

Análisis de indicadores del virus de la hepatitis B en portadores asintomáticos tratados con Hu IFN α por vía intraperitoneal

ANTONIO GONZALEZ GRIEGO¹, V. RAMIREZ ALBAJES², M. LIMONTA VIDAL², E. SELMAN-HOUSSEIN ABDO², A. ALERM GONZALEZ¹, J. A. MALBÉRTY AGUERO¹, C. SANTISO LESCAILLES³, R. B. GONZALEZ¹

- 1) Instituto Superior de Ciencias Médicas, La Habana, Cuba
- 2) Centro de Investigaciones Biológicas, La Habana, Cuba
- 3) Laboratorio Central de Criminalística, La Habana, Cuba

RESUMEN

Los portadores asintomáticos constituyen reservorios importantes del virus de la hepatitis B, a pesar de lo cual no se han reportado hasta el momento ensayos terapéuticos en estos grupos. Por constituir, además, un modelo que permite evaluar las bondades de los antivirales junto a los antecedentes del empleo de la vía intraperitoneal en trabajos anteriores realizados en nuestro medio, hemos empleado esta vía para administrar IFN en concentraciones crecientes a 15 portadores asintomáticos a los que no se les detectó actividad de IFN circulante antes de iniciar la experiencia. Se estudiaron el número total de partículas, partículas de Dane, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y antígeno "e" (HBeAg). Las variaciones encontradas en estos indicadores denotan que se alcanzó el estado antiviral con los tres esquemas empleados. A pesar de las limitaciones del tamaño de la muestra, se observaron las mayores modificaciones al mes postratamiento en el grupo al cual se administró la dosis más elevada, pudiendo clasificarse la evolución de algunos de los tratados como de tipo II. La ausencia de toxicidad y complicaciones validan el fármaco y la vía empleada para nuevos ensayos tendientes a lograr un esquema terapéutico racional, determinando dosis, periodicidad y duración del tratamiento.

SUMMARY

Asymptomatic carriers are important reservoirs of hepatitis B virus, regardless of which no therapeutical tests in these groups have been performed. Besides, as they are a model which permits the evaluation of the advantages of the antiviruses, together with their previous use via intraperitoneum in works conducted in our environment, we have used this path to administer IFN in increasing concentrations to 15 asymptomatic carriers in which no activity of the circulating IFN was detected prior to the beginning of the experiment. The overall number of particles: Dane particles, hepatitis B surface antigen (HBsAg), and e antigen were studied. The changes found in these markers indicate that

the antivirus state with the three patterns used were achieved. Besides the limitations of the size of sample used, the highest post-treatment changes were achieved one month after in the group which received the highest dose, and the evolution of some of the cases treated were classified as type II. The lack of toxicity and complications validate both, the drug and the path used for new tests aimed at achieving a rational therapeutic scheme, determining dose, periodicity and duration of the treatment.

INTRODUCCION

Todo programa tendiente a controlar la diseminación del virus productor de la hepatitis B (VHB) debe tener en cuenta los reservorios del mismo (Francis, 1983) los cuales están distribuidos en la población como enfermos y asintomáticos. Sin embargo, la mayor parte de los esquemas terapéuticos basados en el uso de antivirales en general y de los interferones (IFN) en particular, se han llevado a cabo en enfermos, sobre todo en aquellos que presentaban formas crónicas de la enfermedad (Müller *et al.*, 1981^a; Müller *et al.*, 1981^b; Scullar *et al.*, 1981; OMS, 1983), habiéndose obtenido resultados alentadores en cuanto a variaciones en los indicadores del VHB. A causa de la heterogeneidad de las variaciones de estos con diferentes tratamientos, es que ha sido propuesta una clasificación evolutiva que permite evaluar las bondades y los beneficios de los antivirales, además de señalar la labilidad de los indicadores (Müller *et al.*, 1981^b; Dronenberg *et al.*, 1982). Esta clasificación producto del análisis de trabajos realizados por el grupo que dirige el Dr. Merigan (1976-1980), considera tres grupos, desglosados de la siguiente manera:

Tipo III: Aquellos que evidencian una disminución transitoria de los indicadores del virus durante la administración de la droga.

Tipo II: Aquellos que evidencian desaparición de partículas de Dane y desaparición del HBeAg.

Tipo I: Aquellos con una completa desaparición del HBsAg y partículas de Dane.

