante del injerto hepático y su infección por el VHD también ha sido referido en otras series de pacientes anti-HD

positivos sometidos a TxH (133, 162). Ello es indicativo del corto período de incubación de este tipo de reinfección viral. Esta brevedad en la instauración de la replicación del VHB había sido observada a nivel experimental en cultivos celulares (78) e en inoculaciones seriadas del virus en chimpancés (239). Su interés reside en la aportación al escaso conocimiento que existe en cuanto a su real tiempo de incubación en el hombre.

4<sup>o</sup>) **La modificación del curso infectivo del VHD en función de la instauración o no de la recurrencia del VHB:** Posteriormente al período inicial de aislada reinfección por el VHD, el HDAg tisular experimentó un marcado incremento coincidiendo con la detección de HBcAg en los 3 injertos que desarrollaron la infección por el VHB, y desapareció del tejido hepático estudiado en el injerto que no la instauró. La mayoría de los estudios que describen desarrollo de la reinfección del VHB después de la del VHD (45, 46, 133, 162) también relatan un masivo incremento de inmunotinción hepatocitaria del antígeno coincidiendo con el establecimiento de la segunda reinfección viral. Algunos (46, 187) refieren asimismo transitoriedad del HDAg tisular si no se instaura posteriormente la reinfección por el VHB. Esta modificación de la actividad replicativa del VHD en función de la reactivación o no del VHB postrasplante hepático es congruente con el referido (223, 240) papel modulador que el VHB ejerce sobre el VHD.

5º) **La mayor sensibilidad de los métodos de demostración del HDAg tisular frente a los del ARN sérico para detectar la recurrencia del VHD postrasplante:** En el curso postrasplante, la expresión inmunohistoquímica del HDAg en el tejido hepático fué el marcador más precoz para detectar la instauración de la reinfección viral. En los 4 pacientes la inicial positividad tisular de HDAg no se acompañó de paralela presencia sérica del ARN viral y esta ausencia inicial persistió, en 3 de ellos, durante al menos los tres primeros meses de seguimiento. La expresión inmunohistoquímica de HDAg en el tejido hepático como único signo de actividad infectiva del VHD es un hecho descrito por otros autores (1, 136, 187, 196). La similitud de resultados entre éste y los anteriormente citados estudios califica al estudio inmunohistoquímico como el mejor método diagnóstico de recidiva de la infección por el VHD postrasplante hepático.

#### II.B. CORRELACION VIROLOGICO-MORFOLOGICA.

Clásicamente, el desarrollo de la hepatitis histológica que sigue a la sincrónica o metacrónica infección de un paciente por el VHB y VHD se ha considerado que dependía fundamentalmente del VHD (192, 195, 221) en base a su carácter altamente patógeno (140, 185, 190, 191, 195) y citopático (110, 190, 191, 240). Además, una de las principales razones indicativas de esta directa citopatogenicidad del VHD había sido que la presencia intrahepática de HDAg se asociaba invariablemente a lesión hepatocelular (188, 190, 191, 232).

En el presente trabajo, la secuencia de acontecimientos virológico-morfológicos que ha tenido lugar a lo largo del curso postrasplante ha sido distinta. El correlativo estudio inmunohistoquímico e histopatológico de los injertos ha documentado:

- 1º) **La permanente expresión tisular de HDAg no se acompañó de signos histológicos de hepatitis** durante la etapa inicial de aislada infección del injerto por el VHD. Este hecho demuestra la existencia de un estado de portador no agresivo del virus postrasplante. Nuestros resultados han sido muy similares a los descritos por los trabajos que han estudiado la evolución morfológica del injerto tras la recurrencia de la infección por el VHD (45, 46, 133, 162), en los que se relata también constante ausencia de lesión hepática mientras existe únicamente infección recurrente por el VHD.
- 2º) **El desarrollo de hepatitis histológica se objetivó una vez instaurada la infección recurrente por el VHB.** Esta hepatopatía coincidió con la aparición de HBCAg e incremento del HDAg en el tejido hepático. Esta interdependencia de ambos virus necesaria para que se establezca la lesión morfológica es un rasgo que también refieren los previamente citados estudios (45, 46, 133, 162).

Por lo tanto, la observación en el presente trabajo de un período de "portador sano" del VHD y de instauración del cuadro hepático sólo cuando existe concomitante infección hepática por el VHB, apoya la hipótesis de Ottobrelli y col. (162) y de Davies y col. (45) de que el VHD aislado puede no ser citopático.

### III. INFECCION POR EL VHC.

La recidiva postrasplante de la infección VHC ha sido reportada con variada frecuencia (138, 177, 183) y, al menos, se observó en un paciente de esta serie. En otros 9 pacientes se demostró infección por el VHC postrasplante hepático. Esta infección por el VHC pudo provenir del receptor, del injerto implantado o de la sangre transfundida (184). El fenómeno "ventana" en la determinación serológica del anti-VHC (5, 65, 68) hace posible posible que el VHC pueda ser responsable de hepatitis inesperadas en el injerto hepático. En 4 pacientes que habían negativizado postrasplante todos los marcadores de infección del VHB, la infección por el VHC explicó el desarrollo de una hepatopatía crónica en el injerto. En otros 4 pacientes con hepatitis en el injerto la infección por el VHC coexistió con infección por el VHB. La secuencia evolutiva demostró antígenos del VHB y hepatitis en el injerto antes de la seroconversión a anti-VHC. Sin embargo, no fué posible determinar que grado de responsabilidad tuvo cada uno de estos virus en la lesión hepática.

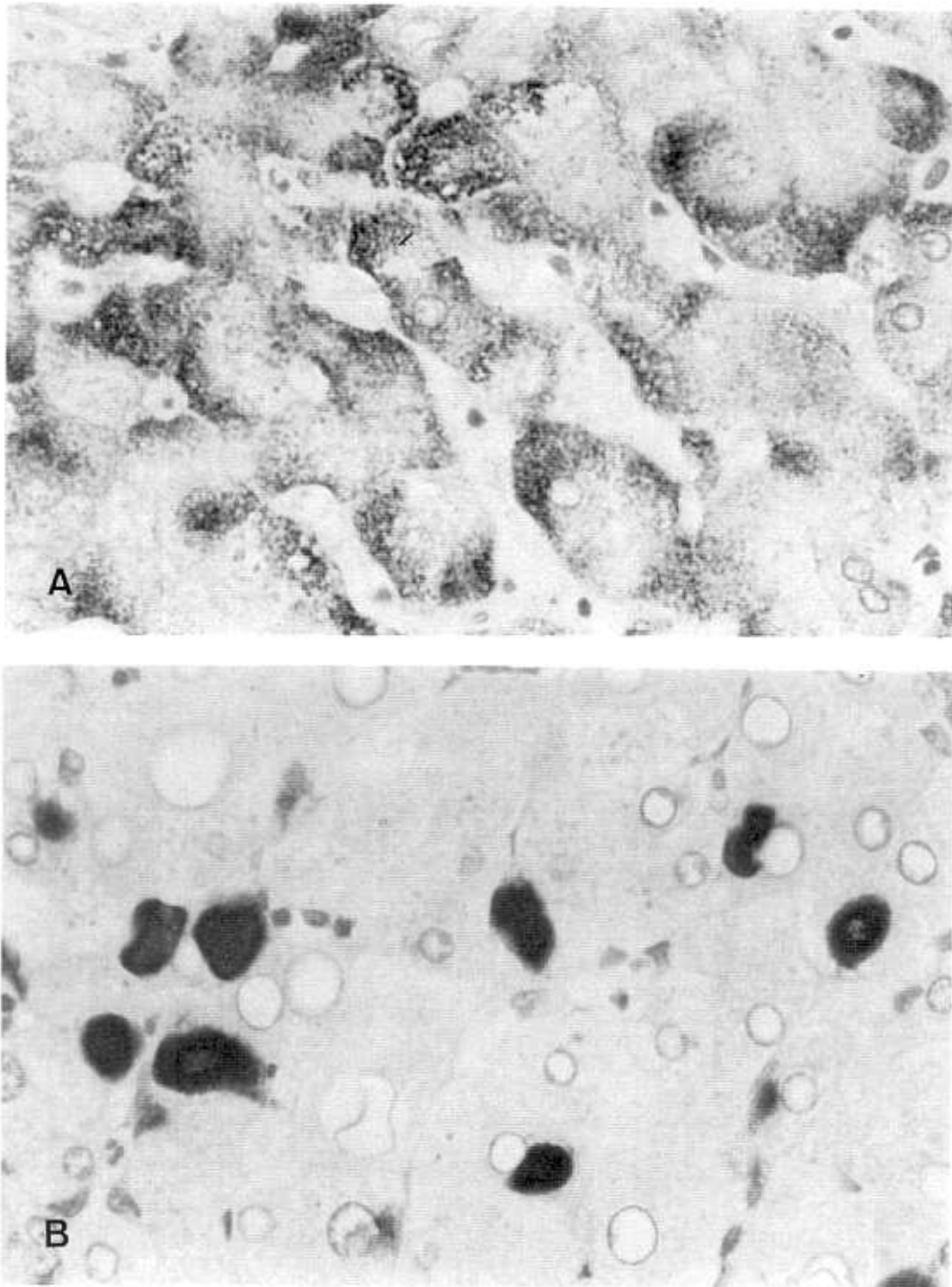
En base a esta frecuente coexistencia de infección de más de un virus en el seguimiento postrasplante de pacientes HBsAg seropositivos, la posibilidad de una etiología multiviral de las hepatitis postrasplante debe ser tomada en cuenta.

## **CONCLUSIONES**

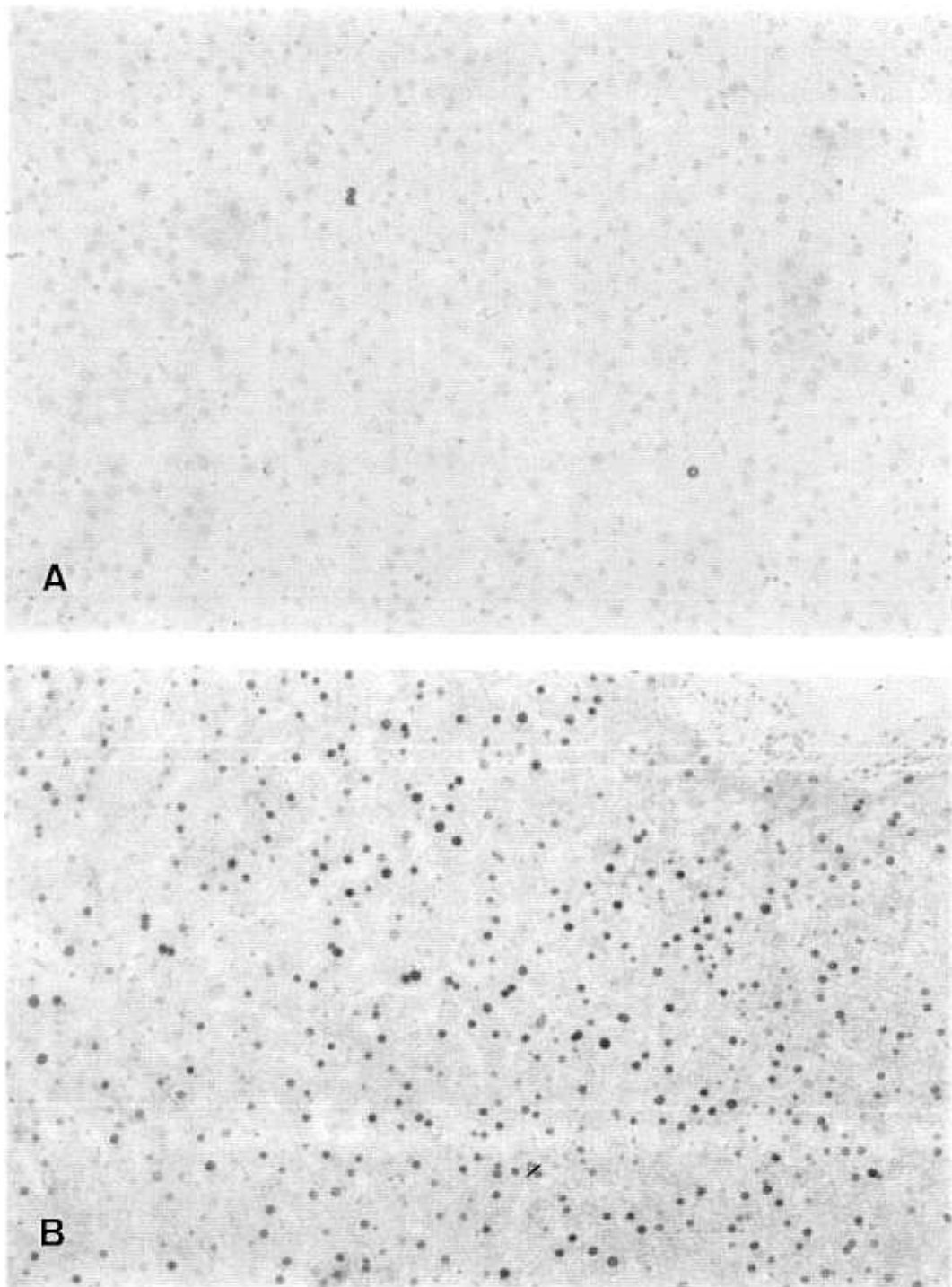
- 1<sup>a</sup>. En un tiempo de seguimiento de  $532 \pm 296$  días, el 50% de los pacientes HBsAg seropositivos sometidos a trasplante hepático desarrollaron infección del injerto por el VHB.
- 2<sup>a</sup>. La recurrencia fué significativamente más frecuente en los pacientes con replicación viral activa pretrasplante que en los no replicativos ( $p=0,02$ ). Fué menos frecuente en los pacientes tratados con inmunoprofilaxis pasiva prolongada que en los que no recibieron este tratamiento ( $p=0,03$ ).
- 3<sup>a</sup>. La histología de los injertos hepáticos infectados por el VHB documentó:
  - desarrollo de hepatitis en el 76,9% y ejemplificación de los siguientes tipos anatomoclínicos: lobulillar, subaguda, fulminante, crónica activa y colestásica fibrosante.
  - una secuencia evolutiva extraordinariamente rápida desde infección sin lesión hasta cirrosis.
- 4<sup>a</sup>. El primer signo de infección del injerto por el VHB fué la expresión inmunohistoquímica focal de HBCAg. Ésta fué seguida de rápida progresión a patrón difuso de HBCAg y HBsAg, rasgo indicativo de sobrecarga viral hepatocelular permitida por la inmunosupresión.

