

MARCADORES DO VÍRUS DA HEPATITE B EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO⁺

Raymundo PARANÁ, Helma Pinchemel COTRIM, Eduardo MOTTA, Ana CARNEIRO, Luiz FREITAS e Luiz Guilherme Costa LYRA

ARQGAF/643

Paraná R, Cotrim HP, Motta E, Carneiro A, Freitas L, Lyra LGC. Marcadores do vírus da hepatite B em células mononucleares do sangue periférico. *Arq Gastroenterol*. São Paulo, 29(4):122-127, 1992.

RESUMO - Foram estudados 69 pacientes com hepatopatia crônica, todos com avaliação histológica e 10 pacientes vacinados para o vírus da hepatite B (VHB). Foram determinados os seguintes marcadores: 1) soro: AgHBs, AgHBe, anti-HBe, anti-HBc total, anti-HBs, anti-HCV, VHB-DNA; 2) lisado de células mononucleares do sangue periférico (MN): AgHBs, AgHBe; 3) tecido hepático: AgHBs, AgHBe. Foram divididos quatro grupos de acordo com a sorologia. Grupo I - pacientes AgHBs positivos (n=25). Em 19 (76%) observou-se AgHBs no lisado de MN. O AgHBe nos MN foi detectado em oito (32%), todos com evidência de replicação viral (presença de AgHBe e/ou HBV-DNA no soro/AgHBe no tecido). Grupo II - pacientes anti-HBc total/anti-HBs positivo (n=14), encontrou-se AgHBs em cinco (36%) e AgHBe em um (7,1%). No paciente positivo para AgHBe em MN, encontrou-se marcadores de replicação no soro e no tecido (VHB-DNA, AgHBe). Dos nove pacientes anti-HBs positivos, três tinham AgHBs nos MN. Grupo III - pacientes seronegativos para VHB. O AgHBs estava presente nos MN em dois (6,6%), porém o AgHBe estava ausente em todos. Havia concomitante presença do AgHBs nos MN e tecido hepático em um caso. Não foram observados marcadores de replicação em nenhum caso. Grupo IV - 10 indivíduos sadios vacinados para VHB. Exceto anti-HBs no soro, nenhum outro marcador do VHB foi encontrado no soro e/ou mononucleares. Os resultados, quanto a utilização dos marcadores de VHB em células MN, sugerem: 1) presença de AgHBs em MN portadores do VHB é evento freqüente, aparentemente sem significado clínico importante; 2) os marcadores do VHB em MN podem apresentar-se como alternativa para o diagnóstico de infecção pelo VHB seronegativo, assim como para aferir a replicação viral; 3) A presença do AgHBs em MN correlacionou-se fortemente com replicação viral demonstrada pelo VHB-DNA no soro e AgHBe no tecido.

UNITERMOS - Antígenos da hepatite B. Anticorpos da hepatite B. Células mononucleares do sangue periférico.

INTRODUÇÃO

Os hepadnavírus, cujo protótipo é o vírus da hepatite B (VHB), são hepatotrópicos capazes de causar hepatite aguda com potencial de evolução para cronicidade⁽⁶⁾. Apesar do hepatotropismo viral, o VHB, assim como os demais hepadnavírus, tem sido encontrado em vários tecidos, indicando a possibilidade de infecção de outras células que não hepatócitos^(3,13).

Mais recentemente, a presença de marcadores do VHB foi demonstrada em células mononucleares do sangue periférico (MN) por vários autores^(1,11,12). Entretanto, o significado clínico deste achado não pode ainda ser esclarecido⁽⁷⁾.

Sabe-se que a maioria dos portadores de VHB apresentam AgHBs em MN, assim como, nos pacientes com replicação viral importante, demonstram-se AgHBe em MN, sugerindo a

⁺ Serviço de Gastro-Hepatologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia - FIOCRUZ - UFBA.
Separatas: Dr. Raymundo Paraná - Serviço de Gastro-Hepatologia - HUPEB-UFBA. - Rua Pe. Feijó, 51 - Canela - 40110-170 - Salvador, BA.

possibilidade de replicação viral nestas células^(1,7,12). O VHB-DNA também foi encontrado em MN de portadores do VIIB em diferentes proporções nos pacientes estudados^(4,11), sem significado clínico evidente.

Este estudo objetiva a observação da prevalência destes marcadores nos MN, de pacientes portadores de doença crônica do fígado associada ao VIIB e de outras etiologias, assim como significado clínico do achado e a comparação com os marcadores tissulares do VIIB.

