

Trabajos originales

Uso del interferón leucocitario durante una epidemia de dengue hemorrágico (virus tipo II) en Cuba

M. LIMONTA¹, V. RAMIREZ¹, P. LOPEZ SAURA¹, A. AGUILERA¹, E. PENTON¹, S. BARCELONA¹, A. GONZALEZ², R. DUJARRIC², C. DOTRES³, O. LEGON⁴, E. SELMAN-HOUSSEIN¹

- 1) Centro de Investigaciones Biológicas, La Habana, Cuba
- 2) Instituto Superior de Ciencias Médicas, La Habana, Cuba
- 3) Grupo de Pediatría Nacional, MINSAP, La Habana, Cuba
- 4) Hospital Pediátrico San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba

RESUMEN

Durante una epidemia de fiebre del dengue hemorrágico en Cuba, el interferón leucocitario se utilizó en dos diseños experimentales. Por una parte, el interferón disminuyó significativamente el número de complicaciones y muertes cuando se aplicó por vía intramuscular, a razón de $5 \cdot 10^4$ U/kg de peso corporal durante tres días, en 165 niños comparados con un grupo control de 160.

En otro estudio, el uso del interferón leucocitario por vía intramuscular ($1,5 \cdot 10^6$ U diariamente durante tres días) en un grupo tomado al azar, de 9 pacientes adultos comparados con un grupo control de ocho casos mostró una tendencia hacia resultados positivos de acuerdo con las diferencias significativas encontradas en parámetros de laboratorio.

No se encontró sistemáticamente la toxicidad debida al interferón.

SUMMARY

During the epidemic outbreak of Dengue haemorrhagic fever in Cuba, Leukocyte Interferon was used in two trials.

On the one hand Interferon decreased significantly the rate of complications and death when applied intramuscularly ($5 \cdot 10^4$ units per Kg during 3 days) on 165 children, as compared with a control group of 160.

On the other hand, the use of Interferon intramuscularly ($1.5 \cdot 10^6$ units daily for 3 days) in a strictly randomized group of 9 adult patients compared with a control group of 8 cases showed a tendency toward positive results according to the significant differences found in laboratory parameters.

Toxicity due to Interferon treatment was not found systematically.

INTRODUCCION

La actividad antiviral del interferón ha sido su característica más importante desde que fue descubierto por Isaacs y Lindenmann en 1957 (Isaacs y Lindenmann, 1957). Varios estudios han demostrado la eficacia de este producto en distintos tipos de infecciones virales *in vitro* (Arya et al., 1980; Fiedman, 1979). Se ha aplicado *in vivo* en infecciones virales locales y generalizadas como en la querato conjuntivitis viral severa (Sundmacher et al., 1981; Romano et al., 1980) en enfermedades del tractus respiratorio superior (Soloviev, 1969; Merigan et al., 1973) en enfermedades virales de la piel (Ikic et al., 1975) en infección por el virus de la hepatitis B (Greenberg, 1976; González et al. y Ramírez et al., 1984) en infección por citomegalovirus (Dunnick et al., 1970), en papilomatosis laríngea (Haglund, 1981; Limonta, 1983).

La enfermedad del dengue puede ser primaria o secundaria. Esta última está casi siempre asociada con anticuerpos producto de una preinfección por dengue y es la que generalmente puede desarrollar la clásica fiebre hemorrágica del dengue y el síndrome de *shock* del dengue. Esta enfermedad brota súbitamente con fiebre, náuseas, vómito, decaimiento, petequias dos días después de su aparición y finalmente hemorragia y *shock*. Más de 350 000 pacientes han sido hospitalizados y se han reportado más de 12 000 muertes en todo el mundo desde 1956 hasta 1980 (Halstead, 1980).

En este trabajo informamos sobre el uso del interferón leucocitario en un brote epidémico de dengue viral tipo II, a mediados de 1981 en Cuba. En un período de cuatro meses se reportaron más de 200 000 casos, principalmente de niños; 152 murieron a causa de un *shock* severo y hemorragia.

Con el fin de evitar las complicaciones graves de esta enfermedad, comenzamos a usar el interferón en un grupo de niños y se comparó su evolución con la de un grupo similar de control que no recibió interferón.