- 5<sup>a</sup>. La rápida y masiva extensión intrahepática de los antígenos virales asociada al curso acelerado de la hepatopatía permiten describir a la hepatitis B recurrente postrasplante hepático como una enfermedad fisiopatológicamente distinta a la hepatitis B del paciente no trasplantado.
- 6<sup>a</sup>. En los pacientes HBsAg y anti-HD seropositivos:
- la infección del injerto por el VHD fué muy precoz (17±7 días postrasplante) y siempre precedió a la del VHB.
  - la hepatitis histológica no se desarrolló hasta el momento en que el injerto expresó la infección recurrente por el VHB. Este hallazgo indica que el VHD aislado puede no ser citopático.
- 7<sup>a</sup>. En esta serie de casos el trasplante hepático también prolongó la supervivencia de los pacientes. Un factor imprevisto y fortuito fué la infección por el VHC que empeoró el curso postrasplante de pacientes que habían superado la infección por el VHB.

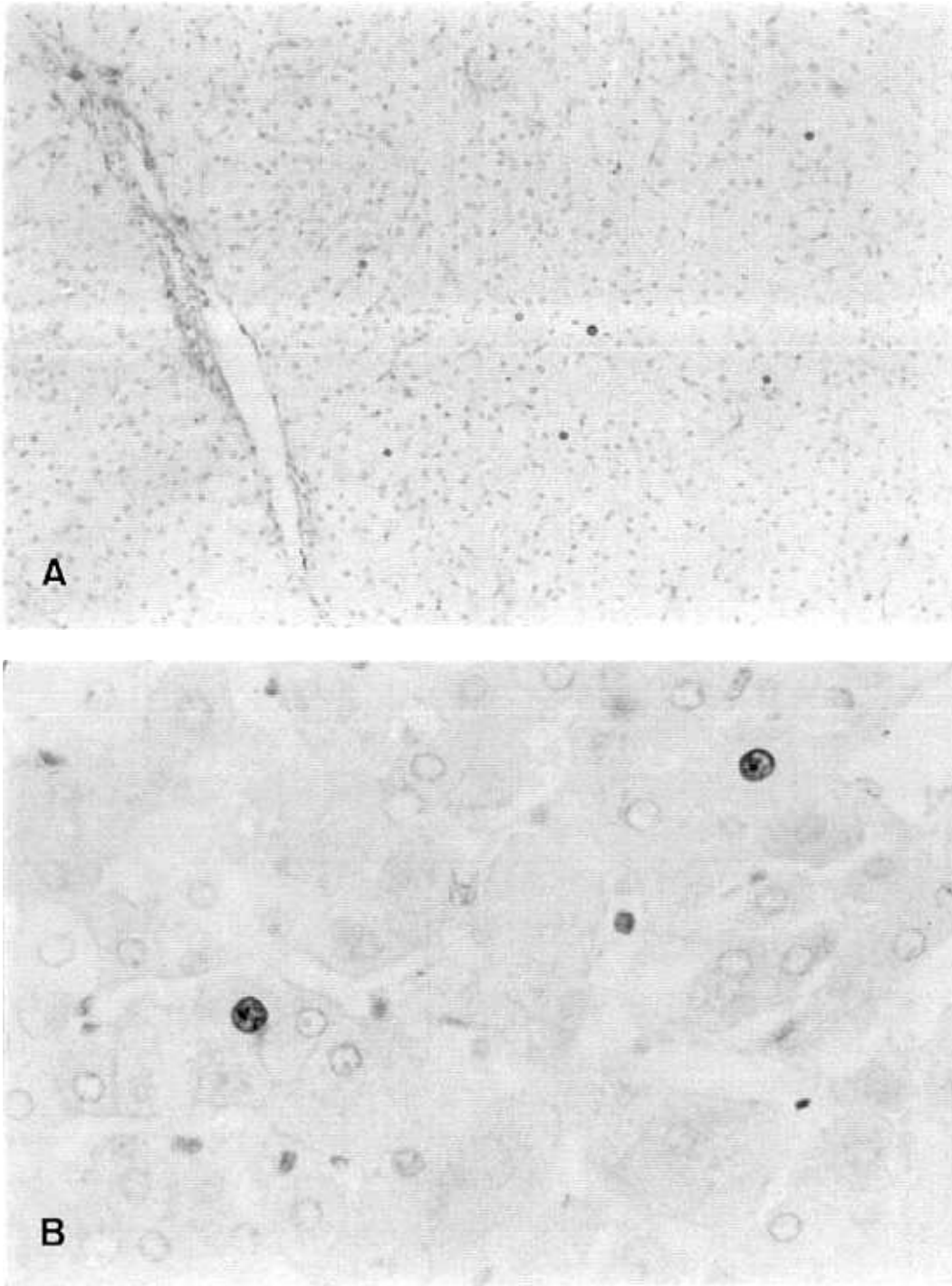
## **FIGURAS**



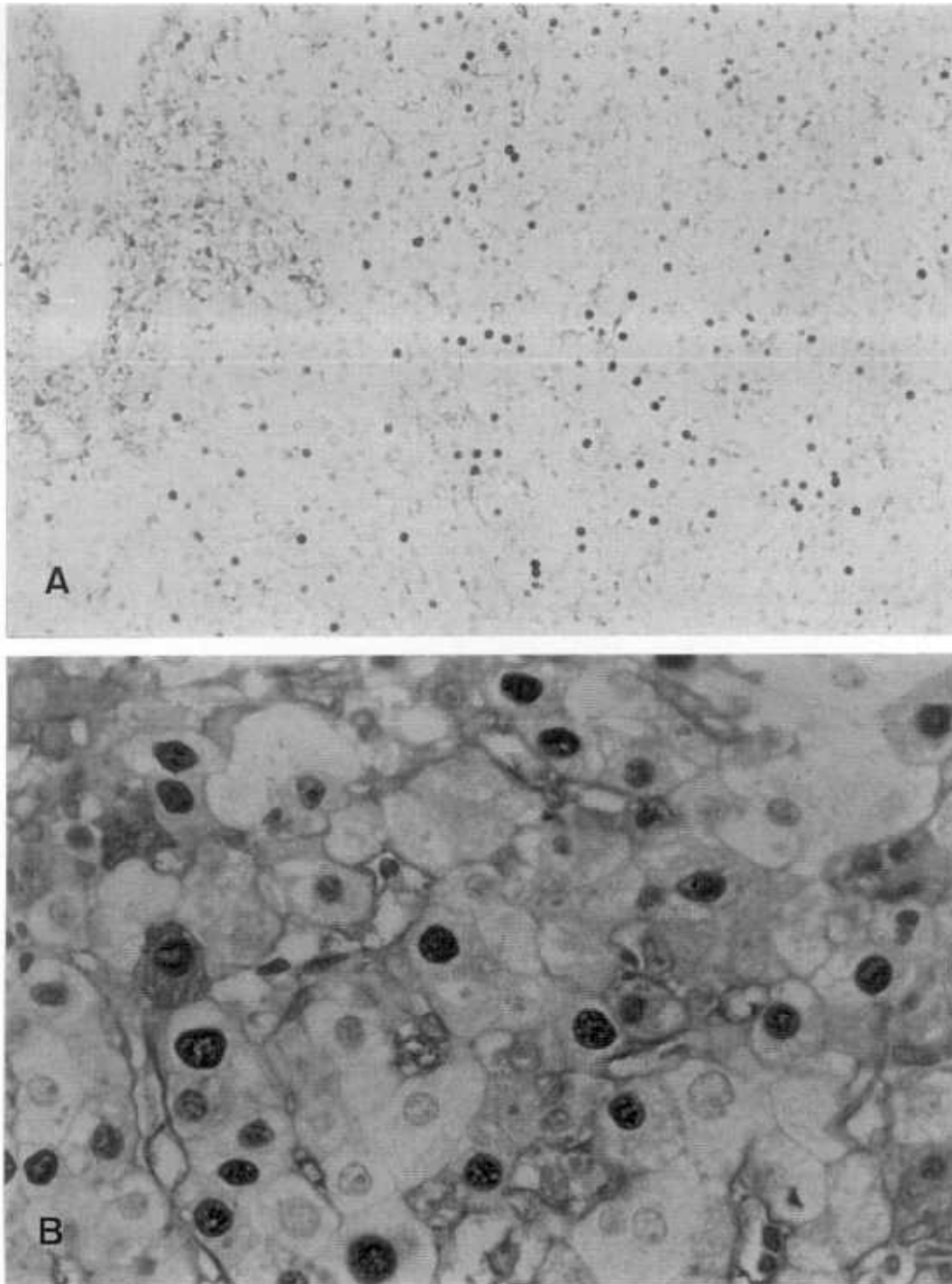
**FIGURA 1. HBSAG EN HIGADO NATIVO CIRROTICO: Patrones de tinción dominantes: A.) de tipo marginal; B.) de tipo globular (Inmunoperoxidasa, x400).**



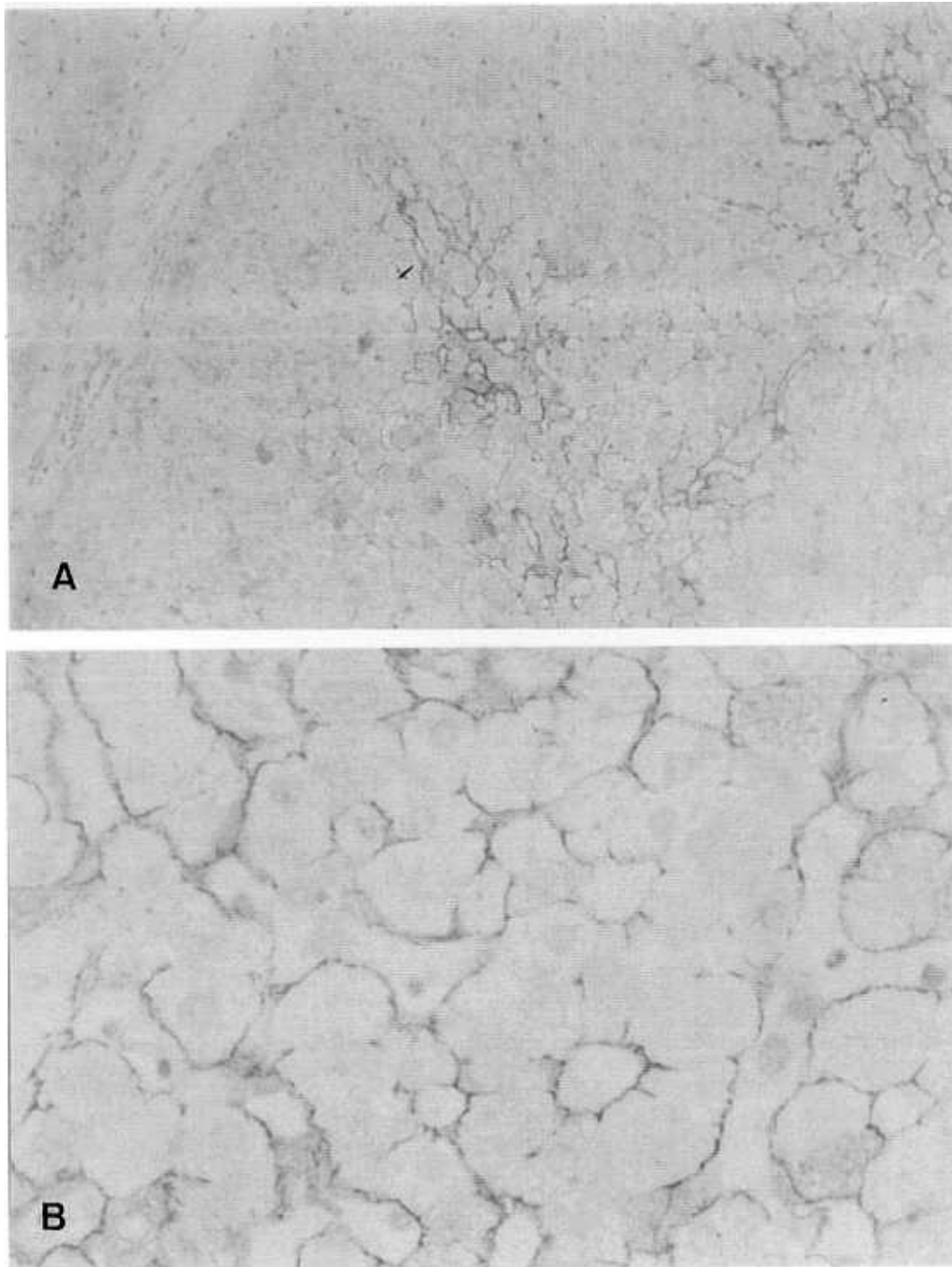
**FIGURA 2. INCREMENTO SECUENCIAL DE HBcAG EN EL INJERTO:**  
A.) Positividad nuclear ocasional en biopsia inicial  
(día 27 postTxH); B.) Tinción nuclear masiva al final  
del seguimiento (día 584 postTxH) (Inmunoperox. x100).



