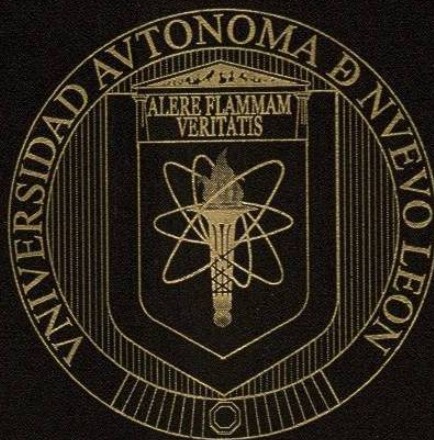


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**DETECCIÓN DE ADUCTOS DE AFLATOXINA B₁-ALBUMINA SERICA POR
RADIO INMUNO ANÁLISIS EN PACIENTES CON PATOLOGÍAS ASOCIADAS
CON SU PRESENCIA EN H. MATAMOROS, TAM; MEXICO**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

ABEL MORON GUZMÁN

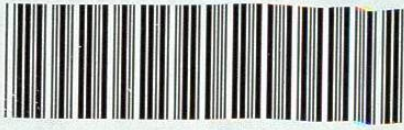
TD

Z5320

FCB

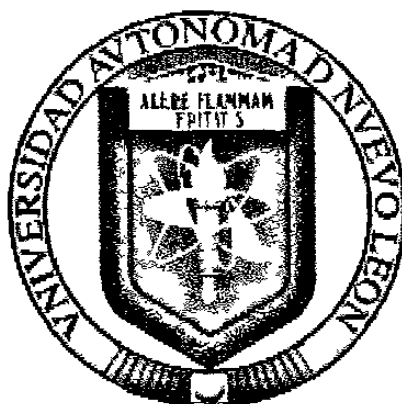
2003

.M676



1020150696

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**DETECCIÓN DE ADUCTOS DE AFLATOXINA B₁-ALBUMINA SERICA POR
RADIO INMUNO ANALISIS EN PACIENTES CON PATOLOGÍAS ASOCIADAS
CON SU PRESENCIA EN H. MATAMOROS, TAM; MÉXICO.**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

ABEL MORON GUZMÁN

SAN NICOLAS, N. L.

DIC 2003

TD
Z53 0
3
2003
,



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**DETECCIÓN DE ADUCTOS DE AFLATOXINA B₁-ALBUMINA SERICA POR
RADIO INMUNO ANALISIS EN PACIENTES CON PATOLOGÍAS ASOCIADAS
CON SU PRESENCIA EN H. MATAMOROS, TAM; MÉXICO.**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

ABEL MORON GUZMÁN

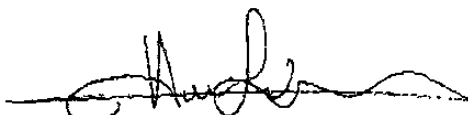
**APROBADA
COMISION DE TESIS**



**DR. LUIS J. GALAN WONG
PRESIDENTE**



**DRA. ISELA QUINTERO ZAPATA
SECRETARIA**



**DR. HUGO A. LUNA OLVERA
VOCAL**



**DRA. LILIA H. MORALES RAMOS
VOCAL**



**DRA. KATUSKA ARÉVALO NIÑO
VOCAL**



**DRA. DORALINDA GUZMÁN DE PEÑA
DIRECTOR EXTERNO**

SAN NICOLAS, N. L.

DIC 2003

DETECCIÓN DE ADUCTOS DE AFLATOXINA B₁-ALBUMINA SERICA POR
RADIO INMUNO ANALISIS EN PACIENTES CON PATOLOGÍAS ASOCIADAS
CON SU PRESENCIA EN H. MATAMOROS, TAM; MÉXICO.

Este trabajo fue realizado bajo la Dirección del Dr. Luis J. Galán Wong y la Co Dirección de la Dra. Doralinda Guzmán de Peña, en el Laboratorio de Microbiología e Inmunobiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio de Micotoxinas del Centro de Investigaciones Avanzadas, Unidad Irapuato del Instituto Politécnico Nacional.

DEDICATORIA.

A mis padres:

Sr. Pascual Morón Tapia (†) y

Sra. Concepción Guzmán de Morón (†).

Porque lo que soy es producto de lo que ustedes sembraron en mi.

A mi esposa:

Dra. Azucena Marín de Morón.

Por su amor, apoyo y comprensión que siempre me ha brindado aun
en los momentos difíciles. Te quiero.

A mis hijos:

Azucena y Abel.

Que son la bendición que Dios me ha dado, los amo con todo mi
corazón.

A mis hermanos:

Pascual, Jovita, Isabel, Mariano, Candelario, Concepción y Daniel.

Gracias por su amor.

Especialmente a la memoria de mi hermano Samuel.

Tu Recuerdo Siempre estará en mi Corazón, tus hijos: son mis hijos,
a ti Chela, mi reconocimiento y todo mi apoyo.

A la Dra. Doralinda Guzmán de Peña.

Porque gracias a su apoyo y tiempo, fue posible la realización de
esta Tesis; pero sobre todo, gracias por tu amistad.

Al Dr. Luis J. Galán Wong.

A ti; mi mas profundo agradecimiento, estimable amigo.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Juan José Peña Cabriales:

Mi agradecimiento por tus consejos y sobretodo por contar con tu amistad.

Al Dr. Juan Salazar Reyna:

Gracias por su estímulo para ver coronados los esfuerzos realizados.

Al equipo de trabajo de la Dra. Doralinda Guzmán de Peña:

Gracias por su ayuda.

Al Dr. Hugo A. Luna Olvera:

Por sus consejos para la realización de este proyecto.

Al Ing. Alejandro Morón Quiroz:

Por su apoyo técnico.

Gracias.

Al personal de mi Laboratorio de Análisis Clínicos del C. E. M. Q.

INDICE DE CONTENIDO

Página de Título	I
Dedicatoria	V
Agradecimientos	VI
Índice de Contenido	VII
Lista de Figuras	X
Lista de Tablas	XI
Lista de Diagramas	XVII
Lista de Esquemas	XVIII
Lista de Abreviaturas	XIX
Resumen	XXIII
Introducción	1
Antecedentes	3
Generalidades de aflatoxinas	3
Tipos y naturaleza química de las aflatoxinas	4
Presencia de aflatoxinas en el mundo	6
Presencia de aflatoxinas en México	7
Legislación sobre aflatoxinas	10
Regulación de aflatoxinas en México	14
Toxicidad de aflatoxinas en animales de experimentación	15
Patologías asociadas con la presencia de aflatoxinas	18
Toxicidad de las aflatoxinas	23
Aflatoxicosis aguda	24

Quimioprotección	25
Métodos para la detección de Biomarcadores	28
Cuantificación de aductos	32
Hipótesis	35
Objetivo General	35
Objetivos Específicos	35
Materiales y Métodos	36
Primer Muestreo (2001)	37
Recolección de sangre	37
Obtención de albúmina	39
Método de Bradford para cuantificación de proteínas	41
Determinación de proteínas	42
Electroforesis en gel de poliacrilamida	43
Geles de Electroforesis	44
Obtención del aducto AFB ₁ – Lisina del hidrolizado	46
Digestión de albúmina con Pronase	46
Radio inmuno Análisis	50
Sep Pak	52
Determinación de la concentración de anticuerpos para calcular	
Ab curva de calibración para RIA	55
AFB ₁ curva de calibración y RIA de muestras	57
Resultados	
1° Pacientes 2001 (Primer Muestreo)	59
Pacientes con Tuberculosis	61

	Pacientes con Cirrosis Hepática	70
	Pacientes con Cáncer	78
	Pacientes con Hepatitis	86
	Pacientes Clasificados como Controles Sanos	93
	Pacientes 2002 (Segundo Muestreo)	104
	Pacientes con Cáncer	105
2°	Resultados de obtención de albúmina pacientes 2001	116
	Resultados de obtención de albúmina pacientes 2002	116
3°	Resultados de la Electroforesis en poliacrilamida	120
4°	Cuantificación de la molécula AFB ₁ – Lisina en los sueros de pacientes 2001.	123
	Cuantificación de la molécula AFB ₁ – Lisina en los sueros de pacientes 2002.	130
	Discusión	132
	Conclusiones	134
	Bibliografía	135

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.-	Extracción de sangre de paciente	59
Figura 2.-	Gel de poliacrilamida de albúmina humana en pacientes con cáncer	120
Figura 3.-	Gel de poliacrilamida de albúmina humana en pacientes con cirrosis	121
Figura 4.-	Gel de poliacrilamida de albúmina humana en pacientes con Hepatitis	121
Figura 5.-	Gel de poliacrilamida de albúmina humana en pacientes con Tuberculosis	122

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.-	Ocurrencia de aflatoxina en México	8
Tabla 2.-	Incidencia de aflatoxina en maíz blanco y amarillo recién cosechado en Tamaulipas.	9
Tabla 3.-	Niveles de aflatoxinas permitidos en diferentes alimentos en Estados Unidos de Norteamérica	11
Tabla 4.-	Niveles de aflatoxinas permitidos en diferentes alimentos en algunos países	12
Tabla 5.-	Niveles permitidos de aflatoxinas diferentes alimentos de consumo humano en Italia	13
Tabla 6.-	Niveles Máximos de aflatoxinas permitidos en diferentes alimentos para consumo humano en Europa.	14
Tabla 7.-	Limites permitidos de aflatoxinas en cereales para consumo pecuario en México	15
Tabla 8.-	Lesiones celulares encontradas en diferentes animales alimentados con dietas contaminadas con aflatoxinas.	16
Tabla 9.-	Hepatocarcinogenicidad de las aflatoxinas B ₁ en distintas especies de animales	17
Tabla 10.-	Incidencia de cáncer hepático en humanos y nivel de ingestión de aflatoxinas	20
Tabla 11.-	Métodos para cuantificar diferentes aductos	33

Tabla 12.-	Distribución de pacientes por patologías del presente estudio	36
Tabla 13.-	Ficha de identificación de pacientes	37
Tabla 14.-	Concentración de datos de pacientes Primer Muestreo 2001.	60
Tabla 15.-	Clasificación de pacientes con Tuberculosis de acuerdo a la edad. 2001	62
Tabla 16.-	Clasificación de pacientes con Tuberculosis de acuerdo al peso. 2001	63
Tabla 17.-	Clasificación de pacientes con Tuberculosis de acuerdo a varios parámetros. 2001	64
Tabla 18.-	Clasificación de pacientes con Tuberculosis de acuerdo a la ocupación. 2001	66
Tabla 19.-	Clasificación de pacientes con Tuberculosis de acuerdo al lugar de origen. 2001	67
Tabla 20.-	Clasificación de pacientes con Tuberculosis de acuerdo a años de residencia en H. Matamoros, Tamaulipas. 2001	68
Tabla 21.-	Clasificación de pacientes con Tuberculosis de acuerdo al nivel socio económico. 2001	69
Tabla 22.-	Clasificación de pacientes con Cirrosis Hepática de acuerdo a la edad. 2001	71
Tabla 23.-	Clasificación de pacientes con Cirrosis Hepática de acuerdo al peso. 2001	72

Tabla 24.-	Clasificación de pacientes con Cirrosis Hepática de acuerdo a varios parámetros. 2001	73
Tabla 25.-	Clasificación de pacientes con Cirrosis Hepática de acuerdo a la ocupación. 2001	74
Tabla 26.-	Clasificación de pacientes con Cirrosis Hepática de acuerdo al lugar de origen. 2001	75
Tabla 27.-	Clasificación de pacientes con Cirrosis Hepática de acuerdo a años de residencia en H. Matamoros, Tamaulipas. 2001	76
Tabla 28.-	Clasificación de pacientes con Cirrosis Hepática de acuerdo al nivel socio económico. 2001	77
Tabla 29.-	Clasificación de pacientes con Cáncer de acuerdo a la edad. 2001	79
Tabla 30.-	Clasificación de pacientes con Cáncer de acuerdo al peso. 2001	80
Tabla 31.-	Clasificación de pacientes con Cáncer de acuerdo a varios parámetros. 2001	81
Tabla 32.-	Clasificación de pacientes con Cáncer de acuerdo a la ocupación. 2001	82
Tabla 33.-	Clasificación de pacientes con Cáncer de acuerdo al lugar de origen. 2001	83
Tabla 34.-	Clasificación de pacientes con Cáncer de acuerdo a años de residencia en H. Matamoros, Tamaulipas. 2001	84

Tabla 35.-	Clasificación de pacientes con Cáncer de acuerdo al nivel socio económico. 2001	85
Tabla 36.-	Clasificación de pacientes según tipo de Cáncer. 2001	87
Tabla 37.-	Clasificación de pacientes con Hepatitis de acuerdo a la edad. 2001	88
Tabla 38.-	Clasificación de pacientes con Hepatitis de acuerdo al peso. 2001	89
Tabla 39.-	Clasificación de pacientes con Hepatitis de acuerdo a varios parámetros. 2001	90
Tabla 40.-	Clasificación de pacientes con Hepatitis de acuerdo a la ocupación. 2001	92
Tabla 41.-	Clasificación de pacientes con Hepatitis de acuerdo al lugar de origen. 2001	92
Tabla 42.-	Clasificación de pacientes con Hepatitis de acuerdo a años de residencia en H. Matamoros, Tamaulipas. 2001	94
Tabla 43.-	Clasificación de pacientes con Hepatitis de acuerdo al nivel socio económico. 2001	95
Tabla 44.-	Pacientes clasificados como Controles Sanos de acuerdo a la edad. 2001	96
Tabla 45.-	Pacientes clasificados como Controles Sanos de acuerdo al peso. 2001	98
Tabla 46.-	Pacientes clasificados como Controles Sanos de acuerdo a varios parámetros. 2001	99

Tabla 47.-	Pacientes clasificados como Controles Sanos de acuerdo a la ocupación. 2001	100
Tabla 48.-	Pacientes clasificados como Controles Sanos de acuerdo al lugar de origen. 2001	101
Tabla 49.-	Pacientes clasificados como Controles Sanos de acuerdo a años de residencia en H. Matamoros, Tamaulipas. 2001	102
Tabla 50.-	Pacientes clasificados como Controles Sanos de acuerdo al nivel socio económico. 2001	103
Tabla 51.-	Concentración de datos de pacientes Segundo Muestreo 2002.	104
Tabla 52.-	Clasificación de pacientes según tipo de Cáncer. 2002	106
Tabla 53.-	Clasificación de pacientes con Cáncer de acuerdo a la edad. 2002	107
Tabla 54.-	Clasificación de pacientes con Cáncer de acuerdo al peso. 2002	108
Tabla 55.-	Clasificación de pacientes con Cáncer de acuerdo a varios parámetros. 2002	110
Tabla 56.-	Clasificación de pacientes con Cáncer de acuerdo a la ocupación. 2002	111
Tabla 57.-	Clasificación de pacientes con Cáncer de acuerdo al lugar de origen. 2002	112
Tabla 58.-	Clasificación de pacientes con Cáncer de acuerdo a años de residencia en H. Matamoros, Tamaulipas. 2002	114

