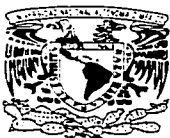


00381



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE
AFLATOXINA B₁ LIBRE Y EN ADUCTO EN
ORINA HUMANA EN GRUPOS DE RIESGO
PARA CARCINOMA HEPATOCELULAR**

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de

**DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA)**

P r e s e n t a

MARÍA TERESA ÁLVAREZ BAÑUELOS

1997

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi querido esposo Mario porque gracias a su cariño, guía apoyo y ejemplo he logrado alcanzar esta importante meta de mi vida.

A mis adorados Padres Esther y Atanasio a quienes admiro y de quienes he recibido el afecto, apoyo y compañía para obtener este Doctorado.

**A mis Hermanos Yolanda, Consuelo, Esther,
María Antonieta, Atanasio y Víctor por
su cariño y su motivación para concluir
este trabajo.**

**A mis sobrinos Gabriel, Cynthia, Enrique,
Jaqueline, Merit, Iván, Yusbireth, Yesmín,
Yaritseli, Katya, Jorge y Carlos por el cariño
que les tengo y la alegría que nos dan.**

**A mis entrañables amigos
del IPN de toda la vida.**

AGRADECIMIENTOS

A las personas

Que aportaron su esfuerzo en forma directa o que colaboraron durante el desarrollo y la culminación del presente trabajo.

Dra. Magda Carvajal Moreno, por aceptar ser la Directora de mi tesis Doctoral, integrarme a su equipo de trabajo, la planificación, tecnología, obtención de recursos económicos, desarrollo de mi investigación, revisión de cada paso de la Tesis Doctoral y por su amistad personal.

Dr. Ignacio Méndez Ramírez, por el análisis estadístico, interpretación de los resultados obtenidos y revisión de la Tesis Doctoral y su amabilidad e interés por este trabajo.

M. en C. Francisco Rojo Callejas, por sus enseñanzas de cromatografía de líquidos, espectrofotometría, computación, su buena disposición de apoyo en todo momento y por su amistad.

A los otros 2 miembros del Comité Tutorial:

Dr. Mauricio Lisker-Melman por su disponibilidad para formar parte de mi Comité Tutorial ha contribuido en el análisis de los aspectos clínicos de esta tesis, por facilitar la toma de muestras y revisión del manuscrito final.

Dr. Saúl Villa Treviño que como miembro de mi Comité Tutorial siempre me ha estimulado y ha contribuido en mi formación profesional y en la revisión de la Tesis Doctoral.

Agradecimientos al Jurado de Examen Doctoral:

Presidente:	Dr.	Teófilo Herrera Suárez
Primer Vocal:	Dra.	Cristina Pérez Amador
Segundo Vocal:	Dra.	Magda Carvajal Moreno
Tercer Vocal:	Med. Cir.	Mauricio Lisker Melman
Secretario:	Dr.	Saúl Villa Treviño
Suplente:	Dr.	Ignacio Méndez Ramírez
Suplente:	Dr.	Luis Felipe Jiménez García

Dr. Rolando Camacho. Director del Instituto Nacional de Oncología (INOR) y a la *Dra. Leticia Fernández Garrate*. Subdirectora de Investigaciones (INOR), por todas las facilidades otorgadas durante mi programa de estudios y la confianza que siempre me han manifestado.

Dr. Arturo Escobar por su colaboración al desarrollo de esta tesis y por su amistad.

Dra. Margarita Collazo, por su amistad, ayuda y comprensión durante todo este tiempo.

Dr. José Luis Bello, Por su actitud siempre positiva y brindarme su colaboración para realizar esta etapa de mi formación académica.

Q.F.B. Socorro Cruz y Sara Sixtos por su colaboración en las determinaciones de creatinina de las muestras.

Dr. Pedro Astoa, por su ayuda en todo momento y su asesoramiento en aspectos de Biología molecular.

MC. Raúl Bobes por su ayuda en algunos aspectos de Biología Molecular y su amistad.

Dibujante Felipe Villegas Márquez, por su colaboración en la elaboración de los dibujos contenidos en esta tesis.

Biól. Alfredo Wong por su asesoría en técnicas de computación.

Dr. Luis Felipe Jiménez y Dr. Javier Espinoza, por su valiosa asesoría, consejos sobre Biología Celular y participación en el Examen Predoctoral.

A mis compañeras de laboratorio **Nora Ruisánchez e Isnalvis Ramírez** que durante estos años hemos compartido tantas vivencias.

A mis compañeros de estudio: **Sergio Ayvar, Lupita Moctezuma, Luis Villarreal, Roberto Montes, Isaac Luna y Adolfo Stanley** que han logrado hacer muy llevadera esta etapa de intenso trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Micología por el apoyo y la confianza que siempre me han mostrado durante mi estancia en el mismo.

A las Instituciones

Que colaboraron en diversas áreas para hacer posible la realización de este trabajo:

INSTITUTO DE BIOLOGÍA DE LA UNAM, por haberme acogido en su seno como estudiante de Doctorado y permitirme la utilización de sus instalaciones, materiales, reactivos, servicios y equipo en la realización de esta investigación.

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, por otorgarme una Beca de Doctorado sin la cual no hubiera podido realizar este trabajo.

INSTITUTO NACIONAL DE ONCOLOGÍA Y RADIOBIOLOGÍA DEL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DE CUBA, por todas las facilidades brindadas y el apoyo recibido que han permitido la culminación satisfactoria de esta tesis.

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN", y a su Laboratorio de Gastroenterología por el apoyo brindado en la obtención y parte del procesamiento de las muestras, y la asesoría del Depto. de Nutriología para la planeación de la encuesta sobre alimentos.

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNAM, por aceptarme para realizar mis estudios de Doctorado y por los recursos recibidos a través del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP).

CENTRO MÉDICO LA RAZA, por facilitarme parte de las muestras utilizadas en esta tesis.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATEMÁTICAS APLICADAS Y EN SISTEMAS DE LA UNAM, por las facilidades en el procesamiento estadístico de la información.

CONTENIDO

v

Páginas

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Contenido	v
Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	x
Apéndice	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Las aflatoxinas	1
1.1 Definición y estructura química	1
1.2 Propiedades fisicoquímicas	2
1.3 Biosíntesis	4
1.4 Ocurrencia natural.	5
1.5 Interacción ecológica.	5
1.6 Situación en México	6
1.7 Descontaminación	6
2. Efectos de las aflatoxinas a nivel molecular.	7
2.1 Metabolismo	7
2.2 Descripción de la AFB ₁ libre y en aductos	8
2.3 Efectos bioquímicos tóxicos	9
2.4 Teratogenicidad	10
2.5 Inmunosupresión	10
2.6 Relación Mutagénesis - Carcinogénesis	10
3. Epidemiología de enfermedades hepáticas relacionadas con la AFB₁	12
3.1 Hepatitis	12
3.1.1 Hepatitis B	12
3.1.2 Hepatitis C	13
3.2 Cirrosis	14
3.3 Carcinoma hepatocelular	16
4. Efectos de las aflatoxinas en la salud humana.	18
4.1 Relación entre la AFB ₁ y el carcinoma hepatocelular.	18

5.	Métodos de análisis de aflatoxinas	20
5.1	Químicos	20
5.1.1	La cromatografía de capa fina (TLC)	20
5.1.2	La cromatografía de líquidos (HPLC)	20
5.2	Inmunológicos	21
5.2.1	Antígeno o hapteno.	21
5.2.2	Anticuerpos (Ac).	21
5.2.3	Reacción antígeno-anticuerpo.	22
5.2.4	Clasificación de los inmunoensayos.	22
5.2.5	Validación de un ensayo.	25
II.	OBJETIVOS	28
	Generales	28
	Específicos	28
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
1.	Encuesta sobre alimentos	29
1.1	Análisis estadístico	29
2.	Diseño de muestreo y análisis de orina	30
2.1	Criterios de selección de los pacientes	30
2.2	Tamaño de muestra	31
2.3	Recolección y procesamiento de las muestras	31
3.	Métodos químicos	32
3.1	Cromatografía de capa fina (TLC)	32
3.2	Cromatografía de líquidos (HPLC)	32
3.2.1	Equipo y material	33
3.2.2	Patrones de aflatoxina	33
3.2.3	Condiciones del análisis.	33
3.2.4	Preparación de las muestras	33
3.2.5	Cuantificación de las muestras	33
3.2.6	Determinación de la curva de calibración	34
4.	Técnica inmunoenzimática de ELISA	34
4.1	Síntesis de conjugados	34
4.1.1	Síntesis de AFB ₁ con ADN	34
4.1.2	Síntesis de AFB ₁ -Cl-Ovalbúmina	35
4.2	Evaluación del tipo de placa	36
4.3	Evaluación del recubrimiento de las placas	36
4.4	Evaluación de las diluciones óptimas de los anticuerpos anti-AF y de los conjugados peroxidasa	36
4.5	Técnica ELISA inhibitoria	37
4.6	Validación del ensayo inmunoenzimático	39
4.6.1.	Exactitud	39
4.6.2.	Precisión	39

IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN	40
1. Análisis estadístico de la encuesta sobre alimentos	40
1.1 Análisis de correlaciones	40
1.2 Análisis de varianza	40
1.3 Prueba de Kruskal Wallis	40
1.4 Prueba de Tukey	41
1.5 Contrastes	43
1.6 Conglomerados	43
1.6.1 Análisis de correspondencia	46
1.7 Análisis discriminante	47
2. Muestreo y análisis de orina	51
2.1 Recolección de muestras	51
3. Implementación de la técnica inmunoenzimática ELISA	51
3.1 Síntesis de aductos	51
4. Estandarización de la técnica de ELISA	55
4.1 Optimización del tipo de placa	55
4.2 Evaluación del recubrimiento de placas	56
4.3 Evaluación dilución óptima de los Ac policlonal y monoclonal y de los conjugados de peroxidasa correspondientes	56
4.4 Evaluación del anticuerpo monoclonal	58
4.5 Curvas estándar del aducto AFB ₁ -N ⁷ -ADN y de la AFB ₁ libre	59
4.6 Sensibilidad y límite de detección.	60
5. Validación del ensayo inmunoenzimático de ELISA	61
5.1 Exactitud	61
5.2 Precisión	62
6. Procesamiento de las muestras de orina	63
6.1 Cuantificación de aflatoxina de las muestras de orina por ELISA	63
6.2 Recuperación de aflatoxinas por HPLC	67
6.3 Recuperación de aflatoxinas por los métodos de ELISA y HPLC	70
V. CONCLUSIONES	81
VI. BIBLIOGRAFÍA	82
VII. APÉNDICE	101

Lista de Tablas

1.	Propiedades fisicoquímicas de algunas aflatoxinas y sus metabolitos (OPS, 1983)	3
2.	Resultados estadísticos de la encuesta de alimentos	41
3.	Contrastes entre grupos, consumo de alimentos y logaritmo de aflatoxinas.	44
4.	Conglomerados por consumo de alimentos	45
5.	Caracterización de conglomerados y sus correspondencias más claras, con los diagnósticos	47
6.	Análisis discriminante	48
7.	Grupos de igualdad estadística al 5 % basados en el análisis discriminante	48
8.	Coefficientes de las Funciones Discriminantes	49
9.	Alimentos asociados	49
10.	Características de las muestras de orina	51
11.	Purificación del aducto AFB ₁ -Cl-Ov por columna de Sephadex	53
12.	Comparación entre la eficacia de los Ac monoclonales anti-AF y el conjugado peroxidasa anti-ratón por ELISA	59
13.	Porcentaje de recuperación de AFB ₁ (ng/mL) en ELISA	61
14.	Coefficiente de variación intra-ensayo	62
15.	Coefficiente de variación inter-ensayo	62
16.	Pacientes del grupo de riesgo a carcinoma hepatocelular, positivos a aflatoxina en orina, por ELISA	64
17.	Número de controles positivos a aflatoxina en orina por ELISA	65
18.	Niveles de aflatoxina en los grupos control y de riesgo para carcinoma hepatocelular	65
19.	Resumen de la excreción de los diferentes tipos de aflatoxina por HPLC	72
19a.	Determinación del aducto AFB ₁ -N ⁷ -Gua y metabolitos de aflatoxina por HPLC	73
19b.	Análisis estadístico de las mediciones del aducto AFB-N ⁷ -Gua y metabolitos AF entre los casos positivos	74
20.	Comparación entre las aflatoxinas totales por HPLC y ELISA	75

Lista de Figuras

Páginas

1.	Fórmulas de las principales aflatoxinas (Steyn <i>et al.</i> , 1980)	1
2.	Biosíntesis de las aflatoxinas (Steyn, 1980)	4
3.	Vías metabólicas de la AFB ₁ (OPS-OMS, 1983)	7
4.	Activación metabólica de la AFB ₁ para formar el aducto 8,9, óxido de AFB ₁ -ADN (Irvin, 1987)	8
5.	Mutación puntual inducida por AFB ₁ y mecanismo de iniciación oncogénica.	11
6.	Mortalidad por cirrosis hepática en México. 1970-1971 (Narro-Robles <i>et al.</i> , 1994)	14
7.	Distribución de la mortalidad por cirrosis hepática por grupos de edad y sexo en México, 1991 (Narro <i>et al.</i> , 1994)	15
8.	Principales causas de mortalidad general en 1993 (Dirección General de Epidemiología, 1994)	16
9.	Casos de cáncer de hígado por grupos de edad y sexo, 1985-1989 (SSA, 1993 b)	17
10.	Método de ELISA Inhibitoria Indirecta	25
11.	Diagrama de flujo del método de ELISA	38
12.	Prueba de Tukey de la encuesta de alimentos.	42
13.	Análisis de correspondencia	46
14.	Tendencias de asociación.	50
15.	Cromatografía capa fina del derivado clorado AFB ₁ -Cl	52
16.	Espectros de absorción Ovalbúmina, AFB ₁ y AFB ₁ -Cl-Ov	52
17.	Electroforesis del ADN y de ADN hidrolizado	54
18.	HPLC de hidrolización de ADN que dió al aducto AFB ₁ -N ₇ -Gua y espectros de los estándares de AFB ₂ , AFG ₁ y AFB ₁	54
19.	Diferentes marcas de placas de ELISA y tipo de adherencia	55
20.	Concentraciones de aducto AFB ₁ -Cl-Ov de recubrimiento	57
21.	a: Titulación del anticuerpo policlonal (anti-AFB ₁)	57
	b: Titulación del segundo anticuerpo (conjugado de peroxidasa anti-conejo)	57
22.	a: Titulación de anticuerpo monoclonal (anti-AFB ₁)	58
	b: Titulación del segundo anticuerpo (conjugado de peroxidasa anti-ratón)	58
23.	Curva estándar de la AFB ₁ y el aducto AFB ₁ -N ₇ -Gua.	60
24.	Porcentaje de pacientes con orina positiva a aflatoxina en grupos de riesgo y controles.	66
25.	a: Áreas, desviación estándar, regresión lineal y curvas de los estándares del aducto AFB ₁ -N ₇ -Gua y AFM ₁	67
	b: Áreas, desviación estándar, regresión lineal y curvas de los estándares de AFB ₁ , AFP ₁	68

26.	<i>a</i> : Espectro UV - visible del aducto AFB-N ⁷ -Gua	69
	<i>b</i> : HPLC del aducto AFB ₁ -N ⁷ -Gua	69
27.	HPLC de estándares del aducto AFB-N ⁷ -Gua, AFM ₁ , AFP ₁ y AFB ₁	70
	<i>a</i> : Sistema de elución por gradiente con metanol 30% en 50 min.	70
	<i>b</i> : Sistema isocrático con metanol (60 %), agua (40 %) en 10 min.	70
28.	Frecuencia de excreción de AFB ₁ , AFM ₁ , AFP ₁ y el aducto AFB-N ⁷ -Gua por grupos	71
29	Regresión logarítmica (correlación) entre ELISA y HPLC	76

Apéndice

1. Encuesta de alimentos y bebidas 101

RESUMEN

Se realizó un estudio de epidemiología descriptiva para conocer la importancia e incidencia en México de las hepatitis B y C crónicas, la mortalidad por cirrosis hepática y por carcinoma hepatocelular de los últimos 10 años.