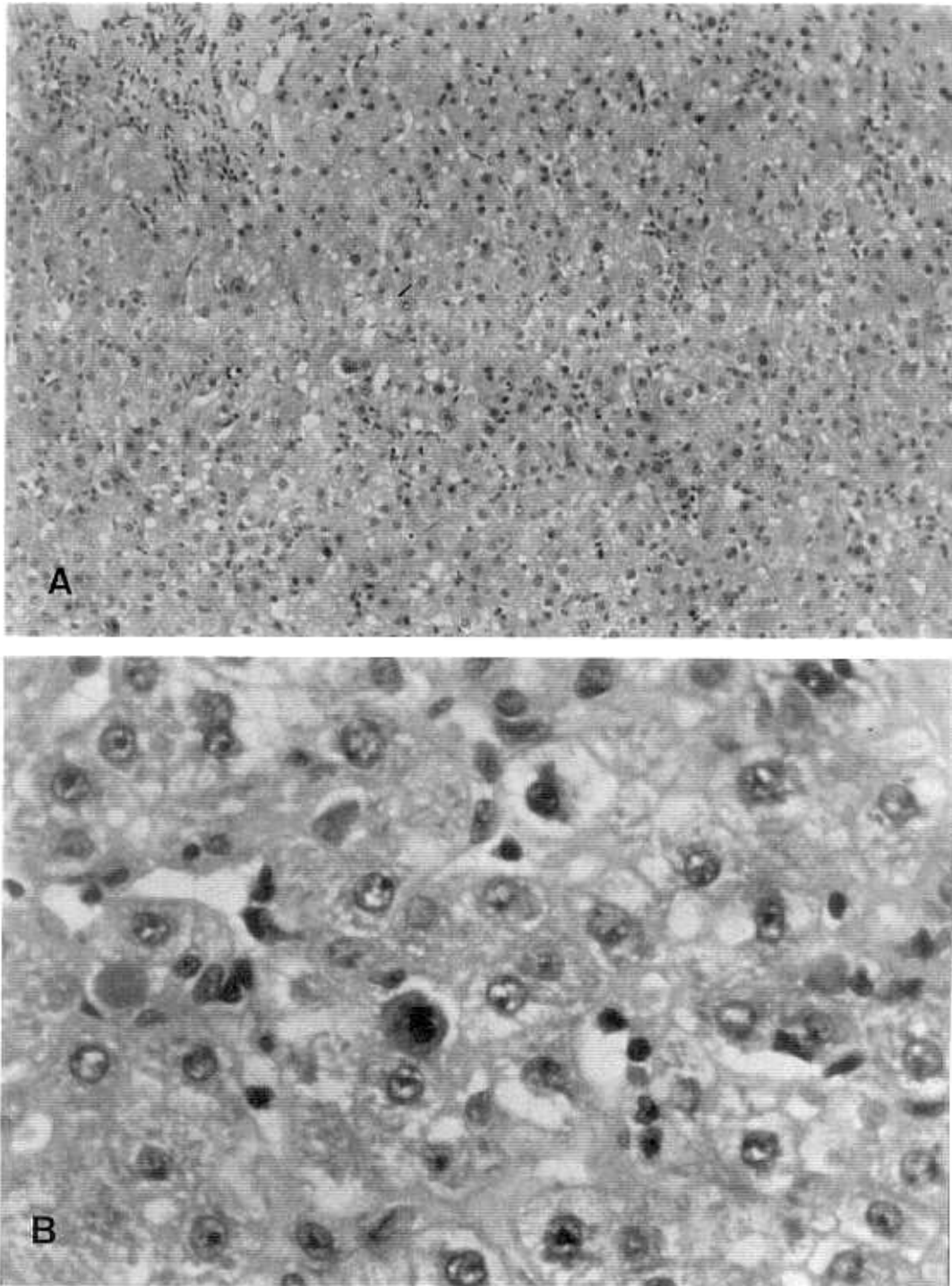
**FIGURA 3. HDAG EN AISLADA INFECCION DEL INJERTO POR EL VHD: A.) Especimen del día 8 PostTxH sin lesión necroinflamatoria y con positividad nuclear para HDAG inferior al 5% de los hepatocitos (Inmunoperoxidasa, x100); B.) Detalle (x400).**



**FIGURA 4. HDAG EN INJERTO INFECTADO POR VHD Y VHB:**  
A.) Biopsia hepática del día 140 postTxH con lesión  
hepatítica portal y más del 70% de hepatocitos HDag  
positivos (Inmunoperoxidasa, x100). B.) La tinción  
es nuclear y, ocasionalmente, citoplasmática (x400).

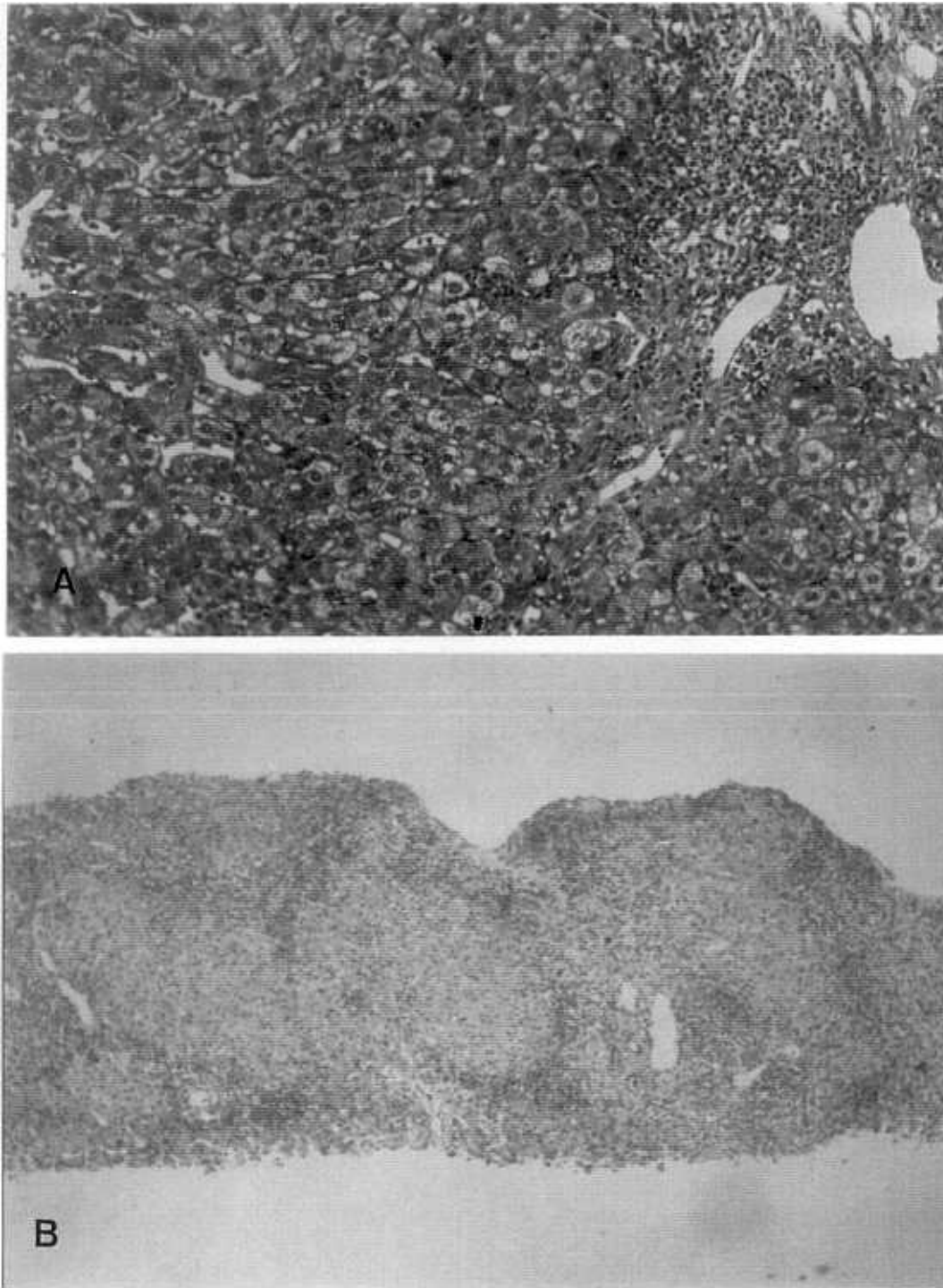


**FIGURA 5. HBSAG EN INJERTO PORTADOR SANO DEL VHB:**  
A.) Especimen hepático del día 584 postTxH con espacio porta conservado y extensa expresión membranosa de HBsAg (Inmunoperoxidasa, x100); B.) Detalle de la positividad limitada a la membrana celular (x400).

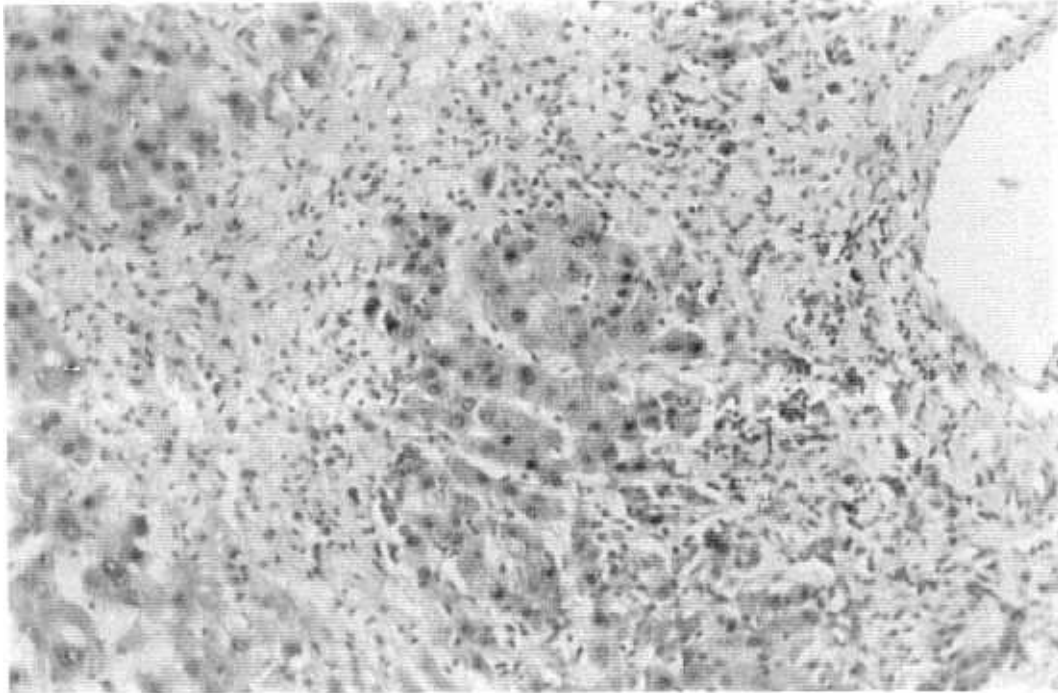


**FIGURA 6. HEPATITIS AGUDA LOBULILLAR:**

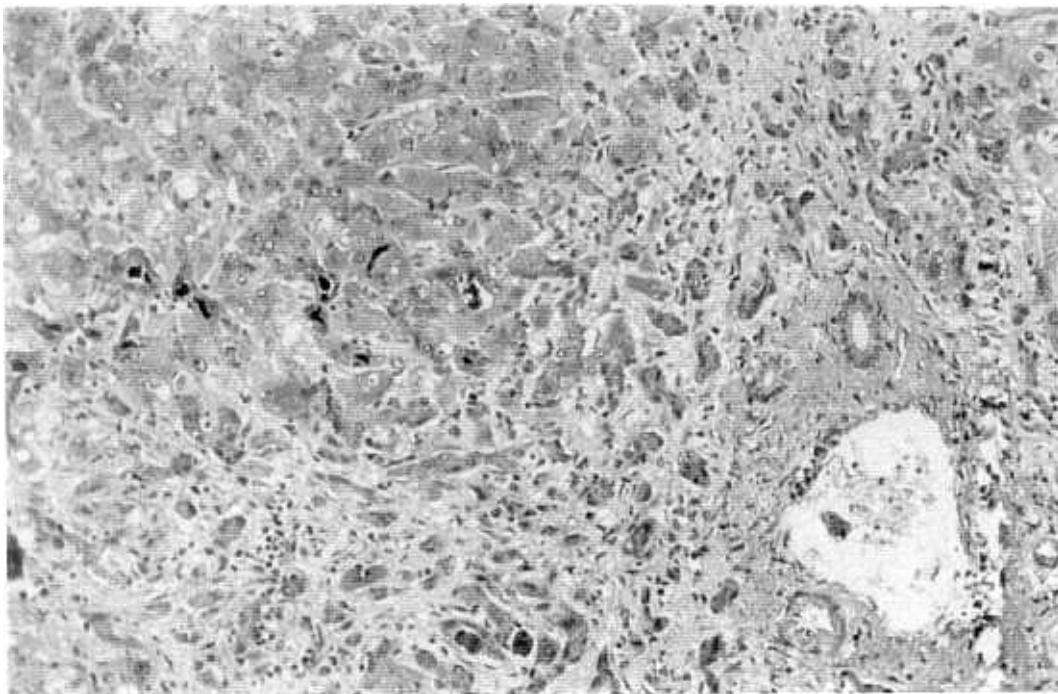
A.) Lobulillo hepático con desorden trabecular, anisocitosis y anisocariosis de los hepatocitos, frecuentes cuerpos acidófilos y escaso infiltrado mononuclear (HE, x100); B.) Detalle (x400).



