

EFFECTOS MUTAGENICOS DE LA FOTOTERAPIA EN LINFOCITOS HUMANOS DE NEONATOS HIPERBILIRRUBINEMICOS

Dr. RAMIRO LOPEZ ¹; Dr. GALO CANTOS² y
Dr. FABIAN VASCONEZ R.³

RESUMEN:

Se realizó cultivo de linfocitos en 20 recién nacidos hiperbilirrubinémicos del Servicio de Neonatología del Hospital Gineco Obstétrico "Isidro Ayora" de Quito, en medio de cultivo RPMI 1640 y RPMI 1640 con adición de Bleomicina (Blenoxane — Bristol 2 ug/ml de cultivo) antes y después de 72 horas de fototerapia con luz fluorescente blanca; se analizaron 100 metafases de cada RN para avalizar el efecto mutagénico de la luz fluorescente mediante el análisis cromosómico, demostrándose efectos clastogénicos y turbagénicos de los cromosomas en cultivos celulares "in vitro". Efectos turbagénicos: se demuestra la capacidad de la luz fluorescente para la producción de aberraciones cromosómicas, $p < 0.0001$, para la producción de gct y ace, para gcs $p = -0.00183$, bct $p = 0.0039$, bcs $p = 0.0012$ y puz $p = 0.0084$.

La bleomicina es un excelente radiomimético para inducir la presentación de aberraciones cromosómicas estructurales en cultivos celulares "in vitro". (Revista de la Facultad de Ciencias Médicas, 15 (1 - 2):12 — 19, 1990).

Introducción

La fotosensibilidad de la bilirrubina sérica a la luz fluorescente blanca fue ampliamente demostrada (1), por lo que el uso de lámparas de luz blanca fría para el tratamiento de la ictericia neonatal fue aceptado y diseminado en todo el mundo gracias a su eficiencia y temor que existía a la encefalopatía bilirrubinémica. En el Ecuador esta forma de tratamiento para la ictericia neonatal empezó a ser usada por la Maternidad Isidro Ayora de Quito, desde 1967, obteniéndose buenos resultados para disminuir los

niveles de bilirrubina en el recién nacido, práctica que es utilizada hasta hoy.

Debido a que la propagación de método ocurría sin conocer claramente su mecanismo de acción y los posibles efectos colaterales que podría producir, en 1969 se realizó un Congreso en Chicago, sobre la efectividad de la fototerapia, concluyéndose que se debería recomendar a los pediatras que deberían hacer uso de la fototerapia con los mismos cuidados y preocupaciones utilizadas en la decisión del uso de una nueva droga para el tratamiento de un RN (2).

1. Laboratorio de Genética, Postgrado de Ciencias Básicas Biomédicas, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central.
2. Laboratorio de Genética, Escuela de Biología.
3. Servicio de Neonatología, Hospital Gineco Obstétrico "Isidro Ayora", Quito.

En 1976 se destacó que la fototerapia, que ya se encontraba en términos de terapéutica, si fuese una droga "jamás" (3) sería utilizada sin una evidencia de su seguridad, además de su eficacia ya que su acción no es restringida al metabolismo de la Bb y que ya hay considerables evidencias de graves efectos de la luz sobre plantas y animales (4 - 9); igualmente, se consideró que la luz en algunas circunstancias se presenta como mutagénica y carcinogénica.

En 1978, se demostró que realizando cultivos de células de pulmón de ratas y sometidos a la acción de la luz fluorescente blanca, se producen lesiones de ADN y aberraciones cromosómicas que se expresan como quiebras de crómá-

tidos y presencia de cromosomas pequeños (10) Hasta el momento existen evidencias que indican que la longitud de onda más efectiva para el uso de la fototerapia, se encuentra entre 370 y 470 nm (11) que corresponde a la luz fluorescente azul, pero también existen fuertes evidencias de que la luz con longitud de onda menor a 450 nm es mutagénica, carcinogénica y turba-génica (12, 13).