Se estudiaron 210 pacientes de la consulta de Gastroenterología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", con diagnóstico de hepatitis B y C crónicas, cirrosis viral y alcohólica, y como grupos control a enfermos con insuficiencia renal, con otras enfermedades digestivas pero sin enfermedad hepática y a individuos sanos. Se completó el número de casos de hepatitis B con casos de la consulta de hígado del Hospital de Infectología del Centro Médico "La Raza".

Se obtuvieron, purificaron y procesaron las orinas de 24 horas y se cuantificaron, por ELISA, a las aflatoxinas presentes. Además, se aplicó un cuestionario sobre alimentos consumidos, a cada uno de los pacientes.

El montaje del ensayo inmunoenzimático de fase sólida se realizó mediante la titulación cruzada entre diferentes concentraciones del recubrimiento de (0.01 a 1 $\mu\text{g/ml}$) dado por diluciones de anticuerpos policlonal y monoclonal tanto de cultivo celular como purificado. Se investigaron las mejores diluciones de los anticuerpos anti-aflatoxinas para el sistema de ELISA inhibitoria indirecta que fueron de 1/300 para el anticuerpo monoclonal y de 1/1000 para el segundo anticuerpo ya sea anti-conejo para el policlonal o bien de anti-ratón acoplado a peroxidasa para el monoclonal. Las concentraciones del antígeno AFB₁, usadas fueron de 1 picogramo a 1 000 nanogramos por mililitro. Los parámetros de calidad como son los coeficientes de variación intra e inter-ensayo, así como los porcentajes de recuperación, estuvieron dentro de los límites aceptables de precisión para estos métodos.

El sistema ELISA montado con anticuerpo monoclonal resultó ser específico y 10 veces más sensible que el policlonal. Se determinaron por ELISA los niveles de aflatoxina de las 210 muestras de orina recolectadas entre grupos de riesgo y controles; de las cuales resultaron 35 positivas o sea un 16.6 %.

Al comparar el porcentaje de orinas positivas a aflatoxinas entre los grupos de riesgo y controles, los niveles más altos correspondieron a los grupos de riesgo de hepatitis B crónica con 50 % de positivos seguido por el de cirrosis con un 26 % y el de hepatitis C con 16.6 %. Las orinas de los pacientes con cirrosis alcohólica no presentaron cantidades significativas de aflatoxinas.

Los grupos control de personas sanas sólo tuvieron 3 muestras de orina con aflatoxinas (10 % de positividad); el grupo control con insuficiencia renal presentó una sola orina con aflatoxina con 1.61 ng de AF/mg de creatinina y los pacientes con enfermedades crónicas del aparato digestivo pero no hepáticas tuvieron todas las orinas negativas a aflatoxina. Existe una buena correspondencia lineal entre la determinación por ELISA y HPLC. Los datos obtenidos por HPLC para el total de los metabolitos oxidativos en la orina AFM₁, AFP₁, AFB₁ y el aducto AFB-N⁷-Gua en orina en comparación con los resultados obtenidos por ELISA mostraron un coeficiente de correlación de 0.95 y el valor de r^2 fue de 0.90. Los niveles de aflatoxina totales obtenidos por HPLC fueron menores a los obtenidos por ELISA.

ABSTRACT

A study about descriptive epidemiology to know the importance and incidence of chronic B and C hepatitis, the mortality from hepatic cirrhosis and from hepatocellular carcinoma in the last 10 years.

The aflatoxins of 210 urine samples from the Department of Gastroenterology of the National Nutrition Institute "Salvador Zubiran" from cases with the diagnostics of chronic B and C hepatitis, viral and alcoholic cirrhosis were detected and studied, as controls 3 groups of patients with kidney failure, other digestive not hepatic chronic diseases and healthy persons.

These 24 hours urine samples were purified, processed and quantified for aflatoxins by ELISA. A survey about ingested foods was applied to each person.

The immunoenzymatic assay of ELISA in solid phase was done by cross titering between different coat concentrations (0.01 to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with dilutions of polyclonal and monoclonal antibodies of cellular and purified cultures. The best dilutions of the monoclonal antibodies for indirect inhibitory ELISA were studied and they were 1/300 for monoclonal from cellular tissue and 1/1000 for the second antibody link to peroxidase. The used concentrations of the antigen aflatoxin B₁ were from 1 picogram to 1000 nanograms/mL. The quality parameters as coefficient of variation inside and among assays and the recovery percentage were under the acceptable limits for these methods.

ELISA system was tested with a monoclonal antibody that resulted specific and 10 times more sensitive than the polyclonal. The aflatoxin levels of the 210 urine samples were quantified by ELISA with 35 positive to aflatoxins (16.6 %) and they were identified by HPLC. When comparing the percentage of positive urines to aflatoxins from the risk and control groups, the higher levels were found in chronic B hepatitis group with 50% of positive cases, followed by cirrhosis with a 26% and chronic C hepatitis with 16.6%. The urines from patients with alcoholic cirrhosis did not present significant quantities of aflatoxins.

The healthy control group had only 10% of positive cases; the control group with kidney failure had only one urine with aflatoxin with 1.61 ng of AF/mg of creatinine and the patients with chronic diseases not hepatic had the urines negative to aflatoxins. There was a good linear correspondence between the determinations by ELISA and HPLC. The data obtained by HPLC for the total urine oxidative metabolites AFM₁, AFP₁, AFB₁ and the adduct AFB-N⁷-Gua in urine, in comparison with the results obtained by ELISA, showed a correlation coefficient of 0.95 and the r² value was 0.90. The levels of total aflatoxin by HPLC were less than those obtained by ELISA.

I. INTRODUCCIÓN

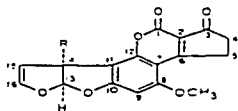
1. Las aflatoxinas.

1.1 Definición y estructura química.

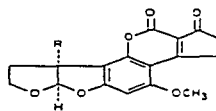
Las aflatoxinas (AF) son metabolitos secundarios de los hongos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, y se consideran los mutágenos y hepatocancerígenos biológicos más potentes que se conocen (Olsen *et al.*, 1988).

La palabra "a-fla-toxina" viene de a = *Aspergillus*, fla = *flavus* y toxina = veneno. Químicamente corresponden a bis-dihidrofurano cumarinas.

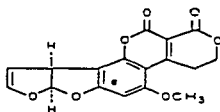
La estructura química de las AF se hizo por resonancia magnética nuclear, espectroscopía infrarroja y se fundamenta en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos. La frecuencia de resonancia de un conjunto de protones (H^+) del sistema molecular depende del entorno electrónico de los mismos. Este fenómeno conocido como corrimiento o desplazamiento químico se expresa en el orden de las partes por millón (ppm), lo que constituye el punto de partida para los análisis espectrales de los compuestos. El espectro de aflatoxina B₁ (AFB₁) mostró 4 átomos de hidrógeno al lado de 2 átomos de carbono adyacentes en un anillo ciclopentano (Steyn *et al.*, 1980) (Figura 1).



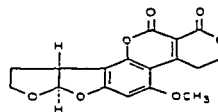
1 R = H: AFLATOXINA B₁,
2 R = OH: AFLATOXINA M₁,



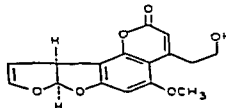
3 R = H: AFLATOXINA B₂,
4 R = OH: AFLATOXINA M₂,



5 AFLATOXINA G₁,



6 AFLATOXINA G₂,



7 PARASITICOL

Figura 1: Fórmulas de las principales aflatoxinas (Steyn *et al.*, 1980).

1.2 Propiedades fisicoquímicas.

Las AF tienen diferentes propiedades fisicoquímicas como son el ser fluorescentes, termo-resistentes, inodoras, insaboras y actuar en cantidades traza de millonésimas de gramo (microgramos por kilo o sea $\mu\text{g}/\text{kg} = \text{ppb}$). Se nombran según el color de su fluorescencia, las de tipo B la dan azul (= blue) y las de tipo G la emiten verde (G = green), las de la leche se denominan M ($M = \text{milk}$) y las de la orina son del grupo P ($P = \text{phenol}$), mientras que los subíndices se refieren a su movilidad electroforética en cromatografía de capa fina (Jones, 1977). Todas las AF derivan de la aflatoxina B_1 (AFB_1), que es la más tóxica con DL_{50} bajas, junto con la M_1 (Allcroft *et al.*, 1966). Las AF tienen efectos agudos y/o crónicos como son carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis e inmunodepresión (Hesseltine, 1967 y Bilgrami & Sinha, 1992).

Se conocen 21 tipos de AF, pero sólo algunas son contaminantes naturales de los alimentos como las B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1 y M_2 (De Miguel, 1987). El principal hongo productor es (*A. flavus*), del cual se conoce a un grupo de compuestos estructuralmente relacionados de ocurrencia natural, otros productos del metabolismo animal y algunos de sus precursores biosintéticos.

En la Tabla 1 se presentan las principales propiedades fisicoquímicas de las AF. En estado puro las AF son muy estables a temperaturas elevadas, con puntos de fusión de 237°C (la AFG_2) a $> 320^\circ\text{C}$ (AFP_1). Son relativamente inestables cuando se les expone a la luz, particularmente a la radiación UV y al aire en una placa de cromatografía de capa delgada, especialmente cuando se disuelven en solventes polares. Las soluciones de cloroformo y benceno las mantienen estables por años en lugar oscuro y frío. Su masa molecular relativa es baja variando de 298 (AFP_1) a 330 (AFG_2 y AFM_2).

La presencia de un anillo de lactona en la estructura de las AF las hace susceptibles a la hidrólisis alcalina propia de la nixtamalización. Sin embargo, si el tratamiento alcalino es leve la acidificación invertirá la reacción, reconstituyendo a la AF original (De longh *et al.*, 1962).

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas de algunas aflatoxinas y sus metabolitos (OPS, 1983).

Aflatoxina	Fórmula molecular	Masa molecular relativa	Temperatura de fusión (°C)	Absorción ultravioleta		Emisión de fluorescencia (nm)	Referencias
				265 nm	360-362 nm		
B _{1a}	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	265 ** -270 *	12 400	21 800	425	Asao <i>et al.</i> , 1965.
B _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	280 ** -309 *	12 100	24 000	425	Chang <i>et al.</i> , 1963.
G _{1a}	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244 * - 250	9 600	17 700	450	Asao <i>et al.</i> , 1965.
G _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330 ***	229 * -240 ***	8 200	17 100	450	Hartley <i>et al.</i> , 1963.
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	14 150	21 250 (357 nm)	425	Holzpfel <i>et al.</i> , 1966.
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	12 100 (264 nm)	22 900 (357 nm)		Holzpfel <i>et al.</i> , 1966.
P _{1b}	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	298	> 320	11 200 (267 nm)	15 400 (362 nm)		Dalezios <i>et al.</i> , 1971.
				14 900 (362 nm)			Büchi <i>et al.</i> , 1973.
Q ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328		11 450 (267 nm)	17 500 (366 nm)		Masri <i>et al.</i> , 1974.
Aflatoxicol	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	230-234 ***	10 800 (261 nm)	14 100 (325 nm)	425	Detroy & Hesselstine, 1970.

* = Townsend, 1967; ** = Stubblefield *et al.*, 1967; *** = Butler, 1974; a = coeficiente de absorción molar de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁; G₂ se obtuvo de Rodricks *et al.*, 1970 y el correspondiente a las aflatoxinas M₁ y M₂ de Stubblefield *et al.*, 1972; b = La P indica los productos fenólicos de la O-demetilación de la AFB₁.

1.3 Biosíntesis.

El hongo requiere de condiciones óptimas (27 -30 °C, 85 % H.R.) para la producción de AF, cuya cantidad aumenta después de 24 horas, con máximo nivel al quinto día (Steyn *et al.*, 1980), cuando el hongo alcanza la fase estacionaria de crecimiento. La producción de AF disminuye marcadamente del sexto al octavo día.

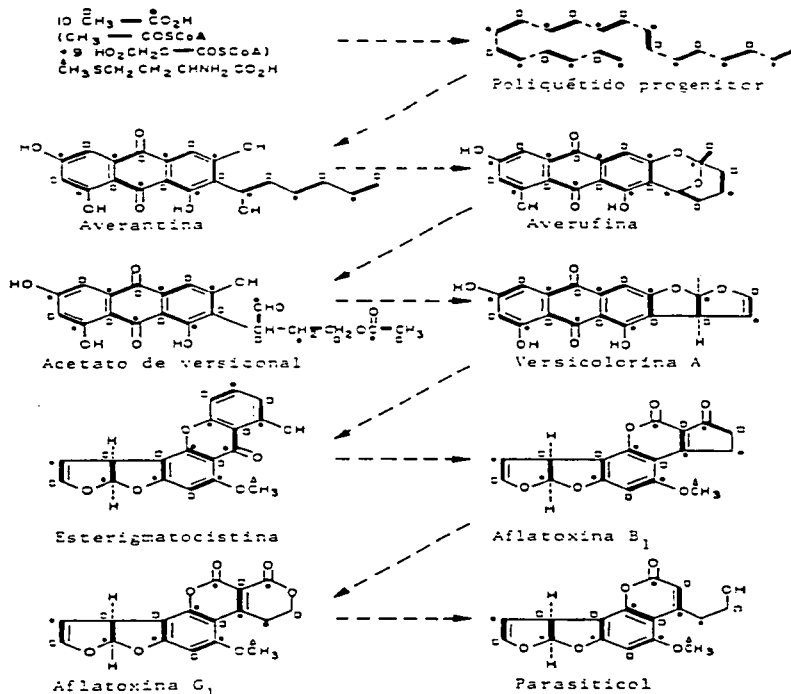


Figura 2: Biosíntesis de las aflatoxinas (Steyn, 1980).

Los patrones de formación de AF y de lípidos son muy similares, dado que ambos provienen de un precursor común (acetato) (Shih & Martin, 1974; Dutton *et al.*, 1985). Cuando se incorpora glucosa marcada con el isótopo C¹⁴ en posición uno, en condiciones anaeróbicas, se desencadena el catabolismo de la glucosa vía Embden-Meyerhof y se favorece la producción de AF.

La biosíntesis de AF (AFB₁ en concreto), se comprende mejor al conocer algunos metabolitos o precursores de estructura similar, de los hongos productores, que tienen un origen común en una estructura base de C₂₀ poli-β-quetido.

