

Uso del IFN- α leucocitario por vía intraperitoneal en humanos: aspectos farmacocinéticos

VICTORIA RAMIREZ ALBAJES¹; A. GONZALEZ GRIEGO²;
M. LIMONTA VIDAL¹; S. BARCELONA¹; N. FERNANDEZ PARDO³;
E. SELMAN-HOUSSEIN ABDO¹

- 1) Centro de Investigaciones Biológicas, La Habana, Cuba
- 2) Instituto de Ciencias Médicas, La Habana, Cuba
- 3) Hospital "Comandante Piti Fajardo", La Habana, Cuba

RESUMEN

Una posible vía de administración del IFN- α , no explorada hasta el momento en el tratamiento a enfermos de hepatitis asociada al virus B o a portadores asintomáticos, es la vía intraperitoneal. Por las posibilidades terapéuticas que ella puede brindar, hemos iniciado estudios mediante esta vía de administración en humanos.

Se estudiaron aspectos farmacocinéticos del interferón leucocitario humano durante su administración a 25 portadores asintomáticos del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, empleando dosis simple intraperitoneal, peritoneoclisis y dosis simple intraperitoneal inicial más peritoneoclisis. Se administraron 4×10^6 U.I. y 8×10^6 U.I., cada 24 horas, quedando conformados cuatro grupos.

Se determinó la actividad antiviral del IFN- α basal, no detectándose actividad en 13 de los estudiados, y el valor promedio fue de 2 U.I./ml.

Se determinó la actividad horaria dentro de las primeras 8 horas a partir de iniciada la administración del IFN, observándose su incremento en suero, en relación con la dosis empleada. El incremento en la temperatura se corresponde con los niveles del IFN sérico en el período de tiempo estudiado.

La actividad máxima del IFN- α en suero, en todos los grupos, se alcanzó al final de cada esquema de tratamiento, y el 50% de este valor, a las 8 horas después de culminado éste.

Se determinó la actividad del IFN- α en sangre intrahepática y venosa.

No se observaron complicaciones determinadas por la vía de administración en ninguno de los pacientes estudiados. No se observaron efectos indeseables en cuanto a cifras de plaquetas, leucograma y actividad de transaminasa glutámico-pirúvica.

SUMMARY

Intraperitoneal is a possible route of α -IFN administration not explored up to date for the treatment of patients with hepatitis B, as well as asymptomatic carriers of hepatitis B virus.

We have started studies by using this route of administration in humans on account of its therapeutic possibilities.

Pharmacokinetic aspects of human leukocitary interferon were studied during intraperitoneal (IP) administration on 25 asymptomatic carriers of the hepatitis B surface antigen virus, using IP single-dose, peritoneoclysis, or IP single dose plus peritoneoclysis at 4×10^6 U.I. and 8×10^6 U.I. doses every 24 hours. Four groups were created.

Antiviral activity of basal α -IFN was studied detecting no activity in 13 of studied subjects, having an average of 2 U.I./ml. Time activity was determined within the first 8 hours after IFN administration, observing an increase of serum IFN related to employed dosis. The increase in body temperature corresponds to serum IFN levels in the studied period of time.

The highest serum α -IFN activity in all groups was reached at the end of each treatment scheme and 50% of this level was reached 8 hours after treatment was finished. The activity of α -IFN in intrahepatic and venous blood was determined.

No complications determined by the route of administration were found in any of the studied patients. No side-effects were found regarding platelet levels, leucogram and glutamic-pyruvic transaminase activity.

INTRODUCCION

Se ha señalado por distintos autores la existencia de aspectos no resueltos en el uso terapéutico del IFN, tales como el conocimiento de la dosis óptima, el mejor esquema de tratamiento, la duración de este o la vía de administración idónea, para una enfermedad en particular, así como si es mejor la vía sistémica o el uso local (Merigan, 1981; Cantell y Pyhälä, 1976; Myers y Galasso, 1982).