Sujetos, materiales y métodos

Participaron en este estudio, 20 RN de los dos sexos, del Servicio de Neonatología de la Maternidad Isidro Ayora de Quito.

Selección de pacientes (Cuadro No. 1)

Cuadro No. 1.— *Identificación y características de los recién nacidos que participaron en el estudio de fototerapia*

No.	Sexo	Tipo de sangre y Rh	Duración gestación	Peso (g)	Hb mg/100 al inicio fototerapia
1	f ^a	O ⁺	35 s ^c	1900	14
2	f	O ⁺	39 s	1700	12.2
3	m ^b	A ⁺	39 s 4 d ^d	1680	12.2
4	m	O ⁺	35 s 4 d	2400	12.3
5	f	O ⁺	38 s	2550	15
6	m	O ⁺	37 s	2800	13.6
7	f	O ⁻	38 s	2980	13.8
8	m	O ⁺	36 s 2 d	2400	13.7
9	m	O ⁺	35 s 6 d	2200	12.2
10	f	O ⁺	37 s	2200	14.2
11	f	O ⁺	40 s	3000	15.3
12	f	O ⁺	38 s	2960	15.1
13	f	O ⁺	39 s	3140	15
14	m	O ⁺	38 s 4 d	2700	16
15	m	O ⁺	40 s 4 d	2300	13.1
16	m	O ⁺	40 s	4060	13.6
17	m	O ⁺	36 s	2120	16.5
18	f	O ⁺	40 s	4140	15.7
19	f	O ^l	37 s	1880	13.2
20	f	O ⁺	38 s	3100	16.8

a Femenino

b Masculino

c Semanas

d Días

Para la selección de la muestra, se tomaron en cuenta los siguientes aspectos:

- No presentar incompatibilidad sanguínea materno - fetal del tipo ABO o Rh.
- No haber ingerido ningún medicamento.
- No presentar ninguna otra patología a no ser la hiperbilirrubinemia neonatal.
- Los niveles de Bb sérica del RN debían ser siempre superiores a 12 mg/100 ml.
- Fueron escogidos únicamente los RN sometidos a más de 72 horas de fototerapia.

Los RN eran expuestos a la luminoterapia las 24 horas del día, siendo retirados únicamente para higiene y lactancia; se protegieron sus ojos con un antifaz de paño negro y en el caso de los RN de sexo masculino se protegió también los genitales.

Técnicas citogenéticas

Para cada RN se realizó un cultivo temporario de linfocitos de sangre periférica según la técnica de macrocultura (13), modificada (14) durante 72 horas a 37 ° C.

Se sembró 1 ml. de sangre heparinizada (Liquemine - Roche 5000u/ml) en un frasco que contenía medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY) enriquecido con suero humano, PHA, penicilina 100 u/20 ml y estreptomina 0,0025U/20 ml; igualmente se sembró 1 ml de sangre en otro frasco de cultivo que además contenía Bleomicina (Blenoxone - Bristol 2 ug/ml).

Para el arresto del cultivo, 90 minutos antes de completar el período de incubación se adiciona a cada frasco de cultivo dos gotas de colchicina alcaloide (Fisher Cientific USA) 0.004M al 0,0016 g o/o.

El material así obtenido fue centrifugado a 800 RPM, hipotonizado con CIK (0.075M) fijado y lavado con metanol- ácido acético (3:1); posteriormente se realizó el extendido y coloración con Giemsa glicerinado diluida en tampón fosfato 0.06M de pH 6,8 (1:30).

Análisis Citogenético

Se analizó 100 metafases de cada RN pertenecientes a la muestra, antes y después de la fototerapia distribuidos así:

- Análisis de 50 metafases obtenidas después del cultivo de 72 horas en medio RPMI 1640 con adición de bleomicina.
- Análisis de 50 metafases obtenidas después del cultivo de 72 horas en medio RPMI 1640

El análisis comprendió observación y diseño de los cromosomas con lente objetivo de inmersión (100 x), las aberraciones cromosómicas analizadas fueron: Gaps cromatídicos y cromosómicos (gtc, gcs), quiebras cromatídicas y cromosómicas (bct, bcs), acéntricos (ace), poliploides (end), pulverizaciones (pvz), anillos (r), dicéntricos (dic), rearrreglos cromosómicos (rea) y condensación prematura centroméricas (pcc).