Tabla 59.-	Clasificación de pacientes con Cáncer de acuerdo al nivel socio económico. 2002	115
Tabla 60.-	Concentración de albúmina en pacientes con Hepatitis. 2001	117
Tabla 61.-	Concentración de albúmina en pacientes con Cáncer. 2001	117
Tabla 62.-	Concentración de albúmina en pacientes con Cirrosis Hepática. 2001	118
Tabla 63.-	Concentración de albúmina en pacientes con Tuberculosis. 2001	118
Tabla 64.-	Concentración de albúmina en pacientes con Cáncer. 2002	119
Tabla 65.-	Radio Inmuno Análisis del aducto de AFB ₁ – Lisina en suero de pacientes con Tuberculosis. 2001	124
Tabla 66.-	Radio Inmuno Análisis del aducto de AFB ₁ – Lisina en suero de pacientes con Cirrosis Hepática. 2001	125
Tabla 67.-	Radio Inmuno Análisis del aducto de AFB ₁ – Lisina en suero de pacientes con Hepatitis. 2001	127
Tabla 68.-	Radio Inmuno Análisis del aducto de AFB ₁ – Lisina en suero de pacientes con Cáncer. 2001	128
Tabla 69.-	Radio Inmuno Análisis del aducto de AFB ₁ – Lisina en suero de pacientes usados como Controles Sanos. 2001	129
Tabla 70.-	Radio Inmuno Análisis del aducto de AFB ₁ – Lisina en suero de pacientes con Cáncer. 2002	131

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1.-	Uso racional de Biomarcadores para evaluación de un riesgo	29
Diagrama 2.-	Concepto de paralelograma	31
Diagrama 3.-	Biomarcadores de exposición	32
Diagrama 4.-	Obtención de sangre de pacientes	38
Diagrama 5.-	Obtención de albúmina	40
Diagrama 6.-	Separación de AFB ₁ – Lisina del hidrolizado	50

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.-	Metabolismo de las aflatoxinas	24
Esquema 2.-	distribución de pacientes para verificación de banda de albúmina en gel de electroforesis	45

LISTA DE ABREVIATURAS.

A

AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
Add	Adicionar

B

BSA	Albúmina Serica Bovina
BCP	Púrpura de Bromocresol

C

CPM	Cuentas por minuto
°C	Grados Centígrados
CHL	Clorofila
CA	Cáncer

D

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
-----	---------------------------

F

FDA Administración de Drogas y Alimentos

H

HCC Hepatocarcinoma
HBV Virus de la Hepatitis "B"
HCV Virus de la Hepatitis "C"
HIV Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HPLC Cromatografía líquida alta presión

K

kg Kilogramo

M

mgr Miligramo
ml Mililitro
mmol Milimol
MeOH Metanol
 μ g Microgramo
 μ l Microlitro

N

NOM	Norma Oficial Mexicana
NAD	NicotinAdenindinucleotido
ngr	nanogramo

P

%	por ciento
PPB	Partes por billón
PPM	Partes por millón
PBS	Buffer Salino de Fosfato

R

RIA	Radio Inmuno Análisis
-----	-----------------------

S

SDS	Dodecil sulfato sodico
SSA	Secretaria de Salud y Asistencia

T

tons	Toneladas
------	-----------

U

USA Estados Unidos de Norteamérica

V

Vol Volumen

X

xg Revoluciones por minuto

RESUMEN.

En México como en otros países hay un interés muy grande por el conocimiento de los riesgos que significan la contaminación de alimentos con compuestos tóxicos como las aflatoxinas; estas sustancias están consideradas como agentes carcinogénicos potentes que causan además una gama muy grande de patologías. Sabiendo que los hongos que las producen se encuentran en granos almacenados y que uno de ellos es el maíz, el que constituye uno de los alimentos básicos del mexicano y que el Noreste del país es una zona altamente contaminada, razón por la cual se procedió a realizar un muestreo en la Ciudad de H. Matamoros, Tamaulipas; con pacientes que presentaban diferentes patologías como HBV, HCV, Cáncer, Cirrosis Hepática y Tuberculosis para conocer los niveles de AFB₁ – Lisina en Sangre y tratar de establecer una correlación con las distintas patologías del estudio. Se procedió a estandarizar la cuantificación del aducto por la técnica de RIA se efectuaron dos muestreos uno en el año 2001 y otro en el 2002, con un total de 80 pacientes llenándose una ficha con los datos generales de cada uno, para graficarse posteriormente, se les determino albúmina por el Método de Wild et. al., para la obtención del aducto y se cuantifico por el Método de RIA de Sheabar et. al., modificado por Trudel y Wogan. Los valores encontrados indican que la población a ingerido alimentos contaminados con aflatoxinas; considerando la vida media de la albúmina es probable que la población este ingiriendo en forma cotidiana alrededor de 1

$\mu\text{gr}/\text{día}$; no se encontró correlación entre la AFB_1 – Lisina y las patologías presentes en los pacientes del estudio.

ABSTRACT.

In México as in other countries there is a great interest for the knowledge of the risks that signify the contamination of food with toxic components such as aflatoxins; these substances are considered as potent carcinogenic agents that also cause a large degree of pathologies. Knowing that the fungi that produce them are found in stored grains and one of them is corn, which constitutes one of the most basic nourishment of the Mexican population to carry out a sampling in the city of H. Marmoros, Tamaulipas; with patients who presented different pathologies such as HBV, HCV, cancer, liverwort cirrhosis, and tuberculosis to know the levels of AFB₁ – Lysine in the blood and try to establish a correlation with the different pathologies of the study. It was proceeded to standardize the quantification of the aduct by the technique of RIA, two samplings were carried out in the years 2001 and 2002, with the total of 80 patients filling out a questionnaire with each individuals' personal data, to graph afterwards, albumin was determined using the method of Wild et. al., for the obtaining of the aduct and it was quantified by the method of RIA of Sheabar et. al., modified by Trudel and Wogan. The values found indicate that the population has ingested nourishments contaminated with aflatoxins, considering the half life of the albumin it is likely that the population is ingesting on a daily basis about 1 µgr/day; no correlation was found between the AFB₁ – Lysine and the pathologies present in the patients of the study.

TITULO

DETECCIÓN DE ADUCTOS DE AFLATOXINA B₁-ALBUMINA SERICA
POR RADIO INMUNO ANALISIS EN PACIENTES CON PATOLOGÍAS
ASOCIADAS CON SU PRESENCIA EN H. MATAMOROS, TAM; MÉXICO.

INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas en 1960 ha habido un creciente interés por el conocimiento sobre los posibles riesgos sanitarios provocados por la contaminación de alimentos con compuestos tóxicos y posiblemente carcinogénicos producidos por hongos toxigenicos.

La aflatoxina B₁ es considerada como uno de los agentes carcinogénicos naturales más potentes que se ha encontrado debido a que un µg es capaz de inducir cáncer en cultivo de células (112); y a que en concentraciones de 2 mgr/kg en alimento fue capaz de inducir cáncer hepático en el 10% de una población de animales de experimentación (97, 137, 310); se ha establecido una correlación positiva alta entre el consumo de alimentos contaminados con la aflatoxina B₁ y cáncer hepático en humanos en países como África y China (119), así como cirrosis hepática, cáncer de tubo digestivo, tuberculosis, efectos teratogenicos, trastornos de la coagulación, degeneración grasa, así como trastornos inmunitarios (27, 60, 155, 298) entre otros padecimientos.

La acción hepatocarcinogénica de esta micotoxina en animales de experimentación, incluyendo primates; contemplando además su amplia distribución en alimentos humanos y animales, ha determinado que al estar presente en alimentos se considere como un alto riesgo potencial para la salud (24, 119, 147, 197).

Esta demostrado que granos básicos como el maíz y oleaginosas pueden estar contaminados con aflatoxinas. En México se ha reportado una alta incidencia de maíz contaminado con aflatoxinas sobre todo en la región de H. Matamoros (noreste del país) (46, 227); en donde los niveles de contaminación durante los últimos 10 años han sido de más de 125 $\mu\text{gr}/\text{kg}$ (195). Considerando que la principal fuente de alimento de los mexicanos es el maíz en forma de tortilla, podría ser posible que la población esté ingiriendo aflatoxinas constantemente. Una forma de establecer si existe este riesgo, es determinar la cantidad de aflatoxina unida a albúmina presente en el suero humano, ya que esta AFB₁ – lisina es catalogada como un potente biomarcador (101).

ANTECEDENTES

Generalidades de aflatoxinas

Las aflatoxinas son sustancias naturales producidas por hongos en alimentos y que causan efectos tóxicos en humanos y animales cuando los consumen (227, 234); Estas micotoxinas son el producto del metabolismo secundario de los hongos imperfectos: *Aspergillus flavus*, *A. nomius* y *A. parasiticus* (21), los que se descubrieron en 1960 como consecuencia de una epizootia, que causó la muerte de miles de guajolotes jóvenes, patos y faisanes en el este y en el sur de Inglaterra (105, 252) . Este padecimiento se conoció como enfermedad "X" de los pavos que se caracterizó por letárgia, pérdida del apetito y muerte. La necropsia evidenció necrosis hemorrágica hepática extensa, congestión renal, degeneración parenquimatosa hepática y proliferación de los conductos biliares.

Los estudios que se realizaron para elucidar la etiología del problema no pudieron demostrar una causa microbiológica o viral en estas aves (105) por lo que se pensó en la posible contaminación química de los alimentos. El alimento estaba integrado con harina de cacahuete importada de Brasil, alimento que se le llamo Rosetti por el barco que lo transportó, encontrándose que estaba altamente contaminada con *Aspergillus flavus* (227, 17), y con una sustancia azul fluorescente al ser observada con luz ultravioleta; aislándose las toxinas B₁ y G₁

por cromatografía en papel (252) y posteriormente por la técnica de cromatografía en capa fina (201) denominándoseles aflatoxinas.

El término de aflatoxina proviene de las siguientes raíces: "A" por el género *Aspergillus*, "FLA" por la especie *flavus* y "TOXINA" que significa veneno, debido a que estas micotoxinas fueron aisladas primeramente en cultivos de *Aspergillus flavus* (84).

Tipos y naturaleza química de las aflatoxinas

Químicamente las aflatoxinas son dihidrofuranocumarínicos altamente substituidos (158) los principios tóxicos fueron aislados (16, 119, 134, 201) e identificadas obteniéndose 4 principales aflatoxinas: 2 de la serie "B" (aflatoxina B₁ y aflatoxina B₂) y dos de la serie "G" (aflatoxina G₁ y aflatoxina G₂); las primeras se identifican por su fuerte fluorescencia azul bajo la luz ultravioleta mientras que las de la serie G tienen fluorescencia verdosa bajo la misma luz. Las aflatoxinas de la serie B presentan un ciclopentano unido al anillo cumarínico y las de la serie G presentan una fusión con una lactona (111).

Actualmente se consideran más de 18 tipos diferentes de estas aflatoxinas pero indudablemente que las más importantes son las B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂ (30). Las aflatoxinas B₁ y en menor cantidad las aflatoxinas G₁ son las responsables de la contaminación en alimentos, estas dos toxinas tienen un puente instaurado en la posición 2, 3 en el anillo furano terminal. La B₂ y aflatoxina G₂ están saturadas

en esa posición; en el caso de las aflatoxinas M₁ y aflatoxinas M₂ son hidroxilados de las aflatoxinas B₁ y aflatoxinas B₂ respectivamente (76, 119, 284).

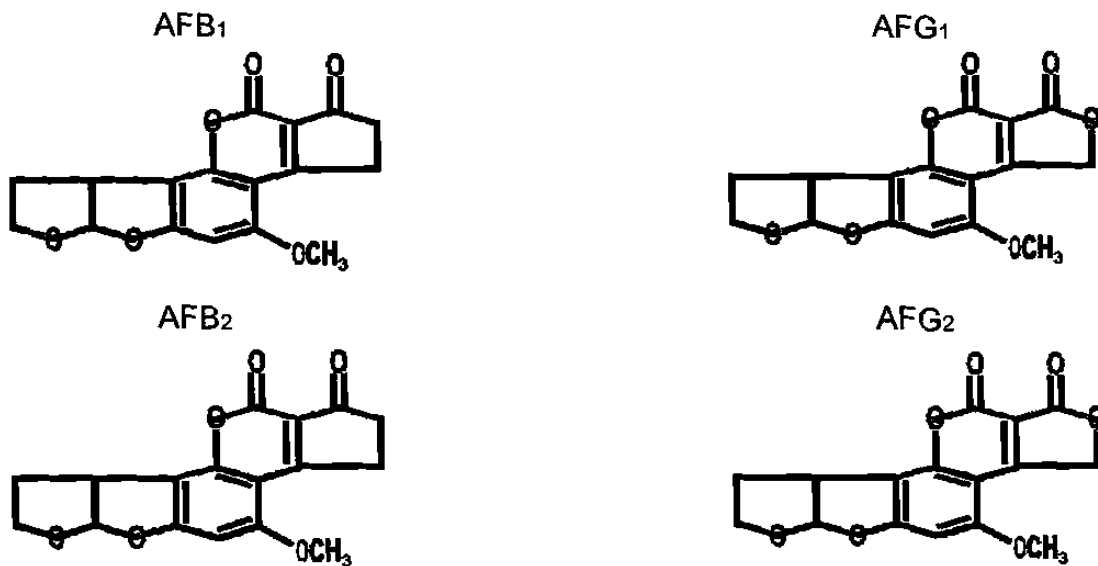


Fig.1 Estructura de aflatoxinas

Las aflatoxinas son solubles en solventes orgánicos como cloroformo y metanol entre otros; son poco solubles en agua, son sustancias termoestables (en alimentos) pudiendo resistir hasta 150° C durante 30 minutos cuando están en harina de maíz (103). Sin embargo son desactivadas con facilidad por pH extremos ya sea ácidos o alcalinos (menos de 3 o más de 10); o bien por agentes oxidantes o por la exposición a la luz ultravioleta en presencia de oxígeno (119).

Presencia de aflatoxinas en el mundo.

La población humana esta expuesta a la aflatoxina por el consumo de alimentos que han sido contaminados directamente por cepas toxigenicas de *Aspergillus parasiticus* y *A. flavus*; estos hongos contaminan los diferentes alimentos en el campo, durante su cultivo o durante la cosecha y/o durante el almacenamiento de los mismos; puede ocurrir también una contaminación secundaria durante la vida de anaquel de los diferentes alimentos (5, 14, 97, 243).

Taubenhaus en 1920 describe por primera vez la contaminación del maíz por *Aspergillus flavus* en Estados Unidos de Norteamérica y no fue hasta 1975 que Anderson et al, demostró la presencia de aflatoxina en el maíz contaminado por este hongo.

