

Evaluación del efecto toxicológico del interferón alfa-2b recombinante humano sobre la fertilidad y la reproducción en ratas. Valoración de la capacidad teratogénica *in vitro*

M. D. RODRÍGUEZ,¹ L. MARTÍNEZ,² H. GARCÍA¹ y R. LAZCANO²

¹ Departamento de Farmacología y Toxicología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado 6880, La Habana 6, Cuba

² División de Hibridomas y Modelos Animales, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

Recibido en octubre de 1989

Aprobado en marzo de 1990

RESUMEN

Se administró interferón α -2b recombinante a ratas machos y hembras, 80 y 14 días respectivamente, antes y durante el apareo. Las hembras se trataron, además, durante la preñez y el período de lactancia.

Se determinaron los índices reproductivos en ratas sacrificadas el día 19 de la preñez, y en aquellas a las cuales se les permitió parir. El interferón no alteró la fertilidad de los padres ni la gestación en las hembras. No se observaron efectos adversos sobre el desarrollo fetal y postnatal.

En otro experimento se explantaron embriones de rata a los 10 días *post coito* y se cultivaron durante 24 horas en suero homólogo con altas dosis de interferón. El crecimiento embrionario y la diferenciación no fueron afectados.

Se concluye que el interferón α -2b recombinante no mostró efectos reproductivos adversos ni teratogénicos en la rata.

SUMMARY

Recombinant α -2b interferon was administered to male and female rats for 80 and 14 days, respectively, before and through breeding. Females also received treatment during the entire period of pregnancy and lactancy.

Reproductive indices were determined in rats sacrificed on day 19th of pregnancy and in rats allowed

to deliver. Interferon influenced neither the fertility of parents nor the pregnancy. No effects on fetal and postnatal development were observed.

In another experimental series rat embryos were explanted 10 days *p.c.* and cultured for 24 h in homologous serum with high doses of interferon. Embryonic growth and differentiation were not affected.

We can conclude that recombinant α -2b interferon lacks adverse reproductive or teratogenic effects on these rats.

INTRODUCCION

Los métodos utilizados actualmente para evaluar la toxicidad de los interferones y otros productos obtenidos por la vía del ADN recombinante son, en general, los mismos que se usan en la evaluación de las drogas convencionales (Japanese Ministry of Health and Welfare, 1984; French Ministry of Social Affairs, 1984).

Entre las pruebas recomendadas para los ensayos preclínicos del interferón se hallan las de toxicología reproductiva. Muy poco se ha publicado en relación con este tipo de evaluaciones.

En la investigación preclínica del interferón α -2a realizada en monos rhesus se observaron alteraciones del ciclo menstrual y de los niveles de hormonas del suero, y en monos gestantes un incremento de abortos en dependencia de la dosis (Trown *et al.*, 1985).

Por otra parte, estudios similares realizados en ratas, evidenciaron la ausencia de efectos embriotóxicos o teratogénicos del interferón α -2b recombinante cuando este fue administrado durante la organogénesis (Rodríguez *et al.*, 1990).

En este trabajo se muestran los resultados de un estudio reproductivo general del interferón α -2b recombinante humano en ratas, así como los resultados de un estudio de teratogenicidad empleando un método basado en el cultivo de embriones durante la fase crítica de formación de sus órganos, cuando ellos son más susceptibles al daño teratogénico (Schmid, 1987).

MATERIALES Y METODOS

Estudio de fertilidad y proceso general de la reproducción

En este estudio se usaron ratas Sprague-Dawley de 8 semanas de nacidas, cuyo peso oscilaba entre 200 ± 10 g (CENPALAB, La Habana). Los animales se mantuvieron a la temperatura de 23°C , con humedad relativa del 60% y en ciclo de luz-oscuridad de 12 horas; recibieron agua y alimento comercial *ad libitum*.

El interferón α -2b recombinante humano (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana) fue disuelto en solución fisiológica y administrado por vía intraperitoneal en dosis de 0,1; 1 y 3×10^6 U/kg de peso/día.