Análisis Estadístico

Se realiza estadísticas descriptiva, pruebas paramétricas y no paramétricas (Mann-Whitney test)

Resultados

Un total de 4000 metafases fueron analizadas, la categorización de las aberraciones cromosómicas fue realizada según la clasificación internacional (15), cuadros 2 y 3.

Se comprobó que los recién nacidos después de 72 horas de ser sometidos a la fototerapia en medio RPMI 1640 la luz fluorescente blanca produjo daño cromosómico, al inducir la producción de gct y ace $p < 0.0001$ que es estadísticamente muy significativo; para gcs $p = 0.0039$, bcs $p = 0.0012$ y pvz $p = 0.0084$ que es estadísticamente significativo, también se indujo una mayor producción de end, r, dic, pcc y rea aunque no es estadísticamente demostrable (Cuadro 4).

Se demostró que la fototerapia produjo

daño cromosómico en medio RPMI 1640 con Bleomicina, al inducir la producción de bct y bcs $p < 0.0001$ que es estadísticamente muy significativo, para la producción de gct $p = 0.0024$, gcs $p = 0.05$, pvz $p = 0.04$ y dic

$p = 0.011$ que es estadísticamente significativo, también se indujo una mayor producción de ace, end, pcc y rea aunque no es estadísticamente demostrable (cuadro 5).

Cuadro No. 2.— *Aberraciones cromosómicas en 1.000 células analizadas en 20 recién nacidos antes y después de 72 horas de fototerapia en medio de cultivo RPMI 1640*

Aberración	Total	
	Antes	Después
Gap cromatídico (gct)	144	249
Gap cromosómico (gcs)	42	80
Quiebra cromatídica (bct)	32	75
Quiebra cromosómica (bcs)	3	24
Cromosomas acéntricos (ace)	23	107
Cromosomas pulverizados (pv)	3	23
Endoreduplicaciones (end)	1	4
Cromosomas en anillo (r)	1	4
Cromosomas dicéntricos (dic)	2	3
Rearreglos cromosómicos (rea)	1	4
Condensación prematura centromérica (pcc)	1	3

Cuadro No. 3.— *Aberraciones cromosómicas en 1.000 células analizadas en 20 recién nacidos antes y después de 72 horas de fototerapia en medio de cultivo RPMI 1640 con Bleomicina*

Aberración	Total	
	Antes	Después
Gap cromatídico (gct)	269	321
Gap cromosómico (gcs)	86	111
Quiebra cromatídica (bct)	60	131
Quiebra cromosómica (bcs)	21	56
Cromosomas acéntricos (ace)	127	179
Cromosomas pulverizados (pvz)	11	30
Endoreduplicaciones (end)	12	15
Cromosomas en anillo (r)	5	11
Cromosomas dicéntricos (dic)	3	16
Rearreglos cromosómicos (rea)	0	6
Condensación prematura centromérica (pcc)	2	2

Cuadro No. 4.— *Aberraciones cromosómicas en 20 hiperbilirrubinémicos en RPMI 1640 antes y después de la fototerapia*

ABERRACION	\bar{X}_1	DS1 \pm	\bar{X}_2	DS2 \pm	t	p
Gap cromatídico (gct)	7.2	2.21	12.95	3.84	5.893	H0.0001
Gap cromosómico (gcs)	2.1	1.83	4	2.77	2.581	0.0183
Quiebra cromatídica (bct)	1.55	1.57	3.85	2.39	3.285	0.0039
Quiebra cromosómica (bcs)	0.15	0.36	1.2	1.19	3.804	0.0012
Cromosomas acéntricos (ace)	1.15	1.26	5.35	3.85	5.228	< 0.0001
Cromosomas pulverizados (pvz)	0.15	0.36	1.15	1.49	2.938	0.0084
Endoreduplicaciones (end)	0.05	0.22	0.2	0.41	1.370	0.1864
Cromosomas en anillo (r)	0.05	0.22	0.2	0.41	1.831	0.082
Cromosomas dicéntricos (dic)	0.1	0.30	0.15	0.36	0.567	0.577
Condensación prematura (pcc)	0.05	0.22	0.15	0.36	1	0.329
Rearreglos cromosómicos (rea)	0.05	0.22	0.2	0.41	1.831	0.828

