



11115
7 26

Universidad Nacional Autónoma de México

División de Estudios de Postgrado
FACULTAD DE MEDICINA
Hospital 20 de Noviembre

INFLUENCIA DEL SEXO Y HAPLOTIPO EN EL
ACLARAMIENTO DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DE
LA HEPATITIS B (Ag_sHB) EN DOS CEPAS DE RATON.

TESIS DE POSTGRADO

Que para obtener el Título de
ESPECIALISTA EN GASTROENTEROLOGIA

p r e s e n t a

DR. JULIO GARRIDO PALMA

Asesor:

DR. LUIS FELIPE MONTAÑO



México, D. F., 1986

TELIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ANTECEDENTES

El virus de la hepatitis B no es directamente citopático, y la respuesta inmune del huésped es la que induce la lisis de los hepatocitos y finalmente la recuperación de la infección. Un estado de inmunodeficiencia selectiva para antígeno purificado del virus de la hepatitis B ha sido postulado como el responsable del desarrollo de la enfermedad; especialmente en las infecciones de tipo crónico (Dudley, 1975; Edleston y Williams, 1974).

Recientemente, se ha establecido que la infección por virus B es más común en machos que en hembras (Blumberg, 1972; Szmunness, 1978). Más recientemente, Drew y cols. (1978) demostraron en una población con una incidencia muy alta de infección por virus de la hepatitis B, que la presencia de anticuerpos contra el AgsHB en madres, correlaciona con una disminución en el índice macho/hembra de los nacimientos. Esto último sugiere un índice incrementado de abortos espontáneos en fetos machos.

A manera de reforzar esta observación, London y cols. - (1980) han mostrado que pacientes que reciben trasplantes renales y que poseen anticuerpos circulantes contra el AgsHB, rechazan más frecuentemente el trasplante cuando proviene de un donador hombre. Estos últimos datos sugieren que hay una reactividad antigénica parcial cruzada entre el AgsHB y el antígeno de trasplante H-Y del hombre.

De ser cierta esta reacción cruzada, se podría hipotetizar que el AgsHB en sujetos machos se reconoce como "menos extraño" y, por lo tanto, el aclaramiento del virus es más ineficiente. El dato importante es que, hasta la fecha, no ha podido demostrarse esta reacción cruzada.

El reconocimiento de un antígeno como "propio" o "no - propio" es una función fundamental del macrófago, ya que dependiendo de qué tanto reconozca a un antígeno como "no propio", la habilidad del macrófago para eliminarlo será diferente (Zuckerman, 1979).

Esta función también determina la magnitud de la respuesta inmune - que se suceda y, por lo tanto, la eficiencia del aclaramiento inmune del antígeno (Morgan, 1975) (v.gr.: producción de anticuerpo específico que, en un momento dado, al opsonizar al antígeno hará más eficiente la eliminación del mismo por parte de la célula fagocítica, o sea, la eficiencia de aclaramiento será mayor).

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es analizar si las diferencias en sexo se relacionan con la velocidad de eliminación del AgsHB y, a su vez, tratar de determinar si diferentes haplotipos tienen - alguna relación con el aclaramiento del antígeno, independientemente del sexo (Morgan, 1975).

Como objetivo secundario, se analizará la respuesta de anticuerpo específico en términos de concentración máxima en el tiempo, para así poder determinar cuál es el esquema de inmunización ade

cuado en ratones de la cepa BALB-C, para en un futuro desarrollar anticuerpos monoclonales contra el AgsHB.

HIPOTESIS

Nosotros creemos que, tanto las diferencias en sexo como los diferentes haplotipos, incluyen en la velocidad de aclaramiento del AgsHB.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron ratones de las cepas BALB-C y C57 BL/10, obtenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. Estos animales se mantuvieron en el bioterio de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, sitio donde se llevó a cabo todo el estudio. Al iniciar éste, los ratones tenían entre 10 y 15 semanas de edad y su peso oscilaba de 20 a 30 gr.

Para cada cepa se hicieron dos grupos de 10 animales co
da uno, uno de machos y otro de hembras.

El antígeno de superficie del virus de la hepatitis B -
(Ag_{SHB}) se purificó por cromatografía de afinidad a partir de una -
muestra de suero de un paciente con altos títulos de antigenemia -
detectada por radioinmunoensayo comercial (RIA-ASBOT). La columna
de cromatografía de afinidad se preparó ligando anticuerpos monoclo
nales anti-Ag_{SHB} (RF-HBs-I), regalo de la Dra. Allison Goodall, el
cual ha sido reportado previamente en la literatura (Goodall, 1961),
a Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno de acuerdo a las -
instrucciones del proveedor (Pharmacia Fine Chemicals).