Existen dudas acerca de si el nivel del IFN plasmático es un buen indicador para reflejar la concentración del plasma y el estado antiviral en un tejido determinado (Bocci, 1982); se conoce que la concentración del IFN que rodea a la célula que lo produce es mucho más alta que los niveles medios en la circulación (Dianzani y Baron, 1975; Stewart II, 1979). En este sentido, pudiera pensarse que el rol fisiológico del IFN pueda ser principalmente de carácter local, es decir, producto de células en el área en la cual se induce. Se ha planteado que el estado antiviral está relacionado con la concentración del IFN que rodea a la célula y con el número de receptores para IFN en la célula en que se desarrolla este estado (Hill *et al.*, 1979; Brancat *et al.*, 1982; A. R. Joshi. *et al.*, 1982; C. E. Hannigan, 1983).

Además, cuando se usa el interferón como antiviral, es razonable realizar primero estudios farmacocinéticos para determinar si él pudo alcanzar el sitio afectado con el régimen terapéutico planeado.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores y por las razones que vamos a exponer a continuación, iniciamos el uso de la vía intraperitoneal en el tratamiento de afecciones hepáticas relacionadas con el virus de la hepatitis B.

En 1981, investigadores de nuestro grupo trataron con IFN leucocitario por vía intraperitoneal varios casos de hepatitis viral aguda tipo B, de evolución tórpida, obteniendo resultados favorables en relación con la evolución clínica y la disminución brusca de marcadores séricos de presencia del virus (resultados no publicados). Estos primeros hallazgos en un pequeño número de casos, dieron origen a una serie de estudios controlados por nuestro grupo, para probar las bondades de esta vía de administración en afecciones hepáticas.

Por el hecho de tener estas afecciones un órgano diana, por las características de la irrigación de la zona, pues el retorno venoso de la vía intraperitoneal es fundamentalmente a través de venas tributarias de la porta, y esta es, a su vez, responsable del 80% del flujo sanguíneo hepático; para lograr una mayor concentración en el medio que rodea a la célula y por los resultados antes citados, y teniendo en cuenta la factibilidad de la vía de administración y la no aparición de complicaciones debidas a su utilización, decidimos iniciar el estudio de algunos aspectos farmacocinéticos durante la administración del IFN a portadores asintomáticos de este virus.

MATERIALES Y METODOS

Para este estudio se seleccionaron adultos masculinos con presencia de antígeno de superficie del virus productor de hepatitis B (HBs Ag) en suero, y clasificados como portadores asintomáticos con los siguientes criterios: ausencia de manifestaciones clínicas, cifras de transaminasa glutamicopirúvica normales, así como ausencia de alteraciones anatómicas hepáticas evaluadas según laparoscopia y estudio microscópico de biopsia hepática. Fueron tratados con IFN leucocitario humano empleando como vía de administración la intraperitoneal y quedaron conformados cuatro grupos (tabla 1).

A los pacientes pertenecientes a los grupos *A*, *B* y *C* se les determinó la concentración de IFN sérico antes del tratamiento, y posteriormente, durante las primeras ocho horas, a las 24, 48 y 72 horas. Se determinó, además, cada hora durante las primeras ocho horas después de terminada la peritoneoclisis y a las 96 horas de iniciado el tratamiento.

A dos individuos del grupo *B* se les extrajo sangre intrahepática a la primera hora de terminado el tratamiento, durante la realización de la biopsia hepática, comparando dichos valores con los detectados en sangre extraída de la vena antecubital.

A los del grupo *D* se les determinó la concentración del IFN sérico antes del tratamiento, así como a las 2, 4, 8, 10 y 12 horas, después de la primera dosis.

Se estudió, conjuntamente, un grupo de pacientes con hepatitis viral aguda, para determinar el título del IFN endógeno de ellos. En todos se midió la temperatura cada hora durante las primeras ocho horas después de iniciado el tratamiento, considerando todos los incrementos por encima de 37°C.

Se estudiaron diariamente las siguientes variables: conteo de plaquetas, leucograma y actividad de transaminasa glutamicopirúvica.