En virtud de que los requerimientos para la producción de aflatoxinas son: una alto contenido de humedad en los alimentos, temperaturas de 27 – 37°C, alta humedad relativa del medio ambiente; los hongos antes descritos pueden producirlos en alimentos ricos en grasas y carbohidratos.

Las aflatoxinas se encuentran distribuidas ampliamente en el mundo, predominando en climas templados en productos gramíneos almacenados, y con mayor preferencia en el maíz, cacahuate y otros gramíneos (19, 82, 191, 251, 303, 304).

Los resultados obtenidos de diversas muestras internacionales revelaron un alto grado de contaminación, variando en un concentración de aflatoxinas de 4 – 1920 $\mu\text{gr}/\text{kg}$ para el maíz y de 24 – 5000 $\mu\text{gr}/\text{kg}$ para el cacahuate (127, 153, 215).

Las aflatoxinas han sido también reportados en grado variables en varios países de América Latina como el Salvador, Brasil, Costa Rica, Guatemala, Colombia y Ecuador (229). En el caso de Costa Rica de 3,000 muestras de maíz coleccionadas en todas las regiones del país, en diferentes etapas de desarrollo y diferentes contenidos de agua, se encontró contaminación con *A. flavus* en un 80% de las muestras conteniendo mas de 20 μgr de aflatoxinas B₁; en algunas regiones fue mayor de 274 μgr (191).

Presencia de aflatoxinas en México.

En nuestro país se ha investigado la presencia de aflatoxinas en diversos granos, teniendo en primer termino en orden de importancia el maíz (127) y sus derivados, alimento que es más factible de contaminarse por ser un excelente substrato y que además constituye una parte importante de la dieta básica del mexicano, consumiéndose aproximadamente 248 kg por capita anualmente (125). La leche, otros productos agrícolas como sorgo, nuez, semilla de algodón, cacao y oleaginosas como cacahuate y frijol, además de alimentos procesados como harina nixtamalizada y alimentos balanceados, en los que se encontró la presencia de aflatoxinas B₁, G₁ y G₂; los resultados referentes a aflatoxina B₁ oscilan de 0.32 a 465.31 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (8, 130, 195, 229). Tabla (1) en la que se puede apreciar año,

producto, porcentaje de incidencia y diversas estados en las que se ha encontrado esta micotoxina.

Tabla 1.- Ocurrencia de aflatoxinas en México.

Año	Alimento	No. De muestras	Incidencia (%)	Lugar
1975-76	Tortilla	30	46	D.F.
	Frijol	30	100	D.F.
1978	Maíz	120	12	Puebla
	Frijol	120	1	Puebla
1978	Harina de maíz nixta malizado	20	35	Monterrey
1978	Balanceado para conejo	20	75	Coahuila y Nuevo León
1980	Nuez	28	39	Monterrey
	Cacahuate	238	48	D. F.
	Mazapán	238	17	Guadalajara y Monterrey
	Harina de Maíz	96	42	Monterrey
	Fécula de Maíz	41	0	Monterrey
1982	Maíz blanco	41	0	Guanajuato
1983	Maíz amarillo criollo	9	33	Guanajuato
1984	Maíz	5	0	Guanajuato
1984	Leche	110	100	Monterrey
1985	Maíz blanco	42	10	Guanajuato
1987	Sorgo blanco	120	48	Tamaulipas
1987	Maíz amarillo	39	42	Tamaulipas
1988	Maíz blanco	49	10	Chiapas
1988	Maíz	64	0	Durango y Chihuahua
1988	Maíz	26	0	Edo.deMéxico
1988	Fécula de maíz	4	0	Guadalajara
1989	Cacao	10	100	D.F.

Guzmán de Peña D. (102)

En distintos estados del País se han practicado monitores similares como en el caso de Chiapas, que en el año de 1993 se encontró en el maíz almacenado cantidades de aflatoxinas que variaban entre 16 – 74 µgr/kg y en los años siguientes las concentraciones fueron de 9 hasta 2100 µgr/kg (229).

En Tamaulipas en el año de 1989 se analizó maíz recién cosechado encontrándose niveles de contaminación de 68 y 102 $\mu\text{gr}/\text{kg}$. Lo que propicio una serie de investigaciones en el maíz blanco y amarillo recién cosechado en 7 municipios del norte del Estado encontrándose niveles de contaminación que variaban de 34 $\mu\text{gr}/\text{kg}$ a 125 $\mu\text{gr}/\text{kg}$. (188) (tabla 2).

Tabla 2.- Incidencia de Aflatoxinas en Maíz Blanco y Amarillo recién cosechado en Tamaulipas.

Municipio	Número de Bodegas	Numero de muestras	Aflatoxinas Incidencia %	Nivel X ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Río Bravo	17	22	50	62
Miguel Alemán	3	3	100	125
Reynosa	2	2	66	85
Matamoros	5	9	66	62
Camargo	1	1	100	100
Díaz Ordaz	2	2	100	100
Valle Hermoso	8	13	38	34

Guzmán de Peña D. (188)

Posteriormente de los años de 1989 a 1992 el Gobierno Federal instituyó un programa con la Secretaría de Salud, de Agricultura, Recursos Hidráulicos y Conasupo, para evaluar la presencia de aflatoxinas en el maíz en el Estado de Tamaulipas; como resultado de estas supervisiones se encontró que durante la recepción del maíz en el año de 1989 en Conasupo el grano estaba altamente contaminado con aflatoxina con concentraciones que oscilaban entre 21 y 400 mgr/kg por lo que se decidió ponerse en cuarentena la totalidad de la cosecha

(440,000 tons) y no autorizarse para consumo humano (172, 235). Posteriormente en el año 2000 se encontraron 27,000 toneladas de maíz contaminados con aflatoxinas en la región de H. Matamoros (225), sin que se especificara el grado de contaminación.

En base a los antecedentes antes descritos, se evidencia que el maíz que se cosecha en diversas partes de la Republica Mexicana ha estado contaminado con aflatoxinas, siendo por lo tanto un riesgo para el consumo humano.

Legislación sobre aflatoxinas

En virtud de la alta toxicidad de estas micotoxinas, así como su distribución muy amplia a nivel mundial, se han establecido regulaciones sobre su presencia en insumos para alimentos humanos y pecuarios, incluyendo productos derivados de ellos como leche y carne. De acuerdo a la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica, las aflatoxinas son sustancias venenosas contempladas en la sección dos del acta referida a comida, drogas y cosméticos mencionándose los niveles permitidos de estas en las cantidades siguientes:

Tabla 3.- Niveles de aflatoxina permitidos en diferentes alimentos en Estados Unidos de Norteamérica.

Maíz para consumo humano	hasta 20 µgr/kg
Maíz para aves, ganado lechero y porcinos	hasta 20 µgr/kg
Maíz y derivados del cacahuate para el terminado de la engorda de vacunos	hasta 300 µgr/kg
Semilla de algodón para engorda de ganado	hasta 300 µgr/kg
Maíz o derivados del cacahuate para el terminado de la engorda de cerdos de mas de 100 kg.	hasta 200 µgr/kg
Maíz o derivados del cacahuate para pie de cría de ganado vacuno o porcino	hasta 100 µgr/kg
Maíz o derivados del cacahuate para animales jóvenes	hasta 20 µgr/kg
Nuez de Brasil	hasta 20 µgr/kg
Leche	0.5 µgr/kg (AFM1)
Cacahuate y sus derivados	20 µgr/kg
Pistaches	20 µgr/kg

Administración de Drogas y Alimentos (88, 89)

De la misma manera otros países, han establecido regulaciones en los niveles de estas toxinas en sus alimentos. En la tabla 4 se puede ver que Malasia no permite la presencia de aflatoxinas en ningún alimento; en cambio en México

permite 20 µgr/kg en uno de los alimentos más importantes para su población, el maíz.

Tabla 4.- Niveles de aflatoxinas permitidos en diferentes alimentos en algunos países.

País	Producto	Tolerancia para aflatoxinas µg/kg (ppb)
Brasil	Cacahuete (exportación)	50
Canadá	Nueces y productos de nueces	15
Dinamarca	Cacahuete y nueces de Brasil semillas	5 22
India	Cacahuete (alimento)	30
Israel	Todas las semillas	20
Japón	Todos los alimentos	10
Malasia	Todos los alimentos	cero
Malawi	Cacahuates	5
México	Maíz	20
Polonia	Todos los alimentos y semillas	5
Rhodesia	Cacahuates	25
Suecia	Todos los alimentos	10
U. S. A.	Todos estos productos	15
Inglaterra	Nueces y sus derivados	4
Suiza	Cereales	4

Stolofflin et al, (272)

En Italia específicamente se han establecido regulaciones más severas en los alimentos para bebés, como se puede ver en la Tabla 5.

Tabla 5.- Niveles permitidos de aflatoxinas en diferentes alimentos de consumo humano en Italia.

AFLATOXINA	PRODUCTO	Ug/Kg
Aflatoxina B1	Condimentos	10
Aflatoxina B1	Hierbas de té	5
Aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2)	Comida para bebe	0.1
Aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2)	Condimentos	20

(Secretaria de Salud, Italia 1999).

La actual Comunidad Europea ha determinado que los niveles permitidos sean más bajos que los autorizados por la F. D. A. en los Estados Unidos de Norteamérica como se puede apreciar en la Tabla 6.

Tabla 6.- Niveles máximos de aflatoxinas permitidos en diferentes alimentos para consumo humano en Europa.

PRODUCTO	AFLATOXINA	µg/Kg
Cacahuates	Aflatoxina B1	2
	Aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2)	4
Frutas Frescas	Aflatoxina B1	2
	Aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2)	4
Cacahuates seleccionados	Aflatoxina B1	8
	Aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2)	15
Frutas secas Seleccionados	Aflatoxina B1	5
	Aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2)	10
Cereales y Procesados	Aflatoxina B1	
	Aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2)	4
Leche y derivados	Aflatoxina M1	.5ng/L

(Comunidad Europea, julio 1998).

Regulación de aflatoxinas en México

La Secretaria de Salud, en la norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios, control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal en la Sección 5.3.1 y 5.3.2 establecen que los cereales no deben excederse de 20 µgr/kg de aflatoxinas totales; en caso de observarse valores de 21-300 µgr/kg el cereal únicamente se usara para consumo animal.

Los cereales para consume pecuario deberán ajustarse a lo dispuesto en la tabla 7.

Tabla 7.- Límites permitidos de aflatoxinas en cereales para consumo pecuario en México.

	Limite Máximo $\mu\text{gr}/\text{kg}$
Aves excepto pollos de engorda	100
Cerdos en engorda:	
De 25 – 45 kg	100
Mayores de 45 kg	200
Cerdos adultos destinados a la reproducción	100
Rumiantes:	
Adultos destinados a la reproducción	100
De engorda en etapa de finalización	300

Secretaria de Salud (247)

Toxicidad de las aflatoxinas en animales de experimentación

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas por la muerte masiva de pavos en Inglaterra en 1961 (79, 250) en lo que se denominó la enfermedad "X" de estas aves; ha habido un interés creciente por el conocimiento de la actividad tóxica de estas micotoxinas en distintas especies de seres vivos, de los cuales los más utilizados para experimentar han sido: ratas, ratones, pollos, cerdos, borregos, ardillas, vacas, cultivos celulares, varias especies de monos y peces. Como se puede observar en la Tabla 8 las lecciones ocasionadas en el hígado como órgano y en sus unidades celulares son bastantes agresivas.

Tabla 8.- Lesiones Celulares encontradas en diferentes animales alimentados con dietas contaminadas con aflatoxinas.

Lesiones	Bovino	Cerdos	Borregos	Patos	Guajolotes	Pollo
Lesiones de hígado						
Necrosis aguda y Hemorragia	-	-	-	+	+	-
Fibrosis crónica	+	+	-	-	-	-
Nódulos regenerativos	+	+	-	-	+	-
Proliferación del ducto biliares	+	+	-	+	+	+
Lesiones veno-occlusivas	+	-	-	-	-	-
Células hepáticas						
Megalocytosis (células Engrandecidas)	+	+	-	+	+	-
Núcleo engrandecido	+	+	-	+	+	+
Infiltrado de células inflamatorias	-	-	-	-	+	+
Tumores en hígado	0	0	*	+	0	0

Lewis et al. (172)

La mayor parte de la información respecto a la toxicidad de las aflatoxinas se ha derivado sobre experimentos en ratas las que son muy susceptibles para este propósito; en los demás animales como conejos, bovinos, cerdos, borregos, se ha obtenido una respuesta en grado variable (2, 72, 86, 230, 286) razón por la que se han manejado con menor frecuencia.

Con base a los estudios realizados se ha demostrado que la aflatoxina B₁ es un potente carcinogénico para animales y peces (23, 47, 78, 152, 306) en los que por lo general el hígado fue el órgano blanco, induciendo una alta presencia de hepatocarcinoma celular y en menor grado otro tipo de neoplasias y padecimientos diversos como: mutaciones y malformaciones congénitas (2, 51, 100, 189, 218, 269), alteraciones inmunitarias (72, 224), fibrosis incluyendo la hepática (242, 249) alteraciones del metabolismo (51, 91, 112, 226, 238)

trastornos de la fertilidad (149, 150) cursando con síntomas como: hepatomegalia, necrosis periportal, trastornos hemorrágicos, degeneración grasa, proliferación de los conductas biliares, diversos grados de fibrosis hepática, diarrea así como el desarrollo de tumores en hígado (149, 150). Tabla 9. Siendo estos de los efectos inducidos que se han presentado bajo circunstancias muy diversas como: especie y cepa de animales usados, dosis, vías de administración, dieta, edad y sexo; respecto al cual no se ha encontrado que haya diferencias respecto a los efectos en la toxicidad de las aflatoxinas; es importante considerar que la respuesta carcinogénica se ha evaluado incluyendo además de las ya mencionadas variables como: el status hormonal, la magnitud del daño hepático, actividad enzimática hepática y presencia de otros metabolitos (51, 112, 238, 306).

Tabla 9.- Hepatocarcinogenicidad de las aflatoxinas B1 en distintas especies animales.

Especies animales	Régimen de dosificación	Duración de tratamiento	Período de observación	Incidencia de tumores hepáticos
Mono rhesus (M)	1,655g total	5.5 años	8.0 años	1 de 1
Mono rhesus (H)	1,655g total	5.5 años	10.75 años	1 de 1
Titi	3.0 mg Total	50-55 semanas	50-55 semanas	1 de 3
Titi	5.04-5.85 mg/total	87-94 semanas	87-94 semanas	2 de 3
Pato	30ug/Kg	14 meses	14 meses	8 de 11
Trucha arco iris	4ug/Kg	12 meses	12 meses	15%
Embriones de trucha	.5ug/Kg en el agua	1 hora	296-321 días	38%
Salmón	12ug/Kg de dieta	20 meses	20 meses	50%

Torres E. (281)

Respecto a las experiencias que se han obtenido en primates alimentados por vía oral con aflatoxinas B1, incluidas en su dieta, se pudo inducir la producción de tumores clasificados como hepatocarcinomas celulares, similares a las

desarrolladas en las ratas (136, 152, 222, 268); en monos Rhesus también se ha probado la susceptibilidad a la carcinogenicidad de la aflatoxina B1 desarrollando carcinoma en la mayoría de los casos, habiendo algunos monos que desarrollaron carcinoma de vías biliares o de vesícula biliar (119).