Cuadro No. 5.— *Aberraciones cromosómicas en 20 recién nacidos hiperbilirrubinémicos en RPMI 1640 con Bleomicina antes y después de la fototerapia*

ABERRACION	\bar{X}_1	DS1 \pm	\bar{X}	DS2 \pm	t	p
Gap cromatídico (gct)	13.45	2.98	16.05	4.37	2.436	0.024
Gap cromosómico (gcs)	4.3	2.77	5.55	2.66	2.046	0.05
Quiebra cromatídica (bct)	3	1.68	6.55	3.13	5.559	< 0.0001
Quiebra cromosómica (bcs)	1.05	0.94	2.8	1.39	5.705	H 0.0001
Cromosomas acéntricos (ace)	6.35	3.09	8.9	2.93	2.934	0.08
Cromosomas pulverizados (pvz)	0.55	0.51	1.5	1.23	3.226	0.004
Endoreduplicaciones (end)	0.6	0.88	0.75	1.16	0.512	0.614
Cromosomas en anillo (r)	0.25	0.44	0.55	0.51	2.348	0.029
Cromosomas dicéntricos (dic)	0.15	0.36	0.8	0.89	2.795	0.011
Condensación prematura (pcc)	0.1	0.30	0.1	0.30	0	1
Rearreglos cromosómicos (rea)	0	0	0.2	0.41	0	1

Discusión

Está demostrado que la luz con longitud de onda de 390 nm es la más efectiva para producir fotodegradación de la Bb, y que longitudes de onda menores a 450 nm son mutagénicas y turbagénicas (16). Los efectos turbagénicos fueron comprobados por el aumento de células poliploides después de la fototerapia, aunque no es estadísticamente significativo ($p = 0.018$), cuadro 4.

Para el análisis citogenético se utilizó la técnica de macrocultura de cultivo de linfocitos, por considerarlo uno de los tests más compatibles para la investigación de los daños inducidos en el material genético del hombre, ya que permite la visualización de todo el genoma al microscopio óptico y es un indicador directo de las alteraciones cromosómicas e indirecto de mutación genética (17, 18).

La luz utilizada para la fototerapia en la Maternidad Isidro Ayora, es de tipo blanca con una longitud de onda de 370 a 470 nm, por lo que las aberraciones inducidas por la luz en los hiperbilirrubinémicos principalmente bct $p = 0.0012$ y ace $p < 0.0001$ (Tabla IV) estaría llevando a la muerte celular (Revell 1983, citado en 12).

El mayor número de quiebras y gasps cromosómicos visualizados después de 72 horas de fototerapia con luz fluorescente blanca (Cuadro 2), nos estaría indicando la ineficiencia de los mecanismos de reparo del ADN (19), la explicación para la no detección de los posibles efectos mutagénicos inmediatos de la luz sobre el RN sería quizás debido a que se realiza una síntesis no programada de ADN en respuesta a los daños causados por la radiación ultra violeta (20) que es un componente de la luz blanca.

El medio de cultivo en nuestro trabajo, fue el RPMI 1640, que es uno de los que menos quiebras cromosómicas espontáneas induce en

comparación con otros medios de cultivo que existen, debido a su alta concentración de L-Cisteína y por poseer diez veces más ácido ascórbico que otros medios (21).