Tabla 1

Grupo	Número de individuos	Dosis c/24 horas (UI x 10 ⁶)	Vía de administración y esquema	Tiempo total de tratamiento (días)
A	9	4	Peritoneocclisis	3
B	3	8	Peritoneocclisis	3
C	5	16 (1er. día)	Inyección IP+ Peritoneocclisis	
		8 (2do. y 3er. día)	Peritoneocclisis	
D	4	8	Inyección IP cada 12 horas	15

TABLA 1. Portadores asintomáticos del virus productor de la hepatitis B. Grupos estudiados. GRUPO A. Recibieron 4×10^6 UI cada 24 horas mediante peritoneocclisis durante tres días. GRUPO B. Recibieron 8×10^6 UI cada 24 horas mediante peritoneocclisis durante tres días. GRUPO C. Recibieron 16×10^6 UI el 1er. día, divididas en 8×10^6 UI como dosis intraperitoneal simple y 8×10^6 UI mediante peritoneocclisis, y a continuación, 8×10^6 UI el 2do. y 3er. días mediante peritoneocclisis. GRUPO D. Recibieron 8×10^6 UI cada 24 horas, administradas como inyección de 4×10^6 UI cada 12 horas, durante 15 días.

Preparación de interferón

Se utilizó para el estudio IFN- α leucocitario humano producido en el Centro de Investigaciones Biológicas de Cuba según el método de Cantell (Cantell *et al.*, 1981), con una actividad específica de $1,5$ a 2×10^6 U.I./mg proteína. Para este trabajo se realizó la prueba de estabilidad del IFN en iguales condiciones a las realizadas en el estudio en cuanto a dilución y a temperatura hasta un tiempo tres veces superior al empleado por dosis mediante peritoneocclisis.

Ensayo de interferón

Se determinaron los niveles del IFN sérico como actividad en el suero de los individuos estudiados mediante el método de inhibición del efecto citopatogénico. Se utilizó el virus *Mengo* y las células de cultivo de línea Hep-2. El título del IFN resultó de la comparación con el IFN- α de referencia cedido por K. Cantell, incluido en la prueba.

Resultados y consideraciones

La prueba de estabilidad del IFN utilizado demostró que no existió pérdida evidenciable de actividad antiviral del IFN utilizado bajo las condiciones experimentales de dilución, temperatura y tiempo.

Actividad antiviral del IFN sérico antes del inicio del tratamiento

De 18 portadores asintomáticos estudiados, en 13 (61%), el valor de la determinación de IFN pre-tratamiento fue 0, y en el resto, el valor promedio fue de 45 UI/ml. Se observó, como promedio, en el grupo 2 UI/ml. De ocho pacientes con hepatitis viral aguda tipo B, sólo en uno no se detectó actividad basal o endógena. El valor promedio del grupo fue de 36 UI/ml.

Actividad antiviral del IFN sérico después de iniciado el tratamiento. Estudio cinético

En los grupos sometidos a tratamiento con infusión constante (peritoneoclisis) durante 72 horas (A y B), así como en el grupo al que se administró 8×10^6 U por vía intraperitoneal al inicio del tratamiento, y seguidamente peritoneoclisis con 8×10^6 U/día (grupo C), los máximos valores del IFN en suero se obtuvieron a las 72 horas de iniciado el tratamiento (tabla 2).

Tabla 2

Grupo	Experimental																							
<i>A</i>	Infusión continua 4×10^6 c/24 horas																							
Horas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	24	48	72	73	74	75	75	77	78	79	80	81	82	96	
% valor máximo	4	18	37	40	-	41	-	50	37	56	46	100	-	56	-	-	37	37						
<i>B</i>	Infusión continua 8×10^6 c/24 horas																							
Horas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	24	48	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	96	
% valor máximo	4	-	17	9	4	8	7	11	6	50	-	100	-	-	69	62	54	30	33	59	-	39		
<i>C</i>	Dosis inicial 8×10^6 UI+ infusión constante 8×10^6 UI c/24 horas																							
Horas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	24	48	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	96	
% valor máximo	0	8	20	34	74	62	64	-	78	-	-	100	-	-	74	78	-	34	32	32	26			

TABLA 2. Algunos aspectos de la cinética de actividad de IFN- α en suero de portadores asintomáticos del virus de la hepatitis B, expresados como por ciento del valor máximo, a diferentes tiempos a partir del inicio del tratamiento.

