

## Trabajos originales cortos

### El interferón alfa no induce síntesis no programada de ADN

A. ROJAS

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Departamento de Farmacología y Toxicología, Apartado 6990, La Habana, Cuba.

*Recibido en mayo de 1987*

#### RESUMEN

En el presente trabajo se evalúa la presunta capacidad inductora de Síntesis no programada de ADN (SNP de ADN) del interferón alfa leucocitario, utilizando la línea celular RAJI (linfoma de Burkitt), incluyéndose la realización de un ensayo de citotoxicidad de las concentraciones seleccionadas (1 400, 700, 350, 175 UI/ml).

No se detectó capacidad inductora de SNP de ADN, ni actividad citotóxica en el rango de concentraciones empleado.

#### SUMMARY

Human leukocyte interferon was evaluated through Unscheduled DNA Synthesis (UDS) test in RAJI cell line (Burkitt lymphoma). The different concentrations (1 400, 700, 350, and 175 UL/ml) were also analyzed for cytotoxicity capacity.

No positive effects were found neither UDS nor cytotoxicity inducing activities using the described rank concentrations.

#### INTRODUCCION

Con el descubrimiento del interferón en 1957 por Isaacs y Lindenmann, y posteriormente la demostración de sus posibilidades en la terapéutica de diversas entidades patológicas (Cantell, 1984), se han llevado a cabo numerosas investigaciones con el objetivo de determinar sus posibles efectos adversos.

En relación con su evaluación en diversos sistemas de ensayo para la determinación de actividad genotóxica, la mayor parte de los reportes apuntan hacia la inocuidad genética del interferón (Bartram *et al.*, 1981; Shimada *et al.*, 1984; Sorensen *et al.*, 1981; Vijayalaxmi, 1982).

En el presente trabajo se determinó la capacidad del interferón de inducir síntesis no programada (SNP) de ADN, un método de rutina utilizado en el tamizaje de compuestos a evaluar para presunta actividad genotóxica (Mitchell *et al.*, 1983).

## MATERIALES Y METODOS

### Línea celular

La línea celular RAJI (línea linfoblastoide humana establecida de un paciente con linfoma de Burkitt), la cual se ha utilizado en numerosas ocasiones en estudios de reparación del ADN (Scudiero *et al.*, 1975; Strauss *et al.*, 1975), fue mantenida en medio completo consistente en: medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con glutamina, 300 mg/l (SIGMA); piruvato de sodio 110 mg/l (BDH); gentamicina 40 mg/l (PHARMACHIN), 2-mercaptoetanol 350  $\mu$ l/l (MERCK) y suero fetal bovino al 10% (GIBCO), en frascos de 25 cm<sup>3</sup> (NUNCLON) a 37°C.

### Interferón

El interferón evaluado fue del tipo  $\alpha$  leucocitario, obtenido y suministrado por el Centro de Investigaciones Biológicas, en estado liofilizado y con un título de  $3 \cdot 10$  UI/bulbo.

### Citotoxicidad

Se determinó la vitalidad celular antes y después de un período de incubación de cuatro horas a 37°C. La elección del rango de concentraciones empleado (1 400, 700, 350 y 150 UI/ml), el mismo utilizado en el ensayo de SNP de ADN, se realizó tomando en cuenta el esquema terapéutico utilizado en humanos.

En placas de 24 pozos (NUNCLON), se sembraron las células ajustándose a una densidad final de  $1 \cdot 10$  células/pozo en un volumen final de 1 ml de medio completo, suplementado con las diferentes concentraciones de interferón a evaluar. La viabilidad fue determinada antes y después del tratamiento utilizando la técnica de tinción por exclusión con azul de tripano. Los resultados se expresan en porcentaje de células viables al finalizar el tratamiento.

### Síntesis no programada de ADN

Inicialmente las células fueron sembradas en placas de 24 pozos (NUNCLON), con las mismas condiciones de cultivo del ensayo de citotoxicidad, con excepción de la concentración de suero, la cual fue disminuida al 2% y la incorporación de hidroxurea (MERCK) a una concentración final de 10 mM, con el objetivo de inhibir la síntesis replicativa del ADN y de esta manera garantizar que la incorporación del precursor marcado al ADN se deba a síntesis reparativa (fase de repolimerización del fragmento escindido utilizando la cadena opuesta como molde).

En estas condiciones de cultivo, las células fueron sometidas a un período de incubación por 30 minutos a 37°C, realizándose el ajuste de las concentraciones a evaluar una vez concluido el período. Cada concentración fue evaluada por triplicado.

El control positivo utilizado fue el metilmetanosulfonato (MMS) (MERCK) 2 mM. Con el objetivo de verificar el posible sinergismo entre la acción del mutágeno y el interferón, se evaluó la combinación de IFN (700 UI/ml) y MMS (2 mM).