También se trató un segundo grupo de pacientes seleccionados al azar en un estudio a doble ciego controlado con placebo.

MATERIALES Y METODOS

Interferón: Interferón leucocitario humano semipurificado, producido en el Centro de Investigaciones Biológicas de La Habana, siguiendo el método del profesor Cantell (Cantell y Hirvonen, 1981; Cantell et al., 1981a; Cantell et al., 1981b), con una actividad específica de $1-1,5 \cdot 10^6$ U/mg de proteína, suministrado siempre por vía intramuscular.

Pacientes y esquema de tratamiento

Primer estudio

Trescientos cincuenta niños entre 5 y 14 años fueron ingresados durante las primeras 48 horas de la enfermedad. El diagnóstico se basó en un examen clínico siguiendo el criterio de la OMS (Nimmannitya et al., 1969); 165 pacientes recibieron 50 000 unidades de interferón por kilogramo de peso durante los primeros tres días de ingreso, mientras que 160 no recibieron interferón.

Se seleccionaron dos hospitales para esta prueba. En uno de ellos ingresó el grupo tratado con interferón y en el otro el grupo de control. Ambos hospitales tenían las mismas condiciones generales y un equipo científico equivalente.

Los dos grupos de niños estuvieron ingresados entre el 17 de julio y el 15 de agosto de 1981; en ambos hospitales los criterios para los ingresos, altas, evolución clínica y tratamiento sintomático general fueron similares.

Segundo estudio

Se estudiaron 17 casos de pacientes adultos, todos con el diagnóstico clínico y serológico de dengue. El diagnóstico serológico se basó en la inhibición de la hemaglutinación (Clarke y Casals, 1958) y las pruebas de fijación del complemento (Sever, 1962). Todos los pacientes fueron ingresados antes de 48 horas después de la aparición de la enfermedad y se dividieron en dos grupos:

Nueve pacientes recibieron interferón $1,5 \cdot 10^6$ unidades diarias durante tres días; el otro grupo de 8 pacientes recibió NaCl 0,15 M en lugar de interferón. Estos dos grupos fueron seleccionados al azar; ni los pacientes ni el personal asistente conocía a qué grupo pertenecía cada paciente.

Los diferentes parámetros estudiados fueron: hematocrito, hemoglobina, eritrosedimentación, conteos de glóbulos blancos, de neutrófilos segmentados, de neutrófilos de banda y juveniles, de eosinófilos, de linfocitos, de monocitos, tiempo de sangramiento, tiempo de coagulación, conteo de plaquetas, tiempo de protrombina, transaminasa glutámica oxalacética y transaminasa glutámica pirúvica en suero, días de artromialgias y debilidad general.

Procedimiento estadístico

Se evaluaron los parámetros cuantitativos usando la prueba de la t de Student. Para la evaluación de los parámetros cualitativos se utilizó la prueba de la probabilidad exacta de Fisher. En ambos casos las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Estudio a gran escala en niños con fiebre hemorrágica del dengue

La tabla 1 muestra que ninguno de los casos tratados con interferón tuvo complicaciones graves (grado III-IV, y muerte). Sin embargo, en el grupo que no recibió interferón 8 niños tuvieron por lo menos *shock* y dos murieron. Estos resultados son altamente significativos según la prueba de chi cuadrado ($p < 0,001$).

Tabla 1
ESTUDIO EN GRAN ESCALA DE NIÑOS CON DENGUE

	Número total de casos	Grado II	Grado III-IV	Muertes
Interferón	165	44	0	0
Control	160	32	8	2

Significativo para $p < 0,001$

Estudio doble ciego, al azar, controlado por placebo

No hubo diferencias significativas en relación con los parámetros clínicos entre ambos grupos de pacientes (tabla 2). Existieron diferencias significativas durante el tercer día al comparar ambos grupos en el conteo de neutrófilos de banda y juveniles, el resto de los parámetros en el conteo de leucocitos y corpúsculos rojos no mostró ninguna diferencia significativa (tabla 3 a-b). Se encontró una diferencia significativa el tercer día en el tiempo de sangramiento y en el conteo de plaquetas al comparar ambos grupos. Es de destacar, que a pesar de las diferencias significativas, las cifras en ambos grupos aparecen dentro de los límites normales. No se encontraron diferencias en el resto del perfil de coagulación (tabla 4). Finalmente hubo una diferencia significativa en el quinto día en las transaminasas séricas de ambos grupos (tabla 5). En el caso de la transaminasa glutámica-pirúvica, la actividad retomó sus valores normales.