Patologías asociadas con la presencia de las aflatoxinas

La actividad toxica de la aflatoxina B1 ha sido demostrada por el cultivo en tejidos y células HELA en los que se observa inhibición en el crecimiento de células de hígado, aberraciones morfológicas hasta llegar a la muerte (289).

En células de riñón se observan alteraciones en la respiración y cambios morfológicos (166); hay también supresión de mitosis e inhibición en la síntesis del DNA dando como resultado la formación de células gigantes; así como la disminución en la actividad de la polimerasa del DNA. (99, 167, 299).

Se ha reportado alteraciones a nivel de cromosomas en células de hígado de embriones humanos y en células sanguíneas (308, 316).

Se ha encontrado que uno de los órganos blancos de las aflatoxinas es el hígado en el que causa desde una disfunción orgánica hasta la producción de hepatomas, como se ha evidenciado por sus propiedades carcinogénicas en distintas especies de seres vivos como aves, peces y mamíferos (9, 17, 286).

Además de las enfermedades que se asocian con las micotoxinas, especialmente las aflatoxinas que pueden ser implicadas como hepatotóxicas (8, 119, 157, 254); hay varios factores que pueden ser considerados propiciadores en la etiología de la cirrosis como: consumo de alcohol, infecciones virales, enfermedades de Kwashiorkor, hepatomegalia tropical causada por parásitos como Plasmodium y Schistosoma, sustancias químicas como el tetracloruro de carbono, micotoxinas como las producidas por Amanita, Fusarium, Rhizopus, Aspergillus y Penicillium, (65) en los que se ha encontrado que afectan el sistema nervioso y circulatorio y que los órganos blancos son hígado, bazo y vías respiratorias (160, 188).

Se ha encontrado que los enfermos de Hepatitis "C" presentan gran sensibilidad a las aflatoxinas, considerándose que existe un sinergismo entre esta enfermedad y la toxicidad de estas micotoxinas para el desarrollo de cáncer hepático en la especie humana (68, 95, 230, 256, 302).

Se han realizado diversos estudios epidemiológicos para obtener información acerca de la relación entre la ingestión de aflatoxinas en alimentos y la incidencia de hepatocarcinoma en diversas partes del mundo como Asia, Uganda, China, Filipinas, Swazilandia, Kenia, Tailandia y Mozambique el cual tiene la más alta incidencia de cáncer de hígado en humanos en el mundo con un consumo alto de aflatoxinas (119). Tabla 10.

Tabla 10.- Incidencia de cáncer hepático en humanos y nivel de ingestión de aflatoxinas (119).

Población	Consumo alimenticio de Aflatoxinas (ng/kg) del Peso del cuerpo/d	Casos de adultos con cáncer (>de 15 años)			
		Hombres		Mujeres	
		No./100,000 Población/año	Incidencia	No./100,00 población/año	Incidencia
Kenya					
Altitud alta	3-5	1	3.1	0	0
Altitud Media	6-8	13	10.8	6	3.3
Altitud baja	10-15	16	12.9	9	5.4
Swazilandia					
Llanura alta	5-9	9	7	2	1.4
Llanura media	9-14	24	14.8	5	2.2
Lebombo	15-20	4	18.7	0	0
Llanura baja	43-53	35	26.7	7	5.6
Tailandia					
Songkhala	5-8	-	-	-	-
Ratburi	45-77	-	-	-	-
Mozambique	222	-	35	-	15.7

Groopman, et al, (119)

En esta tabla se puede apreciar:

a): Que la ingesta de aflatoxinas y la incidencia de hepatocarcinoma celular (HCC) va en orden decreciente.

b): Que la ingesta de aflatoxinas varia entre 3-222 $\mu\text{mg/kg}$ de peso corporal / día

c): Que los valores estimados para HCC van desde un mínimo de 2.0 a un máximo de 35.0 casos por cada 100,000 habitantes por año

d): Hay una asociación positiva entre los dos parámetros en los que la ingesta elevada de aflatoxinas fueron fuertemente asociadas con altas tasas de incidencia de cáncer hepático.

e): Que la asociación fue más aparente en conexión con los índices de incidencia, por lo que un gran número de casos fueron involucrados dando estimados más precisos de la incidencia de las enfermedades.

f): Que la incidencia de cáncer de hígado en estos estudios fue una función lineal de logaritmo de la ingesta de aflatoxinas.

Los datos anteriores proporcionan evidencias circunstanciales de una relación causal importante entre la ingestión de aflatoxinas y la presencia de cáncer hepático en humanos; aun y cuando estas no son evidencias concluyentes de la etiopatogénesis entre aflatoxinas y HCC, si no que son correlaciones para considerar que la exposición a estas sustancias está asociada con un alto riesgo a este tipo de cáncer (119).

Se ha establecido también una asociación entre cirrosis hepática y la presencia de aflatoxinas que aun y cuando se ha visto cierta distribución geográfica de este padecimiento con una epidemiología alta en ciertas partes del sur de África: Sahara, Sureste de Asia; Sureste de la India y Japón (56); se ve también que puede ser favorecida con la dieta de la población potencialmente contaminada con aflatoxinas.

Es importante considerar que de acuerdo a la exposición directa a las aflatoxinas en aquellos individuos que se dedican al manejo de granos almacenados, la inhalación podría favorecer la bioactividad de estas sustancias a nivel de pulmón tal y como se ha demostrado que la mucosa de vías respiratorias es más susceptible que el hígado mismo (102, 165, 213).

Oyelami, (213) encontró una asociación muy importante entre la aflatoxina B₁ y la tuberculosis en niños que presentaban una enfermedad extrema como la enfermedad de Kwashiorkor, que aún y cuando deja la incertidumbre en la relación de desnutrición y tuberculosis contra tuberculosis y aflatoxinas; sabiendo que la tuberculosis esta fuertemente asociada con la desnutrición; es importante considerar que al haber desnutrición hay una deplección del sistema inmunitario per se; y esto permite la predisposición a agentes infecciosos diversos; pero en forma similar se ha encontrado que la presencia de la aflatoxina provoca una disminución de la actividad del sistema inmune (57, 94, 137, 140, 189, 224).

Se ha reportado también una relación estrecha entre la degeneración grasa del hígado con la presencia de aflatoxinas (27) e interfiriendo, también con el transporte sanguíneo de la grasa, provocando niveles bajos de estas en sangre aunque esto se ha observado en menor grado. Ahora bien se encuentra cierta tendencia a otros tipos de cáncer, con mayor predominancia en individuos de raza negra que en la raza blanca, como: de estómago, intestino delgado, endometrio, ovario, cerebro (161, 210) pulmón y piel (184).

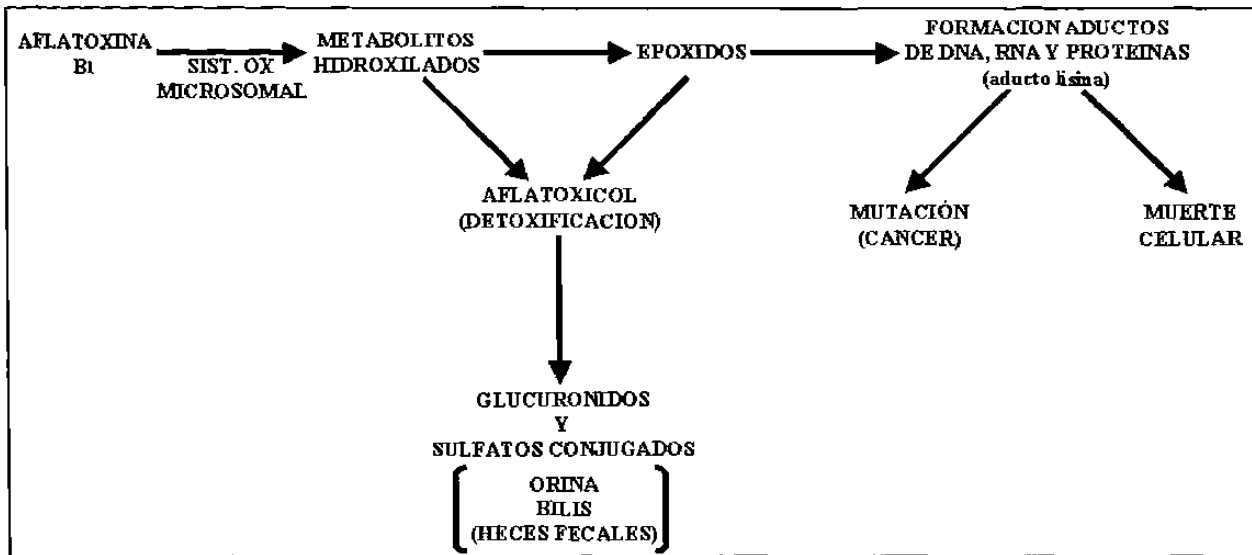
Herndrickson R. G., (81) y Cusumano V. et al (270); determinan que las aflatoxinas inducen a la inmunosupresión y que el cuadro clínico de los individuos con H.I.V. se agrava cuando están presentes las aflatoxinas; así mismo la sintomatología de las enfermedades parasitaria como la malaria y la coccidiosis se presentan en una forma más severa (18).

Toxicidad de las aflatoxinas

De acuerdo con las descripciones de Groopman (120); la aflatoxina B1 con la acción de las enzimas microsomales se transforman en un metabolito hidroxilado; y este a la vez en epoxido el cual tiene reacción reversible con la formación de aflatoxicol. La otra alternativa es que el epoxido se una a la albúmina (Aflatoxina-Lisina); o bien al DNA (Aflatoxina-DNA); (Esquema 1); puede presentarse también un efecto mutagénico (210, 299) provocando mutaciones puntuales que ocurren en la tercera base del codón 249 del gen P53. (51, 276)

Estos epoxidos orgánicos pueden unirse a vitaminas, inhibiendo algunas enzimas e interferir con la función de la cortisona (309); también puede actuar reduciendo la viscosidad del DNA, actuar sobre la hemoglobina, inducir la esterilidad y provocar alteraciones hematológicas (161).

Esquema 1.- Metabolismo de las Aflatoxinas



(Groopman j. et al, (120, 121)

Aflatoxicosis Aguda

La toxicidad aguda de la aflatoxina B₁ es debido probablemente a la producción del 2, 3 dihidrodiol a partir de la aflatoxina B₁ en el hígado (198, 287). Considerando el antecedente de los casos de intoxicación en animales, se han podido establecer casos de aflatoxicosis aguda en humanos, los que refieren evidencias sustanciales de la presencia de las aflatoxinas B₁ y M₁ en la leche humana, de madres que ingirieron alimentos contaminados con estas toxinas. Matsumara M., et al (184) encuentra altos niveles de aflatoxinas en pacientes que murieron de leucemia con lesiones concomitantes en pulmón y piel; Oyelami et al, (213) reporta evidencias de la presencia de altos niveles de aflatoxinas en las autopsias de niños de Nigeria que murieron de la enfermedad de Kwashiorkor. Cambel et al (45) encuentra el aducto de la aflatoxina B₁; en la orina de pacientes

que habian ingerido cacahuates altamente contaminados con aflatoxina B₁. En Taiwán y Uganda se presentan casos clínicos importantes de aflatoxicosis aguda en que los pacientes presentan náuseas, vómito, dolor abdominal, edema pulmonar, infiltración, grasa y necrosis del hígado, encontrándose la aflatoxina B₁ en la orina (116, 289). En 1974 en el oeste de la India se presenta una epidemia por un envenenamiento aparente con aflatoxinas en personas que habían consumido maiz altamente contaminado, de 400 pacientes examinados, 100 perecieron; se descarto el origen infeccioso de padecimiento y como causa de muerte se encontró hemorragia gastrointestinal así como una extensa proliferación de los conductos biliares, encontrándose altos niveles de metabolitos de aflatoxina en la orina (116, 289).

En Tailandia, en niños que murieron de lo que se denomina la Enfermedad de Reyes, presentaron síntomas que hicieron pensar en una aflatoxicosis caracterizándose por: vómito, convulsiones, coma y muerte; en el examen postmortem se encontró edema cerebral e infiltración grasa en hígado, riñones y corazón, encontrándose la aflatoxina B₁ y G₁ en el hígado, así como en el suero (116, 199, 281).

QUIMIOPROTECCIÓN

En este proceso se puede considerar la administración de substancias naturales o químicas que van a impedir la carcinogenesis provocada por la

aflatoxina o bien la aflatoxicosis aguda impidiendo la formación de aductos (93, 242).

Kensler, 1997 (157) afirma que uno de los mejores mecanismos de quimioprotección para la carcinogenesis, efectos mutagénicos y otras formas de toxicidad es por medio de la inducción de enzimas como la glutathion transferasa, Urdindifosfato-glucuronotransferasa y NAD, así como la quinina reductasa.

Esta demostrado que lo primero que ocurre en el hígado humano es la acción de la enzima Lipoxigenasa, oxidando a la aflatoxina B₁ a dihidrodiol uniéndose a tris-diol; se ha demostrado que esta enzima puede modificar al efecto carcinogénico del tris-diol.

Hay diversas sustancias que pueden actuar como quimioprotectores; tal es el caso de la clorofila; que es conocida como un inhibidor del aducto DNA-AFB₁ y la producción de carcinogenesis, cuando se administra en dosis superiores a 4,000 PPM en la dieta junto con Aflatoxinas B₁; explicándose que esto ocurre porque se forma un complejo de CHL- AFB₁, bloqueándose por lo tanto la actividad de la aflatoxina libre; se ha encontrado que la aducción se reduce en un 95% y la Hepatocarcinogenesis de un 2-20.5% (39).

Substancias como los carotenoides ejercen un efecto protector a través de la desviación del metabolismo de la Aflatoxina B₁ como un mecanismo de protección, a través de una ruta de toxificación inhibiendo la formación de aductos

de albúmina y así como de DNA y como consecuencia disminuyendo la producción de lesiones neoplásicas en el hígado (112).

Se pueden citar los diterpenos, cafesol y kahwasol que son agentes químicos protectivos presentes en el café, los cuales actúan bloqueando las enzimas involucradas en la carcinogenesis en el ratón, encontrando una inhibición significativa a 2,300 PPM en la reducción del aducto de DNA, siendo la más alta inhibición a 6,200 PPM (47). Se ha demostrado en ratas que la administración del indol 3 carbinol retarda la inducción de la carcinogenesis en el hígado por un proceso de competencia (179). Se ha encontrado también que el ácido ascórbico funciona como un quimioprotector en la aflatoxicosis aguda en cerdo de Guinea, impidiendo la necrosis masiva del hígado e intestino (204).