Pacientes

Sessenta e nove pacientes portadores de doença hepática crônica, 40 homens (média idade 42 anos) e 29 mulheres (média idade 36 anos) com doença hepática comprovada clínica e histologicamente, e 10 pacientes assintomáticos, vacinados para o VHB, quatro homens (média de idade 28 anos) e seis mulheres (média de idade 29 anos).

Dos 79 pacientes, dividiram-se quatro grupos conforme o perfil sorológico e presença de doença hepática:

Grupo I - 25 pacientes AgHBs positivos no soro (sete AgHBe positivos), apresentando evidências de doença hepática crônica.

Grupo II - 14 pacientes AgHBs negativos no soro, porém nove anti-HBc total e anti-HBs positivos, e cinco anti-HBe positivos isoladamente, com evidências de doença hepática crônica.

Grupo III - 30 pacientes seronegativos para todos os marcadores do VHB com evidências de doença hepática crônica.

Grupo IV - 10 indivíduos, sadios, anti-HBs positivo pós vacinação, sem evidências clínico-laboratoriais de doença crônica do fígado, porém vacinados para o VIIB com Engerix-B (SKF), apresentando resposta anti-HBs satisfatória.

Todos os pacientes dos Grupos I, II e III foram submetidos à biópsia hepática (Tabela 1).

MÉTODOS

Separação de MN

Colhia-se 40 ml de sangue heparinizado de cada indivíduo, para posterior diluição em solução PBS, e centrifugação contra gradiente de Ficoll-Paque, 400g por 20 minutos. Os MN recolhidos do anel superior da interface eram lavados três vezes em solução PBS e contados em câmara de Neubauer. Uma vez alcançado o número mínimo de 02×10^6 cels, congelava-se o concentrado celular a -20°C em solução de PBS, juntamente com uma amostra do último líquido de lavagem.

Marcadores virais no soro por Elisa

A detecção de marcadores virais no soro (AgHBs, AgHBe, anti-HBc total, anti-HBs), foi realizada usando-se kits comerciais dos laboratórios Abbott (Chicago, Illinois).

Marcadores virais em MN por Elisa

O AgHBe e AgHBs em MN foi testado em lisado de MN utilizando-se kits comerciais Abbott (Chicago, Illinois). Brevemente, o concentrado de MN era retirado do freezer, aquecido a 37°C por 15 minutos, submetido a choque hiposmótico com solução de PBS diluído 1:10, sob agitação, por 5 minutos, e corrigida a osmolaridade com solução PBS concentrada 10 vezes.

O lisado celular obtido era, então, testado em duplicata nos kits comerciais conforme indicações do fabricante. Aceitavam-se resultados positivos apenas em duplicata e após teste de neutralização, utilizando-se anticorpo específico contra o AgHBs e AgHBe. Para aferir a qualidade da lavagem das células e a possibilidade de contaminação do lisado celular pelo soro do paciente, uma amostra do último líquido de lavagem era testado para AgHBs e AgHBe.

Extração do DNA do lisado de MN

O DNA total do concentrado de MN era extraído pela técnica do fenol clorofórmio. Brevemente incubava-se o concentrado com proteinase K (100 mg/ml) e sódio deoxil sulfato (0,5%) por 2 horas à 37°C . Posteriormente, procedia-se à

TABELA 1

| GRUPO | Nº | Histologia | | | |
|-------|----|------------|-----|-----|-----|
| | | CIR/HCA | HCP | LHM | FPS |
| I | 25 | 12 | 06 | 05 | 02 |
| II | 14 | 05 | 03 | 03 | 03 |
| III | 30 | 08 | 07 | 10* | 10 |
| IV | - | - | - | - | - |

* 5 pacientes LHM + FPS

HCA - hepatite crônica ativa

HCP - hepatite crônica persistente

LHM - lesão hepática mínima

FPS - fibrose portal e septal

CIR - cirrose

- não realizada

precipitação com etanol. O DNA era resuspenso numa solução Tris-HCL-EDTA ph 8,0, para hibridização pelo Dot-Blot^(10,11).