Existen algunos hechos que permiten prever una mejor evolución de los pacientes tratados, los cuales no están relacionados con el esquema terapéutico empleado. Es así que individuos a los cuales se les ha realizado el diagnóstico de hepatitis crónica activa, mujeres, y aquellos con antecedentes de haber recibido esteroides recientemente, evolucionaron más favorablemente (Scullard *et al.*, 1981; Merigan, 1982; Smith *et al.*, 1983). Estos autores señalan elevaciones en los niveles de transaminasa glutámico-oxaloacética durante el tratamiento antiviral, asociadas a una disminución simultánea de los niveles de indicadores séricos de la partícula de Dane, lo cual podría relacionarse con manifestaciones de una respuesta inmune que se evidencia en estas circunstancias.

Por otra parte, los indicadores se mueven de forma más ostensible espontáneamente a medida que se expresan más intensamente los signos clínicos, bioquímicos y tisulares de la enfermedad, por lo que evaluar en los enfermos un régimen terapéutico determinado, requiere tener en cuenta estas consideraciones.

Entre las características de los indicadores del HBV en los reservorios asintomáticos, se encuentran su estabilidad, los altos niveles del HBsAg que exhiben y la elevada frecuencia de aparición del HBeAg, lo cual denota su alto grado de infección. Además, la ausencia en ellos de antecedentes patológicos personales relativos a esta enfermedad, así como su gran número y distribución en la población, evidencian la importancia de su detección (González Griego *et al.*, 1984). Si a lo anterior añadimos que en la literatura se debate la capacidad de este virus como inductor

de IFN (Patricia Taylor and Zuckerman, 1968) y que en el 61% de estos portadores no se detectó interferón sérico circulante, (Victoria Ramírez *et al.*, 1984), es que consideramos que se impone la búsqueda de soluciones terapéuticas para ellos, no sólo por la magnitud del problema que representan, sino que esto, a su vez, constituye una vía de obtener un modelo de tratamiento adecuado.

En estudios farmacocinéticos realizados en nuestro medio, se detectaron valores de IFN sérico en sangre intra hepática 7,7 veces superiores a los encontrados en sangre periférica, dos horas después de culminada la administración de la droga por vía intraperitoneal (Victoria Ramírez *et al.*, 1984).

En este trabajo se reporta, por vez primera, un ensayo terapéutico en portadores asintomáticos, empleando IFN α producido en el Centro de Investigaciones Biológicas, administrado por vía intraperitoneal con regímenes ascendentes de dosis y durante períodos de tiempo cortos, evaluando diferentes indicadores del virus.

MATERIALES Y METODOS

Para este estudio se seleccionaron 15 adultos masculinos, donantes del Banco de Sangre Provincial de Ciudad de La Habana, con presencia del antígeno de superficie del virus productor de la hepatitis B (HBsAg) en suero, y clasificados como portadores asintomáticos de acuerdo con los siguientes criterios: ausencia de manifestaciones clínicas, valores de alaninaminotransferasa y tiempo de protrombina normales, título del HBsAg constante al menos un mes antes del tratamiento, ausencia de alteraciones hepáticas según criterio laparoscópico y de biopsia hepática, así como no detección de actividad antiviral de interferón en suero antes de iniciar el tratamiento.

Las determinaciones de alaninaminotransferasa, tiempo de protrombina y HBsAg, se realizaron semanalmente durante un mes antes del inicio del tratamiento. El estudio laparoscópico y la toma de biopsia se efectuaron una vez finalizado el tratamiento.

Estos portadores fueron tratados con interferón leucocitario humano producido en el Centro de Investigaciones Biológicas según método de Cantell (Cantell *et al.*, 1981), empleando como vía de administración la intraperitoneal, quedando conformados tres grupos de la siguiente manera:
Grupo A: Compuesto por 6 individuos, a los cuales se administró 4 Mega Unidades cada 24 horas, mediante peritoneocclisis (infusión continua) durante 3 días.

Grupo B: Integrado por 4 individuos, a los cuales se administró 8 Mega Unidades cada 24 horas mediante peritoneocclisis durante 3 días.

Grupo C: Compuesto por 5 sujetos a los cuales se administró 16 Mega Unidades distribuidas de la siguiente manera: 8 Mega Unidades mediante inyección intraperitoneal única y 8 Mega Unidades en peritoneocclisis, el primer día; los otros dos días de los tres que duró el tratamiento, se mantuvo peritoneocclisis a razón de 8 Mega Unidades cada 24 horas.