El carcumín puede inhibir la carcinogenesis química por modulación de la función del citocromo P450, ya que este es un inhibidor de la formación del aducto de aflatoxinas B₁ y DNA, induciendo la inhibición de la actividad de la reductasa en P450 (93). También se demostró que los ditiocarbamatos provocan una disminución en la formación de los aductos de aflatoxinas, uniéndose la lactosa de los ditiocarbamatos a la aflatoxina prometiendo mucha ayuda en la quimiopreención de la carcinogenesis (108).

Una de las sustancias más prometedoras es el oltipráz, que es considerado como un quimioprotector para el desarrollo de hepatocarcinoma en presencia de aflatoxinas en ratas (40); se ha demostrado que el oltipráz actúa

como un antioxidante y que el gen que puede estar involucrado en esta inducción quimioprotectora puede ser al GSTAS, el cual puede estar localizado entre los 421 y 429 bp (136), en la administración simultanea del oltipráz con aflatoxinas en ratas se ha encontrado que la excreción de aflatoxinas en orina disminuyo en un 77% comprobando su papel quimioprotector (63), así como su protección para el hígado en el desarrollo de la hepatocarcinogenicidad (136).

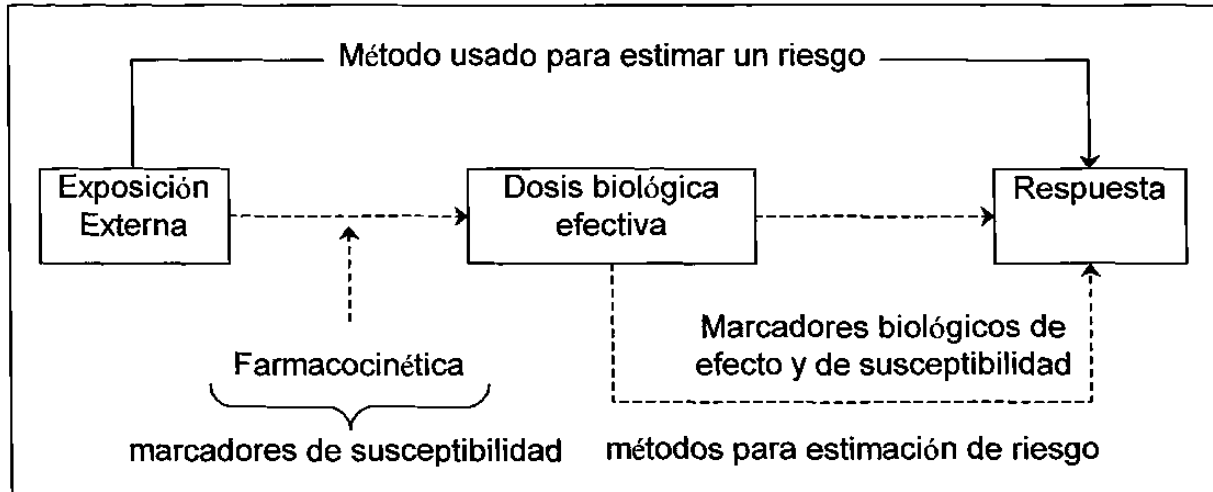
En humanos se ha visto que el oltipráz funciona como un detoxificador pues al administrarlo por un tiempo determinado en personas que excretan altos niveles de aductos de aflatoxinas en orina; estos niveles bajan de una manera significativa (158). En la provincia china de Quidong, a un grupo de 234 adultos se les administro 500mgr/día de oltipráz, encontrando que funciona con muy buenos resultados como quimioprotector en el desarrollo del Hepatocarcinoma de hígado (299).

METODOS PARA LA DETECCIÓN DE BIOMARCADORES

Un biomarcador es cualquier sustancia, estructura o proceso que puede ser medido en el cuerpo o sus productos y que pueden influir para predecir la incidencia de una enfermedad (6); pueden ser clasificados como: de exposición, por sus efectos o por la suseptilidad en función de un factor de riesgo para la salud.

Para poder evaluar un riesgo, debe de existir un conocimiento para uso racional de los biomarcadores.

Diagrama 1.- Uso racional de biomarcadores para evaluación de un riesgo.



Schute y Waters, (246)

En base al amplio conocimiento acumulado en las últimas décadas, se han podido desarrollar biomarcadores de aflatoxinas basados en el metabolismo, formación de aductos y mecanismos de acción en general que permiten el establecimiento de medidas preventivas en la población humana, así como considerar a la aflatoxina B1 como un factor de riesgo para el cáncer de hígado (122).

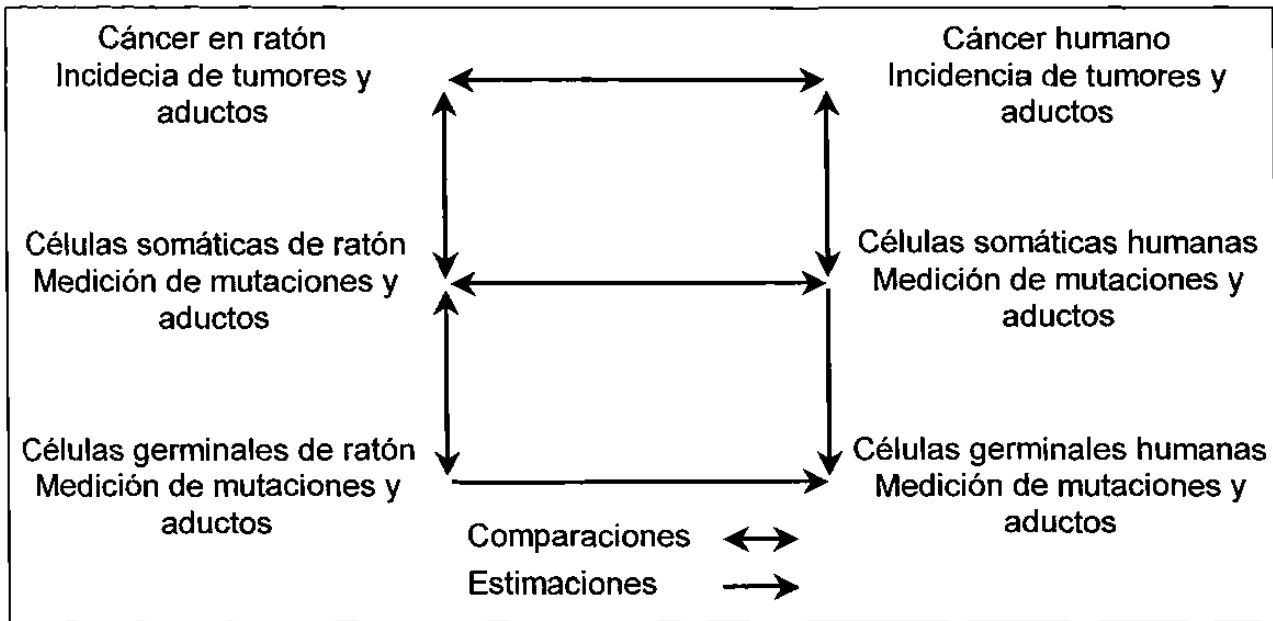
Unos de los aspectos más controversiales del factor de riesgo es el referente a los datos de altos o bajos niveles de exposición (108); cuando son

bajos los niveles de exposición es impracticable hacer estudios epidemiológicos, pero no imposible en virtud del gran tamaño de la muestra (272); con la presencia de los biomarcadores se han podido determinar dosis – respuesta relacionados con bajos niveles de exposición; estos marcadores pueden ser usados como indicadores de dosis para evaluar una medida en movilidad o mortalidad (163).

La validación de un biomarcador requiere de un estudio epidemiológico, que evalúa uno de los tres tipos de relaciones: exposición a la dosis, efecto biológico – enfermedad y la susceptibilidad (145, 232, 246).

El uso óptimo de los biomarcadores como factor de riesgo en la salud de humanos, puede evaluarse en forma paralela con estudios en animales de laboratorio o líneas celulares (11); este tipo de evaluaciones pueden concretarse con un paralelogramo que permite establecer el factor de riesgo entre los distintos grupos de estudio, pudiendo realizar una extrapolación de datos de un grupo a otro en los efectos que tiene el biomarcador (267).

Diagrama 2.- Concepto de paralelograma.



Sobel (227)

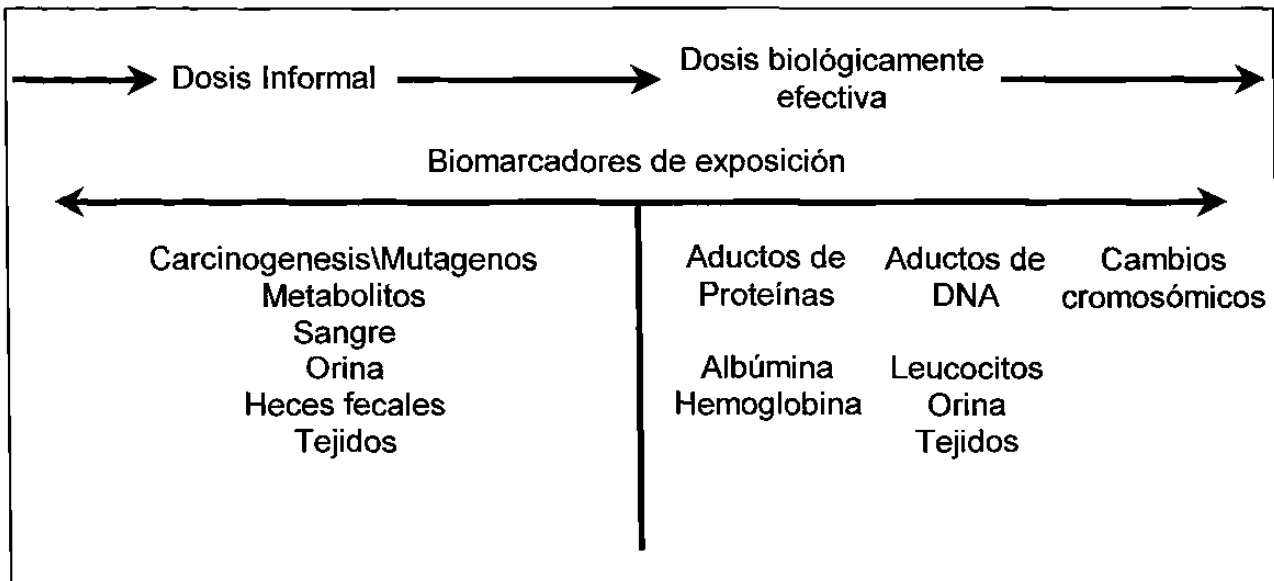
Aunque sabiendo que esta extrapolación no puede ser aplicada de forma completa, si permite poder establecer expectativas de la respuesta o efecto que puede tener en la otra especie, específicamente en el caso del hombre.

Sabiendo que los biomarcadores sean dividido en: de exposición, de efectos o de susceptibilidad (6); pero es importante considerar las siguientes razones (149). Diagrama 3.

- Por medirse lo que son metabolitos.
- Porque son aplicables a humanos.

- Se pueden detectar en la salud individual (para evaluar condiciones precancerosas o de diagnóstico temprano de cáncer).
- Directamente asociado con cáncer (aductos de proteína y DNA)

Diagrama 3.- Biomarcadores de Exposición



IARC (149)

Cuantificación de aductos

Los métodos utilizados con la finalidad de cuantificar biomarcadores requieren de alta sensibilidad, justificado esto porque los niveles de aductos son bajos; estos métodos pueden resumirse en la tabla (12).

Tabla 11.- métodos para cuantificar diferentes aductos.

METODO	APLICACIÓN	VENTAJAS	PRODUCTO BIOLÓGICO	DESVENTAJA
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Sulfatos glucurónidos • glutationes 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensible • Fácil de procesar • Económico • Útil en estudios epidemiológicos 	<ul style="list-style-type: none"> • Orina 	<ul style="list-style-type: none"> • Poca especificidad • Requiere producción de anticuerpos • Método semi cuantitativo
Radio Inmuno Análisis	<ul style="list-style-type: none"> • AFB₁-Lisina • AFB₁-DNA 	<ul style="list-style-type: none"> • Muy sensible • Pequeñas muestras • Cuantitativo • Muy específico 	<ul style="list-style-type: none"> • Suero • Plasma 	<ul style="list-style-type: none"> • Muy laborioso • Radioactivo • Altos costos • Equipo especial
Cromatografía líquida a alta presión	<ul style="list-style-type: none"> • AFB₁-Lisina • AFB₁-DNA • Aflatoxicol • AFM₁ 	<ul style="list-style-type: none"> • Muy sensible • Cuantitativo • Pequeñas muestras 	<ul style="list-style-type: none"> • Suero • Plasma 	<ul style="list-style-type: none"> • Laborioso • Equipo especial

IARC (155, 147, 149)

Durante las últimas décadas la alta especificidad de los anticuerpos monoclonales y policlonales formados a partir de antígenos de aductos de aflatoxina, han permitido desarrollar métodos inmunoenzimáticos como ELISA; o bien estos anticuerpos pueden utilizarse con técnicas químicas analíticas no invasivas como cromatografía en capa fina, cromatografía líquida alta presión, radioinmunoensayo, inmunoistoquímicos, radioinmunoensayo enzima ultrasensitiva que permite monitorear la exposición humana a la aflatoxina del medio ambiente. Estos métodos dependen de la habilidad para cuantificar la aflatoxina y sus metabolitos, incluyendo aductos en el suero u orina (52, 123, 125, 138).

La espectrometría de masas combinada con la cromatografía de gases son técnicas muy buenas pero requieren de instrumentación muy especializada; además hay mucha evaporación de las muestras (149).

La espectroscopia de fluorescencia es fácil de realizar, es específica pero se contamina fácilmente y su uso es limitado, la detección electroquímica y la O^6 Alkiltransferasa, así como la espectroscopia de absorción atómica que tienen una aplicación muy limitada (10, 26).

Cada metodología es única específica y sensible dependiendo de la aplicación mas apropiada para la técnica usada, así como de la disponibilidad de recursos (125).

HIPÓTESIS

La presencia de aflatoxina B1-Lisina en suero humano podría correlacionarse con patologías como Hepatocarcinoma, Cáncer de tubo digestivo, Hepatitis “B” (HBV), Hepatitis “C” (HCV), Cirrosis hepática, cáncer de mama así como Tuberculosis en pacientes de H. Matamoros, Tamaulipas, México.

OBJETIVO GENERAL

- Estandarizar la cuantificación del aducto AFB1 – Lisina en suero por la técnica de Radio Inmuno Análisis.
- Cuantificar el aducto AFB1 – Lisina en pacientes con diversas patologías.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Conocer los niveles del aducto AFB1 – Lisina en pacientes con distintas patologías en una región del país altamente contaminada con aflatoxinas.
- Determinar la asociación que hay entre la AFB1 – Lisina y las distintas patologías.