Estos metabolitos precursores no pertenecen a un único grupo o clase de compuestos químicos, así tenemos a las xantonas (esterigmatocistina, O-metil estigmatocistina, aspertoxina), poli-hidroxi-antraquinonas (averufina, O dimetilnidurufina, ácidos solorínico y norsolorínico, averantina, 1-O-dimetilaverantina, averitrina y acetato de versiconal), aflatoxinas y parasiticol (Steyn, 1980). Figura 2.

1.4 Ocurrencia natural.

Las AF se encuentran principalmente en *cereales* como maíz y sorgo, pero también en avena, cebada, centeno, mijo y arroz (Ulloa & Herrera, 1970; Price & Jorgensen, 1985; Shank *et al.*, 1972; De Miguel, 1987); *oleaginosas* como cacahuates y nueces principalmente, pero también semillas de algodón, de girasol (Park & Rua, 1991), pistaches, avellanas, piñones, almendras, etc.; la *cocoa* y sus derivados (chocolate); *copra* (masa de coco), aceites vegetales; *especies* y muchos otros productos agrícolas (Jones, 1977; Patey *et al.*, 1990 y Taguchi *et al.*, 1995).

La ocurrencia natural de las AF es en zonas tropicales, subtropicales y cálido secas, como hay en el sur de los E.U.A., debido a que las condiciones climáticas necesarias para el crecimiento de los hongos productores (*A. flavus* y *A. parasiticus* principalmente) están alrededor de los 27° C con 85% de humedad relativa (Tuite, 1977; Roy & Chourasia, 1989), aunque en los países templados puedan ocurrir contaminaciones naturales de los productos agrícolas. Hay cientos de artículos sobre la presencia de alimentos naturalmente contaminados por AF, siendo recientes los de Dhavan & Choudary (1995) en *alimentos balanceados para animales e higos*, en India; Purchio *et al.*, (1988), informan la contaminación de diferentes productos alimenticios en Brasil. Trinder (1988) informa la presencia de AF en *cervezas* en Sudáfrica. Yen & Bidasee (1993) en alimentos de aves de la India. Akano y Atanda (1990) en 'tortillas' de maíz en Nigeria, y muchas otras.

La contaminación por AF puede ocurrir antes y después de la cosecha (Singh & Sinha, 1983) y a veces el proceso de producción de AF antes de la cosecha se acelera por condiciones de sequía (Lillehoj *et al.*, 1984; Tsuruta, 1987).

1.5 Interacción ecológica.

El crecimiento de microorganismos sobre cereales, semillas oleaginosas y otros granos almacenados, se relaciona con condiciones ambientales (humedad y temperatura) y con su capacidad genética (Tuma *et al.*, 1989). En México hay clima

propicio (temperatura y humedad relativa altas), para el desarrollo de los hongos y sus toxinas.

La micoflora de la semilla, con población fúngica persistente, constituye un factor biótico importante, que es responsable del deterioro del grano (Tsuruta, 1985 y 1987).

El arroz es el mejor sustrato para cultivar al hongo (Sánchez-Regueiro *et al.*, 1984 y Fan & Chu, 1984), aunque también el cacahuete, y el maíz y trigo en menor medida. El hongo se expresa genéticamente (en cuanto a la producción de toxina) principalmente en arroz, pero también en otros medios naturales (Hill *et al.*, 1983; Bilgrami & Sinha, 1992), a diferencia de algunos medios sintéticos estudiados en los que la presencia de carbohidratos y vitaminas regulan la síntesis de AF (Bilgrami *et al.*, 1985 y Wheeler *et al.*, 1987).

1.6 Situación en México.

El maíz es la base de la alimentación del mexicano, aunque también consume mucho arroz y en menor escala cacahuete (Carvajal *et al.*, 1990), tres alimentos susceptibles a la contaminación por AF. Se han encontrado AF en maíz (Carvajal, 1987), pastas de trigo para sopas (Rodríguez, 1988) y en cacahuete (Avila-Castro, 1991) de la Ciudad de México.

En México hay alta incidencia de cirrosis (Narro-Robles *et al.*, 1994), la cual no siempre está asociada con alcoholismo, y pudiera estar relacionada con AF. A pesar de que no hay alta incidencia de hepatomas, se encontró AFB₁ en orina de enfermos con hepatocarcinoma (Torres *et al.*, 1994). Para conocer la etiología del hepatocarcinoma resulta interesante y significativo hacer una comparación de la incidencia de AF y su relación con los virus de las hepatitis B, y C crónicas, y con cirrosis en la población de México.

1.7 Descontaminación.

Hay que controlar las AF, los hongos productores y eliminar los daños '*in vivo*' con el uso de sustancias ya sean adsorbentes o amoniacales. Las AF son termo-resistentes y químicamente estables, por su alto punto de fusión (Tabla 1), pero en presencia de humedad y altas temperaturas se destruyen parcialmente (Jones, 1983 y Jones *et al.*, 1986); en el tostado del cacahuete, en la fabricación del pan y durante la nixtamalización del maíz para hacer "tortillas" se reducen los niveles de AF en un 50 a un 75 % (Rosiles-Martínez 1979; OPS - OMS, 1983; Price & Jorgensen, 1985).

Norred (1982), Hagler, *et al.*, (1982), Ehrlich & Ciegler (1985), Gueldner *et al.*, (1985) y Samarajeeva *et al.*, (1991) plantean que los principales métodos de descontaminación de AF en piensos u otros alimentos son los físicos, químicos y los microbiológicos. Cuando se utilizan procesos físicos para destruir las AF en alimentos también se destruyen otros nutrientes. Las radiaciones ultravioleta (UV) no son muy efectivas por su poco poder de penetración, y porque deterioran el valor nutritivo del

alimento, pero descontaminaron las aflatoxinas M₁ (AFM₁) en leche pasteurizada (56.2%) y sin pasteurizar (53.9%) (Stubblefield *et al.*, 1970). El ozono inhibe la producción de las AF y se mantienen las propiedades organolépticas y el poder nutritivo de los alimentos ozonizados (González *et al.*, 1990).

Los agentes adsorbentes destoxifican los alimentos con AF, con resultados comprobados 'in vivo' (Diener *et al.*, 1985). Ademoyero & Dalvi (1983) adicionaron carbón activado en alimento contaminado para pollos, y Phillips *et al.*, 1988 usaron alúminio-silicatos hidratados de Na y Ca para descontaminar alimento de pollos y cerdos.

2. Efectos de las aflatoxinas a nivel molecular.

2.1 Metabolismo.

Las AFM₁ y las aflatoxinas M₂ (AFM₂) son productos del metabolismo animal de las AFB₁ y AFB₂ y también han sido aisladas de cultivos de *A. flavus* (Stubblefield *et al.*, 1970; Dutton *et al.*, 1985) y han sido sintetizadas químicamente a partir de su principal precursor.

Las células hepáticas contienen las enzimas para formar los metabolitos promotores del cáncer.

La Figura 3 resume las principales vías metabólicas de la AFB₁ catalizadas por el sistema microsomal de oxidasas de función mixta (MFO) de origen hepático dadas las posibles transformaciones estructurales.

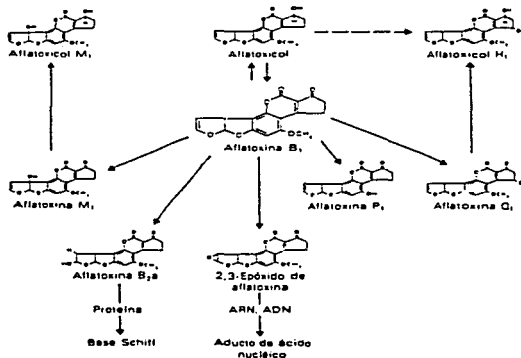


Figura 3: Vías metabólicas de la AFB₁ (OPS-OMS, 1983).

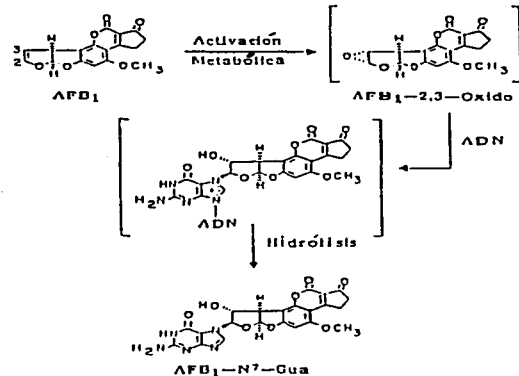


Figura 4: Activación metabólica de la AFB₁ para formar el aducto 8,9 óxido de AFB₁-ADN (Irvin, 1987).

La AFB₁ se absorbe principalmente en el duodeno (Kumagai, 1989) y en el hígado se realizan las transformaciones metabólicas (OPS-OMS, 1983; Irvin, 1987) (Figuras 3 y 4).

La AFB₁ se metaboliza principalmente por el MFO que es una organización compleja de enzimas de las células hepáticas NADPH dependientes, unida al citocromo P-450 (Kumagai, 1989; Yoshizawa *et al.*, 1982; Wheeler *et al.*, 1987 y Shaiq & Avadhani (1989)).

2.2 Descripción de la AFB₁ libre y en aductos.

Las AF interactúan con el ácido desoxirribonucleico (ADN) y producen efectos tóxicos, mutágenos y cancerígenos.

Martin & Garner (1977) relacionaron la capacidad de la AFB₁ para producir mutaciones con la habilidad de un metabolito activado para unirse covalentemente a la guanina del ADN en la posición N-7 (aducto), y esta reacción podría ser importante en el inicio del cáncer. La AFB₁, *per se* no se une al ADN, ya que requiere de una activación metabólica previa. El compuesto químico activo es el 8, 9 óxido de AFB₁. Este compuesto fue obtenido *in vivo* por la activación de la AFB₁ por el sistema de oxidasas de función mixta microsomal (MFO) (Swenson *et al.*, 1977) o por oxidación perácida (Martin & Garner, 1977). El epóxido (8, 9 óxido de AFB₁) fue obtenido por oxidación de la AFB₁ con dimetil dioxirano lo que permitió su completa caracterización. Essigmann *et al.*, (1977) y Croy *et al.*, (1978), identificaron la estructura del principal aducto formado en hígado de ratas, y confirmó la hipótesis existente.

Cuando la AFB₁ se une a las pirimidinas forma aductos de formamidopirimidinas con estructura 8,9-dihidro-8-(N₅-formil-2,5,6,-triamino-4-oxopirimidin-N₅-il)-9-hidroxi AFB₁ (AF-FAPY), con una frecuencia de 17-30%, y se les considera como causa mayor de mutaciones del ADN (Lin *et al.*, 1977) y son activadores del proto-oncogene H-ras; por otro lado, al unirse la AFB₁ a la guanina del ADN se forman un 70% de aductos 8,9-dihidro-8-(N⁷-guanil)-9-hidroxi-AFB₁ (AFB₁-N⁷-Gua) (Essigmann *et al.*, 1977; Croy *et al.*, 1978), que cuando se eliminan por la orina, son medida del metabolismo de las AF, de modo que al cuantificar estos aductos en la orina estamos midiendo también la reparación que hace el ADN frente al ataque de la AFB₁ (Peers and Linsell, 1973; Bennett *et al.*, 1981; Bulatao, 1982; Garner, 1985; Harrison *et al.*, 1991).

La tecnología para la detección de las AF unidas al ADN (aductos) es compleja, implica un conocimiento inmunológico, químico, de manejo de aparatos de precisión y de medidas de protección. La determinación de AF en la orina da datos valiosos y en el caso de la AFB₁ libre, refleja exposiciones previas de 24 a 48 horas. Cuando se complementa con la detección de aductos de AFB₁-N⁷-Gua en orina, muestra la tasa de recuperación del ADN de AF fijadas años atrás.

2.3 Efectos bioquímicos tóxicos.

La AFB₁ ejerce su toxicidad sobre el metabolismo de las proteínas, lípidos y carbohidratos, en el transporte electrónico de la cadena respiratoria y en las membranas celulares y subcelulares (Patterson, 1977). Una interacción tóxica es sobre el ADN, causando efectos mutágenos y cancerígenos.

Patterson (1977) mostró que los principales efectos bioquímicos son porque inhiben la síntesis del ácido ribonucleico (ARN), ADN-dependiente en el núcleo de los hepatocitos, lo que provoca una inhibición de la biosíntesis de las proteínas en el sistema microsomal (proteínas de exportación). En el metabolismo de los carbohidratos, la AFB₁ disminuye las actividades uracil-diamin-fosfato (UDP), glucosa-glucógeno transglucosilasa y glucosa-6-fosfatasa (G-6-P asa), trastornos bioquímicos relacionados con la degradación de las reservas de glucógeno hepático y los cambios morfológicos del retículo endoplásmico respectivamente, dado que la G-6-P asa es específica del mismo. La intoxicación por AFB₁ trae cambios en el transporte de los lípidos del hígado, esta toxina inhibe la actividad tioquinasa, esencial para la activación del acetato en Acetil-CoA. Otra alteración bioquímica sobre el metabolismo de los lípidos, es el trastorno del metabolismo de los carotenoides observado en las aves (Tyczkowski & Hamilton, 1987).

Los efectos metabólicos tóxicos de la AFB₁ a nivel de organelos celulares se han descrito como aumento en la permeabilidad de las membranas tanto mitocondriales, interrumpiendo el transporte de electrones de la cadena respiratoria, como lisosomales con salida al exterior de las hidrolasas ácidas (OPS-OMS, 1983). Estas alteraciones bioquímicas causan daños en el hombre y bajas en la producción animal.

2.4 Teratogenicidad

Los efectos teratógenos de la AFB₁ fueron reportados por primera vez por Di Paolo *et al.*, (1967) en hamsters, ratas y ratones que recibieron una dosis de 4 mg AFB₁/kg de peso al octavo día de gestación, con lesiones a nivel del sistema nervioso central. La AFB₁ retarda el proceso de blastulación y gastrulación en Medaka japonesa (*Oryzias latipes*) proporcionalmente a la dosis utilizada, y produce efectos teratógenos variados a nivel del sistema circulatorio, vejiga urinaria y en el sistema óptico (Llewelyn *et al.*, 1977); sin embargo, Krishnamachari *et al.* (1975) no pudieron demostrar la aparición de malformaciones enormes en embriones de pollo a los que se les administró dosis subletales de AFB₁, y sólo mostró retardo en el crecimiento de ratones. Se observó un efecto teratógeno en embriones de ratas Sprague Dawley de 10 días de gestación, cultivados 'in vitro' (Carvajal & Irvin, 1988) donde la AFB₁ causó hidrocefalia, malformaciones en patas y cola, alteraciones en número de somitas y hemorragias en el telencéfalo.

2.5 Inmunosupresión

Hay un efecto negativo de las AF sobre el sistema inmunitario (Pier *et al.*, 1977). El consumo de bajas dosis de AF afecta la resistencia natural o adquirida a enfermedades infecciosas tanto en animales de experimentación (Wei & Hsieh, 1980) como de producción. La acción tóxica de la AFB₁ afecta al sistema inmune humoral y celular en pollos, y las inmunoglobulinas séricas en terneros disminuyen (Balaraman & Arora, 1987). La actividad del complemento se reduce y se retarda la producción de interferón (Wei & Hsieh, 1980). Todo esto junto con la menor capacidad de los linfocitos y fagocitos, producida por la ingestión de AF, reduce las defensas contra los microorganismos (Wei & Hsieh, 1980; Rausuddin *et al.*, 1990).

