

Inhibición de la multiplicación del virus dengue en presencia de Interferón

GUADALUPE GUZMÁN¹, GUSTAVO KOURÍ¹, ANGEL AGUILERA² y MARITZA SOLER¹

1. Instituto de Medicina Tropical, 15 y 200, Siboney, La Habana, Cuba

2. Centro de Investigaciones Biológicas, apdo. 6996, La Habana, Cuba

Recibido en enero de 1987

RESUMEN

En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos al estudiar la inhibición de la multiplicación del virus dengue por los interferones alfa y gamma *in vitro*. Las células LLCMK-2 utilizadas en el estudio fueron tratadas previamente con diferentes diluciones de interferón, en intervalos de 6, 12, 24 y 36 horas antes de la inoculación de dos cepas del virus Dengue aisladas durante la epidemia de Fiebre Hemorrágica de Dengue (FHD) ocurrida en Cuba en 1981, una de ellas procedente de un paciente con un cuadro clínico de Dengue clásico y la otra aislada del hígado de un paciente fallecido por FHD. En ambos casos, tanto el interferón alfa como el gamma inhibieron la multiplicación viral en las células LLCMK-2, presentándose el mayor efecto antiviral en los tiempos prolongados del tratamiento previo con interferón. Además, se observó que aparentemente la cepa hemorrágica fue inhibida con mayor fuerza por el interferón alfa que la cepa no hemorrágica. Teniendo en cuenta la morbilidad y mortalidad de la FHD y el peligro de su aparición en forma epidémica en las Américas y el Caribe, se recomienda continuar los estudios relacionados con el dengue e interferón tanto *in vitro* como *in vivo*.

SUMMARY

The results obtained studying dengue/viral multiplication inhibition by alpha and gamma interferon *in vitro* are presented.

The LLCMK2 cell line used was treated with different dilutions of interferon 6, 12, 24 and 36 hours before the inoculation with two strains of Dengue 2 virus isolated during the Dengue Hemorrhagic Fever epidemic of 1981; one from a patient with the classical picture of Dengue and the other from the liver of a deceased patient due to FHD. In both cases, alpha and gamma interferon inhibited viral multiplication in the LLCMK2 cell line. A greater antiviral activity was observed when the cells were in contact with interferon for a longer time period. The multiplication of the hemorrhagic strain was inhibited at a greater extent than that of the non-hemorrhagic one, with alpha interferon.

Considering the morbidity and mortality due to FHD and the danger of its appearance in epidemic form in the American continent and the Caribbean, the study with interferon treatment *in vivo* and *in vitro* should continue.

INTRODUCCION

El interferón (IFN), descubierto en el año 1957 por A. Isaacs y J. Lindenmann, puede ser definido como un grupo de proteínas que ejercen su actividad antiviral, al menos en la célula

homóloga, a través del metabolismo celular, envolviendo la síntesis de ácido ribonucleico y proteínas (Stewart, 1981).

De acuerdo con su antigenicidad, secuencia aminoacídica y origen celular, el IFN se clasifica actualmente en los tipos alfa, beta y gamma. El interferón humano alfa, conocido como interferón leucocitario, es producido por los linfocitos B, linfoblastos, macrófagos, en respuesta a estímulos virales, células extrañas y mitógenos B. El interferón beta se origina de fibroblastos o células epiteliales estimuladas con ácido ribonucleico de doble cadena, natural o sintético. El interferón gamma o interferón inmune, se elabora en los linfocitos T a causa de la estimulación-sensibilización con mitógenos o antígenos extraños (Horoszewicz, 1984).

Entre sus características más importantes se encuentra su efecto antiviral, puesto de manifiesto en diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* para los virus *herpes simplex* (Pazin *et al.*, 1979); hepatitis B (Greenberg *et al.*, 1976); adenovirus (Romano *et al.*, 1980), entre otros.

La Fiebre Hemorrágica de Dengue (FHD) ha constituido, desde su aparición en el año 1954, una de las enfermedades infecciosas de mayor morbimortalidad en el sudeste asiático y Pacífico occidental (Halstead, 1980), manteniéndose el peligro de su aparición en forma epidémica en el Caribe y las Américas, dada la circulación actual en forma endémica de los cuatro serotipos del virus Dengue en dichas áreas (Anónimo, 1986).