Se determinó evolutivamente en suero el título del antígeno de superficie mediante contrainmunolectroforesis (empleando reactivos biológicos producidos en nuestro medio) (González Griego *et al.*, 1984), al antígeno "e" mediante ELISA (sistema donado por la Dra. Helga Meisel) y el número de partículas totales y partículas de Dane por la Inmunomicroscopía Electrónica, empleando un método de formación de una fase sólida de anticuerpo por acoplamiento a la rejilla, seguido de incubación con la muestra investigada y finalmente reincubación con anticuerpos, de acuerdo al método descrito por Santiso C. (Santiso *et al.*, 1984).

La inclusión de los casos seleccionados en cada uno de los tres grupos, se realizó secuencialmente, a medida que eran detectados y cumplían los requisitos exigidos pretratamiento.

Las variables en suero fueron estudiadas al inicio, al final y al mes de haber concluido el tratamiento.

RESULTADOS

En todos los individuos estudiados, se observó en el período pretratamiento una ausencia de uniformidad entre ellos en lo que respecta al número total de partículas, incluyendo las de Dane, título del HBsAg y presencia del HBeAg. No obstante, estos indicadores mostraron para un mismo individuo gran estabilidad durante el mes que precedió a la administración del IFN.

En el grupo A, sometido a infusión constante con 4 Mega Unidades, se observó una disminución del número de partículas y partículas de Dane después del tratamiento en 3 de los casos, y al mes de terminado el mismo, en todos los que componían el grupo. El HBsAg se mantuvo constante durante todo el período en 3 de los individuos, encontrándose un decremento en el resto al mes de administrada la droga antiviral, sin que en ningún momento llegara a hacerse negativo. El HBeAg se mantuvo positivo en el único caso en que el mismo se detectó (tabla 1).

Tabla 1

Variables analizadas Sujetos tratados	Antes del tratamiento				Después del tratamiento				1 mes posterior al tratamiento			
	Partículas Total	Partículas Dane	s	e	Partículas Total	Partículas Dane	s	e	Partículas Total	Partículas Dane	s	e
1	*	*	2	—	*	*	2	—	*	*	2	—
2	688	8	16	*	396	12	16	*	159	12	8	*
3	3193	12,8	8	—	418	4,8	8	—	386	5,6	8	—
4	*	*	8	—	*	*	8	—	*	*	8	—
5	7642	108,8	64	+	8400	88	64	+	494	9,6	16	+
6	354	14	16	—	248	2	16	—	289	4	8	—

TABLA 1. Título del HBsAg, presencia del HBeAg y número de partículas asociadas al VHB en asintomáticos tratados con IFN α 4 Mega Unidades c/24 horas durante 3 días, mediante peritoneoclisis (grupo A).

En el grupo B, al cual se administró 8 Mega Unidades, el número total de partículas disminuyó inmediatamente después del tratamiento en 2 de los individuos, al igual que el número de partículas de Dane, no siendo uniforme este decremento durante el período que duró la experiencia. El HBsAg se mantuvo constante en tres de los casos, y en aquel en el que el título descendió, ello se produjo al mes postratamiento. En el individuo donde se detectó el HBeAg, no se evidenciaron cambios para este indicador (tabla 2).

Tabla 2

Variables analizadas Sujetos tratados	Antes del tratamiento				Después del tratamiento				1 mes posterior al tratamiento			
	Partículas Total	Partículas Dane	s	e	Partículas Total	Partículas Dane	s	e	Partículas Total	Partículas Dane	s	e
1	2860	16	16	—	2071	20	16	—	4878	23,6	16	—
2	*	*	8	—	*	*	8	—	*	*	4	—
3	813	9,2	8	+	252	4,8	8	+	1435	4	8	+
4	436	14	8	*	323	2	8	*	738	18	8	*

TABLA 2. Título del HBsAg, presencia del HBeAg y número de partículas asociadas al VHB en asintomáticos tratados con IFN α 8 Mega Unidades, c/24 horas durante 3 días, mediante peritoneocclisis (grupo B).