Se trataron 10 machos y 20 hembras durante 80 y 14 días respectivamente, antes del apareo, con cada una de las dosis. El tratamiento continuó durante el apareo, y además, las hembras fueron tratadas durante la gestación y la lactancia. El grupo de control recibió el vehículo utilizado.

Para el apareo se colocaron dos hembras con cada macho del mismo grupo de dosis y se efectuaron exudados vaginales a la mañana siguiente. La presencia de espermatozoides en el exudado señaló el día 0 de la preñez.

En cada grupo de dosis se sacrificó la mitad de las hembras el día 19 de la preñez y a las restantes se les

permitió parir. Este último grupo continuó recibiendo la droga durante la lactancia y fueron sacrificadas el día 21 post-parto, cuando concluyeron las observaciones morfológicas de las crías.

En las ratas sacrificadas el día 19 se observaron los ovarios y el útero, y se anotó el número de cuerpos lúteos, implantaciones, fetos vivos y muertos y reabsorciones. Los fetos vivos, luego de ser examinada su morfología externa, fueron fijados a fin de revisar si sus vísceras (Wilson, 1965) o esqueleto (Dawson, 1926) mostraban malformaciones. En el estudio postnatal fue anotada la viabilidad de las crías (desde el nacimiento hasta el día 21 de vida) y se observó su desarrollo y comportamiento.

Los resultados fueron estadísticamente analizados mediante un análisis de varianza simple ($p < 0,05$).

Cultivo de embriones

Los embriones se obtuvieron de ratas Sprague-Dawley a las 10:00 am del día 10 de la gestación (el día en que se detectaron espermatozoides en el exudado vaginal se señala como día 0).

Las ratas preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical y el útero transferido a una placa petri con solución salina de Hank.

Los embriones fueron explantados según el método de New (1978) bajo un microscopio de disección. La decidua y la membrana de Reichert fueron retiradas sin dañar el saco vitelino, el cono ectoplacentar y el amnios.

El medio de cultivo utilizado fue suero homólogo preparado según Steele y New (1974).

Los embriones de rata fueron repartidos en frascos entre los diferentes grupos experimentales y controles. Los frascos fueron colocados en un rotador en el interior de una incubadora a 37°C y giraron a 30 rpm durante 24 horas. Antes de añadir los embriones, el medio fue precalentado y gasificado con 20% O_2 /5% CO_2 /75% N_2 . A la mañana siguiente el medio fue gasificado de nuevo esta vez con 40% O_2 /5% CO_2 /55% N_2 (en este estadio aumenta el requerimiento de O_2 de los embriones) y el cultivo se continuó durante otras tres horas.

Terminado el período de cultivo, se revisó la circulación de la sangre en el saco vitelino y los latidos del corazón de los embriones para determinar su viabilidad. Se observaron parámetros de crecimiento y desarrollo que incluyeron longitud cráneo-caudal, número de somitas, proteínas totales y malformaciones morfológicas.

El interferón α -2b recombinante fue administrado en concentraciones de 600 000, 300 000 y 60 000 U/ml de medio de cultivo. El control negativo se hizo con solución salina de Hank y el positivo con salicilato de sodio en concentración de 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Greenaway *et al.*, 1982).

Los datos obtenidos fueron analizados mediante la prueba "t" de Student ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Estudio de fertilidad y proceso general de la reproducción

Este estudio mostró que el interferón α -2b recombinante no afectó la fertilidad ni el desarrollo de la preñez de las ratas (tabla 1).

no mostraron diferencias significativas en cuanto al número de cuerpos lúteos, implantaciones, fetos vivos, reabsorciones y peso fetal.

No se observaron alteraciones de la morfología externa, visceral o esquelética.