El suero del paciente (10 ml.) se mantuvo en contacto -
con la resina durante 12 hrs. a 4°C con agitación moderada. Al tér
mino de este tiempo el sobrenadante se eliminó y la resina se colo
có y empacó en una columna de vidrio de 15 cm. de altura con un diá
metro interno de .5 cm.

Toda la proteína no unida al anticuerpo se lavó por medio de enjuagues extensivos a la columna mediante la aplicación de 500 ml. de una solución de cloruro de Na al 3% en agua destilada. - La fracción que contenía antígeno de superficie se lavó de la columna mediante la aplicación de 30 ml. de una solución de yoduro de potasio 3M en agua destilada.

La fracción lavada se concentró por medio de absorción de membranas y se dializó extensivamente durante dos días contra solución buffer de fosfato (pH 7.4) a 4°C.

La concentración de proteínas se ajustó por Lowry a 1 - mgr. por ml. y la concentración de AgsHB presente se determinó a - 800 microgramos por ml. de acuerdo al control positivo con que cuenta el radioinmunoensayo comercial de Abbot. La ausencia en la muestra de anticuerpos contra el AgsHB, se corroboró por radioinmunoensayo comercial; asimismo, también se determinó por inmunodifusión - en agarosa al 1% en solución buffer de fosfato que la muestra carecía de proteínas plasmáticas.

El antígeno de superficie así obtenido se iodizó con I^{125} por el método de la cloramina T.

La reacción se llevó a cabo durante 30 seg. y se paró con la aplicación de glicina 2M. La proteína marcada con iodo radioactivo se separó mediante la aplicación de la solución de reacción a una columna de Sephadex G-25 lavada con PBS 0.05M (pH 7.4); se colectaron fracciones de 0.5 ml. y solamente se utilizaron aquellas fracciones que poseían más de 10,000 cpm (cuentas por minuto).

La presencia de antígeno en estas fracciones se corroboró con RIA comercial (AUSRIA-II, Abbott).

Se tuvo mucho cuidado de mantener la actividad específica baja para evitar la desnaturalización de la proteína.

Una vez iodinado el antígeno se filtró a través de membranas de .22 micras previo ajuste de la concentración a 800 micro-

gramos por ml. en solución salina; antes de iniciado el experimento se corroboró que 80 microgramos de antígeno iodinado dieron menos de 10,000 cpm y se observó que el número de cuentas para esta concentración de antígeno fue de 5,000 cpm.

Cada uno de los animales fue inyectado con 0.1 ml. del antígeno iodinado que corresponde a 80 microgramos de antígeno. La inoculación se efectuó en la vena de la cola. Después de dieciocho, veinticinco, cuarenta y cuarenta y ocho horas, los ratones fueron sangrados del plexo retroorbital utilizando un capilar heparinizado.

En cada toma de sangre se obtuvieron 50 microlitros de sangre. Una vez obtenidas todas las muestras, se colectaron 25 microlitros de suero, los cuales se contaron en un contador de radiaciones gamma marca Beckman.

La producción de anticuerpos contra el antígeno de superficie se determinó a los 7 y 14 días utilizando un radioinmunoensayo comercial (AUSAB, Abbott). En los términos mencionados se ob-

tuvieron 100 microlitros de sangre a partir del plexo retroorbital de cada animal y el suero obtenido se diluyó 1:4 en suero de ternera inactivado por calor.

El aclaramiento del antígeno de superficie se expresa - como la constante exponencial $K(\text{hr}^{-1})$ que se obtiene de la pendiente de la línea de regresión del logaritmo neperiano ($\ln$) de la concentración sérica de AgsHB contra tiempo, tal como describen Morgan y Soothill (1975).

Brevemente: El número de cuentas por minuto obtenida de las muestras de suero de cada ratón (25 microlitros) se transforman a concentración, mediante una regla de tres, en la cual:

800 microgramos ----- 5 000 cpm

" y " cantidad ----- " x " cpm

Una vez obtenida la concentración se hace un análisis - de varianza utilizando el $\ln$. de la concentración/tiempo con objeto de obtener una curva semilogarítmica que aplique a la función -----

$Y = mx + b$. Con los datos obtenidos, se calcula la pendiente de la curva que se genera y se grafica.