En el grupo C, al cual se administró la dosis mayor, se observó una disminución evidente del número total de partículas, tanto al finalizar el tratamiento como al mes posterior (fig. 1),

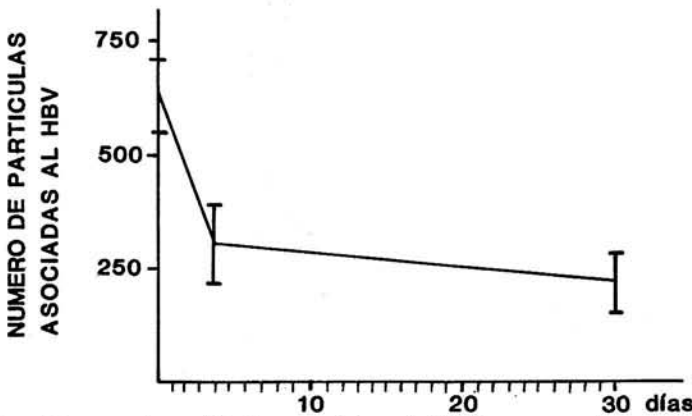


FIG. 1. Número de partículas asociadas al VHB en portadores asintomáticos, tratados con IFN α al final del tratamiento y 30 días después (grupo C).

siguiendo las partículas de Dane este mismo comportamiento. En todos los casos tratados, disminuyó el título del HBsAg al mes de culminado el tratamiento y el HBeAg se hizo negativo en dos de los cuatro en los que se encontró evidencia de este indicador (tabla 3).

Tabla 3

Variables analizadas Suje tos tratados	Antes del tratamiento				Después del tratamiento				1 mes posterior al tratamiento			
	Partículas Total	Partículas Dane	S	e	Partículas Total	Partículas Dane	S	e	Partículas Total	Partículas Dane	S	e
1	*	*	8	+	*	*	8	+	*	*	4	+
2	824	3,2	8	+	351	2,4	4	-	171	2,8	4	-
3	485	64	8	+	167	9,6	8	+	50	1,6	4	-
4	*	*	32	-	*	*	16	-	*	*	8	-
5	610	17,6	16	+	324	11,2	16	+	131	6,4	4	+

TABLA 3. Título del HBsAg, presencia del HBeAg y partículas asociadas al VHB en asintomáticos tratados con IFN α , 16 Mega Unidades, distribuidas en inyección I.P. única, más peritoneocclisis el primer día, y 8 Mega Unidades c/24 horas mediante peritoneocclisis durante 2 días.

DISCUSION

Independientemente de las limitaciones que implica analizar resultados con una muestra pequeña, de forma preliminar hemos podido evidenciar algunos hechos que deben tenerse en consideración. Si bien todos los portadores asintomáticos se caracterizaron por su constancia para cada uno de los indicadores estudiados pretratamiento, este no fue el comportamiento exhibido por los mismos después de iniciada la terapéutica antiviral. No obstante, prácticamente en todos se observaron modificaciones, al menos para algún tipo de indicador, en los tres grupos, lo cual denota que se alcanzó el estado antiviral con el IFN producido en nuestro medio, en los tres grupos, los cuales tenían en común la vía y el tiempo de administración.

El análisis de cada uno de los grupos permite señalar que aun cuando existieron variaciones individuales, la estabilidad de los diferentes indicadores en orden decreciente está de acuerdo con lo referido en la literatura, (Müller *et al.*, 1981^b; Kronenberg *et al.*, 1982), es decir, el número de partículas de Dane, el HBeAg y finalmente el HBsAg, siendo esta variación más ostensible y estable en el grupo C. Esto pone de manifiesto que dichas variaciones están directamente relacionadas con la dosis, y que quizás, aunque el tiempo de desaparición de estos

indicadores pudiese ser diferente, es posible que la dosis de IFN requerida no sea la misma para la inhibición de la replicación de cada uno de ellos.

En general, en los tres grupos después del tratamiento, los aspectos evolutivos pueden ser considerados como del tipo III, pero donde se manifestaron modificaciones al mes postratamiento con mayor permanencia e intensidad, no sólo para el número de partículas sino para el HBeAg, fue en el grupo C, que recibió mayor dosis, pudiendo clasificarse algunos de los casos como evolución de tipo II.

Por último, podemos destacar la ausencia de complicaciones en los individuos estudiados, atribuibles a la vía de administración o a la droga antiviral utilizada, teniendo en cuenta las recomendaciones de la OMS en cuanto a toxicidad para granulocitos y plaquetas (WHO, 1982), pues la determinación diaria de estas variables mostró valores nunca inferiores a 2 y $100 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ respectivamente. La ausencia de toxicidad y las variaciones observadas en los indicadores con los esquemas empleados, constituyen un punto de partida favorable para la ejecución de nuevos ensayos que permitan no solo validar la vía intraperitoneal iniciada por nuestro grupo, sino además definir dosis óptima, periodicidad y duración del tratamiento en este importante grupo de reservorios, lo cual podría ser posteriormente aplicado a los que manifiestan signos de la enfermedad en sus diferentes formas.