Tabla 2

ESTUDIO DEL GRUPO CONTROL POR EL METODO DE DOBLE CIEGO AL AZAR (DATOS CLINICOS)

	Días de evolución			
	Síntomas	Cefalea	Artromialgias	Astenia
<i>Interferón</i>				
Grupo tratado con Interferón	5.22 (1.20)	2.11 (0.78)	2.22 (0.66)	2 (1.32)
<i>Control</i>				
Grupo Control	5 (1.19)	2.5 (0.75)	2.87 (0.8)	2.37 (1.76)

Significativo para $p < 0,05$

Tabla 3 (a)

ESTUDIO DEL GRUPO CONTROL POR EL METODO DE DOBLE CIEGO AL AZAR: HEMATIES

Días	Hematocito ml por 100 ml	Hemoglobina gm por 100 ml	Eritrosedimentación mm/h
<i>Interferón</i>			
2	43 (1.4)	13.02 (0.41)	
3	43 (2.8)	12.62 (1.62)	8.5 (6.11)
4	43 (4.3)	13.02 (1.62)	9.66 (3.01)
5	43 (1.2)	13.44 (0.18)	
<i>Control</i>			
2	44 (4.5)	13.16 (1.73)	
3	44 (4.5)	13.19 (1.53)	8.8 (6.14)
4	45 (4.5)	13.59 (1.46)	6.7 (3.05)
5	45 (3.0)	13.80 (0.66)	

Significativo para $p < 0,05$

Tabla 3 (b)

CONTEO DE LEUCOCITOS

Días	Leucocitos/ mm^3	Neutrófilos segmentados	Juveniles y neutrófilos de banda	Eosinófilos/ mm^3	Linfocitos/ mm^3	Monocitos/ mm^3
<i>Interferón</i>						
2	7675 (2689)	6263 (2545)	206 (150)	112 (190)	851 (339)	243 (121)
3	5911 (2168)	4425 (2079)	212 (155)*	107 (92)	834 (250)	333 (288)
4	4725 (1650)	3245 (1575)	255 (97)	160 (234)	757 (264)	308 (182)
5	4900 (1160)	3048 (848)			1521 (304)	331 (305)
<i>Control</i>						
2	5100 (1485)	3731 (2076)	130 (114)	132 (232)	797 (501)	310 (177)
3	6500 (3497)	4388 (2452)	433 (359)*	134 (276)	1239 (557)	306 (213)
4	4520 (2104)	2828 (1255)	280 (149)	78 (86)	927 (370)	407 (198)
5	4433 (1877)	2194 (1067)			1863 (950)	376 (165)

* Los valores difieren significativamente para $p < 0,05$ con respecto al grupo control

Tabla 4

PERFIL DE COAGULACION

Días	Tiempo de coagulación (minutos)	Tiempo de sangramiento (minutos)	Conteo de plaquetas/ mm^3 ($\times 10^3$)	Tiempo de protrombina (segundos)
<i>Interferón</i>				
2			218 (30)	
3	9.44 (2.14)	1.58 (0.3)*	242 (35)*	13.0 (14)
4	9.21 (2.64)	1.57 (0.6)	218 (28)	12.3 (12)
<i>Control</i>				
2			228 (35)	
3	9.83 (1.21)	2.41 (0.8)*	224 (15)*	13.2 (12.8)
4	10.1 (2.4)	1.71 (0.68)	231 (23)	13.1 (13)

* Significativo para $p < 0,005$

Tabla 5
ACTIVIDAD DE LAS TRANSAMINASAS

Días	A	B
<i>Interferón</i>		
3	24.37 (11.9)	12.05 (5.33)
4	31.6 (14.25)	19.5 (13.27)
5	20 (3)*	8.33 (5.77)*
<i>Control</i>		
3	19.2 (5.93)	11.2 (4.49)
4	44 (14)	18.66 (6.65)
5	58 (26)	31.25 (31)

(A) Actividad de la transaminasa sérica glutámico-oxalacética

(B) Actividad de la transaminasa sérica glutámico pirúvica
(ambas expresadas en unidades internacionales)

* Significativo para $p < 0.05$

Discusión

El interferón se ha utilizado en otras enfermedades virales sistémicas (Soloviev, 1969; Merigan, et al., 1973; Greenberg, et al.; Dunnick, et al., 1979) pero este es el primer informe de su aplicación en pacientes con fiebre hemorrágica de dengue.