Posteriormente, las células fueron sometidas a un pulso de timidina tritiada (<sup>3</sup>H-TdR, 25 Ci/mmol, Amersham, concentración final 10  $\mu$ Ci/ml) por espacio de cuatro horas a 37°C. Concluido este tiempo, las células fueron lavadas dos veces con solución salina tamponada con fosfatos (SSTF) pH 7,2 (bien fría), seguido de una incubación en baño de hielo por 30 minutos, depositadas sobre filtros de fibra de vidrio (WHATMAN), y sometidas a una serie de lavados: dos veces con 15 ml de ácido tricloroacético al 10% y dos veces con etanol al 95%. La actividad de los filtros fue determinada en un contador de centelleo LKB Wallac 1215. Los resultados se expresan en porcentaje de incorporación relativa de H<sup>3</sup>TdR.

### Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones de media por la prueba "t" de Student, utilizando el paquete estadístico MICROSTAT (ECOSOFT Inc.,1984) en una computadora personal Olivetti M19.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad indican la ausencia de efectos tóxicos que comprometan la viabilidad celular, al menos durante el período de tiempo analizado (figura 1).

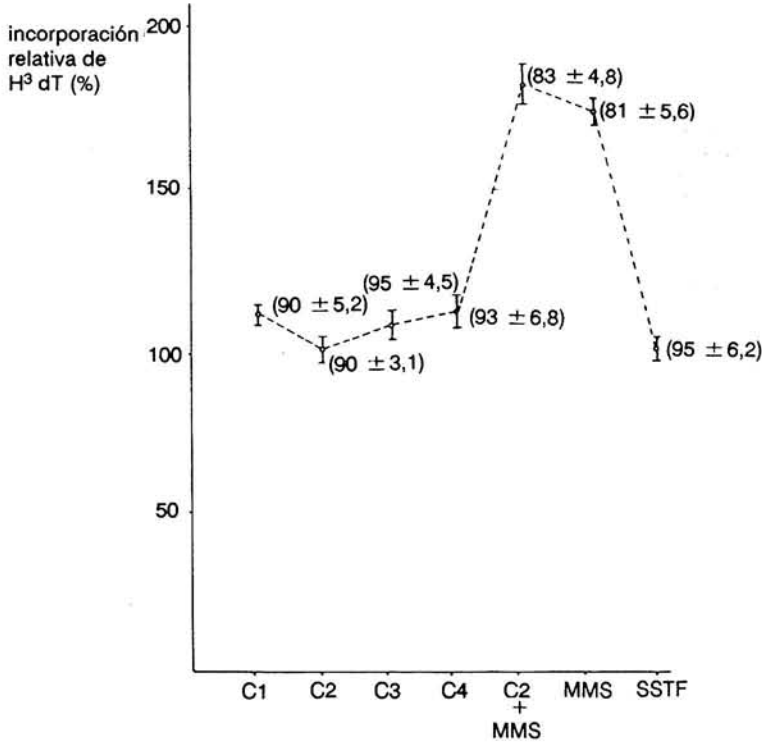


Fig. 1. Resultados del análisis de citotoxicidad y de SNP de ADN. Los valores señalados entre paréntesis representan la media y la desviación estándar de los valores de viabilidad celular. Las barras verticales representan la desviación estándar del ensayo de SNP de ADN para cada concentración. Para ambos ensayos cada punto evaluado representa tres determinaciones.

Respecto al ensayo para determinar la capacidad inductora de SNP de ADN (figura 1), éste mostró resultados negativos para la capacidad inductora de SNP, así como sobre el posible efecto de sinergismo en el tratamiento combinado de interferón y el control positivo (MMS).

La mayoría de los reportes indican la inocuidad del interferón desde el punto de vista genotóxico. La ausencia de efectos citogenéticos adversos ha sido demostrada en varias ocasiones: Bartram *et al.*, (1981) utilizando interferón leucocitario humano; Sorensen *et al.*, (1981), al evaluar el interferón obtenido de fibroblastos humanos, en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Igualmente Vijayalaxmi (1982), reportó resultados negativos para la capacidad de inducción de intercambios de cromátidas hermanas. Sin embargo, Thestrup-Pedersen *et al.*, (1980), reportaron la inducción de aberraciones cromosómicas por interferón leucocitario humano, en linfocitos humanos *in vitro*.

Otros reportes plantean la capacidad de inhibición de la síntesis de ADN en linfocitos de ratón y humanos, estimulados por fitohemaglutinina (Lindahl-Magnusson *et al.*, 1972; Blomgren *et al.*, 1974; Sorensen *et al.*, 1981), aunque han sido reportadas respuestas normales a la estimulación mitogénica *in vivo* e *in vitro* (Einhort *et al.*, 1979; Bartram *et al.*, 1981; Vijayalaxmi, 1982).