VHB-DNA no soro e no lisado de MN (Dot-Blot)

Cinquenta microlitros do soro e do último líquido de lavagem de cada amostra e da suspensão de DNA diluído em Tris-EDTA, foram testados para VHB-DNA, por Dot-Blot segundo MANIATIS et al.⁽¹⁰⁾ e SCOTTO et al.⁽¹⁵⁾. O DNA foi denaturado com 0,2M NaOH, 1M NaCL e posteriormente tratado com 0,5M Tris, 1M NaCL seguindo-se 2x SSC. Realizava-se uma pré-hibridização com formomida e 5x SSC, 0,1% polivinilpirrolidona, 0,1% ficoll, 0,5%SDS, 0,01M EDTA 100 mg/ml de esperma de salmão. A hibridização se fazia com o meio de pré-hibridização adicionando-se sonda marcada com P³² por "Nick Translation"⁽¹¹⁾. A sensibilidade da sonda era de 0,1 pg de VHB-DNA por 50 µL de soro.

Marcadores em tecido

O AgHBs e AgHBe no tecido foram realizados pela técnica de imunoperoxidase, em tecido deparafinado, utilizando-se soro policlonal de coelho imunizados para AgHBe (extraído de fígado humano) e soro de coelho rico em antiHBs, e revelados através de imunoglobulina anti-IgG de coelho marcado com peroxidase.

Immunoblot (Western Blot, W.B.)

W.B. foi realizado sobre lisados linfocitários em gel de poliacrilamida, transferido para folha de nitrocelulose e incubado com anticorpos policlonais de coelho, sendo posteriormente revelado com soro anti-IgG de coelho marcado com peroxidase. Considerando-se positividade para AgHBe uma revelação em banda correspondente a 20 kd e AgIIBe a 14 kd⁽⁶⁾.

RESULTADOS

Grupo I - Os resultados estão sumarizados nas Tabelas 2 e 3. Dos 25 pacientes deste grupo, sete apresentavam AgIIBe no soro (28%), 19 (76%) dos pacientes apresentavam AgHBs no lisado de MN, porém o AgIIBe nos MN estava presente em apenas oito (32%). Todos os pacientes com positividade para AgHBe nos MN, apresentavam concomitante positividade para AgHBs. O VHB-DNA no soro foi encontrado em 10 pacientes (40%).

Tomando-se a presença de AgIIBe e/ou VHB-DNA como marcadores sorológicos de replicação, observou-se que dos oito pacientes AgHBe positivos nos MN, apenas cinco apresen-

tavam AgIIBe no soro, concomitantemente. Por outro lado, destes, sete apresentavam positividade para VHB-DNA no soro, indicando replicação viral. Em relação à presença de AgHBe no tecido, este estava presente em todos os pacientes VHB-DNA positivos no soro. Em três pacientes nos quais o AgIIBe estava negativo no soro, porém havia atividade de doença hepática além da presença de VHB-DNA no soro e AgHBe no tecido, encontrou-se AgIIBe nos MN.

A presença do AgIIBe em MN, correlacionou-se fortemente à replicação do VHB, se se tomar o IIBV-DNA no soro ou AgHBe no tecido, como "Gold Standard" para replicação.

O DNA extraído do lisado linfocitário mostrou-se positivo para VHB-DNA por Dot-Blot em seis dos oito pacientes AgHBe positivos nos MN, sendo todos IIBV-DNA positivos no soro.

Visando aferir a especificidade dos resultados realizou-se WB para AgHBe e AgIIBe em MN dos três pacientes AgIIBe positivos nos MN, porém negativos no soro e em cinco pacientes AgIIBe negativos nos MN. O AgHBe e mesmo AgIIBe pode ser evidenciado pelo WB em todos os três pacientes AgHBe positivo nos MN, independente da sorologia para sistemas Ag/anti-HBe, enquanto foi negativo em todos os pacientes AgIIBe negativo nos MN, por Elisa.

Grupo II - Sumário dos resultados nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2

| SORO | | | | | | |
|-------|----|-------|-------|---------|---------|---------|
| GRUPO | Nº | AgHBs | AgHBe | antiHBc | antiHBs | VHB-DNA |
| I | 25 | 25 | 7 | 25 | 0 | 10 |
| II | 14 | 0 | 0 | 14 | 09 | 01 |
| III | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| IV | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 |

TABELA 3

| GRUPO | Nº | TECIDO | | | MN | |
|-------|----|-----------|------------|------------|------------|----------|
| | | AgHBs | AgHBe | AgHBs | AgHBe | VHB-DNA |
| I | 25 | 24 (96%) | 10 (40%) | 19 (76%) | 08 (32%) | 06 (24%) |
| II | 14 | 01 (7,1%) | 01 (7,01%) | 05 (35,7%) | 01 (07,1%) | 0 (00%) |
| III | 30 | 01 (33%) | 0 (0%) | 02 (6,6%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| IV | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Dos 14 pacientes deste grupo, nove eram anti-IIBs/anti-HBc total positivos e cinco eram anti-IIBc total positivo isoladamente.