2.6 Relación Mutagénesis - Carcinogénesis

La carcinogenicidad de la AFB₁ fue probada al producir hepatomas en ratas, por el suministro del mismo alimento de cacahuete implicado en la enfermedad X de los pavos, antes de conocerse su identidad. Sus efectos cancerígenos fueron probados en otros animales, como patos (Carnaghan, 1965), y monos (Gopalan *et al.*, 1972).

Existe una estrecha relación entre mutagénesis y carcinogénesis. La mutagenicidad es el proceso por el cual se produce una alteración del ADN presente en las células vivas (genoma) y el mutágeno es el agente físico o químico que produce la mutación o alteración del ADN (Alberts *et al.*, 1994). Hay varios métodos capaces de detectar la capacidad mutágena de los compuestos, utilizando sistemas de ensayo con células procariontes (bacterias) o con células eucariontes (Darnell *et al.*, 1993). Los agentes altamente cancerígenos son frecuentemente mutágenos potentes (Miller *et al.*, 1984). Se realizó un estudio de la actividad genotóxica de 33 micotoxinas utilizando el test de reparación del ADN, encontrando que la AFB₁ presenta una actividad genotóxica potente.

Está bien establecido que los cancerígenos químicos, como la AFB₁, se unen covalentemente al ADN formando aductos (Yu *et al.*, 1990) y que el mecanismo de producción de la mutagénesis de AFB₁ es el mismo que el de los agentes alquilantes, produciendo mutaciones puntuales (Figura 5). Estos mismos autores plantearon un posible mecanismo de iniciación oncogénica en el que está involucrado el 2, 3 óxido de AFB₁, a través del proceso de carcinogénesis (Figura 5) con la activación química de un proto-oncogén (Yang *et al.*, 1985 y Massey *et al.*, 1995).

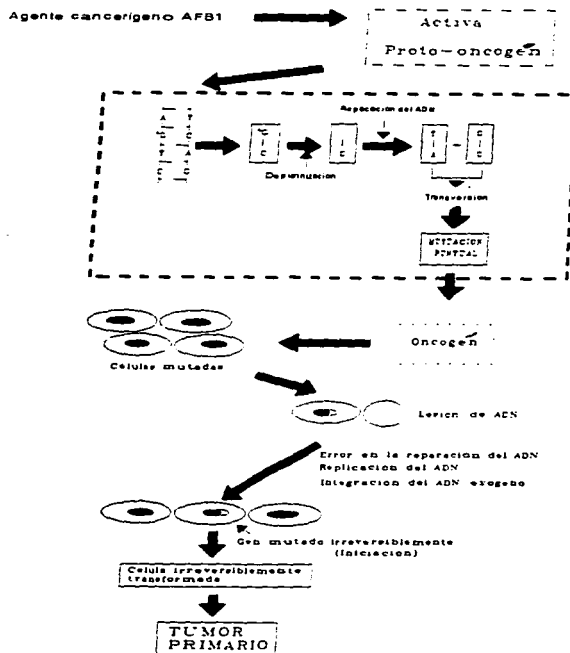


Figura 5: Mutación puntual inducida por AFB₁ y mecanismo de iniciación oncogénica.

3. Epidemiología de enfermedades hepáticas relacionadas con la AFB₁

3.1 Hepatitis

Hepatitis significa inflamación del hígado. El conocimiento de la hepatitis viral data de épocas muy antiguas, aunque la identificación de los virus que la originan, es reciente con apoyo de técnicas de ingeniería y biología molecular, que han permitido caracterizar los virus que intervienen en la fisiopatogenia y respuesta inmune de este grupo de enfermedades infecciosas.

3.1.1 Hepatitis B

La hepatitis B viral (HBV) es la enfermedad hepática infecciosa más importante a nivel mundial, también por sus secuelas, como son la infección crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular (Maynard, 1990). En el mundo existen alrededor de 300 millones de portadores de infección activa de este virus (OMS, 1988). La mayoría localizados en Asia, seguida por la región del Sahara en África. Del total de la población, el 65 % vive en áreas donde el padecimiento es endémico. Más del 90 % de portadores se localizan en regiones subdesarrolladas, con servicios de salud deficientes y falta de recursos económicos. Se pensó que la HBV sólo se transmitía por vía parenteral (sanguínea), pero actualmente se ha demostrado que también por contacto sexual como una verdadera enfermedad venérea (Treviño *et al.*, 1994).

El virus de la hepatitis tipo B es de la familia llamada Hepdnaviridae, es de ADN de doble cadena, mide 42 nm y consta de una porción lipoproteica externa que contiene al antígeno de superficie (HBsAg) y de una porción central o nucleocápside con el ADN, el antígeno core (HBcAg) y el antígeno "e" (HBeAg). El virión completo de 42 nm, circula en la sangre del paciente infectado, al igual que pequeñas esferas y túbulos de 22 nm que son el HBsAg y parecen ser un excedente de cubierta lipoproteica viral. El HBsAg se encuentra en otros fluidos como orina, saliva, bilis, secreciones nasal y vaginal, semen, lágrimas y leche materna e incluso en las heces.

Aunque el virus de la HB no se ha cultivado *in vitro*, la aplicación de la técnica recombinante ha permitido la síntesis de polipéptidos sintéticos del HBsAg en el laboratorio y ha permitido definir la estructura física del genoma viral, el cual está compuesto por dos cadenas de ADN, una larga "L" y una corta "S".

El diagnóstico de HBV se establece con marcadores serológicos específicos para hepatitis viral B: HBsAg anticuerpo (Ac) contra el HBcAg (Anti-HBcAg), HBeAg y Ac contra el HBeAg (Anti-HBeAg). Hay alta frecuencia en varones homosexuales, prostitutas, drogadictos, trabajadores de la salud en contacto con sangre o sus derivados, en terapia intensiva, diálisis renal, oncología y en laboratorio tienen de un 15 a 30% mayor riesgo de infección (Lisker *et al.*, 1990; De Hoyos *et al.*, 1993; Mast & Alter, 1993). La prevalencia del HBsAg en bancos de sangre de Latinoamérica fluctúa entre 0.3 a más del 10 %, y en México oscila entre 0.33 a 1.61 % (Hadler *et al.*, 1987 y Fay, 1990). El Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ) reporta una prevalencia de 0.28 % de HBsAg (Meléndez *et al.*, 1993).

3.1.2 Hepatitis C

La hepatitis C viral (HCV) es un problema sanitario en todo el mundo, por su frecuencia, las graves consecuencias clínicas y su evolución a la cronicidad. Un riesgo de la HCV es su tendencia a convertirse en enfermedad crónica, a menudo asintomática y que puede llevar a cirrosis en el 10-30% de los casos (Alter, 1993).

En 1988, Houghton y colaboradores de la Chiron Corporation en California, USA, identificaron y clonaron el genoma viral que parecía estar relacionado con el agente de la Hepatitis no-A, no-B transmitida por vía parenteral. Desarrollaron un inmunoensayo para obtener el Ac contra este agente que denominaron virus de la hepatitis C. Se ha demostrado que del 80 al 90 % de la hepatitis no-A no-B son producidos por el virus C (Mandell *et al.*, 1992).

El HCV es un virus de ARN de cadena simple, con polaridad positiva, con alrededor de 10,000 nucleótidos, con cubierta proteica que se destruye con solventes lipídicos que inactivan al virus. Por ultracentrifugación se ha estimado que mide 30 y 60 nm de diámetro. Presenta similitud en características físicas y genómicas con los flavivirus en especial con los arbovirus.

Se cuenta con dos métodos diagnósticos para HCV: el radio inmunoanálisis y el análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Estas pruebas detectan Ac contra la región C 100-3. El anti-HCV constituye un marcador que identifica a los portadores del HCV, pero no sirve para el diagnóstico precoz de la hepatitis aguda. Hay un período largo entre la exposición al HCV y la detección de Ac.

Es posible que el HCV se transmita por contacto sexual, aunque es raro en comparación con el HBV o el virus de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Se ha detectado positividad para anti-HCV entre 4-8 % de los homosexuales masculinos y en el 6 % de las compañeras sexuales de los drogadictos positivos a HCV (Esteban *et al.*, 1989; Alter, 1993). Las poblaciones susceptibles de riesgo por infección de HCV incluyen a profesionales de la salud. Existen pacientes infectados no pertenecientes a ningún grupo de riesgo, con vía de infección desconocida (Zuckerman *et al.*, 1994).

La incidencia de hepatitis post-transfusional es del 7 al 12 %. Crespo *et al.* (1994), señalan su importancia como causa de enfermedades hepáticas persistentes. En América Latina, la prevalencia del anti-HCV fluctúa entre 0.57 a 1.7 %, se estimó de un estudio cooperativo entre doce países (Fay *et al.*, 1994).

Díaz *et al.* (1993) encontraron relación directa entre la frecuencia de anti-HCV y el número de unidades de sangre transfundidas en pacientes que la recibieron antes de 1991. En México, los marcadores anti-HCV empezaron a ser utilizados en general a partir de 1992, logrando abatir la frecuencia de hepatitis C post-transfusional. La prevalencia de marcadores de hepatitis en la población de donadores del INNSZ para el anti-HCV de hepatitis C en México es de 1% (Meléndez *et al.*, 1993).

3.2 Cirrosis

La palabra cirrosis deriva del griego Kippoeiv, que significa "tornarse amarillo rojizo" (Skinner, 1961), es una enfermedad progresiva y mortal que desde la antigüedad se denominaba "endurecimiento del hígado" (Tumen & Cohn, 1968). La cirrosis hepática es una importante causa de muerte, principalmente entre hombres en edad productiva, la mortalidad tiene una distribución regional y la tasa de México, es de las más altas del mundo (Narro-Robles *et al.*, 1992).

La cirrosis se asocia al consumo de alcohol, a productos químicos o a hepatitis viral. De las enfermedades crónicas del hígado en Estados Unidos (1989), el 49.3% se relacionaron con alcoholismo (MMWR, 1993).

En 1993, se reportaron 7 776 casos de cirrosis hepática en México, que dieron una tasa de 9 por cada 100 000 habitantes. Estos casos nuevos de CH representaron 53% de todas las hospitalizaciones notificadas por el Sistema de Salud bajo cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado (Narro-Robles *et al.*, 1994).

La tendencia de la mortalidad en los últimos 20 años ha sido estable e indica un grave problema de salud (Figura 6). En 1993, la CH ocupó el noveno lugar entre las 20 principales causas de muerte con una tasa de 27.7 % de defunciones por cada 100 000 habitantes, donde cerca del 55% se asociaron a alcoholismo (Dirección General de Epidemiología, 1994).

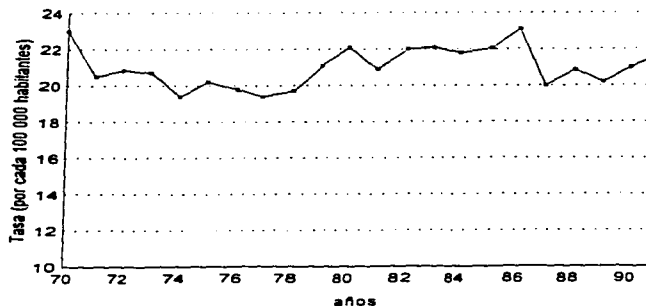


Figura 6: Mortalidad por cirrosis hepática en México. 1970-1991 (Narro Robles *et al.*, 1994).

El grupo de edad más afectado por CH, en México, fue de 25 a 44 años, según la edad de inicio del consumo de alcohol, donde esta enfermedad representa la segunda causa de muerte con 19.6 defunciones por cada 100 000 habitantes, y el grupo de 45 a 64 años, donde es la cuarta causa de muerte (87.2 defunciones por cada 100 000 habitantes). Según el sexo, la mayor proporción de muertes ocurrió en los hombres (78%), esta relación se mantiene en todos los grupos de edad con excepción de las muertes en el grupo de 10 a 14 años cuya relación se invierte (Figura 7) (Secretaría de Salud, 1993 a; Dirección General de Epidemiología, 1993).

El Registro de Salud Pública (Secretaría de Salud, 1993 a) indica que en 1991, la mayoría de los casos de cirrosis se presentaron en los Estados de Querétaro, Morelos y Tlaxcala. En 1992 la distribución geográfica de las defunciones por CH en 3 Estados: Hidalgo, Puebla y Tlaxcala tuvieron las tasas de mortalidad más elevadas ya que son entidades productoras y consumidoras de pulque (Narro-Robles *et al.*, 1992).

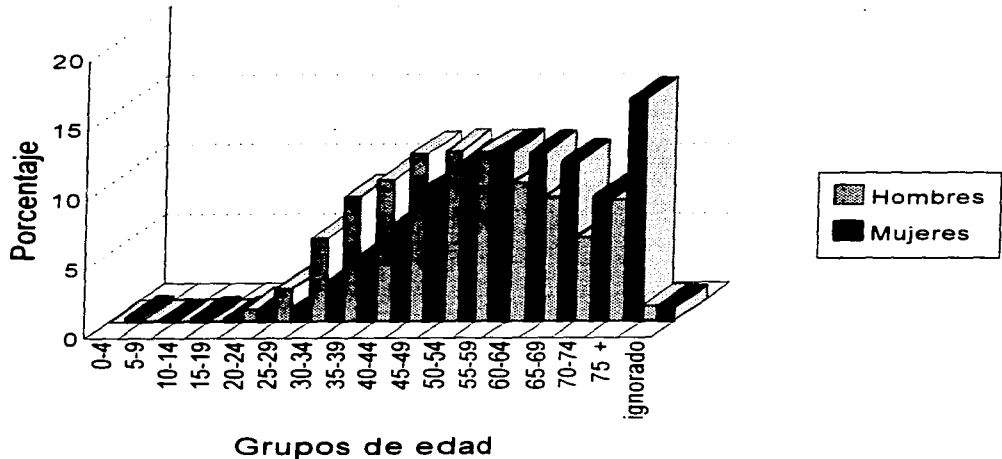


Figura 7: Distribución de la mortalidad por cirrosis hepática por grupos de edad y sexo en México, 1991 (Narro-Robles *et al.*, 1994).

3.3 Carcinoma hepatocelular.

El carcinoma hepatocelular (CHC), ocupa el séptimo lugar entre los cánceres en el hombre y el noveno en la mujer a nivel mundial. El CHC es una neoplasia común en Sudáfrica y en el Lejano Oriente, más frecuente en Mozambique, 103 casos por cada 100 000 habitantes al año. Otras zonas de moderada incidencia son Japón, con 4.6 casos por cada 100,000 habitantes al año, así como Dinamarca y Suiza. Se consideran como áreas de baja incidencia los Estados Unidos, 3 casos por 100 mil habitantes al año, Inglaterra y América Latina (CA. Cancer Statistics, 1994).

En Estados Unidos ha aumentado el CHC, quizá debido a la mayor sobrevivencia de los pacientes cirróticos y de su evolución hacia CHC (Parkin, 1988; Sherlock, 1989). El CHC está en frecuente asociación con enfermedades metabólicas o exposición a tóxicos. La infección crónica por virus B probablemente ocurre en el 90 % de los carcinomas (Beasley, 1982).

Los tumores malignos ocupan el 2° lugar entre las causas de mortalidad general en México, con 20 322 defunciones y con una tasa de 37.9 por cada 100 000 habitantes. Figura 8.