En el grupo A, a las siete horas de iniciado el tratamiento, se alcanzaron valores similares a los obtenidos a las 24 horas.

En el grupo C se obtuvieron valores similares a partir de las cuatro horas de iniciado el tratamiento, lo cual consideramos que se corresponde con la mayor dosis empleada en este grupo para el primer día de tratamiento, así como con el hecho de que la mitad de ella se administra inicialmente en una sola inyección.

En el grupo B, si bien a las 24 horas de iniciada la infusión intraperitoneal continua de IFN, se alcanza el 50% de los valores máximos detectados a las 72 horas, el estudio secuencial de las primeras ocho horas no evidencia el incremento esperado, de acuerdo con los resultados obtenidos en los grupos anteriores; sin embargo, estos tres grupos se comportaron de forma similar en cuanto al decremento de la concentración del IFN sérico, determinándose que entre la tercera y la quinta horas después de culminado el tratamiento se detecta aproximadamente el 50% de la actividad de IFN sérico con respecto al máximo obtenido.

En el grupo D (tabla 3), analizando las primeras 12 horas a partir del inicio del tratamiento, el valor de IFN máximo se alcanzó a las ocho horas de la administración de 4×10^6 U, detectándose actividad de IFN en sangre a las dos horas de la inyección. A las 4, 6, 10 y 12 horas se alcanzan valores superiores a los detectados a las ocho horas de haber administrado la dosis inicial, lo cual pensamos que esté en relación con la administración de una segunda dosis a las 12 horas.

Tabla 3

Grupo Experimental								
D	Dosis simple IP 8×10^6 UI c/24 horas							
Horas	0	2	4	6	8	10	12	24
%valor máximo	0	25	75	75	100	75	75	162

TABLA 3. Aspectos de la cinética de actividad de IFN- α en suero, observados en el grupo D. Se expresan como porcentaje del valor máximo, a diferentes tiempos a partir del inicio del tratamiento.

La tabla 4 ilustra la determinación de actividad antiviral del IFN en sangre intrahepática con respecto a la actividad en sangre venosa antecubital. A las dos horas de culminado el tratamiento, se detectan valores promedios 7,7 veces superiores en la muestra hepática con respecto a la venosa (rango de valores entre 1 200 - 2 200 UI/ml para la primera y 180 - 240 UI/ml para la segunda).

Tabla 4

ACTIVIDAD ANTIVIRAL (UI/ml)

	Individuo 1	Individuo 2
Sangre intrahepática	1 200	2 200
Sangre venosa antecubital	180	240

TABLA 4. Determinación de actividad antiviral del IFN en sangre intrahepática y sangre venosa, tomadas simultáneamente a las dos horas de culminado el tratamiento en dos de los individuos estudiados.

Consideramos que este resultado preliminar, si bien no puede analizarse desde el punto de vista estadístico, apoya la utilización de esta vía en el tratamiento de las afecciones hepáticas, pues niveles altos en sangre intrahepática pudieran permitir la saturación de receptores de dichas células, sin necesidad de mantener niveles elevados en la circulación sistémica que pudieran producir efectos colaterales no deseados, lo cual está acorde con el objetivo planteado por diferentes autores de alcanzar mayor efectividad terapéutica con toxicidad mínima. En este sentido se requiere el estudio en un número mayor de casos.

A continuación describimos nuestros resultados en cuanto a efectos colaterales durante la administración del IFN a esta serie de individuos.

Temperatura

En el grupo A (fig. 1, tabla 5) se observó incremento en la temperatura a partir de la cuarta hora, aumentando ésta hasta la octava hora en que alcanzó un valor máximo de $0,84^{\circ}\text{C}$, por encima de 37°C .

En el grupo B hubo aumento en la temperatura a partir de la primera hora de iniciado el tratamiento con IFN, pero sólo en uno de los cinco individuos tratados. En general, se observó la tendencia al incremento con valores máximos entre tres y seis horas después de iniciado el tratamiento. El máximo alcanzado fue de $1,6^{\circ}\text{C}$ por encima de 37°C .