El químico que nosotros usamos para inducir la producción de aberraciones cromosómicas, fue la Bleomicina que actúa como un alquilante radiomimético (22 - 24), produciendo una inhibición de la síntesis y ruptura de la cadena de ADN (25), condensación prematura centromérica (27, 28) acéntricos (29) y pulverización cromosómica (30), lo que es comprobado ampliamente en nuestro trabajo (Cuadro 3 y 4).

Recomendaciones

Por los resultados obtenidos "in vitro", creemos que deben desarrollarse esfuerzos para que los niveles de indicación de la fototerapia sean mejor conocidos y que su uso se limite a lo "estrictamente necesario"; aunque la mayoría de las unidades de fototerapia poseen un nivel bajo de rayos ultra violeta, las lámparas viejas pueden emitir radiaciones en cantidades "potencialmente lesivas", por lo que se recomienda el uso de un anteparo de vidrio o acrílico azul para bloquear estas radiaciones indeseables.

Creemos que será de mucha importancia el seguimiento de niños que fueron sometidos a fototerapia para la observación de alteraciones físicas que podrían darse, ej. cutáneas y relacionarlas con el tratamiento.

Agradecimiento

A los Dres. Leonardo Lobato y Eduardo Villacís así como también a los Sres. Patricio Quiroga, Carlos Torres y Marcelo López, por su colaboración en el procesamiento de las muestras y al Dr. Camilo Félix por su colaboración en el análisis estadístico.

ABSTRACT

MUTAGENIC EFFECTS OF THE PHOTOTHERAPY IN HUMAN LYMPHOCYTES IN NEW BORN WITH HYPERBILIRUBINEMIA

Lymphocyte subpopulations from 20 hyperbilirubinemia neonates of the Neonatal Service of Hospital Gineco - Obstetrics "Isidro Ayora" Quito, were cultivated in RPMI 1640 and RPMI 1640 with Bleomicina (Blenoxane - Bristol 2 ug/ml of culture medium) before and after 72 hours of phototherapy with white fluorescent light, a total of 100 metaphasic cells of each new born were analyzed in order to evaluate the mutagenic effect of fluorescent light on the chromosomes, specifically the clastogenic and turbagenic in "in vitro" cell cultures.

The turbagenic effects were observed by the increment of polyploid cells, although these effects were not statistically significant ($p = 0.18$). On the other hand the clastogenic effects were seen by the effect of the fluorescent white light upon the production of chromosomic aberrations with values $p < 0.0001$ for the production of gct an ace, $p = 0.00183$ for gcs, $p = 0.0039$ for bct, $p = 0.0012$ for bcs and $p = 0.0084$ for pvz.

The bleomycin is an excellent radiomimetic for the induction of structural chromosomic mutations in "in vitro" cell cultures.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Cremer, R.J., Perryman, P. and Richards, D. Influence of light on the hiperbilirrubinemia of infants. *Lancet* 1 (7030): 1094 - 1097, 1958.
2. Behrman, R.E. and Hsia, D.Y. Summary of a symposium on phototherapy for hyperbilirrubinemia. *The Journal of Pediatrics* 75 (4): 718 - 726, 1969
3. Stern, L. et al. Bilirubin metabolism and the induction of Kernicterus IN: Bregmsna D. Bonhein S.H. (eds). *Excrepta Medica* 1976, pp. 255 - 261.
4. Kubistchek, H.E. Mutagenesys by near visible light *Science* 155: 1545 - 1546, 1967.
5. Webb, R.B. and Malina, M.M. Mutagenesys in *Echericha Coli* by visible light. *Science* 156: 1104 - 1105, 1976.
6. Jostes, R.F. et al. Mutagenesys by fluorescent light in mammalian cell cultures, *Mutation Research* 42: 139 - 144, 1977.
7. Webb, R.B and Lorenz, J.R. Oxigen dependence and repair of the lethal of near ultraviolet and visible light. *Photochemistry and Photobiology* 12 (4): 283-290, 1970.
8. Wang, R.J. et al. Lethal effect of near ultraviolet irradiation in tissue culture medium. *Nature* 247: 43 - 45, 1974.
9. Wang, J.R. Lethal effect of day light on human cells in tissue culture medium. *Photochemistry and Photobiology* 24: 373 - 375, 1975.
10. Gnt, R.T. et al. Fluorescent light induced DNA cross linkage and chromatid breaks in mouse cells culture. *Proceedings of the National Academy of Science* 75: 3809 - 3812, 1978.
11. Ennver, J.F. et al. Phototherapy for neonatal jaundice: optimal wavelenghts of light. *The Journal of Pediatrics* 103: 295 - 299, 1983.
12. Hiroko, N. Avaliação do potencial mutagénico da lampada de luz fluorescernte azul em linfocitos humanos en cultura tempraria. *Riverao Preto, Faculdade da Medicina*, 1988, p. 150. *Disertação apresentada a Faculdade da Medicina de Ribeirao Preto. USP para obtenção do grau de Doutor em Ciencias.*
13. Moorhead, P.S. Chromosome preparationes experimental cultured from human pheriperical blood. *Experimental Cell Research* 20: 613 - 616, 1960.
14. Ferrari, I. Estudo de alteraçoes cromossomicas em pacientes portadores de anomalias fisicas multiplas e retardo mental. *Riverao Preto, Faculdade da Medicina*, 1968. *Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto USP.*
15. ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature. IN: *Report of the Standing*

- Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Switzerland, s.e., 1985 pp. 66 - 69.
16. Santella, R.M. Intra cellular DNA modifying activity of intermitent phototherapy. *The Journal of Pediatrics* 93 (1): 106 - 109, 1978.
 17. Natarjan, A.T. and T.S. Zwanenberg Mechanisms for chromosomal aberrations in mammalian cells. *Mutation Reserarch* 95: 1 - 6, 1982.
 18. Obe, G. and B. Beck. The human leukocyte system. IN: F.J. de Serres and Hallender (eds) 7a. ed. New York, Plenum Pres, 1982, pp. 337 - 340.
 19. Goodenough, U. and Levine, R.P. *Mutation in Genetics*. New York, Rien hart - Wiston, 1974, pp. 184 - 228.
 20. Evans, H.J. and D. Scott. The induction of chromosome aberrations by nitrogen mustards and its dependence on DNA sythesis. *Proc R Soc London* 173: 491 - 512, 1969.
 21. Kech, M. and Emerit, I. The influence of culture medium on the incidence of chromosomal breakage. *Human Genetics* 50: 277 - 283, 1979.
 22. Vig, B.K. and Lewias, R. Genetic Toxicology of bleomycin. *Mutation Research* 55: 125 - 145, 1978.
 23. Yamagami, H. et al. Phenotypic and Genetic characteristics of Bleomycin - sensitive strain of E. Coli *In Gann* 65: 61 - 67, 1974.
 24. Bienkowska, Z. et al. Action of actinomycins, Bleomycin and X rays on He La cells. *Br J Radiol* 46: 619 - 622, 1973.
 25. Berry. D, et al. DNA damage and growth inhibition in cultured human cells by blomycin congeners. *Biochemistry* 24: 3207 - 3214, 1985.
 26. Scott and F. Zampetti - Bosler Relations ships between chromosome damage, cell cycle delay and cell killing induced by bleomycin or X rays. *Mutation Research* 151: 83 - 88, 1985.
 27. Sen, P. and W. Hittelman Kinetics and extended of repair of bleomycin induced chromosome damage in quiescent normal human fibroblast an Human Mononuclear blood cells. *Cancer Research* 44: 591 - 596, 1984.
 28. Sagnier, M. et al. The relation ship between DNA and chromosome damage after bleomycin treatment: dosis response measurements. *Mutation Research* 93: 149 - 159, 1982.
 29. Vijayalaxim, K. H. J. Bleomycin induced chromosomal aberrations in Down's syndrome lymphocytes. *Mutation Research* 93: 107 - 11, 1982.
 30. Haidle, C.W. Release of free bases from ADN after reactions with bleomycin. *Mol Pharmacol* 8: 531 - 537, 1972.