No se ha establecido una asociación entre HCV y CHC en forma concluyente. Hay casos de cáncer en pacientes con cirrosis desencadenada por virus C. La presentación, evolución clínica y pronóstico es similar a casos de CHC por otras etiologías (Kenichi, 1982).

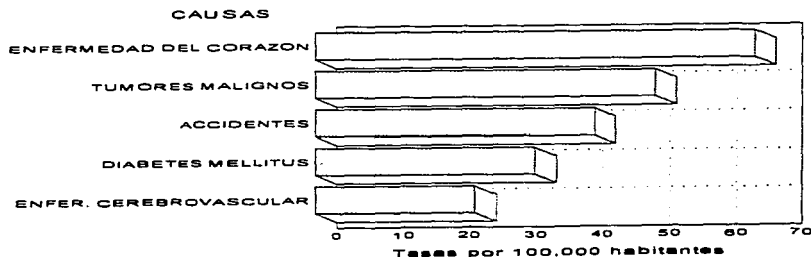


Figura 8: Principales causas de mortalidad general en 1993 (Dirección General de Epidemiología, 1994).

Otros factores relacionados con el CHC son las AF, las enfermedades hepáticas por alcohol, el hábito de fumar y los anticonceptivos orales (Bosch & Muñoz, 1988, Lisker *et al.*, 1989).

El cáncer primario de hígado presentó una frecuencia entre 2.6 y 5.7 % en enfermos con cirrosis hepática y con una frecuencia de 0.56 a 1.2 % cuando se incluyeron todas las necropsias practicadas en los hospitales generales (Dirección General de Epidemiología, 1994). Los grupos de riesgo para enfermedades crónicas por edad son de 45 a 75 años ó más. La mortalidad fue similar en ambos sexos (Figura 9) (Secretaría de Salud, 1993 b).

El CHC generalmente se diagnostica en etapas avanzadas cuando la masa tumoral es mayor de 5 cm y la sobrevida promedio inferior a un año. En un estudio de 1985 a 1992 realizado en el INNSZ, se encontraron 90 pacientes con CHC, 60 % del sexo masculino con edad promedio 59 años; hubo cirrosis en 49 del total (57%), de origen alcohólico en 45 %, de origen viral en 41 % y de origen desconocido en 14 %. Se determinó HBsAg sólo en 55 % (positivos 18%). La sobrevida promedio fue de 13.6 % al año, siendo mayor en pacientes no cirróticos (Meléndez *et al.*, 1992).

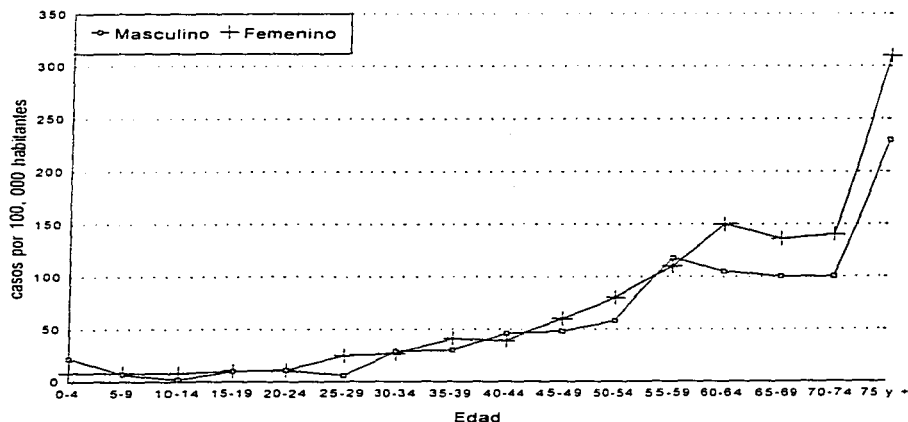


Figura 9: Casos de cáncer de hígado por grupos de edad y sexo 1985-1989 (SSA, 1993 b).

4. Efectos de las aflatoxinas en la salud humana.

Cuando la actividad cancerígena y los efectos tóxicos de las aflatoxinas B (AFB) fueron comprobados en los animales, surgió la inquietud de su posible repercusión en el hombre por la ingestión de alimentos contaminados con ella.

Hay varias enfermedades en humanos relacionadas con la ingestión de alimentos contaminados con AF. Las AF producen dos tipos de síntomas en humanos: agudos por intoxicación severa y crónicos (Campbell & Salamat, 1971).

Una intoxicación severa por AF causa vómitos, diarreas, hemorragias internas y muerte. Dentro de los síntomas crónicos tenemos diferentes tipos de cáncer: de hígado, de pulmón, colorrectal y de esófago, de los cuales existe información donde se relaciona a las AF como los mutágenos causales (Yadgiri *et al.*, 1970; Van Resenburg *et al.*, 1974; Dichter, 1984; Wild *et al.*, 1991 y Harrison, *et al.*, 1993).

Con respecto a otras enfermedades, el cáncer de pulmón ha sido relacionado con la AFB₁, así, Dvorácková *et al.*, (1981) encontraron AFB en pulmones de dos pacientes fallecidos de cáncer de pulmón y también las investigaciones de Stora *et al.* (1982) relacionando el cáncer de pulmón con aspiración de polvo con *A. flavus*.

Los cánceres digestivos, hepatitis y cirrosis, están dentro de las primeras causas de muerte en los países de clima cálido. Se encontró relación entre el cáncer de colon y la ingestión de aflatoxinas (Deger, 1976; Harrison *et al.*, 1993).

También se les relaciona con el síndrome de Reye, pues se encontraron AF en los órganos de niños fallecidos de esta enfermedad (Reye *et al.*, 1963; Dvorácková *et al.*, 1977 y Stora *et al.*, 1982).

Por otra parte, la relación de las AF con el Kwashiorkor fue señalada por Apeagyei *et al.* en 1982 y Chevel (1989) quienes encontraron AF en los hígados de niños con esta enfermedad y plantearon que, para el desarrollo de la misma, es necesario que estén presentes la deficiencia proteico-energética y las AF. Otras enfermedades se han asociado a las AF, como la hepatitis, la cirrosis infantil de la India (Harcharan *et al.*, 1978) y hepatitis B ocurrida también en la India (Krishnamachari *et al.*, 1975). La hepatitis B aparece como un factor que predispone al daño por AF.

Entre los consumidores de heroína existe una alta probabilidad de adquirir AF por vía endovenosa proveniente de la contaminación de la planta. De hecho la AFB₁ se encontró en nueve muestras de orina procedentes de trece heroínómanos callejeros (9616 pg/g) y en el 20% de 113 adictos de Inglaterra y Holanda (Hendrickse *et al.*, 1989).

4.1 Relación entre la AFB₁ y el carcinoma hepatocelular.

El CHC constituye el séptimo cáncer más común a nivel mundial y causa alrededor de 200 000 muertes por año; en varones del centro de África, ocupa el

primer lugar de incidencia; en el sur de África y el sureste de Asia ocupa el segundo lugar; y en China, es la tercera causa de muerte entre los varones, siendo un tumor relativamente raro en América, Europa, norte de África y este de Asia (Parkin, 1988).

En las zonas mencionadas están los estudios epidemiológicos más importantes, que muestran gran relación entre la ingestión de AF y la aparición de CHC (Wogan, 1992). Los primeros informes fueron de Shank *et al.*, (1972) en Tailandia; Peers & Linsell (1973) en Kenya y Van Rensburg *et al.*, (1974) en Mozambique (OPS-OMS, 1983).

En estudios realizados en Filipinas por Bulatao (1982), y en África por Trichopoulos & Day, (1987) se demostró una fuerte asociación entre la ingestión de grandes cantidades de AF y el riesgo de desarrollar CHC, también el consumo de alcohol, el tabaquismo y el uso prolongado de anticonceptivos son factores de riesgo asociados.

Para conocer el efecto cancerígeno de las AF en el hombre, se han usado los métodos estadístico y epidemiológico que relacionan la contaminación por AF en alimentos, con la incidencia del CHC y otros tumores (Alpert *et al.*, 1971). Estudios epidemiológicos de América y África han asociado la incidencia del cáncer primario de hígado con el consumo de AF en alimentos y la presencia del HBV (Austin *et al.*, 1986; Álvarez *et al.*, 1991; Álvarez *et al.*, 1994; Wild *et al.*, 1993).

En China se han identificado las áreas del sureste como las de más alta incidencia de CHC; en un estudio realizado en Guangxi (Yeh *et al.*, 1985). Por otro lado, Stoloff (1983) encontró poca relación entre la exposición estimada a AFB₁, (dado que no la analizó químicamente) y la presencia de CHC en los Estados Unidos. Las causas se desconocen, los resultados no son concluyentes, pero lo que es innegable es que en animales de experimentación, incluyendo los primates no humanos, la hepatocarcinogenicidad de la AFB₁ ha sido probada, siendo improbable que el hombre sea la excepción biológica.

Sobre la incidencia de CHC y el sexo, se pensó que los varones estaban asociados a más factores de riesgo (AF, alcoholismo, tabaquismo), pero después se demostró la importancia de las diferencias hormonales (Chalkias, 1989).

Hay diferentes técnicas para monitorear el riesgo por AF en el CHC, a continuación relatamos algunos de los trabajos más sobresalientes. El uso de técnicas inmunológicas como RIA (Sizaret *et al.*, 1982) o ELISA (Garner, 1985) se han usado para monitorear la AFB₁ y sus metabolitos en fluidos biológicos (orina, sangre y leche) en pacientes y en población abierta. La medición de aductos AFB-N⁷-Gua en orina (Groopman & Sabbioni, 1991) y de aductos AFB₁-albúmina en sangre (Wild *et al.*, 1990) son índices de exposición, y estos últimos reflejan la exposición a AF de cuatro a seis semanas antes del estudio (Bosch & Muñoz, 1988).

La AFM, se encontró en muestras de leche materna en Zimbabwé (Wild *et al.*, 1987), lo cual es un riesgo para los niños. También la presencia de aductos AFB-ADN en el hígado de pacientes fallecidos de CHC (Garner *et al.*, 1985), y en cortes de órganos con carcinomas, refuerza la relación entre cáncer y AF (Harrison *et al.*, 1993). Se han realizado estudios *in vitro* del metabolismo de la AFB₁ con células humanas (Neal, 1987), así como también estudios de exposición humana a las AF, que han

arrojado evidencia de que en ciertas poblaciones de África existen Ac que reconocen epítopes de AFB₁ (Autrup *et al.*, 1990).

La presencia de la AFB₁ es más frecuente en personas que han sufrido infecciones por el VHB, que en sanas (Blumerg, 1985; Peers *et al.*, 1987; Beasley, 1988; Lisker *et al.*, 1989). También en estudios de aductos de AF en orina en Africa (Wild *et al.*, 1993) y en China (Groopman *et al.*, 1994), quedó demostrada la participación de las AF con la hepatitis y el CHC.

5. Métodos de análisis de aflatoxinas.

5.1 Químicos.

Estos métodos detectan a las AF y su cuantificación por un patrón interno o externo. Los principales métodos cromatográficos son: en capa fina (TLC) y la cromatografía de líquidos (HPLC). La cromatografía se basa en la distribución de los componentes de una muestra entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, que se filtra a través de los espacios pequeñísimos de la fase estacionaria o fija.

5.1.1 Cromatografía de capa fina (TLC)

Es una técnica rápida, sencilla, versátil y reproducible, por lo que se emplea para identificar drogas, extractos de plantas y preparaciones biológicas, o para evidenciar contaminantes o toxinas (Peckok & Shields, 1983).

La TLC es una técnica muy utilizada en el análisis de AF y otras micotoxinas. Su éxito depende del tipo de adsorbente, del sistema de solventes, del método de detección empleados y además, se requieren cantidades de muestra muy pequeñas. La cromatografía de capa fina es muy utilizada en el análisis de AF.

5.1.2 Cromatografía de líquidos (HPLC).

Sus ventajas son: aumento de la sensibilidad, exactitud, precisión y resolución de las muestras a analizar, además de que el sistema puede ser automatizado (Guattocchi, 1992).

El éxito de la HPLC para analizar AF radica en el tipo de columna RP C₁₈ usada (Garner, *et al.*, 1993) que es de gel de sílice y da mayor definición. Se utiliza la cromatografía de partición o fase reversa (RP), el detector puede ser de ultravioleta o de fluorescencia y es importante el sistema de solventes que se utilicen. Para incrementar la fluorescencia de las AF se derivatiza la toxina con yodo o bromo, después de la separación por columna (Kok, 1994) y ayuda también el uso de una precolumna de derivatización (Joshua, 1993).

La HPLC sirve para identificar, cuantificar y separar el aducto de AFB₁-N⁷-Gua y la AFB₁ libre o sus metabolitos en orina ya sea por patrón interno o externo.

5.2 Inmunológicos

El origen de las técnicas inmunoenzimáticas se remontan al año 1941, cuando con la técnica de inmunofluorescencia, se realiza el marcaje fluorescente de Ac. El desarrollo actual se debe a los avances en inmunoquímica de las proteínas, en enzimología, en métodos de obtención de proteína y Ac de elevado grado de pureza de los acoplamientos proteína-proteína y al estudio de las capacidades de absorción de diferentes polímeros. Se usa mucho la concentración de AF por columnas de inmuoafinidad

5.2.1. Antígeno ó hapteno

En las reacciones inmunológicas interviene un grupo de moléculas que según su peso molecular (pm) son Antígenos (Ag) o haptenos. Los Ag son sustancias de alto pm (> 5 000 daltones) portadoras de signos de extrañeza genética y que al penetrarle al organismo provocan reacciones inmunológicas específicas (respuesta humoral o celular). Estos Ag deben tener estructura estable y la posibilidad de ser degradadas.

Los haptenos son moléculas extrañas, de bajo peso molecular (< 5 000 daltons) y no pueden por sí solas iniciar una respuesta inmunológica. Las AF pertenecen a este grupo, se requiere unirlos a una macromolécula (proteína) que las hace antigénicas. La proteína que se acopla al hapteno para estos fines se denomina portadora o "carrier". Para llevar a cabo el acoplamiento entre el hapteno y la proteína es necesario que la estructura del hapteno presente grupos funcionales libres (carboxilos o aminos) capaces de reaccionar con los grupos carboxilos, aminos, tioles o fenoles presentes en la proteína para formar un enlace covalente.

Las proteínas portadoras más usadas son: albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina (OVA), gamma globulina (BGG), y polímeros sintéticos como la polisilina. La conjugación entre el hapteno y la proteína puede realizarse de forma directa o indirecta, según las características estructurales del hapteno. La AFB₁, al no presentar un grupo carboxilo en su estructura, requiere de una derivatización química que permita obtener una AF más reactiva que pueda acoplarse directamente a la proteína.

5.2.2. Anticuerpos (Ac)

Los Ac son proteínas que incluyen a las inmunoglobulinas producidas por las células plasmáticas como interacción entre los linfocitos B sensibles y el Ag. Las inmunoglobulinas tienen su máxima concentración en el suero sanguíneo donde constituyen cerca del 2.5% (residuo seco) y más del 30% de todas las proteínas.