Durante la epidemia de FHD en Cuba, en el año 1981, varios autores (Limonta *et al.*, 1984), reportaron los resultados obtenidos en el tratamiento de un grupo de niños con IFN, con un diagnóstico clínico de Dengue, observando que de 165 niños tratados, solo 44 desarrollaron FHD grado II, a diferencia del grupo control (160 niños), en el que 32 desarrollaron FHD grado II; 8 los grados III y IV, y dos fallecieron.

Estos resultados, parecen sugerir una acción *in vivo* del IFN sobre la infección por los virus del Dengue.

El presente trabajo tiene como objetivo verificar *in vitro* la posible inhibición de la multiplicación del virus Dengue en presencia de IFN, y forma parte de un grupo de estudios que actualmente se ejecutan en nuestro país, en relación con el papel desempeñado por el IFN durante la infección en el humano por el virus Dengue y su relación con la etiopatogenia del cuadro severo de la enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

Cultivos celulares

Las células de línea de riñón de mono rhesus LLCMK2, mantenidas por pases seriados en medio 199, suplementado con 10 por ciento de suero de ternero inactivado (56°C por 30 minutos), fueron utilizadas en la prueba de reducción de placas para detectar la acción del IFN sobre la multiplicación viral. Con tal objetivo, se sembraron en placas plásticas de 24 pozuelos a razón de $1,3 \cdot 10^5$ células/ml, incubándose a 37°C en atmósfera de CO₂.

Las células de línea de mosquito C₆36 (*Aedes albopictus*), fueron sembradas en medio MEM con glutamina y aminoácidos no esenciales, suplementado con 10 por ciento de suero de ternero fetal inactivado (56°C por 30 minutos). Las mismas fueron utilizadas en la preparación de los stocks virales.

Virus

Se probaron las cepas A15 (proveniente de un paciente con un cuadro clínico de Dengue) y A115M2 (aislada de una muestra de hígado de un paciente fallecido por FHD) de virus Dengue 2, aisladas durante la epidemia de FHD de 1981 (Guzmán *et al.*, 1984). Ambas cepas fueron propagadas en ratón lactante por vía intracerebral y posteriormente pasadas en cultivo de células C₆36.

IFN

Se utilizaron los interferones alfa y gamma (100 000 UI/ml, 1 200 UI/ml respectivamente), producidos en el Centro de Investigaciones Biológicas de La Habana, Cuba.

Procedimiento

Una vez formada la monocapa de células LLCMK2, se eliminó el medio de siembra y se añadió un mililitro (por pozuelo) de IFN diluido en medio MEM, suplementado con suero de ternero inactivado (56°C por 30 minutos) al 2 por ciento y antibióticos, en diluciones al doble desde 1/25 a 1/1 600. Por cada dilución de IFN se utilizaron tres pozuelos y en cada placa se dejaron varios pozuelos controles (sin IFN).

El tratamiento de las células de cultivo con los interferones se efectuó durante intervalos variables (36, 24, 12 y 6 horas) previo a la inoculación viral.

En el momento de la inoculación, el medio celular que contenía IFN fue eliminado y se añadió 0,05 ml de las cepas virales en estudio, a una concentración predeterminada de 100 UFP de acuerdo al título viral. La prueba de reducción de placas se ejecutó según el método utilizado por Morens *et al.* (1985). Las células inoculadas fueron incubadas a 37°C en atmósfera de CO₂ durante 7 días, momento en el cual se realizó el conteo de las placas virales.

Aquellas diluciones de IFN donde se observó una reducción del 50 por ciento, o más, del número de placas virales en relación al control de virus multiplicado en células sin IFN, fueron consideradas positivas de acción antiviral (E. Lennette, N. Schmidt, 1979).

RESULTADOS

Para el IFN alfa, la dilución mínima de trabajo utilizada fue de 1/50 dada la toxicidad que producía en las células LLCMK2. Con el IFN gamma, pudo utilizarse como dilución inicial 1/25.

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos del efecto del IFN alfa sobre la cepa A15 (no hemorrágica) de Dengue 2. En ella se observa que el tratamiento previo de las células con IFN alfa (12 a 36 horas) inhibe la multiplicación viral y que dicha inhibición es directamente proporcional al tiempo de contacto previo (célula-IFN). La multiplicación viral fue máxima cuando el intervalo de contacto fue de seis horas.

Tabla 1
RESULTADOS DEL EFECTO DEL IFN ALFA SOBRE LA CEPA A15
(NO HEMORRAGICA) DE VIRUS DENGUE 2

| IFN α* | Tiempo de tratamiento | | | |
|--------|-----------------------|------|------|-------|
| | 36 h | 24 h | 12 h | 6 h |
| 50 | 91** | 91 | 89 | NR*** |
| 100 | 86 | 93 | 78 | NR |
| 200 | 76 | 80 | 70 | NR |
| 400 | 61 | 77 | 67 | NR |
| 800 | 69 | 80 | 67 | NR |
| 1 600 | 58 | 53 | 39 | NR |

* Recíproco de la dilución de IFN utilizada.