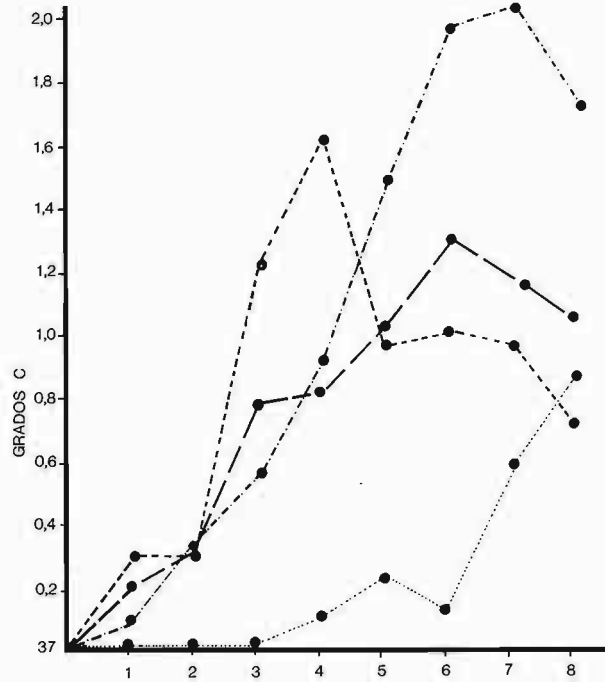


FIG. 1 Incrementos de temperatura durante el tratamiento con diferentes dosis de Hu IFN- α . Los valores en el eje de ordenadas corresponden a incrementos de temperatura en grados, por encima de 37 ; en las abscisas, a tiempo en horas.

GRUPO A 4×10^6 UI cada 24 horas

GRUPO B 8×10^6 UI cada 24 horas

GRUPO C 16×10^6 UI el 1er. día, y 8×10^6 UI el 2do. y 3er. días

GRUPO D 4×10^6 UI cada 12 horas mediante inyección intraperitoneal simple

Tabla 5

GRUPOS/HORAS	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0.	0.	0.	0,1	0,23	0,13	0,56	0,84
B	0,3	0,3	1,2	1,6	0,95	1.	0,45	0,7
C	0,1	-	0,55	0,92	1,48	1,96	2,29	1,7
D	0,20	0,30	0,76	0,81	1.	1,27	1,15	1,09

TABLA 5. Incrementos de temperatura en grados Celcius por encima de 37, a distintas horas, a partir del inicio del tratamiento en los grupos estudiados (A, B, C y D).

El grupo C mostró aumento de la temperatura a partir de las tres horas de iniciado el tratamiento, con un valor máximo a las siete horas que fue de $2,3^{\circ}\text{C}$ por encima de 37°C .

El incremento de temperatura en este grupo es mayor que el observado en los otros grupos, lo que consideramos que está en relación con la mayor dosis empleada en el período de tiempo estudiado.

En el grupo D se observó la máxima elevación en la temperatura a las seis horas, que fue de $1,4^{\circ}\text{C}$. Debemos señalar que no se detectó elevación de temperatura en todos los pacientes

tratados y que en términos generales, independientemente de que fuese infusión continua o dosis única, la elevación máxima se observó entre las cuatro y las ocho horas de iniciado el tratamiento.

De las 21 curvas de temperatura analizadas, sólo en cuatro de ellas no se observó incremento.

En 17 curvas (81%), se observó incremento de temperatura. Para un mismo procedimiento, la aparición y el máximo se observan más rápidamente en los individuos en los cuales se usaron mayores dosis.

En ninguno de los pacientes tratados detectamos cifras de plaquetas menores de $175\ 000/\text{mm}^3$, ni conteo de leucocitos por debajo de $5\ 000/\text{mm}^3$, por lo que consideramos que efectos indeseables como trombocitopenia o granulocitopenia pudieran estar relacionadas con niveles superiores del IFN sérico, a los alcanzados empleando la vía intraperitoneal. Igualmente, no detectamos elevación de las cifras de transaminasa glutamicopirúvica, aun con altas concentraciones de IFN en sangre intrahepática, por lo que si esto es un efecto secundario a la administración de IFN leucocitario, consideramos que pudiera relacionarse más bien con el tiempo de tratamiento que con la concentración intrahepática. Para valoraciones relacionadas con largo tiempo de tratamiento no tenemos criterio, pues el estudio se hizo en un corto período de tiempo.