EJEMPLO:

Ratón 1	Tiempo	cpm	concentración	ln concent.
	18 hrs	703	11.0	2.397
	25 hrs	548	8.76	2.170
	40 hrs	321	5.13	1.635
	48 hrs	220	3.52	1.258

$Y = mx + b$ - - - - - Intersección de Y - 2.8439

valor de la pendiente = -0.031

La constante de aclaramiento K se expresó como (hr^{-1}) -
para evitar el valor negativo de la pendiente.

La graficación de los resultados es de los valores de -
la pendiente para cada ratón en el tiempo.

El análisis estadístico se efectuó utilizando la prueba
"t" de Student y chi-cuadrada para los valores de las pendientes.

RESULTADOS

ACLARAMIENTO DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE

Tanto los machos como las hembras de la cepa C57 BL/10 exhibieron un valor de K mucho menor que los animales del mismo sexo de la cepa BALB-C (Fig.1). Las diferencias más importantes en el índice de aclaramiento se observaron entre los machos y las hembras; en este contexto fue muy claro que las hembras aclaran el antígeno más rápido que los machos.

La diferencia en haplotipo de las dos cepas estudiadas parece ejercer también efecto, ya que los ratones de la cepa BALB-C cuyo haplotipo es del tipo H-2^d eliminaron más efectivamente el antígeno que los ratones de la cepa C57 BL-10, cuyo haplotipo es H-2^b.

PRODUCCION DE ANTICUERPO

De los 20 ratones que conformaban el grupo de la cepa -

CS7 BL-10, el séptimo día dos habían muerto, 1 macho y 1 hembra. -
Todos los ratones del BALB-C sobrevivieron hasta el día 14.

La tabla número 1 muestra cómo al séptimo día el número de ratones con niveles detectables de anticuerpo de la cepa BALB-C era de 18/20. Dentro de la cepa CS7 BL/10 el número de ratones con anticuerpo era de 6/18, siendo 2 de ellos hembras. Llama la atención el porcentaje tan bajo de ratones de la cepa CS7 BL-10 que desarrollaron anticuerpos en comparación con los BALB-C. La diferencia es estadísticamente significativa.

Para el día 14 los niveles de anticuerpos sufren un cambio importante. De los 8 machos BALB-C que mostraban anticuerpos - el séptimo día, ninguno tenía niveles detectables de anticuerpo para el día 14. De las 10 hembras de la misma cepa positivas para anticuerpo el séptimo día, únicamente el 50% mantenía niveles detectables el día 14. En contraste, de las 2 hembras de la cepa CS7 BL/10 con anticuerpo detectable el séptimo día, el número al día 14 se incrementó a 5 de 9. El número de machos de la cepa CS7 BL/10 con anticuerpo detectable al 7º día permaneció sin cambios para el día 14.

torca, teniendo en cuenta las muertes mencionadas anteriormente.

La diferencia entre ambas cepas, incluyendo los machos y hembras, es significativa si se considera el número total de ratones respondedores: 10/18 para la cepa CS7 BL/10 y 18/20 para la cepa BALB-C ($P < 0.05$). La diferencia en la magnitud de la respuesta humoral en cuanto a sexos para cada cepa, no mostró diferencias significativas.

FIG. 1. CONSTANTE DE ACLARAMIENTO K_{AgSHB} (hr^{-1})
PARA MACHOS Y HEMBRAS DE 2 CEPAS MURINAS

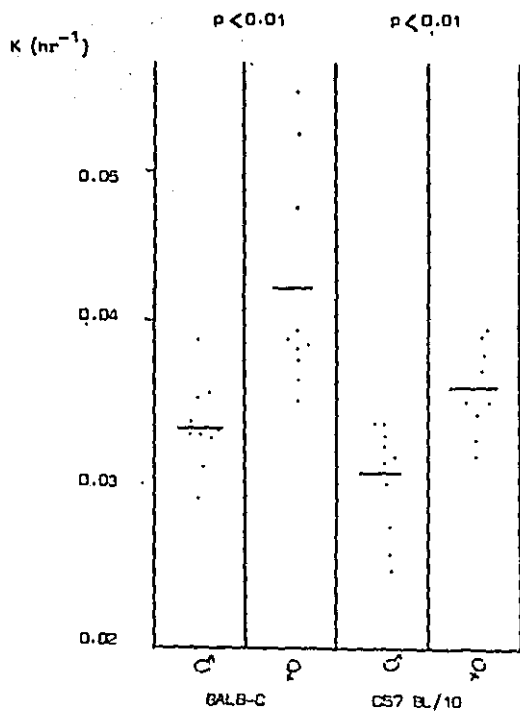


TABLA No. 1

DESARROLLO DE Anti-AgsHB
UNA Y DOS SEMANAS DESPUES DE LA INOCULACION

SEXO	CEPA	AcAgsHB (número positivo)		
		7º día	14º día	Total
♂	BALB-C	8/10	0/10	8/10
♀	BALB-C	10/10	9/10	10/10
♂	CS7 BL/10	4/9	4/9	4/9
♀	CS7 BL/10	2/9	5/9	7/9