** Porcentaje de reducción del número de placas virales.

*** No reducción del número de placas.

Con la cepa A115M2 (hemorrágica), también se observó inhibición de la multiplicación viral en presencia de IFN alfa, aunque aparentemente dicha inhibición fue mayor que con la cepa no hemorrágica (tabla 2), ya que a la dilución de 1/1 600 de IFN, se redujo el número de placas en el 83 por ciento contra el 53 por ciento con la cepa A15. Este resultado se repitió en tres ocasiones.

Tabla 2
COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL EFECTO DEL IFN ALFA
SOBRE DOS CEPAS DE VIRUS DENGUE 2 (HEMORRAGICA Y NO HEMORRAGICA)*

| <i>IFN α**</i> | <i>Cepa A15 (no hemorrágica)</i> | <i>Cepa A115 M2 (hemorrágica)</i> |
|----------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 50 | 91*** | — |
| 100 | 93 | 95 |
| 200 | 80 | 95 |
| 400 | 77 | 95 |
| 800 | 80 | 83 |
| 1 600 | 53 | 83 |

* Veinticuatro horas de contacto célula-IFN.

** Recíproco de la dilución de IFN utilizada.

*** Porcentaje de reducción del número de placas.

Al comparar el efecto de los interferones alfa y gamma sobre la multiplicación de la cepa A15 (tabla 3), después de 24 horas de contacto previo con las células, se observó que el IFN solo inhibió multiplicación viral en un 59 por ciento, en la dilución mínima de IFN utilizada (1/25), a diferencia del IFN alfa, que produjo el 53 por ciento de reducción de placas a la dilución de 1/1 600, aunque cuando se analizan las concentraciones de IFN capaces de inhibir la multiplicación viral en las diluciones expuestas, fueron de 62,5 UI/ml para el IFN alfa y 48 UI/ml para el IFN gamma, no observándose una gran diferencia.

Tabla 3
RESULTADOS DEL EFECTO DE LOS INTERFERONES ALFA Y GAMMA SOBRE LA CEPA A15
(NO HEMORRAGICA) DE VIRUS DENGUE 2*

| <i>Dilución** IFN</i> | <i>IFN α</i> | <i>IFN γ</i> |
|---------------------------|--------------|--------------|
| 25 | — | 59 |
| 50 | 91*** | 30 |
| 100 | 93 | 36 |
| 200 | 80 | 24 |
| 400 | 77 | 15 |
| 800 | 80 | 0 |
| 1 600 | 53 | 0 |

* Veinticuatro horas de contacto célula-IFN.

** Recíproco de la dilución de IFN utilizada.

*** Porcentaje de reducción del número de placas.

DISCUSION

El Dengue es una enfermedad viral, transmitida al hombre por la picada de un mosquito infectado. Normalmente se comporta como una enfermedad aguda, no fatal, caracterizada por su comienzo brusco con fiebre alta, cefalea y dolores articulares (Halstead, 1980).

En algunas áreas del mundo se ha reportado la evolución severa de la enfermedad, desarrollándose un cuadro hemorrágico que en un número de pacientes puede evolucionar hacia el choque y la muerte (Halstead, 1980). La causa de las manifestaciones severas no están claras, aunque se han esbozado varias hipótesis entre las que se destacan la de la infección secuencial (Halstead, 1981); la de la mayor virulencia de la cepa circulante (Rosen, 1982), y más recientemente, una hipótesis integral que tiene en cuenta los factores anteriores, así como otros dependientes del hospedero y de la población (enfermedades crónicas y raza, entre otros) (Kourí *et al.*, 1986). Actualmente se acepta que la FHD es el resultado de un fenómeno inmunológico que se produce en el individuo con anticuerpos, a uno de los cuatro serotipos del virus (Dengue 1, 2, 3 y 4) en una concentración en sangre incapaz de neutralizar a un segundo serotipo infectante, pero sí con posibilidades de formar inmunocomplejos (virus-anticuerpo) capaces de facilitar la entrada del virus al macrófago (célula diana), a través de la unión de los receptores Fc de la célula y de la inmunoglobulina. Esta secuencia determinaría la activación del macrófago (por acción de los linfocitos T estimulados) (Halstead, 1981).