REFERENCIAS

- CANTELL, K.; S. HIRVONEN y V. KOISTINEN (1981). *Partial purification of human leucocyte interferon on a large scale*; en *Methods in Enzymology*, 78 part. A. S. Pestka Ed. Acad. Press N. Y., London, pp. 499-505.
- FRANCIS D. P. (1983). *Selective Primary Health Care: Strategies for control of disease in the developing world III. Hepatitis B virus and its related diseases*. *Review Infect. Dis.* 5, 322-329.
- GONZALEZ GRIEGO, A.; A. ALERM; J. A. MALBERTI; R. BLANCO; J. L. VINGUT; I. VEGA; C. SANTISO; F. VALERON y A. CADIZ (1984). *Diagnóstico, tratamiento y profilaxis de la Hepatitis Viral Tipo B*. *Avances de las Ciencias Médicas serie divulgación No. 2*, ISCM-H.
- KRONENBERG, L. G.; H. M. ROSENBLATT; Y. BRINSON y T. C. MERIGAN (1982). *UCLA Conference. Interferon: Immunology and Clinical significance*. *Ann. Intern. Med.* 96, 80-83.
- MERIGAN, T. C. (1982). *Interferon therapy in viral infections and malignant disease. The clinical potential of interferons. Treatment of viral diseases and malignant tumors. Proceedings of the international conference on clinical potenciales of interferons in viral diseases and malignant tumors*. Japan medical research foundation. Reisaku Kono and Jan Vilcek editors. Univ. Tokyo Press. Publication No. 15, 103-110.
- MÜLLER, R.; W. SIEGERT; H. P. HOFSCHEIDER; F. DEINHARDT; G. FRÖSNER; I. VIDO y F. W. SCHMIDT (1981a). *Treatment of chronic active hepatitis B (CAHB) with human interferon beta*. Elsevier North-Holland Biomed. Press, The biology of the interferon system. Editors E. De Maeyer, G. Galasso and H. Schellekens. pp. 355-359.
- MÜLLER, R.; F. DEINHARDT; G. FRÖSNER; H. P. HOFSCHEIDER; H. KLEIN; F. W. SCHMIDT; W. SIEGERT; E. WILLE e I. VIDO (1981). *Human interferon-beta in chronic active hepatitis B: preliminary data of a controlled trial*. *Proc. of 3erd International Expert Meeting of Deutsche Stiftung für Holbsforschung*, Bonn, March 13-16, en *Contribution to oncology*, K. Munsbard, H. Kirchner editors. 11, 197-204.

- OMS (1983). *Foro Mundial de la Salud*. Revista Internacional de Desarrollo Sanitario **4**, 155-162.
- RAMIREZ ALBAJES, V.; A. GONZALEZ GRIEGO; M. LIMONTA VIDAL; S. BARCELONA; N. FERNANDEZ PARDO y E. SELMAN-HOUSSEIN ABDO (1984). *Uso del IFN- leucocitario por vía intraperitoneal en humanos; aspectos farmacocinéticos*. Interferón y Biotecnología **1**, 31-39.
- SANTISO, C.; O. ANCHETA; A. GONZALEZ GRIEGO y A. ALERM (1983). *Inmunomicroscopía electrónica aplicada a la caracterización de partículas asociadas al virus de la hepatitis B en pacientes tratados con interferón leucocitario*. Memorias Primer Seminario Cubano sobre Interferón (en prensa).
- SCULLARD, G. H.; R. B. POLLARD; J. L. SMITH; S. L. SACKS; P. B. GREGORY; W. S. ROBINSON y T. C. MERIGAN (1981). *Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus infection. I. Changes in viral markers with Interferon combined with Adenine Arabinoside*. J. Infect. Dis. **143**, 772-783.
- SMITH, C. I.; J. WEISSBERG; L. BERNHARDT; P. B. GREGORY; W. S. ROBINSON y T. C. MERIGAN (1983). *Acute Dane particle suppression with recombinant leukocyte A Interferon in chronic hepatitis B virus infection*. J. Infect. Dis. **148**, 907.
- TAYLOR P. E. y A. J. ZUCKERMAN (1968). *Non production of interfering substances by serum from patients with infections hepatitis*. J. Med. microbiol. **1**, 217-219.
- WHO (1982). *Report scientific group. Interferon therapy*. Technical report series **676**, 14.