El uso del interferón en un gran número de niños (165) con fiebre hemorrágica de dengue evitó el desarrollo de los grados III y IV de la enfermedad (deficiencia circulatoria, pulso débil, taquicardia severa, poliserositis y *shock* severo). Sin embargo, cuando se utilizó el interferón en un grupo de 43 pacientes (observación personal) que previamente habían desarrollado los grados III y IV de la enfermedad, no se observaron cambios en comparación con la experiencia general obtenida en este tipo de pacientes durante el brote de la epidemia, incluso algunos de estos pacientes recibieron dosis superiores a los 50 000 U.I. por kilogramo y durante más de 3 días. Estos hechos respaldan la idea de que el interferón debía utilizarse en las primeras etapas de la enfermedad, para cambiar su evolución. El mismo postulado es válido para otras enfermedades virales (Soloviev, 1969; Ikic et al., 1975).

No obstante, este estudio a gran escala no fue estrictamente al azar. Se realizó en medio del brote epidémico y aunque todos los casos tuvieron un diagnóstico clínico estricto de acuerdo con el criterio de la OMS, no se le realizó la investigación serológica a todos. Por lo tanto, se efectuó una investigación más pequeña, pero más rigurosa en un grupo de 17 adultos, todos con confirmación serológica. En esta prueba no se observaron diferencias clínicas, así como tampoco en la mayoría de los resultados de laboratorio. Las pruebas significativas fueron: disminución de la cantidad de neutrófilos de banda y juveniles, disminución del tiempo de sangramiento y aumento del conteo de plaquetas, todo esto en el tercer día de la evolución, y un descenso significativo en la actividad de la transaminasa en el quinto día. No hubo pruebas de mejoría clínica en los casos tratados con interferón en comparación con los del grupo de control. La razón pudo haber sido que la dosis utilizada ($1.5 \cdot 10^6$ unidades diarias) era relativamente baja en comparación con la empleada en el estudio realizado a gran escala.

Estos hallazgos muestran que existe una tendencia hacia los resultados positivos, pero se hace necesario emprender estudios más cuidadosos y a largo alcance. También debe considerarse un mayor número de pacientes con diferentes esquemas de tratamiento y que lo comiencen lo antes posible, así como modelos animales para el dengue y otras enfermedades hemorrágicas virales.

La toxicidad debido al uso del interferón no se encontró de forma sistemática, aunque en algunos casos se pudo relacionar pequeños aumentos de la temperatura con las inyecciones del producto. Estos síntomas resultaron de difícil evaluación, pues la mayoría de los efectos secundarios informados como producidos por el interferón son similares a la sintomatología general de la fiebre hemorrágica del dengue (fiebre, astenia, depresión medular, astralgias), por lo que nuestros estudios no los tomaron en cuenta.