El IFN ha sido usado no solo en la terapéutica, sino también con propósitos profilácticos en varias infecciones virales (Hotta *et al.*, 1984). A pesar de que se han realizado numerosos estudios para conocer la etiopatogenia de la FHD, solo existen aislados reportes (Hotta *et al.*, 1984; Vithanomsat *et al.*, 1984) que estudian el papel del IFN dentro de este mecanismo, así como su posible utilidad, teniendo en cuenta que no existen drogas para el tratamiento específico, ni vacunas para la prevención de la infección.

Vithanomsat *et al.*, en el año 1984, reportaron la inhibición *in vitro* de la cepa prototipo del virus Dengue 2 (cepa Nueva Guinea), en presencia de IFN- α y en cultivos de células de mamíferos tratados durante 12 horas, previo a la inoculación viral. Resultados similares fueron obtenidos por Hotta *et al.*, 1984 quienes también observaron la inhibición de la multiplicación de una cepa no hemorrágica de virus Dengue 2 en cultivos de monocitos de sangre periférica humana, tratados durante 22 horas con IFN- α y β , tanto en presencia como en ausencia de anticuerpos amplificadores de la infección viral.

En nuestro estudio obtuvimos resultados similares a los expuestos anteriormente en lo que se refiere a la inhibición de la multiplicación del virus Dengue 2 en presencia de IFN; además se demostró que dicha inhibición también se produjo no sólo con una cepa aislada de un paciente con un cuadro clínico de Dengue clásico, sino también con otra aislada de un fallecido con un diagnóstico de FHD, hecho de gran importancia si se tiene en cuenta que la virulencia es uno de los factores que actualmente se valoran como predisponentes en el desarrollo de la forma severa de la enfermedad.

Otros autores han planteado que no es posible correlacionar la sensibilidad al IFN de los togavirus con la virulencia (Stephen *et al.*, 1977).

Los resultados anteriormente expuestos, tanto en nuestro trabajo como por otros investigadores (Hotta *et al.*, 1984; Vithanomsat *et al.*, 1984), así como el ensayo clínico reportado en un grupo de pacientes con un cuadro clínico de Dengue (Limonta *et al.*, 1984), parecen indicar que el IFN puede ser utilizado en la prevención de la FHD, principalmente si es utilizado previo a la infección o en los primeros momentos de la misma. En tal sentido, llama la atención que en nuestro caso la inhibición de la multiplicación viral ocurrió entre las 12 y las

36 horas de tratamiento previo a la inoculación, siendo nula en períodos tan cortos como seis horas.

Con el IFN- γ también ocurrió inhibición viral, aunque a la máxima concentración empleada, que representa una dosis similar a la de Interferón α capaz de inhibir al virus.

Varios autores han planteado las características estructurales del IFN- γ que lo diferencian de los IFN- α y β (Vilcek *et al.*, 1985), observando que aunque es capaz de inducir un estado antiviral, no es esta la única, ni quizás la más importante de sus características. No obstante, en nuestro caso se comportó en forma similar al IFN- α , lo que representa un hallazgo, ya que los estudios realizados previamente en Dengue sólo se habían utilizado los interferones α y β , no conociendo la posible acción del IFN- γ .

Sierra, en 1985, planteó una hipótesis del posible mecanismo de acción del IFN en el tratamiento de un paciente con FHD, teniendo en cuenta los mecanismos inmunológicos de la enfermedad. En tal sentido, dicho autor concluye que el IFN puede, por una parte, inhibir en cierta medida la replicación del virus, pero por otra puede actuar suprimiendo la producción de anticuerpos por los linfocitos B (sensibilizados previamente a un serotipo del virus Dengue), disminuyendo directamente el número de células B activadas y estimulando la subpoblación supresora de células T o inhibiendo las T auxiliares.

En nuestro estudio pudo comprobarse parte de los planteamientos anteriores en lo que se refiere a la acción del IFN sobre la replicación viral, quedando como muy sugestivo y pendiente de comprobación lo referente a la acción del mismo sobre los linfocitos B sensibilizados. Este aspecto, el conocimiento de la posible producción de IFN endógeno en un paciente infectado con virus Dengue, y el tiempo y la dosis de IFN exógeno a utilizar en ensayos *in vivo*, son de particular interés y requieren de una investigación profunda para evaluar cabalmente la utilidad del IFN en la terapéutica y prevención de la enfermedad en cuestión.