DISCUSION

El antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, es aclarado de manera más lenta en ratones machos que en ratones — hembras. Esta diferencia en sexos se observó en dos cepas distintas de ratones, las cuales exhibían valores de aclaramiento K, altos y bajos. La variación en los valores de K debido a diferencias de edad (Morgan y Steward, 1976), contenido protéico en la dieta — (Coovadia y Soothill, 1976 a-b) y limpieza de las cajas en las que se mantuvieron los animales, fueron excluidos al utilizar machos y hembras de la misma camada, que tenían peso corporal similar, se — alimentaron con la misma dieta y se mantuvieron en las mismas cajas.

Aunque se sabe que las dosis farmacológicas de estrógenos tienen un efecto estimulante sobre la función fagocítica del macrófago (Nelson, 1976), los niveles de estas hormonas, observados — en circunstancias fisiológicas en las hembras, no producen un incremento generalizado en la función fagocítica en comparación con los machos.

Se ha observado que los valores de aclaramiento para polivinilpirrolidona (substancia que se utiliza como marcador de la actividad fagocítica de los macrófagos), ácido desoxirribonucleico y gammaglobulina bovina, no son significativamente diferentes en ratones machos y hembras de una misma cepa (Morgan y Steward, 1976; Whaley y Webb, 1972 a-b).

Las diferencias en los valores de aclaramiento K para el antígeno de superficie observados entre machos y hembras, pueden estar relacionadas en el grado de reconocimiento de "propio" para el antígeno de superficie entre los dos sexos. Si existiese una reacción cruzada antigénica con el antígeno de trasplante masculino (H-Y), es posible que el antígeno de superficie sea detectado como "menos extraño" en los ratones machos y, por lo tanto, sea aclarado de manera más lenta de la circulación.

Este mecanismo explicaría las diferencias observadas en el aclaramiento para el antígeno de superficie entre ambos sexos.

Las diferencias que observamos entre ambas cepas son secundarias a la capacidad de respuesta que existe entre las mismas - (Morgan y Scothill, 1975 b). Es posible pensar que las diferencias en respuesta están dadas por la diferencia en el haplotipo de las - cepas; se sabe que la intensidad de respuesta está directamente asociada al locus 1 presente en el cromosoma 6 (Milich y Chisari, 1982).

Este locus es parte importante del sistema H-2 murino - que tiene su equivalencia en el sistema HLA humano.

Se ha postulado que existe una relación entre la función de aclaramiento de los macrófagos con su habilidad para presentar - antígeno en una forma inmunogénica. Morgan y Scothill han sugerido que una pobre función macrofágica induce la producción de anticuerpos de baja afinidad, debido a que hay una pobre selección de células B en el proceso de presentación antigénica (Morgan y Scothill - 1975 a-b). Nuestros resultados demostraron que de los ratones de - la cepa BALB-C, que tiene un valor alto de K, 18/20 produjeron anticuerpo específico.

La producción máxima de anticuerpo para la cepa BALB-C fue a los 7 días y fue independiente de sexo; sin embargo, para el día 14 el número de ratones con anticuerpo detectable había disminuido a 5/20. Esta disminución fue estadísticamente significativa. Esto se explica por el rápido aclaramiento del antígeno en los ratones de esta cepa. El fenómeno contrario se observó en los ratones de la cepa C57 BL-10, los cuales produjeron anticuerpo específico - en sólo el 50% de los animales estudiados a los 14 días; no olvidar que el aclaramiento de antígeno en esta cepa fue más lento que en la cepa BALB-C.

La diferencia en el número de ratones productores de anticuerpo específico entre las dos cepas estudiadas, es probablemente secundaria a la relación directa entre el haplotipo y la capacidad de presentación antigénica por parte de los macrófagos. Los - BALB-C presentan el antígeno de una manera más rápida y eficiente, con lo que inducen la producción de anticuerpo específico de manera más temprana; la presencia de este anticuerpo circulante ayuda a la más rápida eliminación del antígeno circulante, por opsonización -

del antígeno con el respectivo anticuerpo.