REFERENCIAS

- ARYA, S. K.; C. W. CZARNIERCKI y R. M. FRIEDMAN (1980). *Interferon induced inhibition of mouse mammary tumor virus production*. *Interferon* 1, 147-154.
- CANTELL, K. y S. HIRVONEN (1980). *Preparation and assay of Sendai virus*. En: *Methods in Enzymology*. Vol. 78. "Interferon", S. Pestka, ed. Academic Press, New York, pp. 299-301.
- CANTELL, K.; S. HIRVONEN; H. KAUPPINEN y G. MYLLYLÄ (1981). *Production of Interferon in human leukocytes from normal donors with the use of Sendai virus*. En: *Methods in Enzymology*. Vol. 78. S. Pestka, ed. Academic Press, New York, 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*. Vol. 78. S. Pestka, ed. Academic Press, New York, pp. 499-504.
- CLARKE, D. H. y H. Casals (1958). *Techniques for haemagglutination and hemagglutination. Inhibition with arthropodborne viruses*. *Amer. J. Trop. Med.* 7, 561-573.
- DUNNICK, J. K. y G. J. GALASSO (1970). *Clinical Trials with exogenous Interferon*. *J. Infect. Dis.* 139, 109-123.
- FRIEDMAN, R. M. (1979). *Interferon: Interactions with cells surfaces*. En: *Interferon* 1. I. Gresser, ed. Academic Press Inc., New York, p. 63.
- GONZALEZ, A.; V. RAMIREZ; M. LIMONTA; E. SELMAN-HOUSSEIN; A. ALERM; J. A. MALBERTY; C. SANTISO y R. B. GONZALEZ (1984). *Análisis de indicadores del virus de la hepatitis B en portadores asintomáticos tratados con Hu IFN α por vía intraperitoneal*. En: *Interferón y Biotecnología*, 2, 37-44.
- GREENBERG, H. B.; R. B. POLLARD; L. I. LUTWICK; P. B. GREGORY; W. S. ROBINSON y T. C. MERIGAN (1976). *Effect of human leukocyte Interferon on hepatitis B virus infections in patients with chronic active hepatitis*. *New Engl. J. Med.* 295, 517-522.
- HAGLUND, S., P. G. LUNQUIST; K. CANTELL; H. STRANDER (1981). *Interferon therapy in juvenile Laryngeal Papillomatosis*. *Arch Otolaryngol* 107, 327.
- HALSTEAD, S. B. (1980). *Dengue haemorrhagic fever - a public health problem and a field for research*. *Bulletin of the World Health Organization*, 58, 1:1-21.
- IKIC, D.; N. BOSNIC; S. SMERDEL; D. JUSTIC; E. SOOS y N. DELIMAR (1975). *Double blind clinical study with human leukocyte Interferon in the therapy of condylomata acuminata*. *Proc. Symposium on Clinical Use of Interferon, Zagreb, Yugoslavia, Oct. 1-2*, pp. 229-235.

-
- ISAACS, A. y J. LINDENMANN (1957). *Virus interference. I. The Interferon*. Proc. Roy. Soc. (London), **147**, 258-267.
- LIMONTA M. (1983). *Estado actual de las investigaciones con el uso del interferón en papilomatosis laríngea en Cuba y otros países del mundo*. Rev. Cub. Invest. Biomed. **2**, 35-38.
- MAYOR, M.; E. WEINMANN y J. HIEFENHAUS (1977). *The role of Interferon in the prevention and treatment of Rabies*. 11th Internat. Immunobiol. Symposium on preparation, Standardization and clinical use of Interferon. Zagreb, Yugoslavia.
- MERIGAN, T. C.; S. S. REED; T. S. HALL y D. A. S. TYRRELL (1973). *Inhibition of respiratory virus infection by locally applied Interferon Lancet I.* (7803), 563-567.
- NIMMANNITYA, S. et al., (1969). *Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. II. Observations on disease in outpatients*. Amer. J. Tropical Med. Hygiene **18**, 954-971.
- RAMIREZ, V.; A. GRIEGO; M. LIMONTA; S. BARCELONA; N. PARDO y E. SELMAN (1984). *Uso del IFN- leucocitaria por vía intraperitoneal en humanos: aspectos farmacocinéticos*. Interferón y Biotecnología **1**, 31-39.
- ROMANO, A.; M. REVE; D. GUARAKI-ROTMAN; M. BLUMENTHAL y R. STEIN (1980). *Use of human fibroblast derived (Beta) Interferon in the treatment of epidemic adenovirus Keratoconjunctivitis*. J. Interferon Res. **1**, 95-100.
- SEVER, J. L. (1962). *Application of a microtechnique to viral serological investigation*. J. Immunol. **88**, 320-329.
- SOLOVIEV, V. D. (1969). *Results of controlled observation on the prophylaxis of influenza with Interferon*. Bull. World Health Organ. **41**, 683-690.
- SUNDMACHER, R.; K. CANTELL y D. NEUMAN-HAEFELIN (1981). *Evaluation of Interferon in ocular viral diseases*. En: The Biology of the Interferon System. E. De Maeyer, G. Balasso y H. Schellekens, eds. Elsevier, Amsterdam, p. 343.