MATERIALES Y METODOS

MUESTREO:

Para la realización del presente trabajo se procedió a tomar muestras de sangre de 80 pacientes con las siguientes patologías en la población de H. Matamoros, Tamaulipas, México.

Tabla 12.- Distribución de pacientes por patologías del presente estudio.

Pacientes 2001

Tuber-culosis	HBV	HCV	Cirrosis Hepática	Cáncer Laringe	Cáncer Mama	Cáncer Gástrico	Cáncer Pulmón	Cáncer Páncreas	Controles sanos
14	7	4	4	3	3	1	1	-	15

Pacientes 2002

Tuber-culosis	HBV	HCV	Cirrosis Hepática	Cáncer Laringe	Cáncer Mama	Cáncer Gástrico	Cáncer Pulmón	Cáncer Páncreas	Controles sanos
-	-	-	4	3	15	3	-	3	-

Los pacientes fueron contactados en las Instituciones de Salud como: IMSS, Hospital General de la SSA, Centro de Control de Tuberculosis de la Jurisdicción Sanitaria, en clínicas y consultorios particulares. Se les explico el objeto del estudio para obtener su autorización e incluirlos en el muestreo (algunos no aceptaron), se procedió a recabar información de cada uno, llenando una ficha de identificación. Tabla 13.

Tabla 13.- Ficha de identificación de paciente.

Nombre: _____	Edad: _____	Peso: _____
Enfermedad: _____	Fumador: _____	Alcoholismo: _____
Consumo de Tortillas: Si _____	No _____	de Maíz _____ de Trigo _____
Ocupación : _____	Originario: _____	
Años de Residir e esta Ciudad: _____	Nivel Socioeconómico: _____	

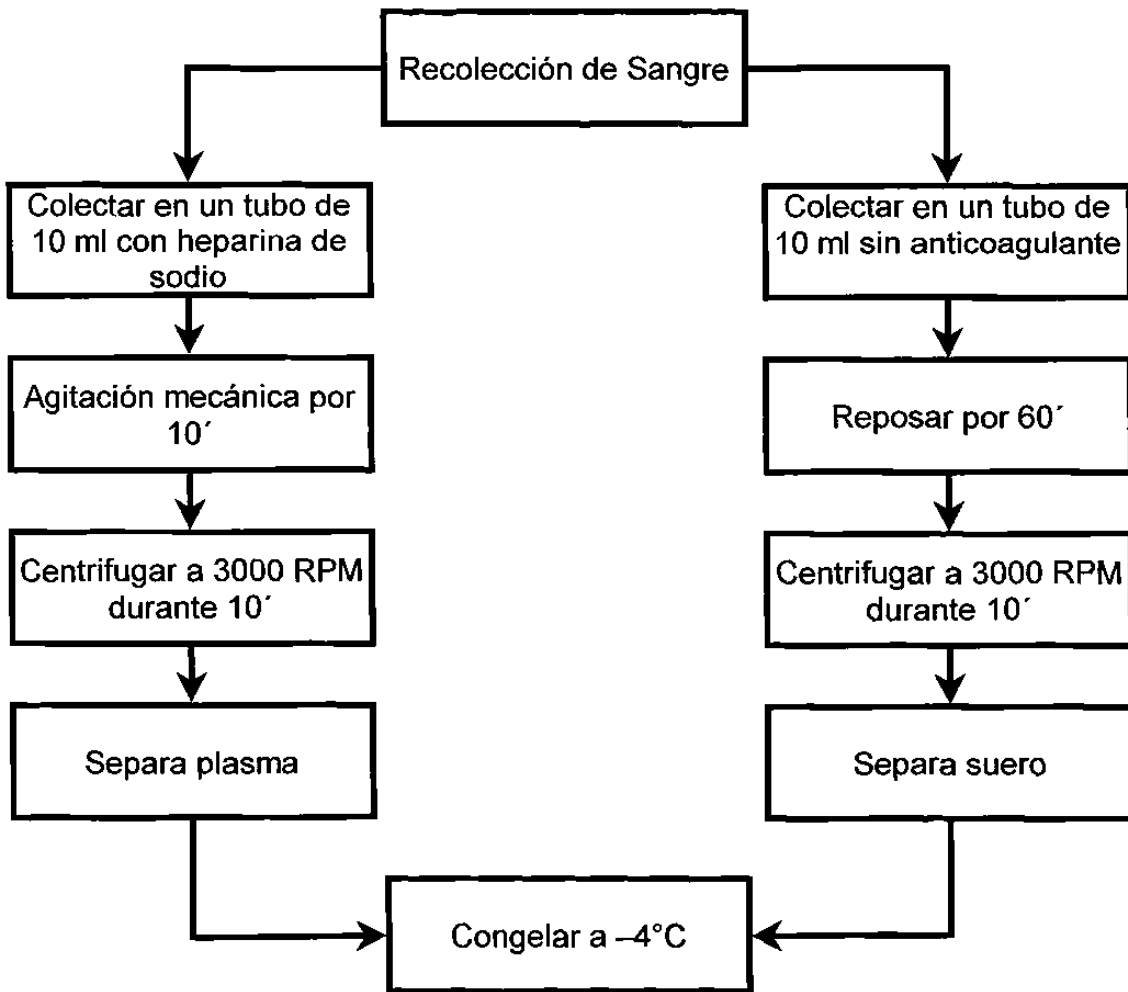
PROCESO PARTE I

RECOLECCION DE SANGRE: (Diagrama 4)

- Se les pidió a los pacientes tener un ayuno de 4 horas mínimo previo a la toma de muestra.
- Las muestras se les tomaron en su domicilio particular, en la cama de hospital o bien acudiendo al laboratorio.
- El tipo de sangre que se tomo fue venoso.
- El volumen de sangre que se les extrajo fue de 20 mls. por paciente separado en dos tubos.
- La sangre se colecto en tubos con vacío de marca comercial con capacidad de 10 ml.
- Se utilizaron dos tipos de tubos con el mismo paciente: uno sin anticoagulante para la obtención de suero (tapón rojo) y uno con heparina de sodio (tapón verde) para al obtención de plasma.
- Antes de puncionar al paciente, se procedió a la identificación de los tubos.

- Después de tomar la muestra, los tubos sin anticoagulante se dejaron reposar por 60 minutos; los tubos con anticoagulante se mezclaron bien por 10 minutos en un agitador mecánico (Scientific Products R4185-10).
- Se procedió a centrifugar los tubos a 3,000 RPM durante 10 minutos para separar tanto el suero como el plasma.
- Se colocaron en congelación a -4°C para su posterior procedimiento.

Diagrama 4.- Recolección de Sangre de Pacientes.



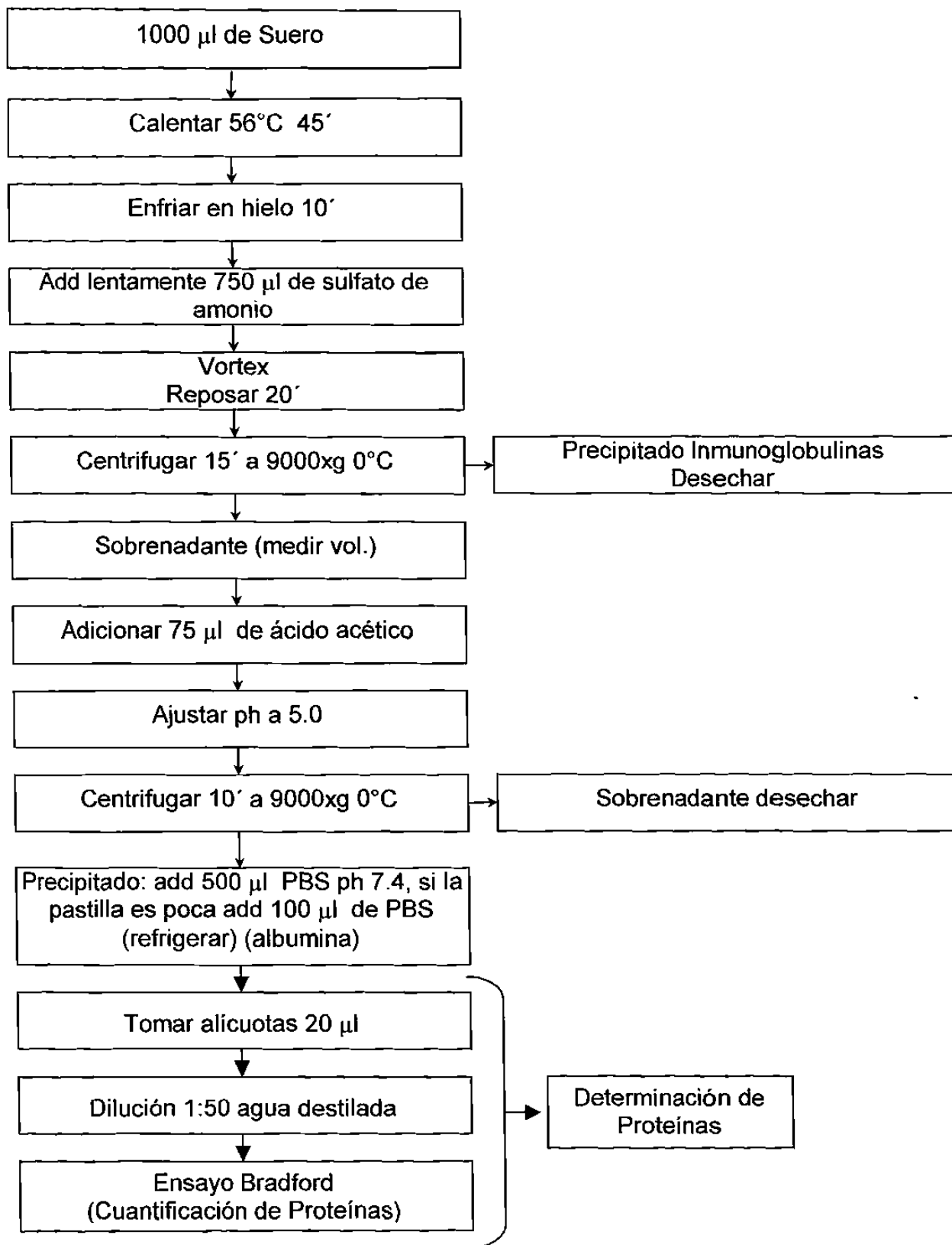
OBTENCIÓN DE ALBÚMINA

(Diagrama 5)

Todas las muestras de suero de los diferentes pacientes fueron procesadas de la siguiente manera:

- Las muestras se calentaron a 56°C durante 45 minutos en un termoblock para eliminar los posibles contaminantes infecciosos (HIV, Hepatitis) que pudieran estar presentes.
- Posteriormente se realizó una precipitación con sulfato de amonio para obtener la albúmina tal como se indica en el diagrama.
- Una vez obtenida la albúmina se cuantificó la proteína tomándose en alícuotas de 20 µl y se diluyeron para ser leídas por el método de Bradford (35), como se indica en el diagrama.

Diagrama 5.- Obtención de albúmina.



Método de Bradford para cuantificación de Proteínas

Reactivos: Reactivo de albúmina Marca Sigma (BCP)

Solución estándar de proteína marca Sigma.

Procedimiento:

Determinación de albúmina.

- Ajustar espectrofotómetro a 600 nm.
- Marcar 1.5 mls. En cubetas desechables.
- Adicionar 1 ml. de BCP a cada celda.
- A 1 ml. de BCP en una celda adicionar 10 μ l de PBS y mezclar por inversión, calibrar el espectrofotómetro con estas muestras.
- A celdas conteniendo BCP adicionar 10 μ l del estándar de proteínas con 2, 4, 6, 8, 10 gr/dl; mezclar por inversión con parafilm.
- Leer.
- Repetir por duplicado.
- Hacer curva estándar y generar la regresión lineal.

Determinación de proteínas.

Reactivos: estándar de albúmina marca Sigma; es también proteína humana total con la cual se hace una curva estándar.
estándar de albúmina proteica humana marca Sigma
Catalogo #540-10

Hacer su propio estándar usando 20 μl del reactivo, usando 980 μl de PBS
ph 7.4.

Concentraciones de la curva estándar:

Stock 1.6 mgr/ml de proteína total

$$2 \mu\text{l} = 3.2 \mu\text{gr}$$

$$4 \mu\text{l} = 6.4 \mu\text{gr}$$

$$8 \mu\text{l} = 12.8 \mu\text{gr}$$

$$10 \mu\text{l} = 16.0 \mu\text{gr}$$

$$12 \mu\text{l} = 19.2 \mu\text{gr}$$

$$16 \mu\text{l} = 22.4 \mu\text{gr}$$

Bio Rad Protein Assay (Dye reagent concentrate) guardar a 4°C.

Procedimiento:

- Poner espectrofotómetro a 590 nm.
- Adicionar 800 µl de PBS ph 7.4 a una celda y 1 µl de la muestra.
- Determinar absorbancia (nm) y tomar ecuaciones de la grafica, usando la curva estándar.
- Calcular µgr de proteína por ecuación.

Para calcular la cantidad de proteína se realizo un curva estándar de albúmina humana que contenía desde 2 µgr hasta 12 µgr graficando densidad óptica contra concentración de albúmina.

Para confirmar la pureza de la albúmina obtenida, se realizaron geles de electroforesis de la proteína de pacientes con cáncer, hepatitis y tuberculosis.

Electroforesis en gel de Poliacrilamida

Preparación del gel al 75%

Acrilamida 30%	4.99 mls.
Buffer Tris 1 M ph 8.8	3.76 mls.
Agua desionizada	1.19 mls.
SDS 20%	25.0 µl
Persulfato de amonio 10%	5.0 µl
Temed	5.0 µl

Nota 1: El Temed se agrega hasta el final y se agita rápidamente una vez puesto, y con una pipeta Pasteur se coloca entre los vidrios rápidamente ANTES de que se gelifique.

Nota 2: Al gel separador (inferior) se le añadieron 75 μ l más de persulfato de amonio y 15 μ l de Temed para que gelifique más rápidamente (10 minutos).

Geles de Electroforesis

Se correrá un gel de electroforesis para corroborar que la banda detectada en los geles anteriores, corresponde a la de albúmina.

Estrategia:

En uno de los carriles se pondrá un estándar de albúmina humana, igualmente se colocara un marcador de peso molecular.

El gel se hará con pacientes enfermos de: Cirrosis Hepática, Cáncer y Tuberculosis según el siguiente esquema:

Esquema 2.- Distribución de pacientes para verificación de banda de albúmina en gel de electroforesis.