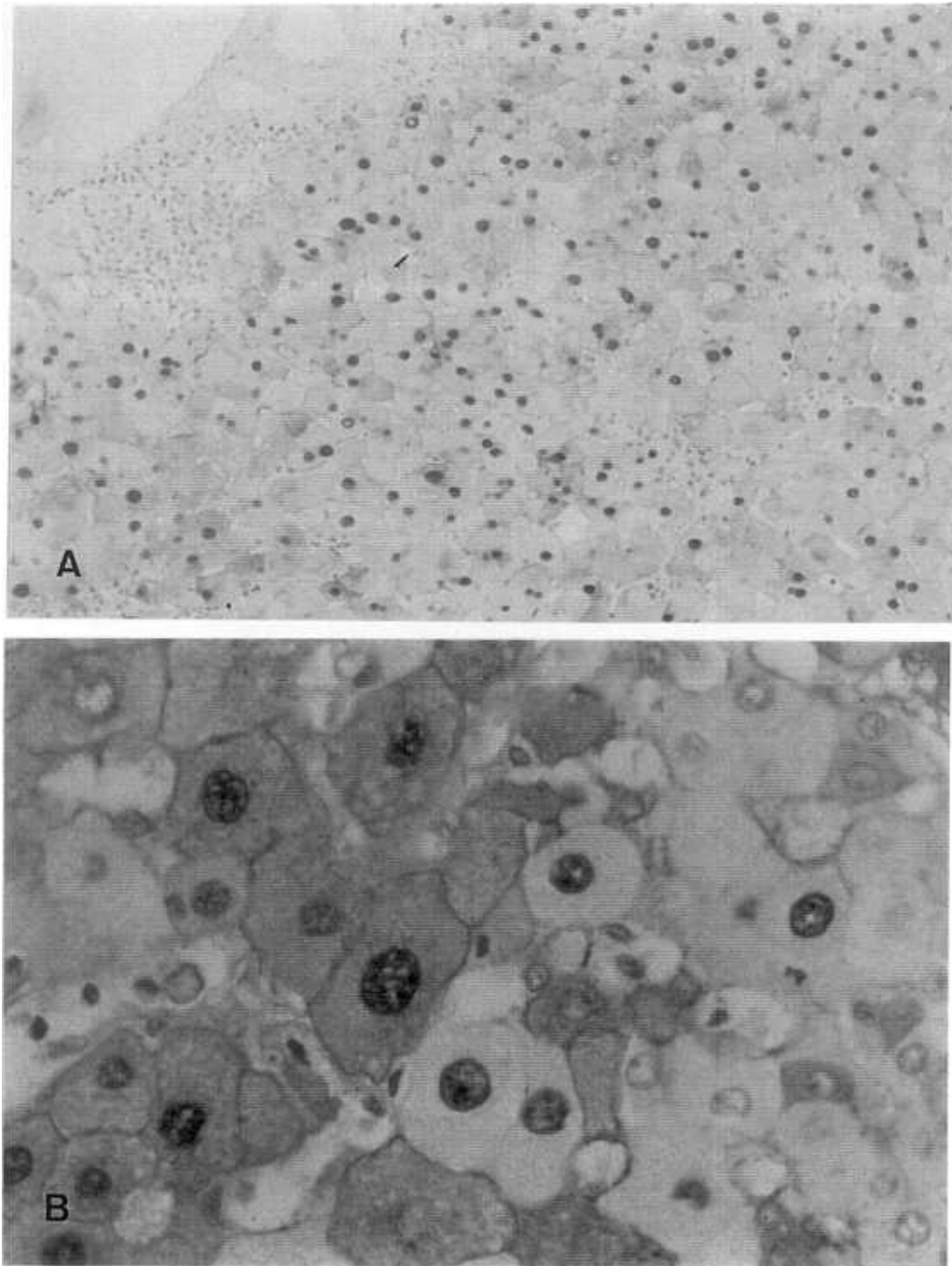
**FIGURA 7. HEPATITIS CRONICA ACTIVA:** A.) Biopsia hepática del día 147 postTxH con inflamación y necrosis erosiva periportal (Masson x100). B.) Especímen biopsico del mismo injerto en el día 323 postTxH, con puentes fibrosos porto-portales (HE x400)



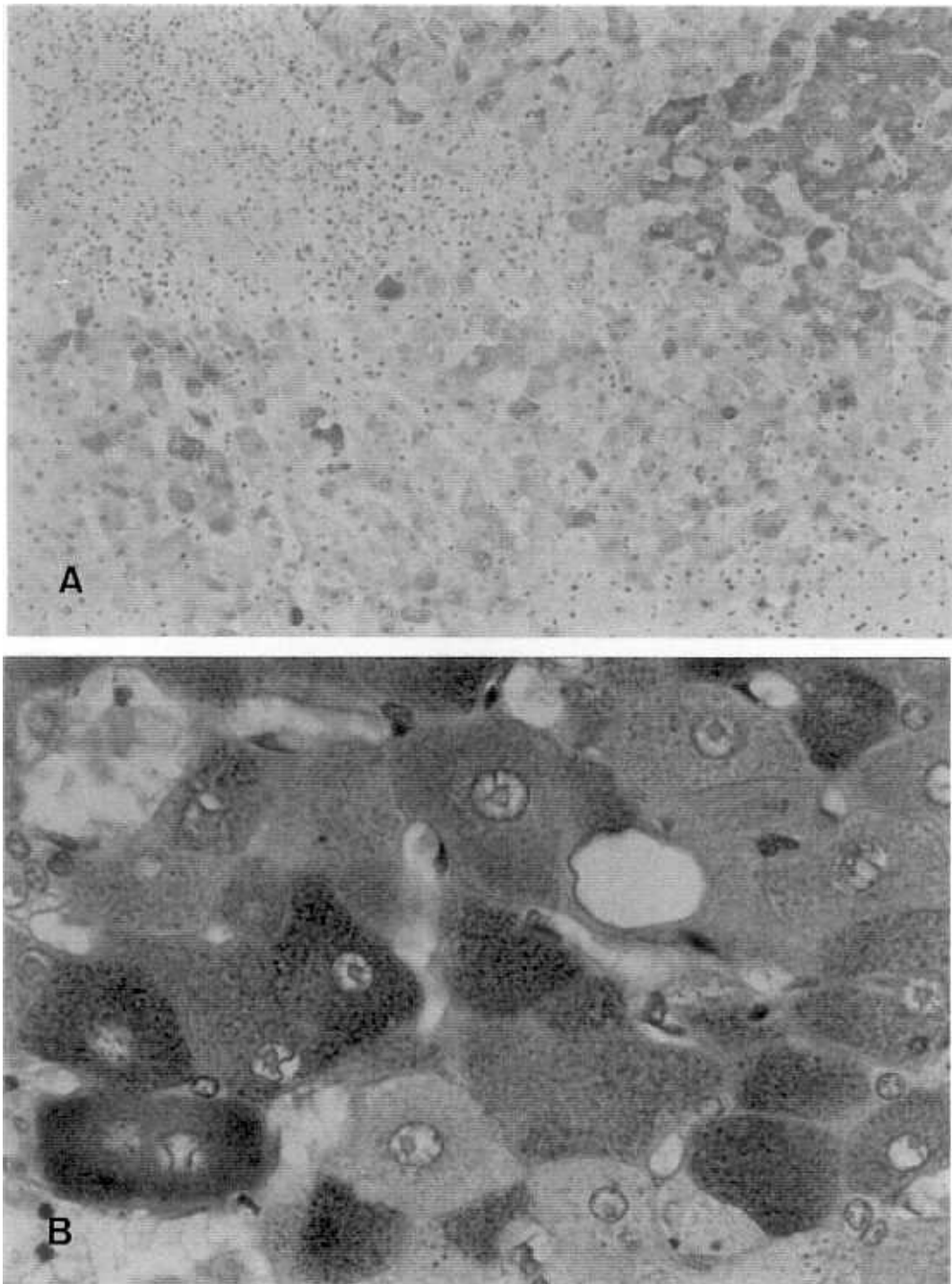
**FIGURA 8. HEPATITIS SUBAGUDA:** Puente de necrosis contiguo a espacio porta con infiltrado inflamatorio e interrupción de la membrana limitante (HE, x100).



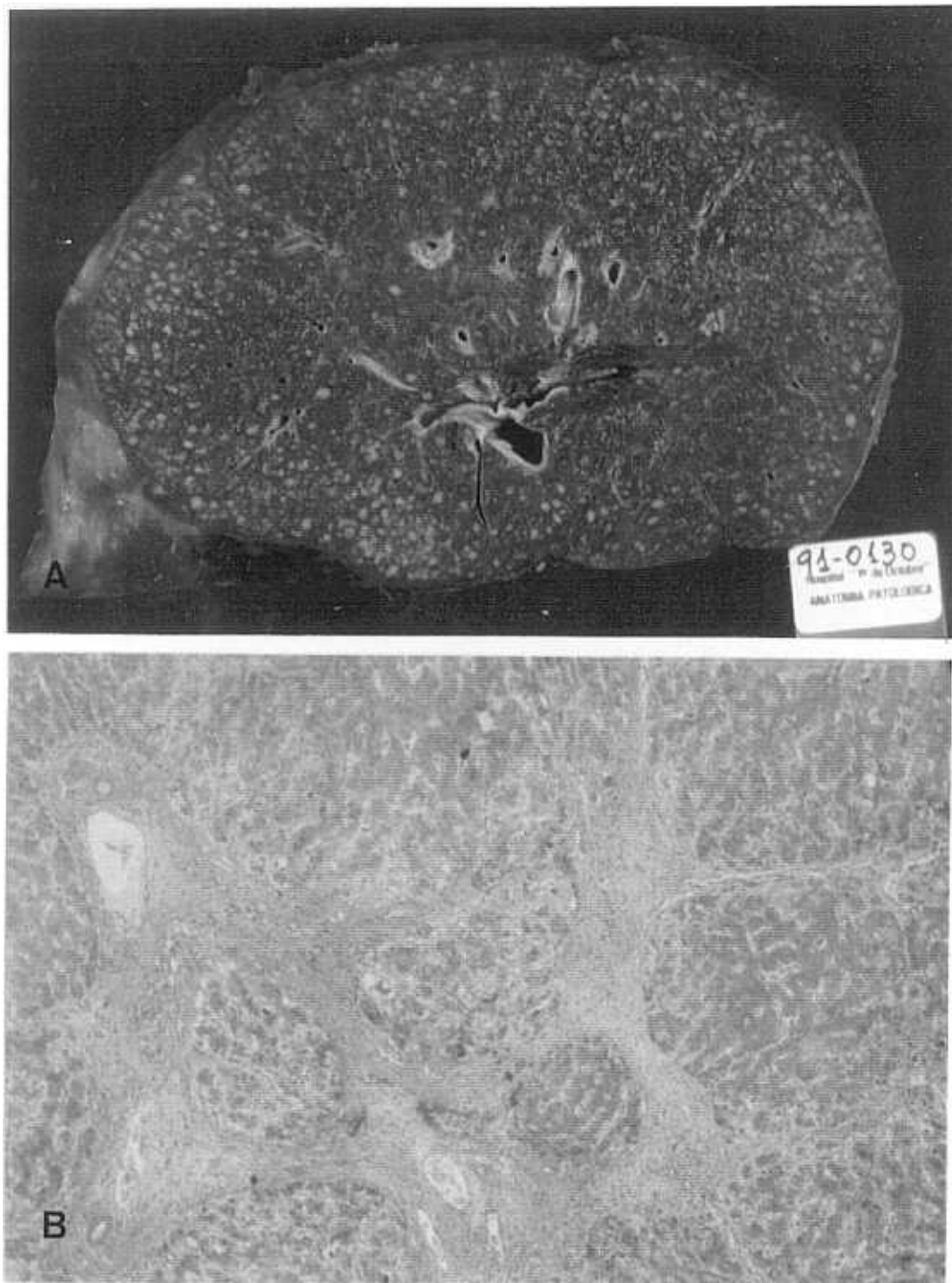
**FIGURA 9. HEPATITIS COLESTASICA FIBROSANTE:** Tejido hepático con proliferación ductulillar, colestasis y collagenización sinusoidal (Masson, x100).



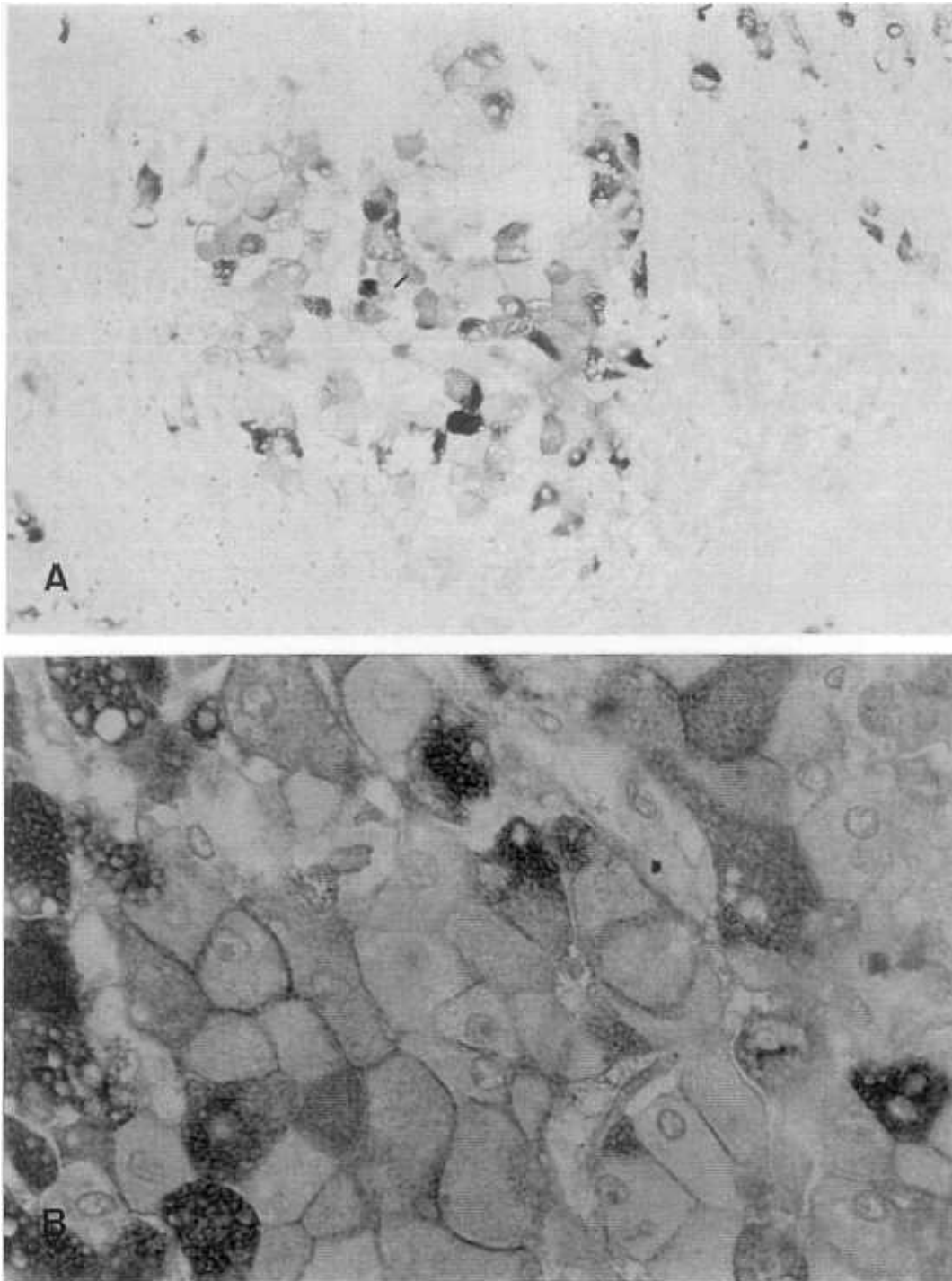
**FIGURA 10. HBcAG EN INJERTO HEPATICO CON HEPATITIS CRONICA:** A.) Parénquima hepático con necrosis erosiva del espacio porta y expresión hepatocitaria de HBcAg marcada, de localización nuclear y citoplasmática (Inmunoperoxidasa, x100); B.) Detalle (x400).