CONCLUSIONES

1. Actividad antiviral en suero. En el 61% de los portadores asintomáticos estudiados no se detectó actividad del IFN antes del tratamiento, encontrándose valores muy inferiores a los detectados en enfermos de hepatitis viral tipo B. En todos los grupos que recibieron tratamiento con infusión constante, el valor máximo del IFN en suero coincidió con la terminación de este (72 horas). El incremento en los niveles del IFN sérico se observó más tempranamente en el grupo sometido a mayor dosis inicial, C. La desaparición del IFN sérico se comportó de forma similar en los tres grupos, detectándose el 50% de la actividad máxima de las ocho horas postratamiento.
2. Los valores del IFN sérico de sangre intrahepática con respecto a los de la vena antecubital, tomados a las dos horas de terminada la peritoneoclasia, fueron 7,7 veces superiores.
3. El incremento en la temperatura está relacionado con la dosis, iniciándose este en general a las tres horas del comienzo del tratamiento. Los valores máximos se observaron entre las tres y las ocho horas.
4. En ninguno de los individuos tratados se detectaron alteraciones en cuanto a cifras de transaminasa, conteo de plaquetas y leucograma.

REFERENCIAS

- BRANCA, A. A.; C. R. FATTYNEK; S. B. D'ALESSANDER y C. GAGLIONI (1982). *Interaction of Interferon with cellular receptors*. J. Biol. Chem. **25**, 13291-13296.
- BOCCI, V. (1982). *Pharmacokinetics of interferons. A reappraisal*. Tex. Rep. Biol. Med. **41**, 336-343.
- CANTELL, K. y L. PYHALA (1976). *Interferon: properties and production. Pharmacokinetic of human leukocyte interferon*. J. Infect. Disease **133**, Supplement A6-A12.
- CANTELL, K.; S. HIRVONEN; H. L. KAUPPINEN y G. MYLLYLÄ (1981). *Production of interferon in human leukocytes from normal donors with the use of Sendai virus*, en *Methods in Enzymology*, **78** Part. A. S. Pestka ed. Acad. Press, New York y London, pp. 29-38.
- CANTELL, K.; S. HIRVONEN y V. KOISTINEN (1981). *Partial purification of human leukocyte interferon on a large scale*, en *Methods in Enzymology*, **78** Part. A. S. Pestka ed. Acad. Press, New York y London, pp. 499-505.
- DIANZANI, F. y S. BARON (1975). *Unexpectedly rapid action of human interferon in physiological conditions*. Nature **257**, 682-689.
- HANNIGAN, G. E.; D. R. GEWERT; E. N. FISH; S. E. READ y B. R. G. WILLIAMS (1983). *Differential binding of human interferon subtypes to receptors on lymphoblastoid cells*. Biochem. Biophys. Res. Com. **110**, 537-544.
- HILL, N. O.; A. KHAN; E. LOEB; A. PARDUE; C. ALEMAN; G. DORN y J. M. HILL (1980). *Clinical trials of high dose human leukocyte interferon*, en *Interferon Properties and clinical uses*. A. KHAN; N. O. HILL; G. L. DORN, ed. Leland. Fibes Foundation Press, Dallas, Texas, pp. 667-677.
- JOSHI, A.R.; F. H. SARKAR y S. L. GUPTA (1982). *Cross-Linking of human leukocyte interferon on α -2 to its receptor on human cells*. J. Biol. Chem., **257**, 13884-13887.
- MERIGAN, T. C. (1981). *Present appraisal of and future hopes for the clinical utilization of human interferons*, en *Interferon 3*. I. Gresser. ed. Acad. Press. London, pp. 135-154.
- STEWART II, W. E. (1979). *Pharmacokinetics of Interferons*, en *The Interferon System*. W. E. STEWART II. ed. Springer Verlag, Berlin, of New York, pp. 257-265.
- MYERS, M. y G. GALASSO (1982). *Interferon, an antiviral drug for use in man*. Tex. Rep. Biol. Med. **41**, 543-547.