AGRADECIMIENTOS

Los estudios que se describen en este artículo forman parte de un programa de investigación sobre Fiebre Hemorrágica del Dengue, ejecutado por el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", de La Habana, con apoyo financiero del Centro Nacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID, Canadá).

REFERENCIAS

- ANONIMO (1986). *Dengue - the Americas, 1984*. MMWR, 35: 51-57.
- GREENBERG, H. B.; R. B. POLIARD, J. I. LUTWICK; P. B. GREGORY; W. S. ROBINSON y T. C. MERIGON (1976). *Human leukocyte interferon and hepatitis B virus infection*. N. Engl. J. Med. 295: 517-522.
- GUZMAN, M. G.; G. KOURI; L. MORIER y S. VAZQUEZ (1984). *Aislamiento del virus del Dengue 2 en sueros de pacientes utilizando el ratón lactante y cultivo de células LLCMK2*. Rev. Cub. Med. Trop. 36: 4-10.
- HALSTEAD, S. B. (1980). *Dengue Haemorrhagic fever - a public health problem and a field for research*. Bull. WHO 58: 1-21.
- HALSTEAD, S. B. (1981). *The pathogenesis of Dengue. Molecular epidemiology in infectious disease*. Am. J. Epidemiol. 114: 632-648.
- HOROSZLWIEZ, J. S. (1984). *Interferon. The Prostate* 5: 213-219.
- HÖTTA, H., S. HÖTTA y M. HOMMA (1984). *Effect of interferons on Dengue virus multiplication in cultured monocytes macrophages*. Biken Journal 27: 189-193.

- ISAACS, A. y J. LINDENMANN (1957). *Virus interference. I. The interferon*. Proc. R. Soc., London, B: 147-258.
- KOURI, G.; G. GUZMAN y J. BRAVO (1986). *Why Dengue haemorrhagic fever in Cuba? III. An integral analysis* (en imprenta).
- LENNETTE E. H. y N. J. SCHMIDT (1979). *Diagnostic Procedures for Viral Rickettsial and Chlamydial Diseases*. American Public Health Association (5ta. Ed. Parte I, capítulo III).
- LIMONTA, M.; V. RAMIREZ; P. LOPEZ SAURA; A. AGUILERA; E. PENTON; S. BARCELONA; A. GONZALEZ; R. DUJANIC; C. DOTRES; O. LEGON y E. SELMAN-HOUSSEIN (1984). *Uso del interferón leucocitario durante una epidemia de Dengue hemorrágico (virus tipo II) en Cuba*. Interferón y Biotecnología I: 15-22.
- MORENS, D. M.; S. B. HALSTEAD y L. K. LARSEN (1985). *Comparison of Dengue Virus Plaque Reduction Neutralization by macro and "semi-micro" methods in LLCMK2 cells*. Microbiol. Immunol. 29: 1197-1205.
- PAZIN, G.; J. ARMSTRÖNG; M. T. JAM; G. TARR; P. JANNETTA y M. HO (1979). *Prevention of re-activated Herpes simplex by human leukocyted interferon after operation on the trigeminal root*. N. Engl. J. Med. 301: 225-230.
- ROMANO, A.; M. REVEL; D. GUARARI-ROTMAN; M. BLUMENTHAL y R. STEIN (1980). *Use of human fibroblast derived (beta) interferon in the treatment of epidemic adenovirus keratoconjunctivites*. J. Interferon Res. 1: 95-98.
- ROSEN, L. (1982). *Dengue an overview. Viral Diseases in South-East Asia and the Western Pacific*. Academic Press, Australia: 484-493.
- SIERRA, G. (1985). *Relación de los interferones con algunos aspectos esenciales de la respuesta inmune*. Interferón y Biotecnología 2: 163-192.
- STEPHEN, E. L.; S. K. SCOTT; G. A. EDDY y H. B. LEVRY (1977). *Effect of interferon on togavirus and arenavirus infections of animals*. Texas reports on Biology and Medicine 35: 449-454.
- STEWART, W. (1981). *The interferon system*. Springer-Verlag, Berlin and New York.
- VILVEK, J.; H. C. KELKER; J. LE y Y. K. YIP (1985). *Structure and function of human interferon-gamma*. Mediators in Cell Growth and Differentiation: 299-313. Editado por R. F. Ford y A. L. Maizel, Raven Press, New York.
- VITHANOMSAT, S.; G. WASI; C. HARINASUTA y P. THONGCHAROEN (1984). *The effect of interferon on flavivirus in vitro: a preliminary study*. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 15: 27-31.