**FIGURA 11. HBsAG EN INJERTO HEPATICO CON HEPATITIS CRONICA:** A.) Cuadro de hepatitis crónica activa con masiva expresión hepatocitaria de HBsAg citoplasmático (Inmunoperoxidasa, x100); B.) Detalle del carácter homogéneo de la tinción en el citoplasma (x400).



**FIGURA 12. INJERTO HEPATICO CON CIRROSIS B RECURRENTE:**  
A.) Pieza de hepatectomía de injerto hepático (día 180 post-TxH) con cirrosis de patrón micronodular; B.) Corte histológico (Masson, x40).



**FIGURA 13. HBsAG EN INJERTO HEPATICO CON CIRROSIS B:**  
A.) Nódulo cirrótico con extensa inmunopresión  
citoplasmática homogénea de HBsAg (Inmunoperoxidasa  
x100). B.) Detalle que muestra un componente de tinción  
membranosa asociado (x400).

## **BIBLIOGRAFIA**

1. **Agnes S, Avolio AW, Magalini SC, Nanni G, Foco M, Serino F, Hassan G, y col.** Results of liver transplantation for hepatitis delta disease without immunoprophylaxis. *Transplant Proc* **1989**; 21:2426-2428.
2. **Albin C, Robinson WS.** Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J Virol* **1980**; 34:297-302.
3. **Alexander GLM, Fagan E, Hegarty JE, Yeo J, Eddleston AL, Williams R.** Controlled clinical trial of acyclovir in chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol* **1987**; 21:81-87.
4. **Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ.** New antigen antibody system in Australia antigen positive hepatitis. *Lancet* **1971**; 2:1225-1227.
5. **Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G.** Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* **1989**; 321:1494-1500.
6. **Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH.** The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature and classification. *Bull WHO* **1977**; 55:521-550.
7. **Bain VG, Danicls HM, Chanas A, Alexander GJM, Williams R.** Foscarnet therapy in chronic hepatitis B virus E antigen carriers. *J Med Virol* **1989**; 29:152-155.
8. **Balfour HJ, Jr.** Management of cytomegalovirus disease with antiviral drugs. *Rev Inf Dis* **1990**; 12 (Suppl.7):S849-S856.

9. **Bänninger P, Altorfer J, Frösner GG, Pirovino M, Gudat F, Bianchi L, Grob PJ y col.** Prevalence and significance of anti-HBcIgM (radioimmunoassay) in acute and chronic hepatitis B and blood donors. *Hepatology* 1983; 3:337-342.
10. **Barker LF, Chisari FV, McGarth PP, Dalgard DW, Kirschstein RL.** Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees. *J Inf Dis* 1973; 127:648-662.
11. **Belli L, Dusheiko G, Rolles K, Burroughs AK.** Liver transplantation for chronic viral hepatitis. *Ital J Gastroenterol* 1991; 23:36-41.
12. **Bergmann KF, Gerin JL.** Antigens of hepatitis delta virus in the liver and serum of humans and animals. *J Infect Dis* 1986; 514:702-705.
13. **Berninger M, Hammer M, Hoyer B, Gerin JL.** An assay for the detection of the DNA genome of hepatitis B virus in serum. *J Med Virol* 1982; 9:57-68.
14. **Bianchi L, Spichin HP, Gudat F:** Chronic hepatitis. Pathology of the liver. MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ eds. Edinburgh, Churchill Livingstone. 1987; 310-341.
15. **Bird GLA, Smith H, Portmann B, Alexander GJM, Williams R.** Acute liver descompensation on Withdrawal of cytotoxic chemotherapy and immunosuppressive therapy in hepatitis B carriers. *Q J Med* 1989; 73:895-902.
16. **Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S.** A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965; 191:541-546.

17. **Blumhardt G, Neuhaus P, Bechstein WO, Steffen R, Hopf U, Möller B, Raakow R, y col.** Liver transplantation in HBsAg positive patients. *Transplant Proc* 1990; 22:1517-1518.
18. **Bonino F, Hoyer B, Nelson J, Engle V, Gerin J.** 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. **Bonino F, Negro F, Brunetto MR, Verme G.** Hepatitis delta virus infection. In: *Progress in liver disease*; Popper H, Schaffner F eds., WB Saunders Company, 1990:485-496.
20. **Boyer JL, Klatskin G.** Pattern of necrosis in acute viral hepatitis. Prognostic value of bridging (subacute hepatic necrosis). *N Engl J Med* 1970; 283:1063-1071.
21. **Bras G, Brandt KH.** Vascular disorders. In: *Mac Sween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, eds. Pathology of the liver.* 2nd ed. New York. NY: Churchill Livingstone Inc; 1987:478-502.
22. **Brechot C, Hadchouel M, Scotto J, Fonck M, Potet F, Vyas GN, Tiollais P.** State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with hepatitis B surface antigen-positive and -negative liver diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:3906-3910.
23. **Brechot C, Lugassy C, Dejean A, Pontisso P, Thiers V, Berthelot P, Tiollais P.** Hepatitis B virus DNA in infected human tissues. In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*, edited by Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH. NY: Grune and Stratton; 1984:395.

24. Brechot C, Bernuau J, Thiers V, Dubois F, Goudeau A, Rueff B, Tiollais P, y col. Multiplication of hepatitis B virus in fulminant hepatitis B. Br Med J 1984; 288:270-271.
25. Buti M, Esteban R, Roggendorf M, Fernandez J, Jardí R, Rashed R, Allende H, y col. Hepatitis D virus RNA in acute delta infection: serological profile and correlation with other markers of hepatitis D virus infection. Hepatology 1988; 8:1125-1129.
26. Buti M, Esteban R, Jardí R, Rodríguez-Frías F, Casacuberta J, Esteban JI, Allende E, y col. Chronic delta hepatitis: detection of hepatitis delta virus antigen in serum by immunoblot and correlation with other markers of delta viral replication. Hepatology 1989; 10:907-910.
27. Calne RY, Rolles K, White DJG, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, y col. Cyclosporine A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases and 2 livers. Lancet 1979; 2:1033-1036.
28. Calne RY. Diagnosis of rejection. In: Calne RY, ed. Liver transplantation. 2ªed. Orlando, Grune & Stratton, Inc., 1987:301-302.
29. Carey WD, Tuthill R, Winkelmann E, Vogt D, Broughan T. Clinical and pathological sequelae of orthotopic liver transplantation in chronic B hepatitis. In: Viral hepatitis and liver disease. Zuckerman AJ, ed. New York: Alan R. Liss, 1988; 801-807.

30. **Carey W, Pimentel R, Westveer MK, Vogt D, Broughan T.** Failure of hepatitis B immunization in liver transplant recipients: Results of a prospective trial. *Am J Gastroenterol* 1990; 85:1590-1592.
31. **Chau KH, Hargie MP, Decker RH, Mushahwar IK, Overby LR.** Serodiagnosis of recent hepatitis B infection by IgM class anti-HBc. *Hepatology* 1983; 3:142-149.
32. **Chen ML, Shieh YSC, Shim KS, Gerber MA.** Comparative studies on the detection of hepatitis B virus DNA in frozen and paraffin sections by the polimerase chain reaction. *Modern Pathol* 1991; 4:555-558
33. **Chisari FV, Filippi P, Buras J, McLachlan A, Popper H, Pinkert CA, Palmiter RD y col.** Structural and pathological effects of syntesis of hepatitis B virus large envelope polipeptide in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6909-6913.
34. **Chu CM, Karayiannis P, Fowler MJF, Monjardino J, Liaw YF, Thomas H.** Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan. Studies of hepatitis B virus DNA in serum. *Hepatology* 1985; 5:431-434.
35. **Chu CM, Liaw YF.** Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigens in chronic hepatitis B virus infection. Hepatocyte with cytoplasmic/membranous hepatitis B core antigen as a possible target for immune hepatocytolysis. *Gastroenterology* 1987; 92:220-225.
36. **Colina F, Mollejo M, Moreno E, Alberti N, García I, Gómez-Sanz R, Castellano G.** Effectiveness of histopathological diagnoses in disfunction of hepatic transplantation. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115:998-1005.

37. **Colina F.** The role of histopathology in hepatic transplantation. *Sem Diag Pathol* 1992; 9:200-209.
38. **Colina F, Mollejo M, Alberti A, Marchall T, Jucá NT, Fiaño C.** Histopatología y trasplante hepático. *Gastroenterología y Hepatología* 1992; 15:108-114.
39. **Colledan M, Gislou M, Doglia M, Fassati LR, Ferla G, Gridelli B, Rossi G, y col.** Liver transplantation in patients with B viral hepatitis and delta infection. *Transplant Proc* 1987; 19:4073-4076.
40. **Colledan M, Grendele M, Gridelli B, Rossi G, Fassati LR, Ferla G, Doglia M, y col.** Long-term results after liver transplantation in B and delta hepatitis. *Transplant Proc* 1989; 21:2421-2423.
41. **Colombo P, Di Blasi F, Magrin S, Fabiano C, Di Marco V, D'Amelio L, Lojacono F, y col.** Smouldering hepatitis B virus replication in patients with chronic liver disease and hepatitis delta virus superinfection. *J Hepatol* 1991; 12:64-69.
42. **Corman JL, Putman CW, Iwatsuki S, Redeker AG, Porter KA, Peters RL, Schröter G, y col.** Liver allograft. Its use in chronic active hepatitis with macronodular cirrhosis, hepatitis B surface antigen. *Arch Surg* 1979; 114:75-78.
43. **Czisari FB, Klopchin K, Moryama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Fell S, Pinkert CA, y col.** Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989; 59:1145-1156.
44. **Dane DS, Cameron CH, Briggs M.** Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1:695-698.

45. **Davies SE, Portmann B, O'Grady JG, Alexander GJM, Williams R.** Can hepatitis D virus infection following liver transplantation be non-cytopathic?. (Abstract) *Hepatology* **1990**; 12:399.
46. **Davies SE, Portmann BC, O'Grady JG, Aldis PM, Chaggar K, Alexander GJM, Williams R.** Hepatic histological findings after transplantation for chronic hepatitis B virus infection, including a unique pattern of fibrosing cholestatic hepatitis. *Hepatology* **1991**; 13:150-157.
47. **Davis GL, Hoofnagle JH.** Interferon in viral hepatitis: role in pathogenesis and treatment. *Hepatology* **1986**; 6:1038-1041.
48. **Davison F, Alexander GJM, Trowbridge R, Fagan EA, Williams R.** Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes, of chronic HBsAg carriers: a lack of relation-ship with serum markers of replication. *J Hepatol* **1987**; 4:37-44.
49. **Degos F, Marcellin P, Benhamou JP.** Traitement de l'hépatite chronique active due à l'infection par le virus de l'hépatite B. *Gastroenterol Clin Biol* **1988**; 12:845-854.
50. **Degos F, Lugassy C, Degott C, Debure A, Carnot F, Thiers V, Tiollais P, y col.** Hepatitis B virus and hepatitis B-related viral infection in renal transplant recipients. A prospective study of 90 patients. *Gastroenterology* **1988**; 94:151-156.
51. **Deinhart F.** Predictive value of markers of hepatitis virus infection. *J Inf Dis* **1980**; 141:299-305.

52. Demetris AJ, Lasky S, Van Thiel DH, Starlz TE, Dekker A: Pathology of hepatic transplantation. A review of 62 adult allograft recipients immunosuppressed with a cyclosporine steroid regimen. *Am J Pathol* 1985; 118: 151-161.
53. Demetris AJ, Jaffe R, Sheahan DG, Burnham J, Spero J, Iwatsuki S, Van Thiel DH, y col. Recurrent hepatitis B in liver allograft recipients. Differentiation between viral hepatitis B and rejection. *Am J Pathol* 1986; 125:161-172.
54. Demetris AJ, Todo S, Van Thiel DH, Fung JJ, Iwaki Y, Sysyn G, Ming W, y col. Evolution of hepatitis B virus liver disease after hepatic replacement. Practical and theoretical considerations. *Am J Pathol* 1990; 137:667-676.
55. Desmet VJ. Cholestasis: extrahepatic obstruction and secondary biliary cirrhosis. In: Mac Sween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, eds. *Pathology of the Liver*. 2nd ed. New York, NY: Churchill Livingstone Inc; 1987:364-423.
56. Di Bisceglie AM, Negro F. Diagnosis of hepatitis delta virus infection. *Hepatology* 1989; 10:1014-1016.
57. The ACG Committee on FDA-related matters under the primary authorship of AM Di Bisceglie and JH Hoofnagle. Antiviral therapy of chronic viral hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1990; 85:650-654.
58. Dienstag JL. Acute hepatitis. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. Brawnwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB and Fauci AS eds. McGraw-Hill Book Company; New York. 1987: 1325-1338.