Los Ac pueden ser policlonales o monoclonales según la cantidad de clones celulares que los produzcan. El Ac policlonal es producido por distintos clones de un sólo animal como resultado de una inmunización con el Ag, mientras el Ac monoclonal es derivado de un solo clon de células producidas por un hibridoma (fusión de una célula de bazo de animales inmunizados con células mielómicas cultivadas en un medio nutritivo (Abbas *et al.*, 1994) producto de varias inmunizaciones.

5.2.3 Reacción antígeno - anticuerpo.

Las fuerzas que unen al Ag con el Ac son interacciones no covalentes, que forman complejos de manera rápida y reversible y que permiten reutilizar las moléculas de Ac. Las uniones no covalentes se forman con distancias intermoleculares relativamente pequeñas, por eso, la unión más fuerte entre Ag y Ac se produce cuando las formas del epítoto (característica de un Ag que define el patrón de reconocimiento por un Ac) y del lugar de combinación del Ac se adaptan de manera muy estrecha, como sistema de llave/cerradura.

Las fuerzas que contribuyen a la interacción Ag-Ac son los enlaces (electrostáticos, de hidrógeno, hidrófobos) y las fuerzas de Van der Waals. Las uniones hidrófobas son las más importantes. Las fuerzas de la unión entre un epítoto y una molécula de inmunoglobulina (Ac) recibe el nombre de afinidad y se calcula por la Ley de Acción de las Masas y se refiere al Ag. Un sinónimo de afinidad es avidéz, pero se refiere al Ac. Ambos términos reflejan la energía con la cual se combinan los sitios de unión del Ac con el Ag específico.

5.2.4 Clasificación de los inmunoensayos.

Las técnicas inmunológicas se fundamentan en la reacción Ag - Ac y se clasifican según el compuesto marcado. Si es un radioisótopo se denominan Radio inmunoanálisis (RIA) y si es una enzima se les llama Enzimo inmunoensayos (EIA).

El RIA es un método usado para cuantificar AF, en sistemas solubles, pero contamina el ambiente con desechos radioactivos, y las radiaciones afectan la salud del hombre; así, han surgido métodos más seguros y baratos como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Chan & Perstein, 1987; Gosling, 1990).

La introducción de los sustratos fluorescentes y los procedimientos con control estricto de la reacción (Ishikawa & Kato en 1977; Calvin *et al.*, 1986) permitieron desarrollar trabajos en rangos ultrasensibles. La precisión del ELISA está relacionada con la sensibilidad de las enzimas inmunoensayadas, y constituyen el marcador y a la vez el sistema de amplificación de estas técnicas (Lehtonen & Viljanen, 1980).

Para que una enzima sea utilizada como marcador de un inmunoensayo debe reunir varias características como son: alta actividad hidrolítica, disponibilidad en grandes cantidades y con elevada actividad específica, estar ausente o en muy bajas concentraciones en las muestras y ser barata.

Las enzimas más utilizadas son la fosfatasa alcalina, la peroxidasa, la β galactosidasa y la glucosa oxidasa (Ashihara *et al.*, 1987; Kemeny *et al.*, 1989).

Dos limitaciones en la sensibilidad de los ensayos enzimáticos, son la actividad específica de las enzimas y las limitaciones del método para determinar el producto de la reacción enzimática. Las enzimas β -d galactosidasa y fosfatasa alcalina son muy utilizadas por tener una gran actividad específica. Los productos de las reacciones enzimáticas, se determinan por fluorometría, espectrofotometría o radiológicamente. Los métodos por fluorescencia son los de mayor sensibilidad (Ishikawa & Kato, 1977).

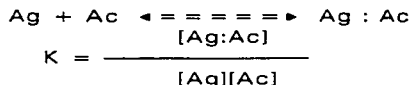
Factores que influyen en la sensibilidad del ensayo:

a. *Temperatura y tiempo de incubación.*

No existe una regla en cuanto al tiempo y la temperatura de incubación pero tiene que tomarse en cuenta el punto donde la sensibilidad no sea crítica. El calor reduce drásticamente la sensibilidad, sobre todo cuando se utilizan dos anticuerpos.

b. *Reacción Antígeno (Ag) - anticuerpo (Ac).*

La reacción Ag:Ac es reversible, obedece a la ley de Acción de las masas y se puede expresar de la siguiente manera:



donde: K es la constante de equilibrio.

Es determinante el límite de detección que se establece con la Ley de Acción de Masas y por la avidéz enlazante del hapteno al Ac. A mayor avidéz del Ac, mayor sensibilidad del ensayo.

c. *Naturaleza del enlace entre el hapteno y la enzima.*

Se requiere que el enlace entre el hapteno y la enzima sea diferente a la estructura del inmunógeno que se utilizó para levantar Ac específicos a este hapteno, los Ac obtenidos deben tener diferente avidéz por el hapteno nativo y por el hapteno marcado, por lo tanto no habrá pérdida de sensibilidad. Por lo que se recomienda utilizar otros puentes de conjugación entre hapteno y la enzima, diferente al utilizado por el inmunógeno.

d. *Efectos no específicos.*

Se observan en aquellas muestras biológicas que presentan mayor concentración de enzimas que pueden inhibir la actividad enzimática. Estas interferencias afectan la sensibilidad del ensayo. Estos efectos inespecíficos pueden eliminarse con el uso de proteínas como la BSA para bloquear sitios activos no ocupados por los Ac y además, la inclusión de detergente ó la utilización de altas molaridades de sal en la etapa de incubación (Lovborg, 1982).

Los métodos de análisis de AF más modernos son los inmunológicos, con una alta sensibilidad y especificidad ya que se basan en la reacción Ag-Ac. Lagone & Van Vunakis (1976) describieron uno de los primeros ensayos inmunológicos y utilizaron

el RIA. Posteriormente, Lawellin *et al.*, (1977) utilizaron el EIA para determinar AF.

Los métodos de análisis inmunológicos tienen una alta sensibilidad y especificidad, y no requieren de una exhaustiva limpieza química de la muestra, como en la HPLC, lo que abarata su costo y permite procesar un gran número de muestras en un corto tiempo.

El método, inmunoenzimático ELISA, es apropiado para determinaciones masivas de AF (Garner, 1985). La detección y cuantificación de AF tanto en alimentos como en fluidos biológicos (orina y leche materna) han requerido desarrollar métodos inmunológicos capaces de detectar concentraciones del orden de picogramos (Garner *et al.*, 1985; Groopman *et al.*, 1985; Chapot & Wild, 1991).

Para desarrollar un método inmunoenzimático, hay que considerar la estructura de la molécula y sus grupos funcionales para seleccionar el mejor método de detección, y así sintetizar el Ag adecuado y producir los conjugados y su purificación.

Los métodos de ELISA usados para medir Ag en una matriz son: el competitivo directo, el de doble Ac o sandwich y el de inhibición del Ac.

En el método competitivo directo, la fase sólida (placa de microtitulación de poliestireno) se recubre con el Ac específico para el Ag de prueba. La cantidad apropiada de la muestra que contiene el Ag (residuos) y el Ag marcado con la enzima son adicionados. Hay una competencia por el Ac entre el Ag marcado y el Ag sin marcar. El sustrato es adicionado y producirá color por la reacción enzimática y esta será inversamente proporcional a la concentración del Ag en la muestra.

En el método de doble Ac o sandwich, el Ac es absorbido a la placa. La muestra de prueba que contiene el Ag es adicionado seguido por el Ac que en este caso está conjugado con una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina ó β galactosidasa). El sustrato se adiciona y el color producido es directamente proporcional a la cantidad de Ag en la muestra de prueba.

El método de inhibición del Ac consiste en la preincubación de los Ac con la muestra de prueba. Si cualquier Ag está presente en la muestra, los Ac se unirán a éste. Cuando se le adicione, a la placa de recubrimiento, la mezcla Ag-Ac, habrá una disminución en la intensidad del color producido.

El tipo de inmunoensayo de elección para la cuantificación de las AF utilizado en el presente trabajo es el de ELISA Inhibitoria Competitiva Indirecta (Garner *et al.*, 1985; Chapot & Wild., 1991; Groopman & Sabbioni, 1991 y Hsieh *et al.*, 1988).

El principio del ELISA inhibitoria (Figura 10), se basa en la competencia de la AF presente en la muestra/estándar, con la AFB₁ de recubrimiento (AFB₁-Cl-Ov) en la placa por los sitios de unión. La cantidad de Ac que se unió a la AFB₁-Cl-Ov depende de la concentración presente en la muestra/ estándar. Si no hay AF en la muestra habrá un máximo de unión entre el Ac y la AFB₁-Cl-Ov, por el contrario, si el nivel de AF de la muestra es alto, ésta se unirá al Ac y reducirá su unión a la AFB₁-Cl-Ov. La determinación de la cantidad de Ac unido a la AFB₁-Cl-Ov se realiza por la adición de un segundo Ac. Este segundo Ac está conjugado con una enzima (peroxidasa) que nos permite cuantificarlo por la realización de una reacción coloreada con un sustrato específico.

SISTEMA INMUNOENZIMÁTICO TIPO HETEROGÉNEO INDIRECTO

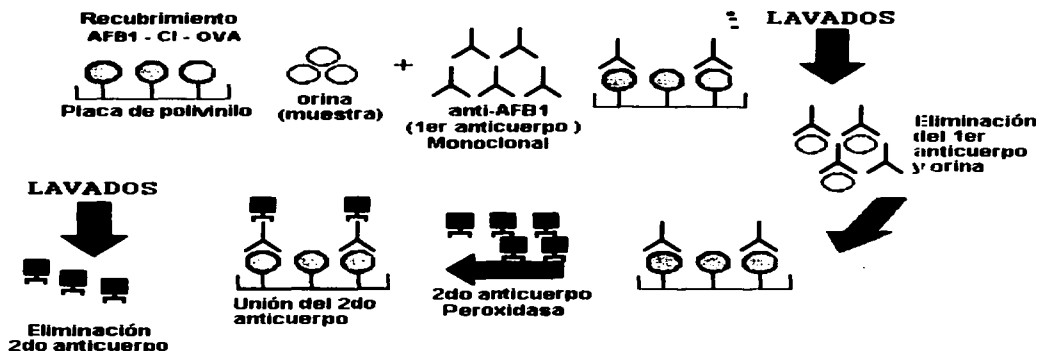


Figura 10: Método de ELISA Inhibitoria Indirecta.

Los primeros sistemas se diseñaron con antisueros policlonales contra AFB₁, obtenidos por inmunización en conejos, tienen mucha heterogeneidad y se debe eliminar la reacción cruzada (falsos positivos) contra otras moléculas (Escobar *et al.*, 1991). Con el desarrollo de la tecnología de hibridomas se pudo disponer de Ac monoclonales contra epítopes (puntos específicos) de la molécula de AFB₁. Así se logró desarrollar un sistema inmunológico específico para la detección de este Ag (Groopman *et al.*, 1982; Groopman & Donahue, 1988 y Garner *et al.*, 1985).

5.2.5. Validación de un ensayo.

Para que un ensayo se aplique a un análisis de micotoxinas en alimentos o fluidos biológicos, debe de reunir las siguientes características:

- El título de los Ac policlonales y monoclonales a utilizar debe ser mayor de 1: 10 000 y 1: 100, respectivamente.
- El límite de detección debe ser menor de 10 pg/pozo.
- Especificidad adecuada para el ensayo según la toxina.
- Recuperación.
- Reproducibilidad.
- Correlación con otros métodos.

a. Titulación de los antisueros.

La dilución óptima de un antisuero se debe determinar en el formato que se emplee durante el análisis, ya que éste depende de la concentración de los inmuno-reactivos, el tiempo de incubación y la temperatura.

La dilución óptima del antisuero se determina cuando existe una diferencia en densidad óptica de 1.5 entre la señal y el ruido, y se calcula a través de experimentos cruzados con diferentes variables (Wilkinson *et al.*, 1989).

b. Sensibilidad.

Sensibilidad es la menor cantidad de hapteno que produce una respuesta diferente del cero a un 95% del límite de confianza. Sería determinada desde la curva de calibración y se define como el valor medio del cero menos 2 desviaciones estándar (DS) para RIA y para ELISA es el valor medio de cero más la DS.

La sensibilidad de un ensayo tiende a confundirse con el límite de detección. En la práctica este valor se calcula como la media del primer punto (patrón cero) menos dos o tres desviaciones estándar de la media. Este valor puede coincidir con la sensibilidad del ensayo.

La sensibilidad depende de las concentraciones de los inmuno-reactivos, en particular del antisuero. A mayor afinidad del antisuero el ensayo es más sensible.

c. Especificidad.

La especificidad de un antisuero (reacción cruzada), es la habilidad que tienen algunas sustancias de enlazarse al Ac con mayor o igual facilidad que el Ag que lo originó. Tales sustancias pueden ser precursores naturales, productos degradados del Ag o sustancias de estructuras similares y en ocasiones pueden dar falsos positivos.

La reacción cruzada de un Ac policlonal varía según la respuesta inmune del animal. Diferentes laboratorios, que emplean el mismo inmunógeno (AFB₁:CMO-BSA) han obtenido antisueros con especificidades diferentes para las distintas AF (Chu, 1984). Incluso cuando se obtienen Ac monoclonales, estos pueden reconocer con gran afinidad a otros metabolitos. Lee & Morgan, (1993) obtuvieron un Ac monoclonal contra la AFB₁ que reconocía de igual manera a la AFG₁.

d. Exactitud y Precisión.

La exactitud es la concordancia entre el valor real del compuesto analizado y la media de los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento.

La exactitud de un ensayo se determina por la recuperación de la toxina de una muestra artificialmente contaminada (Wilkinson *et al.*, 1989) o a partir de una muestra certificada por un laboratorio de referencia como: International Agency for Research on Cancer (IARC), Community Bureau of Reference Brussels (BCR), FAPAS y otros.

La recuperación se considera adecuada cuando sus valores se aproximan al 100 % (± 5 %). Si éste se desvía mucho del valor real, hay que corregir el cálculo final.

Ya establecida la recuperación de la toxina a partir de la muestra, se determina la precisión, que es la concordancia entre los resultados obtenidos por un método estándar, sobre un material idéntico y bajo determinadas condiciones.

La precisión se determina a través de la repetibilidad y reproducibilidad y los términos de intra-ensayo, inter-ensayo e inter-laboratorio también son utilizados como medida de precisión y pueden ser de 15, 25 y 50 %, respectivamente. Los estudios de precisión se deben realizar con más de una muestra contaminada (Wilkinson *et al.*, 1989; Morgan, 1989; Escobar *et al.*, 1991) .

f. Estudios de correlación.

La correlación con otros métodos nos indica exactitud de la técnica investigada respecto a verdaderos positivos y negativos de un conjunto de muestras analizadas paralelamente con un método de referencia. A partir de los datos obtenidos por el procedimiento de referencia y el método propuesto pueden determinarse los indicadores de calidad (sensibilidad, especificidad, prevalencia, eficacia y valor predictivo positivo o negativo).

Son necesarios experimentos inter-laboratorio, en la investigación y la cuantificación de AFB₁ en alimentos, para el reconocimiento internacional de un método. Se ha recomendado adoptar el ELISA (Agri-Screen y Afla cup) como métodos oficiales de análisis para la cuantificación de AF en alimentos cuando la concentración de AF es superior a los 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$.