Carril 1	Carril 2	Carril 3	Carril 4	Carril 5	Carril 6
Exp. 8 CAesofago	Exp. 8 CAcolón	Exp. 7 Cirrosis Hepática	Exp. 6 tuberculosis	Std. de albúmina Humana	Marcador de Peso molecular

Cantidad en μl puestos en el gel de cada muestra:

<p>CAesofago Exp. 8</p> <p>$45 \mu\text{gr} / 11.25 \mu\text{l}$</p> <p>$4 \mu\text{gr} = \frac{45 \mu\text{gr}}{1 \mu\text{l}} \times x$</p> <p>$X = \frac{(1 \mu\text{l}) (45 \mu\text{gr})}{4 \mu\text{gr}}$</p> <p>$x = 11.25 \mu\text{l}$</p> <p>+ $8.7 \mu\text{l}$</p> <p>$20 \mu\text{l}$ vol. final</p>	<p>Cirrosis Exp. 7</p> <p>concentración de albúmina</p> <p>$0.3 \text{ mgr} / \text{ml}$</p> <p>$0.3 \mu\text{gr} = \frac{x}{1 \mu\text{l}} \times 15 \mu\text{l}$</p> <p>$x = 4.5 \mu\text{gr}$</p> <p>$\frac{6 \mu\text{gr}}{15 \mu\text{l}}$</p> <p>+ $5 \mu\text{gr}$ buffer</p> <p>$20 \mu\text{l}$ vol. final</p>
<p>CAcolon Exp. 8</p> <p>$45 \mu\text{gr} / 5.6 \mu\text{l}$</p> <p>+ $14 \mu\text{l}$ buffer de muestra</p> <p>$20 \mu\text{l}$ vol. final</p>	<p>Tuberculosis Exp. 6</p> <p>concentración de albúmina</p> <p>$0.46 \text{ mgr} / \text{ml}$</p> <p>$0.46 \mu\text{gr} / \mu\text{l} \rightarrow 6.9 \mu\text{gr} / 15 \mu\text{l}$</p> <p>$\frac{5 \mu\text{l}}{20 \mu\text{l}}$ vol. final</p>

albúmina humana

$10 \mu\text{l}$

Marcador de peso molecular $10 \mu\text{l}$

OBTENCION DEL ADUCTO AFB₁ – LISINA DEL HIDROLIZADO

Para obtener la molécula AFB₁ – Lisina es necesario primero realizar una hidrólisis con un complejo enzimático llamado Pronase, para después separar la molécula por medio de una columna de afinidad, todo el procedimiento esta ilustrado en el diagrama 6.

Materiales utilizados:

- Suero de pacientes.
- Solución saturada de sulfato de amonio.
- Ácido acético glacial.
- Buffer salino de fosfatos (PBS) ph 7.0.
- Reactivo de Bradford.
- Tubos Eppendorfs.
- Columnas de aflatest 10.

DIGESTIÓN DE ALBÚMINA CON PRONASE

Reactivos:

Pronase Protease. Calbiochem cat. 537088 (almacenar en desecador en cuarto frío) ordenar 25 ku cada vez.

Procedimiento:

- Usando la determinación de proteína, tomar la alícuota apropiada en el volumen de la muestra (ej. 8000 μgr de proteína) en tubos Eppendorfs limpios.
- Preparar la solución de Pronase (concentración 31.7 mgr / 3 ml) en PBS.
- Adicionar Pronase en una relación de 1:4:1 (ej. para digerir 8000 μgr de proteína, 1951 μgr de Pronase en 185 μl de buffer de Pronase es necesario).
- vortex a cada tubo muy bien pero suavemente.
- Poner las muestras en un baño de agua con agitación a 37°C toda la noche.
- Tomar las muestras y darles un pulso en la centrífuga. Poner a 4°C.
- El procedimiento puede detenerse en este punto, guardando las muestras a -20°C.

proteína	Pronase
1000 μgr	243.9 μgr
2000 μgr	487.8 μgr
3000 μgr	731.6 μgr
4000 μgr	975.4 μgr

Reactivos:

Solución saturada de sulfato de amonio:

- Adicionar 900 gr de sulfato de amonio a un litro de agua.
- Calentar hasta que se disuelva.
- Filtrar aun caliente.
- Enfriar a temperatura ambiente.
- Se pueden formar cristales.
- Guardar a 4°C.

Acetona a 4°C.

Reactor RIA:

Packard Tri-card 4640 contador de centelleo marca United Technologies.

Tracer:

10 ml 0.1% BSA/PBS en NaN_3

100 μl suero normal de ratón (1%)

107 CPM ³HAFB₁

Concentración final = 10,000 CPM/100 µl.

10% HS/PBS con 0.01% NaN₃ preparado de la siguiente forma:

445 ml PBS Ph 7.0

50 ml de suero de caballo

5 ml NaN₃ al 2%

Solución saturada de amonio.

Nota: No mezclar sulfato de amonio con hipoclorito de sodio (se produce gas neurotóxico)

Buffer salino de fosfatos:

8 gr de NaCl

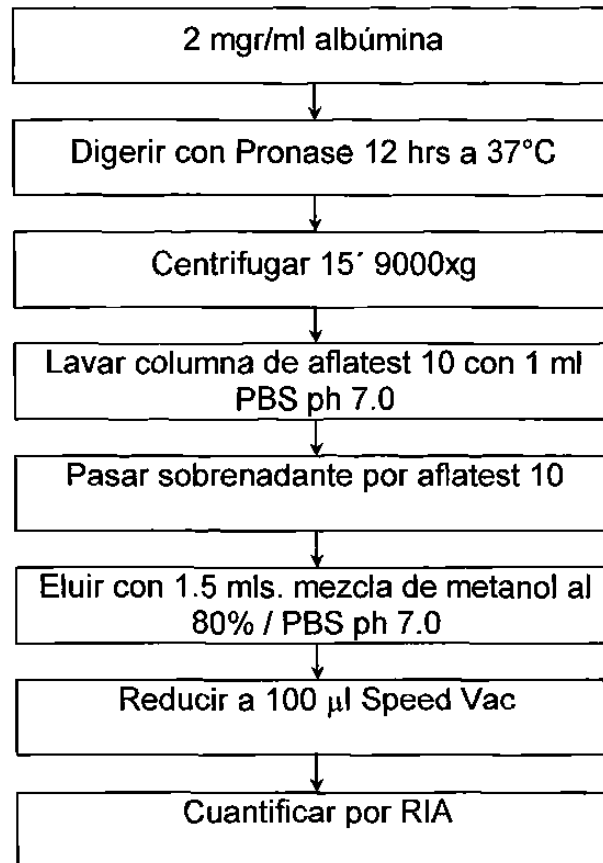
2 gr KCl

11.5 gr Na₂HPO₄

2 gr NaH₂PO₄

adicionar 950 mls. de agua, ajustar Ph 7.0 y aforar a 1000 mls.

Diagrama 6.- Separación de AFB₁ – Lisina del hidrolizado.



Radio Inmuno Análisis (RIA)

Este procedimiento consta de 4 partes:

1. Preparación de la dilución de aflatoxina marcada con ³H para realizar las cuantificaciones.
2. Determinación del 50% de inhibición de los acytes (anti anticuerpos de aflatoxinas).

3. Determinación de la concentración de unión de la aflatoxina fría.
4. Determinación de la concentración del aducto AFB₁ – Lisina en las muestras procesadas.

Preparación de aflatoxina radioactiva.

³HAFB₁ contiene 1mCP/mmol

$$1\text{mci} = 2.2 \times 10^9 \text{ dpm}$$

se necesita tener 10,000 cpm/100 μ l

$$\text{dpm} = \frac{10,000}{0.35} = 28,571.42$$

$$2.2 \times 10^9 \text{ dpm} - 1,000 \mu\text{l}$$

$$X - 100 \mu\text{l}$$

$$X = 2.2 \times 10^8$$



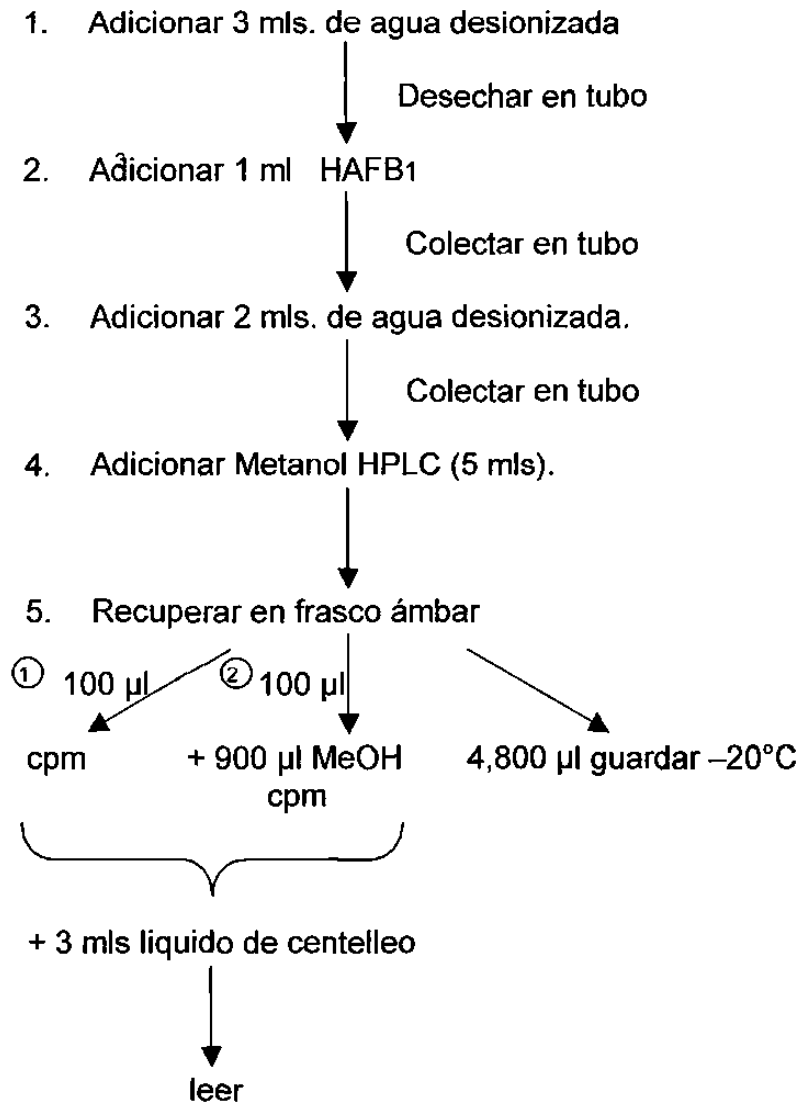
Tomar 100 μ l de HAFB₁ + 900 μ l MeOH HPLC



Se tiene 1 ml con 2.22×10^8 dpm

0150696

SEP PAK



³HAFB1 Sigma Co.

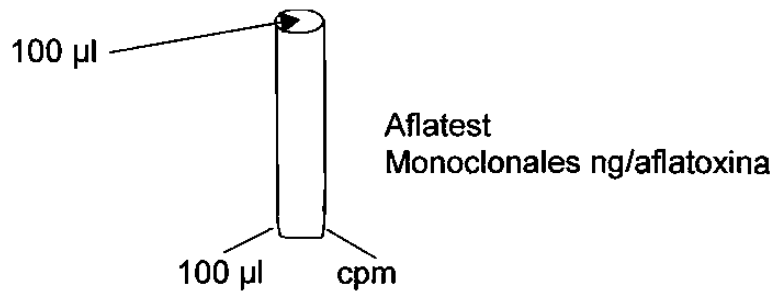
1 mci/ml A.S. 25 ci/mmol

1 mci = 2.2×10^9 dpm

$25 \times 2.2 \times 10^{12}$ dpm = 5.5×10^{12} dpm

5.5×10^{12} dpm – 1mmol

11,000 dpm – X



Preparación del 10% HS/PBS con 0.01% NaN₃

445 mls. PBS Ph 7.0

50 mls. suero de caballo

5 mls. NaN₃ 2% (1gr con 50 mls. de agua)

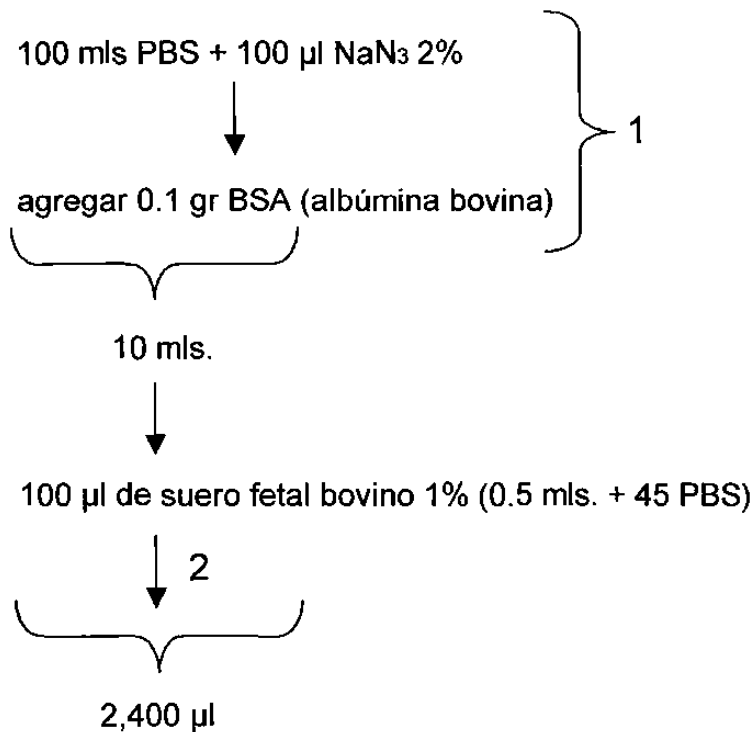
Preparación del TRACER:

10 mls. 0.1% BSA/PBS con/NaN₃

100 µl suero normal de ratón (1%); se uso suero fetal de bovino.

107 cpm ³HAFB1

concentración final = 10,000 cpm/100 µl



+

100 µl ³HAFB1 → Se colocaron 2,250 µl de la ³HAFB1 que provienen de 4,800 µl que se pasaron por Sep Pak.

Se evaporaron a baño maria hasta obtener ±100 µl

3 Bo 100 µl PBS + 100 µl TRACER + 100 µl 10% HS/PBS

2 A 100 µl 4 + 100 µl TRACER + 100 µl ASCITES (E)

5

6

2 B 100 µl 4 + 100 µl TRACER + 100 µl 10% HS/PBS

5

6

Muestras 100 µl + 100 µl TRACER + 100 µl ASCITES (E)

Todos los tubos se incubaron toda la noche a 4°C

Adicionar 300 µl de sulfato de amonio frío

Mezclar en Vortex

Dejar a temperatura ambiente 15 minutos.

Centrifugar 15 minutos a 11,000xg a 4°C

Tomar 300 µl del sobrenadante y colocarlos en viales de centelleo +
10 mls. de liquido de centelleo.

Leer.