El estado de salud de las madres y sus crías fue bueno durante la lactancia. No se

Tabla 1

OBSERVACIONES REPRODUCTIVAS EN EL ESTUDIO DE FERTILIDAD CON EL INTERFERON α -2b RECOMBINANTE HUMANO EN RATAS *SPRAGUE DAWLEY*

	Interferón α -2 recombinante (U/kg de peso/día)			
	Control	$0,1 \times 10^6$	1×10^6	3×10^6
Total de hembras	20	20	20	20
Hembras preñadas	18	17	16	19
Porcentaje de fertilidad	90	85	80	95
Hembras sacrificadas (19 días)	10	10	8	10
Cuerpos lúteos	154	147	115	166
Implantaciones	140	131	107	150
Fetos vivos	138	131	107	145
Reabsorciones	2	0	0	5
Pérdidas preimplantación (%)	9	10	7	10
Pérdidas postimplantación (%)	3	0	0	3
Peso fetal (g)	$2,1 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,6$
Anomalías	0	0	0	0

No se observaron evidencias de toxicidad durante el período de tratamiento. No hubo diferencias significativas entre los grupos respecto al aumento de peso durante el experimento. (Los datos no se muestran.)

En el corte realizado el día 19 de la preñez, los grupos experimentales y control

observó un comportamiento inusual en ellos.

No hubo diferencias significativas entre los grupos control y tratados, respecto al tamaño de la camada, a la sobrevivencia a través de la lactancia y el peso de las crías el primer día de nacidas y al destete (tabla 2).

Tabla 2
OBSERVACIONES EN EL ESTUDIO POSTNATAL CON EL INTERFERON α -2b RECOMBINANTE HUMANO EN RATAS SPRAGUE DAWLEY

	Interferón α -2 recombinante (U/kg de peso/día)			
	Control	$0,1 \times 10^6$	1×10^6	3×10^6
Madres	8	7	8	9
Crías vivas al nacer	97	101	84	95
Crías muertas al nacer	3	4	4	3
Crías vivas al destete	95	101	84	94
Peso al nacer	$6,7 \pm 0,95$	$6,1 \pm 0,57$	$6,9 \pm 0,80$	$6,3 \pm 0,92$
Peso al destete	$37,4 \pm 5,4$	$27,4 \pm 10,9$	$39,8 \pm 12,2$	$37,1 \pm 3,7$

Cultivo de embriones

Los embriones tratados con interferón α -2b recombinante crecieron y se desarrollaron normalmente. El número de somitas y la longitud cráneo-caudal mostraron valores comparables a los obtenidos por el control con solución salina (tabla 3).

No fueron detectadas malformaciones en ninguno de los embriones de control examinados, ni en los embriones de los grupos tratados con interferón.

En el control positivo se observaron cinco embriones con falta de cierre del tubo neural. Los embriones de este grupo difirieron significativamente del control en cuanto al número de somitas y la longitud cráneo-caudal.

Tabla 3
INDICES DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE EMBRIONES DE RATA DE 10 DIAS EXPUESTOS A INTERFERON α -2b RECOMBINANTE HUMANO *IN VITRO*

	N	Somitas	Longitud cráneo-caudal (mm)	Viabilidad (%)	Malformaciones (%)
Control salina	19	$24,9 \pm 1,4$	$3,6 \pm 0,4$	100	0
$0,6 \times 10^6$	18	$24,7 \pm 1,6$	$3,6 \pm 0,4$	100	0
$0,3 \times 10^6$	18	$25,3 \pm 1,4$	$3,6 \pm 0,4$	100	0
$0,06 \times 10^6$	18	$25,1 \pm 1,6$	$3,8 \pm 0,6$	100	0
Salicilato de sodio	12	$22,1 \pm 1,4^a$	$3,2 \pm 0,4^a$	67	42

^a $p < 0,05$ respecto al control negativo.

DISCUSION

Los resultados de este trabajo demuestran que el interferón α -2b recombinante humano no tuvo efectos adversos sobre el proceso reproductivo en general, incluyendo gametogénesis, fertilidad, gestación y lactancia. Estos datos se encuentran en correspondencia con la ausencia de efectos negativos obtenidos anteriormente en el estudio de la teratogenicidad de este interferón en ratas (Rodríguez *et al.*, 1990.)

Por otra parte, la exposición directa de los embriones *in vitro*, a muy altas concentraciones del interferón, confirmó la ausencia de efectos tóxicos de este producto en la rata.