59. **Dienstag JL.** Renal transplantation and hepatitis B. *Gastroenterology* **1988**; 94:235-238.
60. **Doffoel M, Vetter D, Wolf P.** Peut-on évaluer le risque de récurrence de la maladie initiale après transplantation hépatique?. *Gastroenterol Clin Biol* **1989**; 13:963-966.
61. **Dousset B, Calmus Y, Merrigi F, Houssin D.** Récurrence de la maladie initiale après transplantation hépatique. *Gastroenterol Clin Biol* **1989**, 13:984-996.
62. **Dusheiko G, Song E, Bowyer S, Whitcutt M, Maier G, Meyers A, Kew MC.** Natural history of hepatitis B virus infection in renal transplant recipients\_a fifteen year follow-up. *Hepatology* **1983**; 3:330-336.
63. **Edwards MS.** Hepatitis B serology: Help in interpretation. *Pediatr Clin North Am* **1988**; 35:503-515.
64. **Emond JC, Aran PP, Whittington PF, Broelsch CE, Baker AL.** Liver transplantation in the management of fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* **1989**; 96: 1583-1588.
65. **Esteban JI, González A, Hernández JM, Viladomiu L, Sanchez C, Lopez-Talavera JC, Lucea D y col.** Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion associated hepatitis. *N Engl J Med* **1990**; 323:1107-1112.
66. **Farci P, Smedile A, Lavarini C, Piantino P, Crivelli O, Caporaso N, Toti M, y col.** Delta hepatitis in inapparent carriers of hepatitis B surface antigen. *Gastroenterology* **1983**; 85:669-673.

67. **Farci P, Karayiannis P, Brook MG, Smedile A, Lai ME, Balestrieri A, Saldanha JA, y col.** Treatment of chronic hepatitis delta virus (HDV) infection with human lymphoblastoid alpha interferon. *Q J Med* **1989**; 73:1045-1054.
68. **Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller RH, Shih JW, Jett B, Purcell RH.** A long term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* **1991**; 325:98-104.
69. **Feray C, Zignego AL, Samuel D, Bismuth A, Reynès M, Tiollais P, Bismuth H, y col.** Persistent hepatitis B virus infection of mononuclear blood cells without concomitant liver infection. *Transplantation* **1990**; 49:1155-1158.
70. **Ferla G, Colledan M, Doglia M, Fassati LR, Gislou M, Gridelli B, Rossi G, y col.** B hepatitis and liver transplantation. *Transplant Proc* **1988**; 20 (Suppl 1):566-569.
71. **Franca STM, Kiyosawa K, Imai Y, Sodeyama T, Hayata T, Nakano Y, Nakamura M y col.** Change of intrahepatic expression of hepatitis-B core antigen during the clinical course of type-B chronic hepatitis. *Scand J Gastroenterol* **1989**; 24:454-460.
72. **Freeman RB, Sanchez H, Lewis WD, Sherburne B, Dzik WH, Khettry U, Hing S, y col.** Serologic and DNA follow-up data from HBsAg-positive patients treated with orthotopic liver transplantation. *Transplantation* **1991**; 51:793-797.
73. **Gerber MA, Thung SN.** Biology of disease. Molecular and cellular pathology of hepatitis B. *Lav Invest* **1985**; 52:572-590.

74. **Gerber MA, Thung SW.** The diagnostic value of immunohistochemical demonstration of hepatitis viral antigens in the liver. *Hum Pathol* **1987**; 18:771-774.
75. **Gerlich WH, Lüer W, Thomssen R and the Study Group of Viral hepatitis of the Deutsche Forschungsgemeinschaft.** Diagnosis of acute and inapparent hepatitis B virus infections by measurement of IgM antibody to hepatitis B core antigen. *J Inf Dis* **1980**; 142:95-101.
76. **Gerlich W, Robinson WS.** Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* **1980**; 21:801-809.
77. **Gimson AE, Tedder RS, White YS, Eddleston ALWF, Williams R.** Serological markers in fulminant hepatitis B. *Gut* **1983**; 24:615-617.
78. **Glenn JS, Taylor JM, White JM.** In vitro-synthesized hepatitis delta virus RNA initiates genome replication in cultured cells. *J Virol* **1990**; 64:3104-3107.
79. **Govindarajan S, Lim B, Peters RL.** Immunohistochemical localization of the delta antigen associated with hepatitis B virus in liver biopsy sections embedded in araldite. *Histopathology* **1984**; 8:63-67.
80. **Govindarajan S, Fong T-L, Valinluck B, Edwards V, Redeker AG.** Markers of viral replication in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Am J Clin Pathol* **1988**; 89:233-237.
81. **Gowans EJ, Burrell CJ, Jilbert AR, Marmion BP.** Detection of hepatitis B virus DNA sequences in infected hepatocytes by in situ hybridization. *J Med Virol* **1981**; 8:67-78.

82. Grody WW, Cheng L, Lewin KJ. In situ viral DNA hybridization in diagnostic surgical pathology. Hum Pathol 1987; 18:535-543.
83. Grond J, Gouw ASH, Poppema S, Slooff MJH, Gips CH. Chronic rejection in liver transplants: a histopathologic analysis of failed grafts and antecedent serial biopsies. Transplant Proc 1986; 18 (Suppl 4):128-135.
84. Gudat F, Bianchi L, Sonnabend W, Thiel G, Aenishanslin W, Stalder GA. Pattern of core and surface expression in liver tissue reflects state of specific immune response in hepatitis B. Lab Invest 1975; 32:1-9.
85. Gudat F, Bianchi L. Evidence for biphasic sequences in nuclear HBcAg formation and cell membrane directed flow of core particles in chronic hepatitis B. Gastroenterology 1977; 73:1194-1197.
86. Hadziyannis SJ, Lieberman HM, Karvountzis GG, Shafritz DA. Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. Hepatology 1983; 3: 656-662.
87. Hadziyannis SJ, Sherman M, Lieberman HM, Shafritz DA. Liver disease activity and hepatitis B virus replication in chronic delta antigen-positive hepatitis B virus carriers. Hepatology 1985; 5:544-547.
88. Hanson CA, Sutherland DE, Snover DC. Fulminant hepatic failure in an HBsAg carrier renal transplant patient following cessation of immunosuppressive therapy. Transplantation 1985; 39:311-312.

89. **Harnett JD, Zeldis JB, Parfrey PS, Kennedy M, Sircar R, Steinmann TI, Guttman RD.** Hepatitis B disease in dialysis and transplant patients. *Transplantation* **1987**; 44:369-376.
90. **Hart J, Busuttil RW, Lewin KJ.** Disease recurrence following liver transplantation. *Am J Surg Pathol* **1990**; 14 (Suppl 1):79-91.
91. **Hobbs KEF.** Liver transplantation. A review. *J Hepatol* **1987**; 4:148-153.
92. **Hoofnagle JH.** Specific IgM and IgG antibody responses during type B hepatitis. In: Berk PD, Chalmers TC, eds. *Frontiers in liver disease*. New York: Thieme-Stratton, **1981**: 208-212.
93. **Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Schafer DF, Schafer D, Jones EA, Micetich KC, Young RC y col.** Reactivation of chronic hepatitis B virus infection by cancer chemotherapy. *Ann Intern Med* **1982**; 96:447-449.
94. **Hoofnagle JH, Hanson RG, Minuk GY, Pappas SC, Schafer DF, Dusheiko GM, Straus SE, y col.** Randomized controlled trial of adenine arabinoside monophosphate for chronic type B hepatitis. *Gastroenterology* **1984**; 86:150-157.
95. **Hoofnagle JH, Shafritz DA, Popper H.** Chronic type B hepatitis and the "healthy" HBsAg carrier state. *Hepatology* **1987**.; 7:758-763.
96. **Hoofnagle JH, Peters M, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Hallahan C, y col.** Randomized, controlled trial of recombinant human alpha interferon in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **1988**; 95:1318-1325.

97. **Hoofnagle JH.** Type D (Delta) hepatitis. *JAMA* **1989**; 261: 1321-1325.
98. **Hopf U, Neuhaus P, Lobeck H, König V, Küther S, Bauditz J, Bechstein WO, y col.** Follow-up of recurrent hepatitis B and delta infection in liver allograft recipients after treatment with recombinant interferon-alpha. *J Hepatol* **1991**; 13:339-346.
99. **Hsu SM, Raine L, Fanger H.** Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* **1981**; 29:577-580.
100. **Hsu HC, Lin WSJ, Tsai MJ.** Hepatitis B surface antigen and hepatocellular carcinoma in Taiwan: with special reference to its types and localization in tumor cells. *Cancer* **1983**; 52:1825-1832.
101. **Hsu HC, Su IJ, Lai MY, Chen DS, Chang MH, Chuang SM, Sung JL.** Biologic and prognostic significance of hepatocyte hepatitis B core antigen expressions in the natural course of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* **1987**; 5:45-50.
102. **Hsu HC, Lai MY, Su IJ, Chen DS, Chang MH, Yang PM, Wu CY, y col.** Correlation of hepatocyte HBsAg expression with virus replication and liver pathology. *Hepatology* **1988**; 8:749-754.
103. **Hsu HC, Lin YH, Chang MH, Su IJ, Chen DS.** Pathology of chronic hepatitis B virus infection in children: with special reference to the intrahepatic expression of the hepatitis B virus antigens. *Hepatology* **1988**; 8:378-382.

104. **Huang S-N, Neurath AR.** Immunohistologic demonstration of hepatitis B viral antigens in liver with reference to its significance in liver injury. *Lav Invest* 1979; 40:1-17.
105. **Huang S-N.** Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Lav Invest* 1985; 33:88-95.
106. **Huang CC, Lai MK, Fong MT.** Hepatitis B liver disease in cyclosporine-treated renal allograft recipients. *Transplantation* 1990, 49:540-544.
107. **International Group.** Acute and chronic hepatitis revisited. *Lancet* 1977; 2:914-919.
108. **Ishak KG.** Light microscopic morphology of viral hepatitis. *Am J Clin Pathol* 1976; 65:787-827.
109. **Iwatsuki S, Esquivel CO, Gordon RD, Shaw BW, Starzl TE, Shade RR, Van Thiel DH.** Liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Semin Liver Dis* 1985; 5:325-328.
110. **Jacobson IM, Dienstag JL.** The delta hepatitis agent: "Viral hepatitis, type D". *Gastroenterology* 1984; 86:1614-1617.
111. **Kahan BD, Flechner SM, Lorber MI, Jensen C, Golden D, Van Buren CT.** Complications of cyclosporin therapy. *World J Surg* 1986; 10:348-360.
112. **Kaplan PM, Greenman RLO, Gerin JL, Purcell RH, Robinson WS.** DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* 1973; 12:995-1005.

113. Keller GH, Huang D-P, Shih W-K, Manak MM. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction amplification and microtiter sandwich hybridization. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1411-1416.
114. Kojima T, Callea F, Desmyter J, Sakurai I, Desmet VJ. Immuno-light and electron microscopic features of chronic hepatitis D. *Liver* 1990; 10:17-27.
115. Kovarik J, Mayer G, Ponanka E, Scharz M, Trainol O, Graf H, Smolen J: Adverse effect of low-dose prophylactic human recombinant leukocyte interferon-alpha treatment in renal transplant recipients. *Transplantation* 1988; 45:402-405.
116. Kramer P, Tenkate FWJ, Bijnen AB, Jeekel J, Weimar W. Recombinant leukocyte interferon A induces steroid-resistant acute vascular rejection episodes in renal transplant recipients. *Lancet* 1984; i:989-990.
117. Krugman S, Giles JP. Viral hepatitis: new light on an old disease. *JAMA* 1970; 212:1019-1029.
118. Krugman S, Overby LR, Mushahwar IK, Ling CM, Frösner GG, Deinhardt F. Viral hepatitis type B: studies on natural history and prevention reexamined. *N Engl Med J* 1979; 300:101-111.
119. Kuo MYP, Chao M, Taylor J. Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA:role of delta antigen. *J Virol* 1989; 63:1945-1950.
120. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, y col. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244:362-364.

121. Lake JR, Wright TL. Liver transplantation for patients with hepatitis B: What have we learned from our results?. *Hepatology* 1991; 13:796-799.
122. 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.
123. Lauchart W, Müller R, Pichlmayr R. Immunoprophylaxis of hepatitis B virus reinfection in recipients of human liver allografts. *Transplant Proc* 1987; 19:2387-2389.
124. Lauchart W, Müller R, Pichlmayr R. Long-term immunoprophylaxis of hepatitis B virus reinfection in recipients of human liver allografts. *Transplant Proc* 1987; 19:4051-4053.
125. Lautz HU, Müller R, Wittekind C, Mauz S, Barg-Hock H, Ringe B, Pichlmayr R, y col. Unusually rapid development of a HBsAg-positive liver cirrhosis after liver transplantation. *Klin Wochenschr* 1989; 67:1061-1065.
126. Lavine JE, Lake JR, Ascher NL, Ferrell LD, Ganem D, Wright TL. Persistent hepatitis B virus following interferon alfa therapy and liver transplantation. *Gastroenterology* 1991; 100:263-267.
127. Lefkowitz JH. Bile ductular cholestasis: an ominous histopathologic sign related to sepsis and "cholangitis lenta". *Hum Pathol* 1982; 13:19-24.
128. Lefkowitz JH, Goldstein H, Yatto R, Gerber MA. Cytopathic liver injury in acute delta virus hepatitis. *Gastroenterology* 1987; 92:1262-1266.