O AgIIBs nos MN foi encontrado em cinco (35,7%) pacientes, porém o AgIIBc estava presente em apenas um (7,1%); este, apresentava ainda VIIIB-DNA no soro, e pequeno número de células hepáticas expressando AgIIBc e AgIIBs, em contradição com o perfil sorológico mostrando ausência de AgIIBs e presença do anti-IIBc isolado. Dos cinco pacientes AgIIBs positivos nos MN, três eram anti-IIBc/anti-IIBs positivos no soro e dois eram anti-IIBc isolado. Excetuando-se um paciente AgIIBc positivo nos MN, não foram demonstrados marcadores em tecido em nenhum outro.

Grupo III - Dos 30 pacientes seronegativos para todos os marcadores de VIIIB, o AgIIBs foi positivo nos MN em dois (6,6%). Nenhum paciente mostrou-se positivo para o AgIIBc nos MN, VIIIB-DNA no soro ou nos MN.

Os marcadores em tecido mostraram-se positivos em um paciente, onde pequeno número de células mostrava fraca positividade para AgIIBs.

Grupo IV - Dos 10 pacientes estudados, nenhum mostrou-se positivo para qualquer marcador do VIIIB nos MN.

AgHBe nos MN como marcador de replicação viral

Tomando-se o VIIIB-DNA no soro como "Gold Standard" para replicação viral, observamos que o AgHBe em MN mostrou forte correlação com VIIIB-DNA no soro, superior àquela encontrada para AgHBe no soro.

Dos 11 pacientes HBV-DNA positivos no soro, oito (81%) apresentavam AgHBe nos MN, enquanto cinco (45%) apresentavam AgHBe no soro concomitantemente.

COMENTÁRIOS

A presença de AgIIBs em MN de pacientes portadores de VIIIB, com positividade para AgIIBs no soro, foi confirmada neste estudo. Este achado, já demonstrado por outros autores^(11,12), parece ter seu significado ligado à infecção dos MN pelo VIIIB. Entretanto, outras possibilidades não podem ser descartadas: sabemos que a complexa cooperação celular do sistema imunológico envolve várias linhagens celulares, sobretudo as células B e T helper. O reconhecimento dos antígenos virais por receptores celulares dos MN pode explicar o achado freqüente dos antígenos nos lisados linfocitários, mesmo quando existe negatividade antigênica no soro. O significado clínico da presen-

ça em AgIIBs em MN, não está evidente, visto que a sua correlação com atividade de doença hepática não pode ser demonstrada neste estudo (dados não demonstrados).

O encontro de AgIIBs nos MN em 5/14 pacientes anti-IIBc total, anti-IIBs positivo, mostrou que nestes indivíduos a infecção pelo VIIIB pode estar presente apesar da negatividade para AgIIBs no soro. Estudos com PCR demonstraram que pacientes anti-IIBc isolado positivo têm VIIIB-DNA quando pesquisados por PCR, sendo portadores do VIIIB⁽⁹⁾.

A negatividade do AgIIBs no soro pode ser explicado pela presença de pequena quantidade do antígeno circulante, abaixo da sensibilidade dos kits comerciais existentes, ou ainda pela formação de imunocomplexos AgIIBs anti-IIBs, impedindo a sua detecção antigênica. Por outro lado, tem sido descrito na literatura, cepas virais cujo reconhecimento do AgIIBs no soro pelos kits comerciais, tem demonstrado dificuldades⁽¹⁴⁾. Ao utilizar-se anticorpos monoclonais ou técnicas mais sensíveis para o DNA viral, como o PCR, o VIIIB fica definitivamente implicado.

O AgIIBs em MN parece apresentar o mesmo papel do PCR para diagnóstico de infecção oculta pelo VIIIB. Entretanto, é curioso o encontro do AgIIBs em indivíduos anti-IIBs positivos. O real significado deste achado não pode ser concluído neste estudo, porém, como acontece em outras viroses, o VIIIB poderia permanecer em latência nas células de linhagem imunológica. Não pode ser descartada a possibilidade de integração precoce nos mononucleares durante a fase aguda da doença, sendo detectado pequena carga antigênica apenas nos lisados de MN, com significado clínico aparentemente pouco importante.