En conclusión, los resultados de este estudio son de — interés si consideramos que la hepatitis fulminante, la cual resulta de una respuesta inmune exagerada al antígeno de superficie (Dudley, 1975), es más común en mujeres, mientras que la infección crónica — por el virus de la hepatitis B, posiblemente secundaria a una respuesta inadecuada por parte del huésped, es más común en hombres.

El otro resultado interesante de nuestro estudio que se relaciona con el objetivo secundario, es que eventualmente la producción de anticuerpos monoclonales contra el antígeno de superficie — del virus de la hepatitis B tendrá que ser realizada bajo un esquema de inmunización de aplicaciones semanales de antígeno a ratones de la cepa BALB-C. La utilización de esta cepa es obligada por la necesidad técnica que la producción de anticuerpos monoclonales implica (Goodall, 1981).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Akdamar KA, et al. SH antigen in bile. *Lancet*, 1971; 1:909
- 2) Albin C. and Robinson W. Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J. Virol.* 1980; 34:297
- 3) Alfer H J, et al. Health-care workers positive for hepatitis B surface antigen. Are their contacts at risk? *N. Engl. J. Med.* 1975; 292: 454
- 4) Almelda J D. Electron microscopic observations and speculations on Australia antigen. *Postgrad. Med. J.* 1971; 47:484 a.
- 5) Almelda J D, et al. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet*. 1971; 2:1225 b.
- 6) Beeson P B. Jaundice occurring one to four months after transfusion of blood or plasma. *J. A. M. A.* 1943; 121:1332.
- 7) Bellanti. Libro de inmunología II. Segunda edición, 1981.
- 8) Bianchi L, et al. Viral hepatitis. In MacSween NM, et al. --- (eds): *Pathology of the liver*, pp. 164. Edinburgh Churchill Livingstone, 1979.
- 9) Blumberg B J, et al. A "new" antigen in leukemia sera. --- *J. A. M. A.* 1965; 191:101.
- 10) Blumberg B J. The nature of Australia Antigen: Infectious and genetic characteristics. In: *Proper H, Schaffner (eds): "Problems in liver disease"*, New York; Gune and Stratton, pp. 667, 1972.
- 11) Bryan J A, et al. An outbreak of hepatitis A associated with recreational lake water. *Am. J. Epidemiol.* 1974; 99:145.

- 12) Coovadia H M., Soothill J F. The effect of protein restricted diets on clearance of ^{125}I -labelled PVP in mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 1976; 23:373 a.
- 13) Coovadia H M., Soothill J F. The effect of amino acid restricted diets on the clearance of ^{125}I -labelled PVP in mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 1976; 23:562 b.
- 14) Dane D S, et al. Virus-like particles in serum of patients - - with Australia antigen-associated hepatitis. *Lancet*. 1970; - 1:695.
- 15) Drew J S, et al. Hepatitis B virus and sex ratio of offspring. *Science*. 1978; 201:687.
- 16) Dudley F J, et al. Cellular immunity and hepatitis associated Australia antigen liver disease. *Lancet*. 1975; 1:191.
- 17) Edleston A L W F, et al. Inadequate antibody response to - - HBs Ag or suppressor T-cell defect in development of active chronic hepatitis. *Lancet*. 1974; 2 :1545.
- 18) Gerin J L, et al. Biochemical characterization of Australia-antigen. *Am. J. Pathol*. 1975; 81:651.
- 19) Goodall A H, et al. Monoclonal antibodies in a solid phase radiometric assay for HBs Ag. *Medical Laboratory Science*. 1981; 38:1.
- 20) Heathcote J, et al. Hepatitis B antigen in saliva and semen. - *Lancet*. 1974; 1:71.
- 21) Hirschman S Z, et al. Purification of lake^d intranuclear particles from human infected by hepatitis B virus. *Proc. Natl. - Acad. Sci*. 1974; 71:3345.