No existen métodos oficiales ni comerciales para determinación de AFB en orina o suero, la AOAC ha recomendado hacer estudios inter-laboratorio para validar y estandarizar los métodos de análisis de AF y sus aductos en fluidos biológicos (Scott, 1990; Trucksess, 1994).

II. OBJETIVOS

Generales

1. Desarrollar y validar los métodos de ELISA y de HPLC para la detección de AFB₁ libre, sus metabolitos (AFM₁, AFP₁) y de su aducto AFB-N⁷-Gua en orina humana.
2. Conocer la relación existente entre la presencia de AFB₁ libre, sus metabolitos (AFM₁ y AFP₁) y su aducto AFB-N⁷-Gua en orina humana, con las enfermedades hepáticas que preceden al cáncer hepatocelular primario.
3. Relacionar la presencia de AFB₁ libre, sus metabolitos (AFM₁, AFP₁) y de su aducto AFB-N⁷-Gua en orina tanto de grupos de riesgo (con hepatitis B y C crónicas, con cirrosis viral y alcohólica) con los niveles de AFB₁ de los grupos control (sano, con deficiencia renal y enfermos con enfermedad gástrica no hepática), con la frecuencia de ingestión y tipo de alimentos susceptibles de contaminación por AF.

Específicos

1. Realizar la síntesis de los aductos AF-ADN y AF-ovalbúmina, la validación del tipo de placa, tipo de anticuerpos y sus diluciones óptimas.
2. Recolectar 210 muestras de orina de 24 horas y aplicar una encuesta sobre alimentos con riesgo de tener AF (cereales, oleaginosas, especias, cervezas, vinos, etc) a los grupos de riesgo y control.
3. Relacionar los niveles de AFB₁ obtenidos por ELISA y HPLC en los grupos de riesgo con los niveles de AFB₁ de los grupos control.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio de epidemiología descriptiva para conocer la incidencia de hepatitis B, C y cirrosis hepática, se realizó en el INNSZ de México con la revisión de las estadísticas existentes en los últimos 10 años, y se complementó con la consulta de información de la Dirección General de Epidemiología; publicaciones anuales de Morbimortalidad de 1984-1994 de la SSA y también el Anuario Estadístico y otros materiales que hacen referencia a estas patologías.

1. Encuesta sobre alimentos.

Se elaboró un cuestionario para conocer la frecuencia de ingestión y tipo de alimentos ya conocidos como susceptibles a la contaminación por AF. Se incluyeron en el cuestionario los datos de los alimentos y las raciones que se consumieron durante las 24 y 48 horas previas a la toma de la muestra de orina, los alimentos citados se agruparon según su origen vegetal y animal. También se recogió la información de la dieta habitual, con el consumo de raciones diarias, por semana, mes y año de los productos derivados de cereales (maíz, trigo, arroz), semillas oleaginosas, condimentos, productos lácteos, cárnicos y consumo de bebidas alcohólicas (Apéndice 1) .

Para el diseño de este cuestionario se consultaron diferentes epidemiólogos de la Subjefatura de Epidemiología de la Coordinación de Salud Comunitaria del IMSS y se contó con la asesoría profesional de un grupo de expertos del Departamento de Nutriología del INN-SZ.

Posteriormente, el cuestionario se sometió a una prueba piloto, con la finalidad de detectar si las preguntas eran claras y comprensibles a la población y recogían la información requerida para nuestro estudio.

A los pacientes seleccionados, según criterios preestablecidos en el inciso 2.1 de Materiales y Métodos, se les aplicó el cuestionario en el momento de recepcionar la orina.

Con los datos de cada paciente, la frecuencia de ingestión (por raciones) y el tipo de alimento, se elaboró una base de datos en el programa FOX PLUS y EXCEL, para posteriormente analizarla con el paquete estadístico JMP de la empresa SAS (Statistical Analysis System), en los programas IIMAS de la UNAM.

1.1. Análisis estadístico.

Se hizo un análisis de correlaciones de Pearson para cada variable dependiente como son el consumo de cada alimento y el logaritmo de AF (se tomó el logaritmo para que se acercara más a la distribución normal), se realizó el análisis de varianza para evaluar si las medias de los log (AF) cambian de un grupo de pacientes de una enfermedad a otra.

Para buscar menos dependencia del supuesto de normalidad, se hizo la prueba de Kruskal-Wallis. Se hizo una comparación de grupos por contrastes, comparando los pacientes con enfermedad viral con el resto y se comparó el grupo de sanos con el resto. Cuando hubo diferencias significativas en la F, se realizó la prueba de Tukey. Estos análisis se hicieron dos veces una incluyendo los 7 grupos y la otra excluyendo al grupo de cirrosis hepática alcohólica (CHA).

Para poder estudiar en forma conjunta la asociación entre consumo de alimentos y las enfermedades (excluyendo CHA), se hizo un análisis de conglomerado seguido de análisis de correspondencias y un análisis discriminante con selección de variables (Hair *et al.*, 1995).

Se analizaron estadísticamente sólo los individuos que presentaron AFB₁ libre, sus metabolitos (AFM₁ y AFP₁) y aducto AFB-N⁷-Gua en orina. Se hizo un análisis de varianza con la variable transformada, según la transformación de Box-Cox. Además, se hicieron contrastes de los sanos contra enfermos, los de enfermedad viral contra alcohólicos. Estos contrastes se modificaron cuando algún diagnóstico no presentó valores positivos a la AFB₁, sus metabolitos y aducto.

2. Diseño de muestreo y análisis de orinas.

2.1 Criterios de selección de los pacientes.

Se seleccionaron pacientes que asistieron a la consulta de Gastroenterología del INNSZ con diagnóstico de hepatitis B y C crónicas, cirrosis viral y enfermos con cirrosis alcohólica; como grupos control se tomaron enfermos con insuficiencia renal, con enfermedad del aparato digestivo pero no hepática e individuos sanos. Se completó el número de casos de hepatitis B con la consulta de hígado del Hospital de Infectología del Centro Médico "La Raza" (HI CMR).

Los pacientes que llegan al INNSZ y al HI CMR se consideran representativos de todos los pacientes de niveles económicos medios y bajos, del mismo padecimiento en toda la República Mexicana.

Esta selección se realizó de acuerdo con el diagnóstico final del médico especialista y se basó en los resultados de los exámenes clínicos, de laboratorio y de anatomía patológica. Los pacientes se incluyeron en los grupos de riesgo ó control.

Los criterios de selección para los grupos de riesgo fueron los siguientes:

Para los pacientes con hepatitis B (HBV)

1. Histología de hepatitis crónica.
2. Marcador de HBV positivo el HBsAg.
3. Pruebas bioquímicas anormales.

Pacientes con hepatitis C (HCV)

1. Histología de hepatitis crónica.
2. Marcador de HCV positivo anti HCV.
3. Pruebas bioquímicas anormales.

Pacientes con cirrosis hepática viral (CHV) post-hepatitis

1. Histología de cirrosis hepática.
2. Función hepática anormal.
3. Pruebas bioquímicas anormales.

Pacientes con cirrosis hepática alcohólica (CHA).

1. Antecedentes de alcoholismo crónico, moderado o severo.
2. Histología de cirrosis hepática alcohólica.
3. Función hepática anormal.
4. Marcadores HBV y HCV negativos.

Los criterios de selección para los grupos control fueron:

Pacientes con insuficiencia renal (IR) crónica terminal.

1. Bioquímica de insuficiencia renal (urea y creatinina).
2. Fase sustitutiva (hemodiálisis o diálisis peritoneal crónica).
3. Marcadores virales negativos.

Enfermedad crónica no hepática (ECNH) e individuos sanos (S).

1. Función hepática normal.
2. Pruebas serológicas normales.

2.2 Tamaño de muestra

Se invitaron a participar al estudio a 223 pacientes de los cuales 210 llenaron los requisitos antes mencionados, se conformaron 7 grupos de estudio (4 grupos de riesgo y 3 grupos control) con 30 individuos cada uno y con un total de 210 individuos. El tamaño de muestra fue el mínimo para que a pesar de que una variable numérica no tuviera distribución normal en su población, los promedios de muestra de 30, sí tuvieran distribución cercana a la normal y las pruebas paramétricas de F, la t y otras fueran válidas.

2.3 Recolección y procesamiento de las muestras.

Se recibieron y procesaron las muestras de orina de 24 horas y se les aplicó el cuestionario de alimentos a los pacientes incluyendo a los sanos del Laboratorio de Hepatitis del INNSZ y del Laboratorio de Inmunología del HI CMR según el caso.

Se estudiaron 210 pacientes incluyendo los individuos sanos, de los cuales 198 pacientes fueron seleccionados de la consulta de Gastroenterología del INNSZ se incluyeron 12 pacientes de la consulta de hígado del HI CMR. Se recibió la orina de 24 horas y a todos se les aplicó el cuestionario de alimentos.

A las orinas homogeneizadas se les midió el volumen excretado en 24 horas y de la muestra se tomó una alícuota para la determinación colorimétrica de creatinina por el Método de Jaffé (kit de creatinina de Laboratorios Lakeside), con objeto de

conocer la excreción de AF por mg de creatinina (Cr), para medir la función renal.

La creatinina es el anhidrido de la creatina que a su vez proviene de un aminoácido que es la arginina. La creatinina es un producto de su desintegración de la creatina. La edad, sexo y cantidad de creatinina excretada por una persona en 24 horas es constante de día a día. El coeficiente de Cr es un índice fidedigno en la recolección de la orina y corrige diferencias entre individuos (Harper, 1971).

El resto de la orina se ajustó a un pH de 5.0, y se pasaron 25 mL a través de las columnas Sep-Pak C₁₈ activados (Waters ASS, Milford) para concentrar, limpiar y transportar la orina recogida del laboratorio de Gastroenterología del INN-SZ, al laboratorio de micotoxinas del Departamento de Botánica UNAM, donde se purificaron con columnas de inmunoafinidad (Biocode) se diluyeron 1:10 en PBS y se eluyeron con metanol al 80%, se secaron y redisolviéron en 500 μ L de PBS; después se tomaron 20 μ L y se disolvieron con 480 μ L de PBS (dilución 1:25 para tener la concentración original de la orina de cada paciente). Las muestras se trabajaron por triplicado y se preservaron a -20 °C hasta su análisis.

3. Métodos químicos.

Desde hace 30 años se han aplicado métodos analíticos para la cuantificación de AF y sus metabolitos en muestras biológicas, estas técnicas incluyen métodos tales como la TLC, HPLC y ensayos inmunológicos ELISA con la utilización de Ac monoclonales. Cada uno de estos métodos tiene sus características de especificidad y sensibilidad, para la medición de metabolitos de AF, en comparación con los métodos cromatográficos que tienen la fuerza o potencia para resolver la mezcla de metabolitos de AF dentro de compuestos de resolución individual y no introducen interferencia química.

3.1 Cromatografía de capa fina (TLC).

Para conocer el tiempo de exposición del cloro gaseoso para la formación del derivado de AFB₁-Cl fue necesario utilizar la TLC. Como soporte se usó una placa de sílica gel. Como sistema de solvente se utilizó la mezcla de diclorometano - acetona 19:1, el tiempo de corrimiento fue de 20 min. Las bandas fueron visualizadas con una lámpara de luz UV.

3.2 Cromatografía de líquidos (HPLC).

En las muestras de orina de 24 horas de los grupos de riesgo y control se cuantificó la presencia de AFB₁ libre, sus metabolitos (AFM₁ y AFP₁) y el aductos AFB₁-N⁷-Gua por espectrofotometría y por HPLC, según la siguiente metodología:

3.2.1 Equipo y material

- Cromatógrafo de líquidos con sistema de inyección de solventes (bomba) Series 400 y loop de 20 μ L (Perkin Elmer).
- Columna de HPLC C-18 fase reversa, Prodigy 5 ODS-2 Phenomenex (25 x 0.460 cms)
- Integrador de datos LCI-100 (Perkin Elmer).
- Detector de fluorescencia (Perkin Elmer).

3.2.2. Patrones de aflatoxinas

Los estándares de AFM₁, AFP₁, AFB₁, utilizados fueron de la marca Sigma Chemical Co. (St. Louis MO) y el estándar del aducto AFB-N⁷-Gua fue sintetizado en el Instituto de Biología, UNAM, según técnica conocida (Martin & Garner, 1977) modificada por Harrison *et al.*, 1993.

3.2.3. Condiciones de análisis

Fase móvil:

Su preparación se requirió para medir los aductos de AFB-N⁷-Gua y estándares de AFB₁, AFM₁, y AFP₁. Se usó agua bidestilada y filtrada con membrana Millipore de 0.2 μ . Los solventes orgánicos fueron grado HPLC, se desgasificaron y filtraron.

Se hizo un gradiente metanol/agua para obtener una buena separación del aducto y las diferentes AF (AFB₁ y sus metabolitos), se usó 30% de metanol por 5 minutos y después un gradiente lineal por 30 minutos hasta tener 100% de metanol durante 10 minutos. Para sistema isocrático de elución temprana se utilizó una mezcla 60 % de metanol y 40 % de agua. Estos solventes se desgasificaron por agitación y aplicación de vacío. La velocidad de flujo fue 1 mL/min. Se utilizaron filtros de interferencia para una longitud de onda de 418 nm y de emisión de 700 nm.

3.2.4. Preparación de las muestras

Las muestras de orina de 24 horas fueron previamente concentradas en columnas de Sep-pak C¹⁸, se eluyeron y aplicaron a las columnas de inmunoafinidad, y los metabolitos y aductos de AF se separaron y cuantificaron por HPLC de fase reversa.

3.2.5. Cuantificación de las muestras.

Las muestras fueron solubles en la fase móvil en todas las concentraciones empleadas y se pasaron previamente por un filtro Millipore de 1 μ para asegurar su limpieza de materia sólida. Si la muestra tenía una concentración inaceptablemente alta, se realizaron diluciones que se tomaron en cuenta en la concentración final. En todos los casos se utilizó una precolumna para proteger la columna principal.

3.2.6. Determinación de la curva de calibración.

Se realizó la curva de calibración para cada una de las AF (AFB₁, AFM₁, AFP₁) y el aducto (AFB-N⁷-Gua). Se cuantificaron cinco diluciones para obtener la curva de calibración de cada AF y del aducto. Se hicieron tres repeticiones de cada dilución y se graficaron las curvas. Se calcularon los valores de la ordenada al origen y la pendiente, se aplicó una regresión lineal y se calculó su coeficiente de correlación. Que corresponde a la ecuación de la recta siguiente:

$$y = a + bx$$

Donde: y = Valor del área del cromatograma (variable dependiente).
 a = Ordenada al origen.
 b = Pendiente de la recta.
 x = Valor de la concentración de AFB₁ (variable independiente).