Las evaluaciones toxicológicas del interferón se llevan a cabo en modelos animales no homólogos, los cuales carecen de receptores específicos en la superficie celular y pueden, además, desarrollar anticuerpos neutralizantes. Estas podrían ser las causas de que en estas especies se observen muy pocos de los efectos tóxicos producidos en humanos (Teelman *et al.*, 1986; Trown *et al.*, 1986; Zbinden, 1987). Por estas razones se trabaja en la actualidad en el desarrollo de métodos adicionales para evaluar la toxicología preclínica de los nuevos productos biotecnológicos y predecir con mayor efectividad sus efectos adversos en el hombre.

El interferón es un producto potente y altamente específico. Particularmente su carácter antiproliferativo debe considerarse potencialmente peligroso, teniendo en cuenta las altas dosis en que podría ser prescripto a mujeres en edad reproductiva.

La exposición *in vitro* de embriones preimplantación de ratón a altas concentraciones de interferón homólogo, demostró que en este estadio los embriones son

resistentes a la actividad antiproliferativa y antiviral del interferón (Zusman *et al.*, 1984). Sin embargo, células primarias aisladas de estadios tardíos del desarrollo embrionario son sensibles a ambas actividades del interferón (Lengyel, 1982). También se ha sugerido el posible papel del interferón en la diferenciación celular y la regulación de la replicación celular en el feto en desarrollo (Feldman *et al.*, 1986).

Sobre la base de este estudio en ratas Sprague-Dawley, el interferón α -2b recombinante humano utilizado no tuvo efectos negativos sobre el proceso reproductivo.

REFERENCIAS

- DAWSON, A. B. (1926). A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red. *S. Stain Tech.* 1: 123-124.
- FELDMAN, D.; R. M. HOAR; W. H. NIEMANN; T. VALENTINE; M. CUKIERSKI y A. G. HENDRICKX (1986). Tubuloreticular inclusions in placental chorionic villi of rhesus monkeys after maternal treatment with interferon. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 155: 413-424.
- French Ministry of Social Affairs (1984). *Recommandation concernant le protocole toxicologique des interférons pour l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché.* Direction de la Pharmacie et du Médicament, Sous-Direction des Affaires Techniques et Scientifiques.
- GREENAWAY, J. C.; T. H. SHEPARD; A. G. FANTEL y M. R. JUCHAU (1982). Sodium salicylate teratogenicity *in vitro*. *Teratology* 26: 167-171.
- Japanese Ministry of Health and Welfare (1984). Notification on application data for rDNA drugs. *Notification No. 243 of the Pharmaceutical Affairs Bureau*, March 30, 1984.
- LENGYEL, P. (1982). Biochemistry of interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.* 51: 251-282.
- NEW, D. A. T. (1978). Whole embryo culture of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev.* 53: 81-122.
- RODRIGUEZ, M. D.; L. MARTINEZ y H. GARCIA (1990). Evaluación teratogénica del interferón α -2b recombinante en ratas Long Evans. *Biotecnología Aplicada* 7(3): 278.

- SCHMID, B. (1987). Old and new concepts in teratogenicity testing. *Trends in Pharmacological Sciences* 8: 133-137.
- STEELE, C. E. y D. A. T. NEW (1974). Serum variants causing the formation of double hearts and other abnormalities in explanted rat embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 31: 707-712.
- TEELMAN, K.; C. HOHBACH; H. LEHMANN y The International Group (1986). Preclinical safety testing of species-specific proteins produced with recombinant DNA techniques. *Arch. Toxicol.* 59: 195-200.
- TROWN, P. W.; R. J. WILLS y J. J. KANON (1985). The preclinical development of Roferon A. *Cancer* 57: 1648-1656.
- WILSON, J. G. (1965). "Embryological considerations in teratology". En: Wilson, J. G. y Warkany, J. (eds.) *Teratology, principles and techniques*. Univ. of Chicago Press, Chicago, pp. 262-277.
- ZBINDEN, G. (1987). "Biotechnology products intended for human use, toxicological targets and research strategies". En: *Preclinical safety of biotechnology products intended for human use*. Alan R. Liss, Inc. pp. 143-159.
- ZUSMAN, I; D. ENGELHARD; P. YOFFE; A. RON; A. PANET y A. ORNOY (1984). Effects of interferon and encephalomyocarditis virus on *in vitro* development of preimplantation mouse embryo with and without the zona pellucida. *Teratology* 29: 405-409.