- 22) Krugman S, et al. Viral hepatitis, type B studies on natural -- history and prevention reexamined. N. Engl. J. Med. 1979; - 300:101.
- 23) London W T et al. Hepatitis B virus infection in kidney transplant recipients. In Bianchi L., Gerok W., Sickinger K., Stalder G A. (eds): "Virus and the liver" Lancaster: MTP Press. - pp. 262, 1980.
- 24) Magnus L O. and Espmark J A. New specificities in Australia-antigen positive sera distinct from the LeBouvier determinants. J. Immunol. 1972; 109:1017.
- 25) Marlon P L, et al. State of hepatitis B viral DNA in human - hepatoma cell line. J. Virol. 1980; 33:795.
- 26) Millich D R., Chisari F V. Genetic regulation of the immune response to hepatitis B surface antigen (HBs Ag). Journal of Immunology. 1982; 129:320.
- 27) Morgan A G., Stewart M W. Macrophage clearance function and immune complex disease in New Zealand black/white F₁ - hybrid mice. Clinical and Experimental Immunology. 1976. - 26:33.
- 28) Morgan A G., Soothill J E. Measurement of clearance function of macrophages with 125 I-labelled polyvinyl pyrrolidone. Clinical and Experimental Immunology. 1975; 20:711 a.
- 29) Morgan A G., Soothill J F. Relationship between macrophage clearance of PVP and affinity of anti-protein antibody response in inbred mouse strains. Naute. 1975; 254:911 b.
- 30) Nelson D J. Immunobiology of the macrophage. New York: -- Academic Press. 1976.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 31) Neurath A R. and Strick N. Association of hepatitis B "e" antigen (HBe Ag) determinants with the core of DANE particles. J. Gen. Virol. 1979; 42:645.
- 32) Neurath A R, et al. Some properties of hepatitis B core antigen isolate from serum of infected humans. J. Gen. Virol. 1978; 39:91.
- 33) Neurath A R, et al. Confirmatory evidence for the association of hepatitis B surface antigen with antigenic determinant reactive with antibodies present in some anti-HBe positive sera. J. Gen. Virol. 1980; 48:53.
- 34) Robinson W S. The genome of hepatitis B virus. Ann. Rev. Microbiol. 1977; 31:357.
- 35) Schweltzer I L. Vertical transmission of the hepatitis B surface antigen. Ma. J. Med. Sci. 1975; 270:287.
- 36) Summers J, et al. Genome of hepatitis virus: Restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from DANE particles. Proc. J. Pathol. 1975; 81:651.
- 37) Summers J, et al. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in marmosets. Proc. Natl. Acad. Sci. 1978; 75:4533.
- 38) Summers J, et al. Genome of hepatitis B virus; Restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from DANE particles. Proc. Natl. Acad. Sci. 1975; 72:4597.
- 39) Szmuness W, et al. Socio-demographic aspects of the epidemiology of hepatitis B. In Vyas GN, et al. (eds): Viral Hepatitis, p.297, Philadelphia, Franklin Institute Press. 1978.

- 40) Takahashi K, et al. Shift from free "small" hepatitis Be antigen to Ig G-bound "large" form in the circulation of human beings and chimpanzee acutely infected with hepatitis B virus. *Gastroenterology*. 1979; 77:1193 a.
- 41) Takahashi K, et al. Demonstration of hepatitis Be antigen in core of Dane particles. *J. Immunol.* 1979.; 122:775 b.
- 42) Thomas A C. Inducer and suppressor T-cells in hepatitis B-virus-induced liver disease. *Hepatology*. 1982; 2:202.
- 43) Thomas H C, et al. Immune complexes in acute and chronic - liver disease. *Clin. Exp. Immunol.* 1978; 31:150.
- 44) Thomas H C. Cellular immunity to the hepatitis B virus. In: virus and the liver; Bianchi, Gerok W., Sackinger K, and - - Stadler G D., editors. MTP, Press Ltd., pp: 161. 1980.
- 45) Valenzuela P, et al. Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. - *Nature*. 1979; 280:815.
- 46) Ware A, et al. Controlled trial of corticosteroid therapy in severe acute viral hepatitis. *Gastroenterology*. 1978; 75:992.
- 47) Whaley K, Webb J. Clearance of desoxyribonucleic acid from blood in New Zealand mice. *Rev. Eur Etudes Clin. Biol.* 1972 17:788.a.
- 48) Whaley K, Webb J. Catabolic of bovine gammaglobulin in New Zealand mice. *Rev. Eur Etudes Clin. Biol.* 1972; 17:292. b.
- 49) Zukerman S H, et al. Dynamics of the macrophage plasma membranes. In *Annual Reviews Reprints. Immunology 1977--1979.*, editor Weissman I. Annual Reviews Inc. pp.268. -- 1979.