O encontro de AgIIBs no MN em dois dos 30 pacientes seronegativos para todos os marcadores sorológicos do VIIIB, parece-nos intrigante. Em um desses pacientes havia evidências clínicas e laboratoriais de hepatite autoimune, estando o paciente em corticoterapia. A análise retrospectiva do prontuário hospitalar, demonstrou que em duas oportunidades o AgIIBs mostrou-se fracamente positivo no soro, porém os demais marcadores do VIIIB foram sempre negativos. Recentemente a literatura tem chamado atenção para a existência de mutantes virais, capazes de alterar a expressão antigênica clássica do gen S⁽¹²⁻¹⁶⁾. É possível que este paciente seja um exemplo deste fenômeno, ainda pouco conhecido. Melhor avaliação só será possível após estudo das seqüências de DNA isolados, objetivando observar possíveis mutações genômicas que pudessem explicar este evento.

Quanto ao AgHBe em MN, sua presença correlacionou-

se nitidamente à replicação viral demonstrada pela presença de VHB-DNA no soro e AgHBe no tecido, mostrando-se mais evidente que o AgHBe no soro. O fato de terem sido encontrados pacientes anti-HBe positivos com VHB-DNA no soro, aponta para a possibilidade de se ter na região a cepa mutante pre-core. Curiosamente os três pacientes com este perfil sorológico mostraram intensa atividade de doença e tinham AgHBe em MN. Em contrapartida, o AgHBe em MN não foi demonstrado em nenhum paciente VHB-DNA negativo/anti-HBe positivo.

Hipoteticamente, o AgHBe nos MN pode demonstrar presença da cepa clássica do VHB infectando os MN, a despeito da infecção hepática pela cepa mutante pre-core. Tal achado poderá explicar a presença de títulos elevados de anti-HBe nesses pacientes, podendo significar estimulação à produção deste anticorpo pela presença da cepa clássica infectando os MN. Ainda assim, podem existir alterações imunológicas geradas pela infecção dos MN, capazes de modificar a interação vírus x hospedeiro⁽⁹⁾.

São necessários novos trabalhos com amostras maiores,

e com o estudo dos genomas virais no fígado e nos MN destes pacientes.

A dúvida, sempre presente nestes estudos, recai sobre a especificidade do teste. Devido a isto, foram tomadas precauções para aferir a qualidade dos nossos resultados nos MN. Assim, o último líquido de lavagem foi também testado para marcadores de VHB sendo negativo em todos os casos.

Foram realizadas ainda teste em duplicata, confirmando os resultados por testes de neutralização. Só foram aceitos os resultados cuja positividade foi demonstrada em duplicata, com real inibição pós neutralização. Além disso, o AgHBe em MN não foi encontrado em nenhum dos 10 pacientes do Grupo IV. Tomadas tais precauções, parece improvável a inespecificidade do teste.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Prof. C. Trego, INSERM Unidade 271, Lyon, França, pela utilização da sonda VHB-DNA clonada naquela instituição, assim como pelas ponderações pertinentes a este estudo.

Paraná R, Cotrim HP, Motta E, Carneiro A, Freitas L, Lyra LGC. Hepatitis B virus markers in peripheral mononuclear cells. *Arq Gastroenterol*, São Paulo, 29(4):122-127, 1992.

ABSTRACT - Recent studies have shown tropism of the hepatitis B virus (HBV) by peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The consequences of this phenomenon and their clinical use are not yet clear, however. Seventy-nine patients were studied between March 1989 and October 1990. Sixty-nine patients had chronic liver disease with histological evaluations, and 10 were vaccinated for HBV. The following markers were determined: serum: HBsAg, HBeAg, anti-HBe, antitotal-HBc, anti-HBs, anti-HCV, HBV-DNA; lysated PMBC cells: HBsAg, HBeAg. Hepatic tissue: HBsAg, HBcAg. Four groups were formed according to serology. Group I - positive HBsAg patients (n=25) HBsAg was observed in the lysated of PBMC in 19 (76%) of the patients. HBeAg in PBMC was detected in 8 (32%), all of them showed evidence of viral replication (presence of HBcAg and/or HBV-DNA in the serum HBcAg in the tissue). Group II - antitotal HBc/anti-HBs positive (n=14), HBsAg in PBMC was found in 5 (36%) and HBeAg in 1 (7.0%). In this patient replication markers in the serum and in the tissue (HBV-DNA, HBcAg) was also present. Three patients out of 9 anti-HBs positive had HBsAg in PBMC. Group III- seronegative patients for HBV. HBsAg was present in PBMC in 2 (6.6%) of the patients, but was absent in all of them. There was concomitant presence of HBsAg in MN and the hepatic tissue in 1 patient. Replication markers were not observed in the group. Group IV- 10 asymptomatic individuals vaccinated for HBV. Except anti-HBs in serum, no other HBV marker could be identified in serum or in PBMC. Regarding the use of HBV markers in PBMC our results suggest: 1) the presence of HBsAg in PBMC of chronic carriers of HBV, is a common event, not related to clinical evolution; 2) HBV in PBMC may be an alternative to diagnose seronegative HBV infection, as well as, HBV replication status; 3) the presence of HBeAg in PBMC strongly correlated with HBV replication, demonstrated by the concomitant positivity for HBV-DNA in serum and PBMC and in liver tissue.