129. **Lemon SM, Hoofnagle JH.** IgM antibody to hepatitis B core antigen in patients with chronic type B hepatitis. In: Szmuness W, Alter HJ, Maynard JE, eds. Viral hepatitis. 1981 International Symposium. Philadelphia: Franklin Institute Press, 1981; 723-724.
130. **Lever AML.** Mechanisms of virally induced liver damage. *J Hepatol* 1987; 4:399-403.
131. **Levy GA, Sherker A, Fung LS, Greig PD, Sherman M, Blendis LM.** Relevance of hepatitis B viral DNA in assessment of potential liver allograft recipients. *Transplant Proc* 1989; 21:3333-3334.
132. **Maddrey WC, Friedman LS, Munoz SJ, Hahn EG.** Selection of the patient for liver transplantation and timing of surgery. In: *Transplantation of the liver*, Maddrey WC ed. NY, Elsevier 1988; 23-58.
133. **Maggi G, Alberti A, Bettale G, De Carlis L, Del Favero E, Minola E, Rizzi P, y col.** Hepatitis B (HBV) and delta (HDV) virus reinfection in liver transplantation. (Abstract) *Hepatology* 1990; 12:1017.
134. **Manake K, Yamada G, Nagashima H.** Immunohistochemical study of HLA class I antigens on the hepatocytes of patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterol Jpn* 1986; 21:357-364.
135. **Marinucci G, Valeri L, Di Giacomo C, Morganti D, Chieco S, Rossi M, Alfani D, y col.** Is delta infection an aggravating factor in liver allograft recipients?. *Transplant Proc* 1985; 17 (Suppl 2):125-126.

136. **Marinucci G, Valeri L, Alfani D, Rossi M, Di Giacomo C, Cortesini R.** Delta infection and liver disease recurrence in hepatic allografts. *Transplant Proc* **1986**; 18:1402-1404.
137. **Martin P, Friedman LS.** Recurrent hepatitis B in liver transplant recipients-no easy answers. *Gastroenterology* **1991**; 101:1131-1133.
138. **Martin P, Muñoz SJ, Di Bisceglie AM, Rubin R, Waggoner JG, Armenti V, Moritz MJ, y col.** Recurrence of hepatitis C virus infection after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* **1991**; 13:719-721.
139. **Masson WS, Taylor JM.** Experimental systems for the study of hepadnavirus and hepatitis delta virus infections. *Hepatology* **1989**; 9:635-645.
140. **Masson WS, Taylor JM.** Liver transplantation: A model for the transmission of hepatitis delta virus. *Gastroenterology* **1991**; 101:1741-1743.
141. **Maynard JE.** Hepatitis B: global importance and need of control. *Vaccine* **1990**; 8:S18-S20.
142. **McCaughan GW, Gallagher ND, Parsons C, Painter D, Thompson JF, Sheil AGR.** Hepatic transplantation for hepatitis B-associated liver disease. *Transplant Proc* **1992**; 24:194-195.
143. **Millard PR, Herbertson BM, Evans DB, Calne RY.** Azathioprine hepatotoxicity in renal transplantation. *Transplantation* **1973**; 5:527-530.
144. **Mills CT, Perrillo R.** Relationship between histology, aminotransferase levels, and viral replication in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **1990**; 99:519-524.

145. Mondelli M, Naumov N, Eddleston ALWF. The immunopathogenesis of liver cell damage in chronic hepatitis B virus infection. *Advances in Hepatitis Research*. FV Chisari ed. NY, Masson USA; 1984:144-151.
146. Montaña L, Aranguibel F, Boffill M, Goodall AH, Janossy G, Thomas HC. An analysis of the composition of the inflammatory infiltrate in autoimmune and hepatitis B virus-induced chronic liver disease. *Hepatology* 1983; 3:292-296.
147. Mora NP, Klintmalm GB, Poplawski SS, Cofer JB, Husberg BS, Gonwa TA, Goldstein RM. Recurrence of hepatitis B after liver transplantation: Does hepatitis-B-immunoglobulin modify the recurrent disease?. *Transplant Proc* 1990; 22:1549-1550.
148. Moreno Gonzalez E, Landa García I, Calleja Kempin J, Gómez Gutiérrez J, Jover Navalón JM, Arias Díaz J, Riaño D, y col. Resultados del homotrasplante ortotópico clínico de hígado. Valoración de 15 injertos. *Cirugía Española* 1987; 13:925-945.
149. Moreno González E, Landa García JI, Calleja Kempin J, Gómez Gutiérrez M, Jover Navalón JR, Arias Díaz J, Riaño D, y col. Utilización de la arteria hepática derecha del receptor en la reconstrucción arterial del trasplante hepático clínico. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1988; 73:315-321.
150. Moreno González E, Perez-Cerdá F, Calleja Kempin J, Landa García I, Gómez Gutiérrez M, Jover Navalón JM, Riaño Carrera D, y col. Valoración de la estrategia quirúrgica como factor clave de los resultados postoperatorios del trasplante hepático. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1988; 74:499-503.

151. **Moreno González E, García García I, González Pinto I, Gómez Sanz R, Loinaz Seguro C, Riaño Carrera D, Bercedo Martínez J, y col.** Trasplante hepático ortotópico: Resultados del Hospital "12 de Octubre". *Rev Esp Enf Digest* 1990; 78:295-302.
152. **Müller R, Gubernatis G, Farle M, Niehoff G, Klein H, Wittekind C, Tusch G, y col.** Liver transplantation in HBs antigen (HBsAg) carriers. Prevention of hepatitis B virus (HBV) recurrence by passive immunization. *J Hepatol* 1991; 13:90-96.
153. **Nakhleh RE, Schwarzenberg SJ, Bloomer J, Payne W, Snover DC.** The pathology of liver allografts surviving longer than one year. *Hepatology* 1990; 11:465-470.
154. **Naoumov NV, Portmann BC, Tedder RS, Ferns B, Eddleston ALWF, Alexander GJM, Williams R.** Detection of hepatitis B virus antigens in liver tissue. A relation to viral replication and histology in chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology* 1990; 99:1248-1253.
155. **Negro F, Chiaberge E, Oliviero S, Hammer M, Berninger M, Canese MG, Bonino F.** Hepatitis B virus DNA (HBV-DNA) in anti-HBe positive sera. *Liver* 1984; 4:177-183.
156. **Negro F, Bonino F, Di Bisceglie A, Hoofnagle JH, Gerin L.** Intrahepatic markers of hepatitis delta virus infection: a study by in situ hybridization. *Hepatology* 1989; 10:916-920.
157. **Neuhaus P, Steffen R, Blumhardt G, Bechstein W, Keck H, Lemmens HP, Neuhaus R y col.** Experience with immunoprophylaxis and interferon therapy after liver transplantation in HBsAg positive patients. *Transplant Proc* 1991; 23:1522-1524.

158. **Nicholson KG.** Hepatitis delta infections. *Br Med J* 1985; 190:1370-1371.
159. **Nowoslowski A, Madalinski K, Brzosko W, Krawczynski K.** Cellular localisation of australia antigen in the liver of patients with the lymphoproliferative disorders. *Lancet* 1970; 7:494-498.
160. **O'Grady JG, Williams R.** Liver transplantation for viral hepatitis. *Br Med Bull* 1990; 46:481-491.
161. **O'Grady JG, Smith HM, Davies SE, Daniels HM, Donaldson PT, Tan KC, Portmann B, y col.** Hepatitis B virus reinfection after orthotopic liver transplantation. Serological and clinical implications. *J Hepatol* 1992; 14:104-111.
162. **Ottobrelli A, Marzano A, Smedile A, Recchia S, Salizzoni M, Cornu C, Lamy ME, y col.** Patterns of hepatitis delta virus reinfection and disease in liver transplantation. *Gastroenterology* 1991; 101: 1649-1655.
163. **Parfrey PS, Forbes RDC, Hutchinson TA, Beaudoin JG, Dauphinee WD, Hollomby DJ, Guttmann RD.** The clinical and pathological course of hepatitis B liver disease in renal transplant recipients. *Transplantation* 1984; 37:461-466.
164. **Parfrey PS, Forbes RDC, Hutchinson TA, Kenick S, Farge D, Dauphinee WD, Seely JF, y col.** The impact of renal transplantation on the course of hepatitis B liver disease. *Transplantation* 1985; 39:610-615.
165. **Paz MOA, Brenes F, Karayiannis P, Yowett TP, Sheuer PJ, Thomas HC.** Chronic hepatitis B virus infection and patterns of inflammatory activity: serological, clinical

- and histological correlations. *J Hepatol* **1986**; 3:371-377.
166. Peleman RR, Gavaler JS, Van Thiel DH, Esquivel C, Gordon R, Iwatsuki S, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation for acute and subacute hepatic failure in adults. *Hepatology* **1987**; 7:484-489.
167. Persing DH, Varmus HE, Ganem D. Inhibition of secretion of HBsAg by related pre-surface polypeptide. *Science* **1986**; 234:1388-1391.
168. Phillips MJ, Poucell S. Modern aspects of the morphology of viral hepatitis. *Hum Pathol* **1981**; 12:1060-1084.
169. Phillips MJ, Cameron R, Flowers MA, Blendis LM, Greig PD, Wanless I, Sherman M, y col. Post-transplant recurrent hepatitis B viral liver disease. Viral-burden, steatoviral, and fibroviral hepatitis B. *Am J Pathol* **1992**; 140:1295-1308.
170. Pichlmayr R, Ringe B, Lauchart W, Wonigeit K. Liver transplantation. *Transplant Proc* **1987**; 19:103-112.
171. Pignatelli M, Waters J, Brown D, Lever A, Iwarson S, Schaff Z, Gerety R, y col. HLA class I antigens on the hepatocyte membrane during recovery from acute hepatitis B virus infection and during interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* **1986**; 6:349-353.
172. Pontisso P, Poon MC, Tiollais P, Brechot C. Detection of hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells. *Br Med J* **1984**; 288:1563-1566.

173. **Popper H, Thung SN, Gerber MA, Hadler SC, De Monzon M, Ponzetto A, Anzola E, y col.** Histologic studies of severe delta agent infection in venezuelan indians. *Hepatology* 1983; 3:906-912.
174. **Popper H.** Changing concepts of the evolution of chronic hepatitis and the role of piecemeal necrosis. *Hepatology* 1983; 3:758-762.
175. **Porter KA.** The pathology of rejection in human liver allografts. *Transplant proc* 1988 (Suppl 1):483-485.
176. **Portmann B, O'Grady J, Williams R.** Disease recurrence following orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1986; 18 (suppl 4):136-143.
177. **Poterucha JJ, Rakela J, Ludwig J, Taswell HF, Wiesner RH.** Hepatitis C antibodies in patients with chronic hepatitis of unknown etiology after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23:1495-1497.
178. **Rakela J, Wooten RS, Batts KP, Perkins JD, Taswell HF, Krom RA.** Failure of interferon to prevent recurrent hepatitis B infection in hepatic allograft. *Mayo Clin Proc* 1989; 64:429-432.
179. **Ramalho F, Brunetto MR, Rocca G, Piccari GG, Batista A, Chiaberge E, Lavarini C, y col.** Serum markers of hepatitis B virus replication, liver histology and intrahepatic expression of hepatitis B core antigen. *J Hepatol* 1988; 7:14-20.
180. **Ray MB, Desmet VJ, Bradburne AF, Desmyter J, Fevery J, De Groote J.** Differential distribution of hepatitis B surface antigen and hepatitis B core antigen in the liver of hepatitis B patients. *Gastroenterology* 1976; 71:462-467.

181. Ray MB, Desmet VJ, Fevery J, De Groote J, Bradburne AF, Desmyter J. Distribution patterns of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the liver of hepatitis patients. *J Clin Pathol* 1976; 29:94-100.
182. Ray RA, Lewin KJ, Colonna J, Goldstein LI, Busuttil RW. The role of liver biopsy in evaluating acute allograft dysfunction following liver transplantation: a clinical histologic correlation of 34 transplants. *Hum Pathol* 1988; 19:835-848.
183. Read AE, Donegan E, Lake J, Ferrell L, Galbraith C, Kuramoto IK, Zeldis JB, y col. Hepatitis C in patients undergoing liver transplantation. *Ann Intern Med* 1991; 114:282-284.
184. Read AE, Donegan E, Lake J, Ferrell L, Galbraith C, Kuramoto IK, Zeldis JB, y col. Hepatitis C in liver transplant recipients. *Transplant Proc* 1991; 23:1504-1505.
185. Redeker AG. Delta agent and hepatitis B. *Ann Intern Med* 1983; 98:542-543.
186. Repp R, Mance A, Bertram U, Niemann H, Gerlich WF, Lampert F. Persistent hepatitis B virus replication in mononuclear blood cells as a source of reinfection of liver transplants. *Transplantation* 1991; 52:935.
187. Reynès M, Zignego L, Samuel D, Fabiani B, Gugenheim J, Tricottet V, Brechot C, y col. Graft hepatitis delta virus reinfection after orthotopic liver transplantation in HDV cirrhosis. *Transplant Proc* 1989; 21:2424-2425.

188. Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated with hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 1977; 18:997-1003.
189. Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JWK, Purcell RH, Gerin JL. Delta agent: Association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:6124-6128.
190. Rizzetto M, Canese MG, Gerin JL, London WT, Sly DL, Purcell RH. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J Infect Dis* 1980; 141:590-602.
191. Rizzetto M. The delta agent. *Hepatology* 1983; 3:729-737.
192. Rizzetto M, Verme G, Recchia S, Bonino F, Farci P, Aricò S, Calzia R, y col. Chronic hepatitis in carriers of hepatitis B surface antigen, with intrahepatic expression of delta antigen. *Ann Intern Med* 1983; 98:437-441.
193. Rizzetto M, Verme G. Delta hepatitis-present status. *J Hepatol* 1985; 1:187-193.
194. Rizzetto M, Rosina F, Saracco G, Bellando PC, Actis GC, Bonino F, Smedile A, y col. Treatment of chronic delta hepatitis with alpha-2-recombinant interferon. *J Hepatol* 1986; 3:2295-2305.