Cálculos

T = 20,539 9,583 – 100%

Bo = 9,583 4,785 – X

50%

**Determinación de la concentración de anticuerpos para calcular Ab curva de
calibración; requerida para el RIA.**

Procedimiento:

1. Descongelar 2 B 11 ascites. Quitar cualquier fibrina con un palillo y centrifugar a 11,000xg / 10 – 15 min.
2. Hacer las siguientes diluciones:
 - A. 1:10 Tomar 540 µl HS/PBS 10% + 60 µl 2 B 11 ascites.
 - B. 1:30 Tomar 400 µl HS/PBS 10% + 200 µl la dilución 1:10
 - C. 1:90 Tomar 400 µl HS/PBS 10% + 200 µl la dilución 1:30
 - D. 1:270 Tomar 400 µl HS/PBS 10% + 200 µl la dilución 1:90

E. 1:810 Tomar 400 μ l HS/PBS 10% + 200 μ l la dilución 1:270

F. 1:2430 Tomar 400 μ l HS/PBS 10% + 200 μ l la dilución 1:810

Mezclar suavemente.

3. Tomar alícuotas de 100 μ l en 3 tubos diferentes.
4. Tomar alícuotas de 100 μ l HS/PBS 10% en 3 tubos diferentes. (estos serán los controles Bo).
5. Adicionar 100 μ l de PBS a todos los tubos Ab diluciones (3) y controles (4).
6. Adicionar a todos 100 μ l TRACER (10,000 cpm/100 μ l)
7. Incubar a 37°C a temperatura ambiente, o a 4°C por dos horas.
8. Adicionar a todos los tubos 300 μ l de sulfato de amonio (guardado a 4°C).
9. Mezclar en vortex e incubar a temperatura ambiente por 15 min.
Centrifugar a 4°C y 11,000xg por 15 min.
10. Remover cuidadosamente 300 μ l del sobrenadante y adiciónelo al vial de centelleo de 20 ml.
Adicionar Budget Solve y contar usando el Canal 3H.
11. Calcular la radioactividad precipitada (% de control) debido a cada Ab dilución, hacer curva logarítmica de dilución contra correspondiente inhibición y determine la dilución del anticuerpo la cual precipita 50% del total de (Bo) cuentas.
12. Hacer una solución de esa dilución, además otras 2 diluciones entre el rango y reanalizar, seleccionar la mejor dilución para precipitación de 40 – 50 % de cuentas.

AFB1 Curva de Calibración y RIA de Muestras.

1. Hacer las siguientes diluciones de una solución stock de AFB1 en DMSO (300 pmol/100 µl).
2. Para hacer la solución stock 300 pmol/100 µl:
 - A. 5 mg AFB1 / 1 ml DMSO (1.6×10^6 pmol/100 µl).
 - B. 100 µl de solución 1 + 400 µl DMSO (3,200 pmol/1 ml).
 - C. 5 µl de solución 2 + 995 µl HS/PBS 10% (1,600 pmol/100 µl).
 - D. 112.5 µl de solución 3 + 487.5 µl HS/PBS 10% (300 pmol/100 µl).
3. Hacer las siguientes diluciones de una solución stock de AFB1 en DMSO (300 pmol/100 µl).

Para 300 pmol/100 tome 600 µl de la solución stock de AFB1 en DMSO.

	Concentración
600 µl de la Sol. 300 pmol/sol	300 pmol
200 µl de la Sol. 300 pmol sol + 400 µl PBS	100 pmol/100 µl
200 µl de la Sol. 100 pmol sol + 400 µl PBS	33.3 pmol/100 µl
200 µl de la Sol. 33.3 pmol sol + 400 µl PBS	11.1 pmol/100 µl
200 µl de la Sol. 11.1 pmol sol + 400 µl PBS	3.7 pmol/100 µl
200 µl de la Sol. 3.7 pmol sol + 400 µl PBS	1.2 pmol/100 µl
200 µl de la Sol. 1.2 pmol sol + 400 µl PBS	0.4 pmol/100 µl
200 µl de la Sol. 0.4 pmol sol + 400 µl PBS	0.13 pmol/100 µl

4. Tomar 3 alícuotas de 100 µl de las diluciones AFB₁ arriba descritas en tubos Eppendorf.
5. Poner 100 µl de PBS en 2 – 6 tubos marcar “A” (50%).
6. Poner 100 µl de PBS en 2 – 6 tubos marcar “B”
7. Redisolver las muestras en las cuales AFB₁ va a ser determinada en 100 µl de PBS (las cuales están secas a –20°C).
8. Adicionar 100 µl ³ HAFB₁ Tracer a todos los tubos.
9. A todos los tubos “A”, las muestras y las soluciones estándar de AFB₁ adicionar 100 µl de Ab (anticuerpo ascites) a la concentración determinada previamente.
10. A los tubos marcados “B” adicionar 100 µl de HS/PBS 10%.
11. Incubar todos los tubos a 37°C, a temperatura ambiente o 4°C por 2 horas, 5 - 6 horas, o toda la noche respectivamente.
12. Adicionar 300 µl de sulfato de amonio frío como hielo.
13. Mezclar en vortex, encubar a temperatura ambiente (28°C) por 15 min. y centrifugar a 4°C a 11000xg por 15 min.
14. Tomar 300 µl del sobrenadante cuidadosamente y poner en vial de centelleo. Adicionar 10 ml Budget Solve y contar usando el Canal 3H.
15. Calcular la Inhibición de enlace usando la siguiente formula.

$$\%BI = [(S) - (A)] / [(B) - (A)]$$

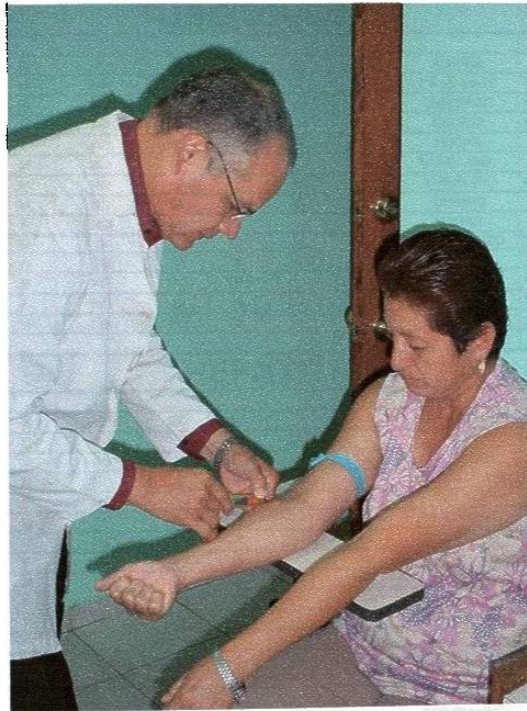
16. Graficar el logaritmo de la concentración de AFB₁ contra % de BI.
Calcular los niveles de aducto de aflatoxina en las muestras desconocidas.

RESULTADOS.

1°. PACIENTES 2001 (PRIMER MUESTREO).

Se procedió a analizar 52 sueros de pacientes con diferentes patologías, así como pacientes sanos usados como controles en el año 2001; de la población de H. Matamoros, Tamaulipas, México. (Foto 1)

Foto 1.- Extracción de Sangre de Paciente



Se obtuvo la información general de los pacientes según la ficha de identificación personal, datos que están consignados en la tabla 14.

Tabla 14.- Concentración de datos de pacientes. (1° Muestreo 2001)

TIPO CANCER	EDAD	PESO	FUMA	SEXO	ALCOHOL	T TRIGO	T MAIZ	DROGO R	DROGO SENS	OCCUPACION	L ORIGEN	AÑOS RESIDE H. MAT	NIVEL SOCIAL
PRIMER MUESTREO 2001													
CANCER													
3 mama	52	115	NO	M	NO	NO	NO	--	--	CONSEJERO	BROOKSVILLE TX	52	AÑOS MEDIO
4 laringe	45	65	NO	F	NO	NO	SI	--	--	HOGAR	H.MATAMOROS TAMP	45	AÑOS MEDIO
5 gastrico	57	60	NO	M	NO	NO	SI	--	--	EMPLEADO	H.MATAMOROS TAMP	57	AÑOS BAJO
7 laringe	70	70	NO	M	NO	NO	SI	--	--	MEDICO	H.MATAMOROS TAMP	70	AÑOS ALTO
8 laringe	73	75	SI	M	NO	NO	SI	--	--	AGRICULTOR	H.MATAMOROS TAMP	73	AÑOS ALTO
9 mama	43	60	NO	F	NO	SI	SI	--	--	HOGAR	H.MATAMOROS TAMP	43	AÑOS BAJO
10 mama	65	75	NO	F	NO	NO	SI	--	--	HOGAR	SAN LUIS POTOSI	40	AÑOS BAJO
11 pulmon	50	60	NO	F	NO	SI	SI	--	--	HOGAR	H.MATAMOROS TAMP	50	AÑOS MEDIO
CIRROSIS HEPATICA													
24	52	60	SI	M	NO	SI	SI	--	--	CHOFER	H.MATAMOROS TAMP	52	AÑOS MEDIO
25	60	54	NO	F	NO	SI	SI	--	--	HOGAR	CD VICTORIA TAMP	50	AÑOS MEDIO
26	20	50	NO	M	NO	NO	SI	--	--	ESTUDIANTE	H.MATAMOROS TAMP	20	AÑOS MEDIO
27	31	62	SI	M	NO	SI	SI	--	--	PEPEADOR	H.MATAMOROS TAMP	31	AÑOS BAJO
TUBERCULOSIS													
26	40	46	NO	M	NO	SI	SI	SI	--	ALBAÑIL	VERACRUZ	38	AÑOS BAJO
31	20	50	NO	M	NO	SI	SI	SI	--	ESTUDIANTE	H.MATAMOROS TAMP	20	AÑOS MEDIO
33	22	54	NO	M	NO	NO	SI	SI	--	EMPLEADO	H.MATAMOROS TAMP	22	AÑOS BAJO
34	40	68	NO	M	NO	SI	SI	SI	--	CHOFER	H.MATAMOROS TAMP	40	AÑOS MEDIO
35	60	66	NO	F	NO	NO	SI	--	SI	HOGAR	VERACRUZ	26	AÑOS BAJO
36	43	62	NO	M	NO	SI	SI	--	SI	VEND AMB	SAN LUIS POTOSI	30	AÑOS BAJO
37	39	60	NO	M	NO	SI	SI	SI	--	JORNALERO	H.MATAMOROS TAMP	39	AÑOS BAJO
39	23	51	NO	M	NO	SI	SI	SI	--	OBRAERO	TULA TAMP	4	AÑOS BAJO
40	47	50	NO	F	NO	NO	SI	--	SI	HOGAR	JAUMAYE TAMP	5	AÑOS BAJO
43	38	46	NO	M	SI	SI	SI	--	SI	DESEMPLEADO	H.MATAMOROS TAMP	38	AÑOS MEDIO
44	44	54	NO	F	NO	SI	SI	--	SI	HOGAR	H.MATAMOROS TAMP	44	AÑOS ALTO
45	36	60	NO	M	NO	NO	SI	--	SI	EMPLEADO	H.MATAMOROS TAMP	36	AÑOS MEDIO
62	60	50	NO	F	NO	SI	SI	--	SI	HOGAR	H.MATAMOROS TAMP	60	AÑOS BAJO
63	46	63	NO	M	NO	NO	SI	--	SI	INGENIERO	REYNOSA TAMP	4	AÑOS ALTO
HEPATITIS													
12	45	74	NO	M	SI	NO	SI	--	--	JORNALERO	H.MATAMOROS TAMP	46	AÑOS BAJO
14	31	72	NO	M	NO	NO	SI	--	--	OBRAERO	SAN FERNANDO TAMP	16	AÑOS BAJO
15	34	60	NO	M	NO	NO	SI	--	--	PANADERO	VERACRUZ	5	AÑOS BAJO
16	39	74	NO	M	NO	SI	SI	--	--	COMERCIANTE	VERACRUZ	20	AÑOS MEDIO
17	79	60	NO	F	NO	SI	SI	--	--	QUIMICA	DF	50	AÑOS ALTO
18	18	120	NO	M	NO	SI	SI	--	--	ESTUDIANTE	CALIFORNIA	10	AÑOS MEDIO
19	18	68	NO	M	NO	SI	SI	--	--	ESTUDIANTE	H.MATAMOROS TAMP	18	AÑOS MEDIO
20	31	70	NO	F	NO	NO	SI	--	--	EMPLEADA	H.MATAMOROS TAMP	31	AÑOS MEDIO
21	54	68	NO	M	NO	SI	SI	--	--	MEDICO	H.MATAMOROS TAMP	54	AÑOS ALTO
22	36	70	SI	M	SI	NO	SI	--	--	VEND AMB	H.MATAMOROS TAMP	36	AÑOS BAJO
23	40	60	NO	F	NO	SI	SI	--	--	SECRETARIA	H.MATAMOROS TAMP	40	AÑOS MEDIO
CONTROLES SANOS													
46	24	70	NO	M	NO	NO	SI	--	--	ESTUDIANTE	MONTERREY N.L.	19	AÑOS MEDIO
47	30	60	NO	M	SI	SI	SI	--	--	EMPLEADO	SAN LUIS POTOSI	20	AÑOS BAJO
48	45	63	SI	M	NO	SI	SI	--	--	CHOFER	H.MATAMOROS TAMP	45	AÑOS BAJO
49	48	78	NO	M	NO	SI	SI	--	--	LICENCIADO	H.MATAMOROS TAMP	48	AÑOS ALTO
50	32	54	NO	F	NO	NO	SI	--	--	SECRETARIA	H.MATAMOROS TAMP	32	AÑOS MEDIO
51	70	75	SI	M	NO	NO	SI	--	--	JUEBLADO	VERACRUZ	50	MESES MEDIO
52	50	74	SI	M	NO	SI	SI	--	--	EMPRESARIO	H.MATAMOROS TAMP	50	AÑOS ALTO
53	36	60	NO	M	NO	SI	SI	--	--	INGENIERO	H.MATAMOROS TAMP	36	AÑOS ALTO
54	40	60	SI	M	NO	NO	SI	--	--	EMPLEADO	H.MATAMOROS TAMP	40	AÑOS BAJO
55	37	65	SI	M	NO	NO	SI	--	--	ALBAÑIL	H.MATAMOROS TAMP	37	AÑOS BAJO
56	25	59	NO	F	NO	SI	SI	--	--	SECRETARIA	MONTERREY N.L.	20	AÑOS MEDIO
57	18	64	SI	M	NO	SI	SI	--	--	ESTUDIANTE	H.MATAMOROS TAMP	18	MESES MEDIO
58	55	68	NO	M	NO	SI	SI	--	--	INGENIERO	H.MATAMOROS TAMP	55	AÑOS ALTO
59	39	85	NO	M	NO	SI	SI	--	--	QUIMICO	MANTE TAMP	25	AÑOS MEDIO
60	35	50	NO	F	NO	SI	SI	--	--	SECRETARIA	VERACRUZ	26	AÑOS MEDIO