La detección de síntesis no programada de ADN en una amplia variedad de líneas celulares, se ha sugerido en numerosas ocasiones como una prueba de gran utilidad en las baterías a corto plazo para la determinación de presunta actividad genotóxica (Martin *et al.*, 1978; Mitchell *et al.*, 1983).

La determinación de compuestos potencialmente mutagénicos-carcinogénicos, por su capacidad de inducción de SNP de ADN, radica en el hecho de que aquellos compuestos capaces de reaccionar con centros nucleofílicos en el ADN, formarán los correspondientes aductos covalentes, los cuales serán eliminados a través de la reparación por escisión.

La no detección de SNP de ADN inducida por el interferón, demostrada en el presente trabajo, sugiere que el mismo no presenta efectos genotóxicos dentro del rango de concentraciones empleado. A pesar de los resultados obtenidos, además de los reportes negativos previos en otros sistemas de ensayos, no debe darse por excluida la genotoxicidad del interferón a concentraciones superiores o en condiciones experimentales diferentes.

### REFERENCIAS

- BARTRAM, C. R.; W. MORTIER y A. SCHMIDT (1981). *Human fibroblast interferon does not induce chromosomal abnormalities*. *Lancet*. 1: 1372.
- BLOMGREN, H.; H. STRANDER y K. CANTELL (1974). *Effect of human leukocytes to mitogenic stimuli in vitro*. *Scand. J. Immunol.* 3: 667-715.
- CANTELL, K. (1984). *Una gota de agua en un océano: Ideas sobre los interferones*. *Interferón y Biotecnología*. 1: 1-10.
- EINHORT, S.; H. BLOMGREN; K. CANTELL y H. STRANDER (1979). *Effect of prolonged in vivo administration of leukocyte interferon on the mitogen responsiveness of human lymphocytes*. *Acta Med. Scand.* 206: 345-350.
- ISAACS, A. y J. LINDENMANN (1957). *Virus interference, I. Interferon*. *Proc. Roy. Soc. Ser. B*: 258-267.
- LINDAHL-MAGNUSSON, P.; P. LEARY y I. GRESSER (1972). *Interferon inhibits DNA-synthesis induced in mouse lymphocyte suspensions by phytohemagglutinin or by allogenic cells*. *Nature (London)* 251: 156-158.
- MARTIN, C. N.; A. C. McDERMID y R. C. GARNER (1978). *Testing of known carcinogens and non carcinogens for their ability to induce unscheduled DNA synthesis in HeLa cells*. *Cancer Res.* 38: 2621-2627.
- MITCHELL, A. D.; D. A. CASCIANO; M. L. MELTZ; D. E. DOUGLAS; R. H. C. SAN; G. M. WILLIAMS y E. S. VON HALLE (1983). *Unscheduled DNA synthesis tests. A report of U.S.E.P.A. Gene-Tox Program*. *Mutat Res* 123: 473-488.
- SCUDIERO, D.; E. HENDERSON; A. NORIN y B. STRAUSS (1975). *The measurement of chemically-induced DNA repair synthesis in human cells by BND-cellulose chromatography*. *Mutat. Res.* 29: 473-488.
- SHIMADA, H.; Y. EBINE; Y. KUROSAWA y T. ARAUCHI (1984). *Mutagenicity studies of human fibroblast interferon (HuIFN  $\beta$ )*. *Mutat. Res.* 139: 183-187.
- SORENSEN, P. J.; M. K. JENSEN y C. JERSILD (1981). *Effect of human leukocyte interferon on human lymphocyte in vitro: Cytogenetic studies*. *Mutat. Res.* 90: 143-147.
- STRAUSS, B.; D. SCUDIERO y E. HENDERSON (1975). "The nature of the alkylation lesion in mammalian cells". En: *Molecular mechanisms for repair of DNA*. Part A. (P. C. HANAWALT and R. B. SETLOW Eds). 13-24. Plenum Press New York, London.
- THESTRUP-PEDERSEN, K.; V. ESMANN; J. R. JENSEN; J. HASTRUP; K. THORLING; A. D. SAEMUNDSEN; S. BISBALLE; G. PALLASEN; M. DADSEN; M. G. MASUCCI y I. ERNBERG (1980). *Epstein-Barr virus induced lymphoproliferative disorder converting to fatal Burkitt-like lymphoma in a boy with interferon-inducible chromosomal defect*. *Lancet* 2: 997-1002.
- VIJAYALAXMI (1982). *Human leukocyte interferon does not induce sister-chromatid exchanges in human blood lymphocytes*. *Mutat. Res.* 105: 287-290.