195. Rizzetto M, Verme G, Gerin JL, Purcell RH. Hepatitis delta virus disease. In: Progress in liver disease; Popper H, Schaffner F, eds. Philadelphia: Grune & Stratton, 1986; 417-431.
196. Rizzetto M, Macagno S, Chiaberge E, Verme G, Negro F, Marinucci G, Di Giacomo C, y col. Liver transplantation in hepatitis delta virus disease. Lancet 1987; 2:469-471.
197. Rizzetto M, Ponzetto A, Forzani I. Hepatitis delta virus as a global health problem. Vaccine 1990; 8: S10-S14.
198. Rizzetto M, Recchia S, Salizzoni M. Liver transplantation in carriers of the HBsAg. J Hepatol 1991; 13:5-7.
199. Robinson WS, Clayton DA, Greenman RL. DNA of human hepatitis B virus candidate. J Virol 1974; 14:384-391.
200. Robinson WS, Lutwick LI. The virus of hepatitis type B. N Engl J Med 1976; 295; 1232-1236.
201. Robinson WS. Genetic variation among hepatitis B related viruses. Ann New York Acad Sci 1980; 354:371-378.
202. Roingeard P, Romet-Lemonne JL, Leturcq D, Goudeau A, Essex M. Hepatitis B virus core antigen (HBcAg) accumulation in an HBV nonproducer clone of HepG2-transfected cells is associated with cytopathic effect. Virology 1990; 179:113-120.

203. Ruebner BH, Montgomery CK. Hepatic injury produced by infectious agents and miscellaneous diseases. Pathology of the Liver and Biliary Tract. New York, NY: John Wiley & Sons Inc; 1982:60-76.
204. Rustgi V, Hoofnagle JH, Gerin JL, y col. Hepatitis B virus markers in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med 1985; 102:795-797.
205. Sagnelli E, Piccinino F, Manzillo G, Felaco FM, Filippini P, Maio G, Pasquale G, y col. Effect of immunosuppressive therapy on HBsAg-positive chronic active hepatitis in relation to presence or absence of HBeAg and anti-HBe. Hepatology 1983; 3:690-695.
206. Samuel D, Benhamou JP, Bismuth H, Gugenheim J, Ciardullo M, Saliba S. Criteria of selection of liver transplantation. Transplant Proc 1987; 19:2383-2386.
207. Samuel D, Bismuth A, Mathieu D, Arulnaden JL, Reynes M, Benhamou JP, Brechot C, y col. Passive immunoprophylaxis after liver transplantation in HBsAg-positive patients. Lancet 1991; 337:813-815.
208. Samuel D, Bismuth A, Serres C, Arulnaden JL, Reynes M, Benhamou JP, Brechot C, y col. HBV infection after liver transplantation in HBsAg positive patients: experience with long-term immunoprophylaxis. Transplant Proc 1991; 23:1492-1494.
209. Sánchez-Tapias JM, Vilar JH, Costa J, Bruguera M, Ballesta AM, Rodes J. Natural history of chronic persistent hepatitis B. Relationship between hepatitis B virus replication and the course of the disease. J Hepatol 1984; 1:15-27.

210. **Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Parés A, Bruguera M, Rodés J.** Analysis factors predicting early seroconversion to anti-HBe in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* **1988**; 6:15-22.
211. **Scheig R.** Normal hepatic function foiled by HBV infection after liver transplantation. *Am J Gastroenterol* **1990**; 85:1555-1556.
212. **Scheuer PJ.** Cirrhosis. In: *Liver Biopsy Interpretation*. London, England: Baillière Tindall; **1981**: 117-132.
213. **Scheuer PJ.** Vascular disorders. *Liver Biopsy Interpretation*. 4th ed. London, England: Baillière Tindall; **1988**:173-185.
214. **Scullard GH, Smith CI, Merigan TC, Robinson WS, Gregory PB.** Effects of immunosuppressive therapy on viral markers in chronic active hepatitis B. *Gastroenterology* **1981**; 81:987-991.
215. **Shafritz DA, Hadziyannis SJ.** Hepatitis B virus DNA in liver and serum, viral antigens and antibodies, virus replication and liver disease activity in patients with persistent hepatitis B virus infection. In: *Advances in hepatitis research*. Chisari FV ed. NY, Masson publishing USA, Inc. **1984**:80-90.
216. **Sherlock S.** Hepatitis B: The disease. *Vaccine* **1990**; 8 (Suppl):6-9.
217. **Shimizu M, Ohyama M, Takahashi Y, Udo K, Kojima M, Kametani M, Tsuda F, y col.** Immunoglobulin M antibody against hepatitis B core antigen for the diagnosis of fulminant type B hepatitis. *Gastroenterology* **1983**; 84:604-610.

218. Sjogren M, Lemon SM. Low molecular weight IgM antibody to hepatitis B core antigen in chronic hepatitis B virus infection. *J Infect Dis* 1983; 148:445-451.
219. Sjogren M, Hoofnagle JH. Immunoglobulin M antibody to hepatitis B core antigen in patients with chronic type B hepatitis. *Gastroenterology* 1985; 89:252-258.
220. Sjogren MH, Hoofnagle JH, Waggoner JG. Effect of corticosteroid therapy on levels of antibody to hepatitis B core antigen in patients with chronic type B hepatitis. *Hepatology* 1987; 7:582-585.
221. Smedile A, Dentico P, Zanetti A, Sagnelli E, Nordenfelt E, Actis GC, Rizzetto M. Infection with the delta agent in chronic HBsAg carriers. *Gastroenterology* 1981; 81:992-997.
222. Smedile A, Rizzetto M, Denniston K, Bonino F, Wells F, Verme G, Consolo F, y col. Type D hepatitis: the clinical significance of hepatitis D virus RNA in serum as detected by a hybridization-based assay. *Hepatology* 1986; 6:1297-1302.
223. Smedile A, Rosina F, Saracco G, Chiaberge E, Lattore V, Fabiano A, Brunetto R, y col. Hepatitis B virus replication modulates pathogenesis of hepatitis D virus in chronic hepatitis D. *Hepatology* 1991; 13:413-416.
224. Snover DC, Freese DF, Sharp HL, Bloomer JR, Najarian JS, Ascher NL. Liver allograft rejection : an analysis of the use of biopsy in determining outcome of rejection. *Am J Surg Pathol* 1987; 11:1-10.
225. Snover DC. Viral infections. In: Biopsy diagnosis of liver disease. Snover DC ed. Baltimore, Williams Wilkins. 1992; 127-154.

226. Starzl TE, Marchioro TL, Von Kaulla K, y col. Homotransplantation of the liver in humans. Surg Gynecol Obstet 1963; 117:659-676.
227. Starzl TE, Koep LJ, Halgrimson CG, Hood J, Schroter GPJ, Porter KA, Weil IIR. Fifteen years of clinical liver transplantation. Gastroenterology 1979; 77:375-388.
228. Starzl TE, Iwatsuki S, Klintmalm G, Schroter GPJ, Weil R III, Koep LJ, Porter KA, y col. Liver transplantation 1980, with particular reference to cyclosporine A. Transplant Proc 1981; 13:281-285.
229. Starzl TE, Demetris AJ, Van Thiel D. Liver transplantation. N Engl J Med 1989; 321:1014-1922.
230. Steininger R, Muhlbacher F, Langle F, Gnant M, Sautner T, Gotzinger P, Walgram M, y col. Experiences with liver transplantation in hepatitis B antigen positive liver cirrhosis. Wien Klin Wochenschr 1991; 103:573-576.
231. Stieber AC, Iwatsuki S, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation for fulminant and subacute hepatic failure. ASAIO Transactions 1988; 34:959-964.
232. Stöchlín E, Gudat F, Krey G, Durmüller V, Gasser M, Schmidt M, Stalder G. Delta-Antigen in hepatitis B: immunohistology of frozen and paraffin-embedded liver biopsies and relation to HBV infection. Hepatology 1981; 1:238-242.
233. Takahashi K, Akahane Y, Gotanda T, Mishiro T, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Demonstration of hepatitis e antigen in the core of Dane particles. J Immunol 1979; 122:275.

234. Tapp E, Jones DM. HBsAg and HBeAg in the livers of asymptomatic hepatitis B antigen carriers. *J Clin Path* 1977; 30:671-677.
235. Thomas HC, Lever AML, Scully LJ, Pignatelli M. Approaches to the treatment of hepatitis B virus and delta-related liver disease. *Semin Liver Dis* 1986; 6:34-41.
236. Thung SN, Gerber MA, Klion F, Gilbert H. Massive hepatic necrosis after chemotherapy withdrawal in a hepatitis B virus carrier. *Arch Intern Med* 1985; 145:1313-1314.
237. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317:489-495.
238. Todo S, Demetris AJ, Van Thiel D, Teperman L, Fung JJ, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation for patients with hepatitis B virus-related liver disease. *Hepatology* 1991; 13:619-626.
239. Trepo CG, Robert D, Motin J, Trepo D, Sepetjian M, Prince AM. Hepatitis B antigen (HBsAg) and/or antibodies (Anti-HBs and Anti-HBe) in fulminant hepatitis: pathogenic and prognostic significance. *Gut* 1976; 17:10-13.
240. Trepo C, Rizzetto M. Le virus de l'hépatite Delta (VHD): troisième virus des hépatites identifié. *Gastroenterol Clin Biol* 1986; 10:248-254.
241. Van Thiel DH, Gavalier JS, Tarter RE, Starzl TE. Past, present and future of liver transplantation. In: Maddrey WC ed, *Transplantation of the liver*. NY: Elsevier 1988;1-22.

242. Vento S, Hegarty JE, Alberti A, O'Brian CJ, Alexander GJM, Eddleston ALWF, Williams R. T lymphocyte sensitization to HBcAg and T-cell-mediated unresponsiveness to HBsAg in hepatitis B virus-related chronic liver disease. *Hepatology* 1985; 5:192-197.
243. Vento S, Eddleston ALWF. Immunological aspects of chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1987; 68:225-232.
244. Verme G, Rocca G, Rizzi R, Mollo F, David E, Solcia E, Sessa F. Histopathology of chronic delta hepatitis. *Prog Clin Biol Res* 1983; 143: 169-176.
245. Villari D, Raimondo G, Smedile V, Rodinó G, Brancatelli S, Longo G, Squadrito G, y col. Hepatitis B-DNA replication and histological patterns in liver biopsy specimens of chronic HBsAg positive patients with and without hepatitis delta virus superinfection. *J Clin Pathol* 1989; 42:689-693.
246. Vogel W, Dietze O, Judmaier G, Then P, Schmid TH, Margreiter R. Delayed clearance of HBsAg after transplantation for fulminant delta-hepatitis. [Letter] *Lancet* 1988; 2:52.
247. Weller IVD, Fowler MJF, Monjardino J, Thomas HC. The detection of HBV DNA in serum by molecular hybridization: A more sensitive method for the detection of complete HBV particles. *J Med Virol* 1982; 9:273-280.
248. White HM, Brunt EM, Regenstein F, Hanto DW, Marsh JW, Peters MG. Effect of alpha-interferon and immune globulin therapy on hepatitis B viral infection in transplanted liver recipients. [Abstract]. *Hepatology* 1990; 12:867.

249. Wiesner RH, Ludwig J, Van Hoek B, Krom RAF. Current concepts in cell-mediated hepatic allograft rejection leading to ductopenia and liver failure. *Hepatology* 1991; 14:721-729.
250. Wight DCG. Differential diagnosis of cholestasis in liver allografts. *Transplant Proc* 1986; 18 (Suppl 4):152-156.
251. Williams JW, Vera S, Peters TG, Van Voorst S, Britt LG, Dean PJ, Haggitt R, y col. Cholestatic jaundice after hepatic transplantation: a nonimmunologically mediated event. *Am J Surg* 1986; 151:65-70.
252. Williams JW. History of liver transplantation. In: Williams JW ed; *Hepatic Transplantation*. WB Saunders Company 1990; 2-10.
253. Wright HI, Gavalier JS, Van Thiel DH. Preliminary experience with alpha-2b-interferon therapy of viral hepatitis in liver allograft recipients. *Transplantation* 1992; 53:121-124.
254. Wu TT, Hsu HC, Chen DS, Sheu JC, Su IJ, Chen SL, Chuang SM. Clearance of hepatitis B surface antigen (HBsAg) after surgical resection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1987; 4:45-51.
255. Wu JC, Lee SD, Govindarajan S, Kung TW, Tsai YT, Lo KJ, Ting LP. Correlation of serum delta RNA with clinical course of acute hepatitis delta virus superinfection in Taiwan: a longitudinal study. *J Infect Dis* 1990; 161:1116-1120.

256. Yamada G, Nakane PK. Hepatitis B core and surface antigens in liver tissue. Light and electron microscopic localization by the peroxidase-labeled antibody method. *Lav Invest* 1977; 36:649-659.
257. Yamada G, Feinberg LE, Nakane PK. Hepatitis B. Cytologic localization of virus antigens and the role of the immune response. *Hum Pathol* 1978; 9:93-109.
258. Yoffe B, Burns DK, Bhatt HS, Donegan E, Ferrell L, Ascher WL, Roberts JP, y col. Extrahepatic hepatitis B virus DNA sequences in patients with acute hepatitis B infection. *Hepatology* 1990; 12:187-192.
259. Yoffe B, Noonan CA. Hepatitis B virus. New and evolving issues. *Dig Dis Sci* 1992; 37:1-9.
260. Zignego AL, Samuel D, Gugenheim J, y col. Hepatitis B virus replication and mononuclear blood cell infection after liver transplantation. In: Zuckerman AJ, ed. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. NY: Alan R. Liss, 1988; 808-809.