KEY WORDS - Hepatitis B antigens. Hepatitis B antibodies. Peripheral blood mononuclear cells.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bouffard P, Lamelin JP, Zoulim F, Pichoud C, Trepo C. Different forms of hepatitis B virus DNA and expression of HBV antigens in peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis B. *J Med Virol*, 31:312, 1990.
2. Coursaget P, Bourdil C, Adamowicz P, Chotard J, Mar Jd, Yvonnet B, Mevelec MN, Barrés JL, N' Doye R, Chiron JP. HBsAg positive reactivity in man not due to hepatitis B virus. *Lancet*, 2: 1354, 1987.
3. Devison F, Alexander JM, Trobridge R, Fagan E, Williams R. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes. *J Hepatol*, 4:37, 1987.
4. Harrison T. Hepatitis B virus DNA in peripheral blood leukocytes: a brief review. *J Med Virol*, 31:33, 1990.
5. Heermann K-H, Gültekin H, Gerlich WH. Protein blotting: techniques and application in virus hepatitis research. Workshop on the application of molecular and immunological techniques in virus hepatitis research. European Association for the Study of the liver (Syabus). 1987. p.1-44.
6. Hoofnagle J, Schafer DD. Serologic markers of hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis*, 6:1, 1986.
7. Lamelin JP, Trepo C. The hepatitis B virus and peripheral blood mononuclear cells: a brief review. *J Hepatol*, 10:120, 1990.
8. Luo K, Zhou R, He C, Hiang Z, Jiang S. Hepatitis B virus DNA in sera of virus carriers positive exclusively for antibody to the hepatitis B core Antigen. *J Med Virol*, 35:55, 1991.
9. Lyra L, Paraná R, Cotrim H. Knowledge of the pre-core mutation variant of the hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol*, 86: 1851, 1991.
10. Maniatis T, Fritsch E, Sombrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
11. Parvaz P, Lamelin JP, Vitvitsky L, Bouffard P, Pichoud C, Cova L, Trepo C. Prevalence and significance of hepatitis B virus antigens: expression in peripheral blood mononuclear cells in chronic active hepatitis. *Immunol Immunopathol*, 43 :1, 1987.
12. Pasguinelli C, Melegari M, Villa E, Scoglioni P, Seidenari M, Mongiardo N, De Rienzo B, Manenti F. Hepatitis B virus infection of peripheral blood mononuclear cells is common in acute and chronic hepatitis. *J Med Virol*, 31:135, 1990
13. Romet-Lemonne JL, Elfassi E, Haseltine W, Essex M. Infection of bone marrow cells by hepatitis B virus. *Lancet*, 2:732, 1985.
14. Trepo C, Vitvitski L, Hantz O, Chevalier P, Pichoud C, Bassin S. Identificação de um vírus semelhante ao da hepatite B no decurso de hepatite Não-A Não-B. *O Médico*, :142, 1983.
15. Scotto J, Hadchouel M, Hery C, Yvart J, Triollais P, Brechot C. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: comparison with results for other viral markers. *Hepatology*, 3:279, 1983.
16. Van Damme, Vranckx R, Safary A, André F, Meheus A. Immunogenicity and efficacy of recombinant DNA hepatitis B vaccine in institutionalized mentally retarded patients: preliminary results. In: Zuckerman AJ (ed.) *Viral hepatitis and liver diseases*. New York, All R. Liss, 1988. p.1065-7.

Recebido para publicação em 16/7/1992.

Aprovado para publicação em 5/8/1992.