4. Técnica inmunoenzimática de ELISA.

4.1 Síntesis de aductos.

4.1.1 Síntesis del aducto AFB₁ con ADN.

- 1) La síntesis de AFB₁-N⁷-Gua se realizó siguiendo el método de Martín y Garner, (1977), modificado por Harrison *et al.* (1993). Este aducto se requiere para utilizarlo como estándar en la técnica de ELISA y para HPLC. Se trabajó en un laboratorio alto riesgo con todas las medidas de precaución posibles para evitar accidentes fatales. Se mezclaron 10 µL de AFB₁ con 990 µL de etanol para la primera de varias diluciones, en la proporción 1:100 y se leyó en un espectrofotómetro (Perkin Elmer) a una absorbancia de 250-450 nm como límites mínimo y máximo de calibración, registrando la absorbancia a 362 nm y se hicieron los cálculos de la concentración con el coeficiente de extinción molar y el peso molecular.
- 2) Se disolvieron 750 µg/mL de AFB₁ en 4 mL de diclorometano (DMC).
- 3) Se disolvieron 1.5 mg de ácido cloroperoxibenzoico (Sigma) en 2 mL de DMC, y a esta mezcla se le añadió la solución de AFB₁ anterior.
- 4) Se disolvieron 10 mg de ADN de timo de ternera (Calf thymus DNA de Sigma) en 8 mL de 20 mM de buffer de fosfatos de sodio. Se añadió esta solución a la de AFB₁ y se mantuvo en agitación y oscuridad por toda la noche.
- 5) Se removió la AFB₁ no ligada por centrifugación extrayendo 3 veces con cloroformo.

- 6) Se tomó la fase acuosa y se añadieron 200 μL de NaCl 5 M y 6 mL de etanol helado y se dejó a -20°C por toda la noche.
- 7) Se centrifugó a 2600 rpm por 15 minutos y se decantó el etanol, se lavó con etanol helado y después con etanol-acetona (1:1), finalmente con acetona pura. Cuando no estuvo bien precipitado se usó etanol al 70% para formar el pellet. Se secó el pellet sin acetona, bajo vacío por 15 minutos.
- 8) Se redisolvió el pellet con 5 mL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 15 mM, bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 30 mM, para abrir el anillo de lactona de la AF hacia una forma estable. Se incubó a 37°C por 2 horas.
- 9) Se añadieron 500 μL de NaCl 5 M con 15 mL de etanol helado y se dejó a -90°C por 45 minutos.
- 10) Se secó al vacío completamente, hasta que quedó como un gis. Se redisolvió en 2 mL de NaCl 15 mM/Citrato trisódico 1.5 mM. Se midió la absorbancia con UV usando el control, y ambos a 260 nm.
- 11) Para conocer su pureza, se realizó una electroforesis en agarosa. Se utilizó un gel de agarosa al 1 %, el buffer de corrida fue tris-acetato + 5 μL de bromuro de etidio (10 mg/mL). El estándar de ADN linfocitario (INOR) y las diferentes concentraciones de ADN problema se aplicaron con 4 μL de bromofenol, con 100 volts por 35 minutos. Posteriormente, se visualizaron las bandas en un Transiluminador (Farmacia).
- 12) El ADN fue sometido a una hidrólisis ácida con HCl 0.15 M durante 15 minutos a 90°C (Groopman *et al.*, 1982). El hidrolizado se puso en hielo y se neutralizó con acetato de K 1M pH 5.0 e hidróxido de K 1N posteriormente se aplicó a una columna Sep-pak C_{18} activada (Waters Associates, Inc., Milford). Se lavó la columna con metanol al 10 % para eliminar el ADN no hidrolizado y otros compuestos polares, se eluyó con metanol al 80 % y se liberaron los derivados de la AF. Se eliminó el metanol por rotavapor, se disolvió con metanol al 20 %, la muestra fue inyectada en el HPLC y fue monitoreada con un detector de fluorescencia.
Se utilizó un sistema isocrático y por gradiente.

4.1.2 Síntesis del aducto $\text{AFB}_1\text{-Cl-Ovalbúmina}$ ($\text{AFB}_1\text{-Cl-Ov}$).

- 1) Se disolvieron 2 mg de AFB_1 en los 900 μL de DCM.
- 2) Se sintetizó el aducto $\text{AFB}_1\text{-Cl-DCM}$ con cloro gaseoso hasta la formación del derivado clorado de $\text{AFB}_1\text{-Cl}$. Se realizó una TLC.

- 3) Al vial con AFB₁-Cl se le añadieron 250 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO).
- 4) Se mezclaron 10 mg ovalbúmina (Ov) en 2 mL de buffer de fosfatos (PBS).
- 5) Se añadió la ovalbúmina al vial que contenía al derivado AFB₁-Cl, + 2 μ L de NaOH 5M. Se agitó durante 2 horas en la oscuridad.
- 6) La mitad del contenido del vial se purificó por columna de Sephadex G 25 de 25 cm. La otra mitad se dializó.
- 7) Con el aducto de AFB₁-Cl-Ov se recubrieron las placas de ELISA.

4.2 Evaluación del tipo de placa.

Para optimizar nuestro sistema se evaluaron, con la concentración óptima de de aducto de recubrimiento y, en forma simultánea se probaron 5 diferentes placas de ELISA marcas: Flow, Costar (de baja y de alta adherencia), Nunc polysorp (para cultivo de tejidos) y Maxisorp (de Nunc para ELISA) de diferente adherencia. Las placas se sometieron a las mismas condiciones de incubación, de lavado, con los mismos reactivos y se conservaron almacenadas a 4 °C.

4.3 Evaluación del recubrimiento de las placas.

Para cada nuevo lote de AFB₁-Cl-Ov (sintetizada en el IB-UNAM) se estandarizó la concentración adecuada, para el recubrimiento.

El recubrimiento con el AFB₁-Cl-Ov se ajustó a una concentración de 50 μ g/mL y de ella se probaron diferentes diluciones del aducto AFB₁-Cl-Ov (2.5, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 ng/pozo). Otros factores determinantes de esta prueba fueron las concentraciones del Ac monoclonal anti-AF y el segundo Ac ya sea anti-conejo o anti-ratón acoplado a peroxidasa.

4.4 Evaluación de las diluciones óptimas de los Ac anti-AFB₁ y de los conjugados peroxidasa.

Se evaluaron las diluciones 1:100, 1:200, 1:300, 1:500, 1:1000 y 1:1500 del Ac policlonal y de 2 Ac monoclonales (de cultivo celular y purificado) de anti-AFB y de los conjugados peroxidasa anti-conejo y anti-ratón correspondientes en diluciones de 1:400, 1:500, 1:600, 1:800, 1:1000 y 1:1500.

El Ac policlonal usado en nuestro sistema fue producido contra un aducto AFB₁-hemocianina, el esquema de inmunización y evaluación fue descrito en detalle por Escobar *et al.*, 1990. El Ac monoclonal, en medio de cultivo celular o bien purificado fue de Biocode, que reconoce a las AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, sus metabolitos AFM₁, AFM₂ y AFP₁ y a un epítopo presente en el aducto AFB-N⁷-Gua, esto hace posible su uso en la estandarización del ELISA inhibitorio.

Con objeto de comparar la eficacia de dos diferentes presentaciones del Ac

monoclonal se hicieron pruebas a seis diluciones del AFB₁ (500 ng, 100 ng, 10 ng y 1 ng). Las 2 presentaciones de Ac monoclonal fueron directamente de cultivo celular y otro purificado de éste con Sephadex y obtenidos de Biocode. Se usaron las mismas 6 diluciones (1:100, 1:200, 1:300, 1:500, 1:1000 y 1:1500) para las dos presentaciones del Ac monoclonal.

4.5 Técnica ELISA inhibitoria

- 1) Las placas fueron recubiertas con 50 μ L/pozo de una concentración del aducto AFB₁-Cl-Ov previamente sintetizada (10 ng/pozo), se incubaron a 37 °C toda la noche. Al día siguiente se lavaron 4 veces con buffer A de lavado, se secaron y se refrigeraron hasta su uso.
- 2) Las placas se bloquearon con 200 μ L de ovalbúmina al 3 % p/v en PBS, por pozo, y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron.
- 3) Se aplicaron los estándares de AFB₁ y el aducto por triplicado en 7 diferentes diluciones (1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/mL) y los controles.
- 4) Se aplicaron 50 μ L de las muestras de orina.
- 5) Se añadieron 50 μ L de anti-AFB₁ monoclonal (de cultivo y purificado) en una dilución previamente determinada 1/300 y 1/1000 respectivamente. Las placas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron.
- 6) Se aplicaron 50 μ L de conjugado peroxidasa anti-conejo ó anti-ratón (Sigma), según el experimento. Posteriormente, las placas fueron incubadas 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron.
- 7) Se añadieron 50 μ L por pozo de sustrato formado por la mezcla (25 mL de buffer C + 5 μ L H₂O₂ + 250 μ L tetrametilbenzidina (TMB). Las placas se incubaron a temperatura ambiente.
- 8) La reacción se paró añadiendo 50 μ L por pozo de ácido sulfúrico al 20%.
- 9) La absorbancia se determinó a 450 nm, utilizando un lector de placas automático Labsystem Multiskan MCC/340. Ver el diagrama de flujo en la Figura 11.
- 10) Se calcularon las medias y las desviaciones estándar de las absorbancias, coeficiente de variación (CV) y el % de inhibición (% Inh) de cada punto de la curva. Si algún punto de la curva presentaba un CV por encima de 12 %, se repitió la determinación. El % de inhibición se obtuvo considerando la media de la absorbancia de cada diluciones del Ag (1 a n).

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\bar{X} - X_n}{\bar{X}} \times 100$$

Donde (\bar{X}) es la media de la absorbancia del control positivo.

- 11) Se realizó una gráfica de % Inh contra concentración de Ag. El porcentaje de cada punto de la curva debía aumentar con el incremento de la concentración del estándar donde el máximo punto de la curva tuvo como mínimo un 50 % de inhibición con respecto al cero de la curva.
- 12) El cálculo de excreción diaria de AF se expresó en mg de creatinina (AF/mg cr), para controlar el factor dilución de la orina y hacer posible la comparación entre poblaciones e individuos.

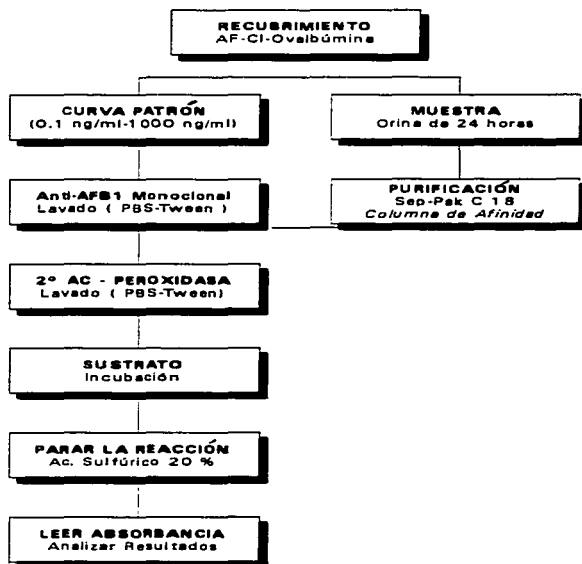


Figura 11: Diagrama de flujo del método de ELISA.

4.6 Validación del sistema inmunoenzimático

Para evaluar las características del sistema se analizaron los siguientes parámetros de calidad: Concentración mínima detectable del sistema, exactitud y precisión.

4.6.1 Exactitud:

Se analizó el porcentaje de recuperación y se seleccionó para ello una mezcla de orinas normales, al cual se le determinó la concentración de AF. A esta mezcla de orina se adicionaron 3 cantidades crecientes de AF y se evaluaron sus concentraciones. El porcentaje de recuperación se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{[\text{AF}] \text{ recuperada} - [\text{AF}] \text{ de la muestra}}{[\text{AF} \text{ añadida}]} \times 100$$

4.6.2. Precisión:

Para el coeficiente de variación intra-ensayo e inter-ensayo se seleccionó una mezcla de orinas normales a las cuales se les añadieron 3 concentraciones diferentes de AF que cubrieran el rango de medición de la curva y que tuvieran valores aproximados al 20, 40 y 60 % de inhibición. Se evaluaron 180 determinaciones realizadas en un mismo experimento para medir el coeficiente de variación intra-ensayo y 180 determinaciones durante 8 días para medir el coeficiente de variación inter-ensayo.

IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN

1. Análisis estadístico de la encuesta sobre alimentos.

La prueba piloto del cuestionario de alimentos comprobó que las preguntas fueron comprensibles para la población y se recogió la información requerida para nuestro estudio. La información de la encuesta de alimentos fue organizada por frecuencia de ingestión de acuerdo al periodo de las 24 y 48 horas previas y la dieta habitual que va desde el consumo diario al anual. Los alimentos se agruparon según su origen.

Los individuos alcohólicos sufren problemas de conducta, son difíciles de entrevistar y con frecuencia faltaron a las citas concertadas, las desviaciones estándar (DS) para sus consumos de maíz, arroz y lácteos fueron altas en comparación al resto, esto hace confusa su interpretación, por lo que se considera que posiblemente haya sesgo en sus respuestas al interrogatorio. Por esto se realizaron los mismos análisis anteriores omitiendo al grupo de los alcohólicos. Aunque la encuesta de alimentos y su estadística son armas valiosas, no son infalibles y hay que tomarlas con cierta reserva ya que hay sesgos incontrolables como son ligeras fallas en la información dada y de la memoria.

1.1 Análisis de correlaciones.

Se obtuvieron las correlaciones de Pearson entre los consumos de cada tipo de alimento y el logaritmo de AF. Sólo dos coeficientes fueron significativos. El logaritmo de AF coincidió con el consumo de vegetales de 24 a 48 horas previas a la toma de la muestra (c.veg. 24-48), con una correlación de 0.24 y $P = 0.001$; y con el consumo de maíz con correlación 0.17 con $P = 0.021$.

1.2 Análisis de varianza:

En la Tabla 2 se presentan las pruebas estadísticas realizadas para cada variable dependiente, siendo éstas el consumo de cada grupo de alimentos y sus valores de P. Para el análisis de varianza el c. veg. 24-48 incluyendo todos los grupos de enfermedades, fue altamente significativo ($P \leq 0.0004$) y sin CHA ($P \leq 0.0005$). Con respecto al consumo de los productos derivados del maíz, incluyendo todos los grupos fue también altamente significativo ($P \leq 0.001$) y sin CHA fue significativo ($P \leq 0.011$). El consumo de oleaginosas fue significativo ($P \leq 0.014$) y sin CHA fue de ($P \leq 0.019$). Esto significa que los únicos alimentos que se asocian significativamente con las enfermedades son los derivados del maíz, oleaginosas y c.veg. 24-48.

1.3 Prueba de Kruskal Wallis

Para esta prueba, el c.veg. 24-48, fue altamente significativo con una $P \leq 0.0007$, al eliminar el grupo CHA fue también altamente significativo $P \leq 0.0013$. En el caso del maíz fue altamente significativo con una $P \leq 0.0002$. Al eliminar CHA el resultado fue de $P \leq 0.0068$.

Como puede observarse para las oleaginosas se encontraron diferencias

significativas con una $P \leq 0.025$. Sin CHA fue similar. Tabla 2.

Las variables que no presentaron diferencias significativas no se incluyeron en la tabla y fueron los alimentos de origen animal (consumidos 24 y 48 horas previas a la toma de muestra) derivados del trigo y del arroz, los condimentos, los productos cárnicos y lácteos. Se corroboró con una prueba estadísticamente más robusta, que los únicos alimentos que se asocian con los diagnósticos de manera global son c.veg. 24-48, maíz y oleaginosas.

Tabla 2: Resultados estadístico de la encuesta de alimentos.

Pruebas Estadísticas	Variables					
	Consumo de 24 a 48 hrs		Consumo Anual			
	Vegetales *		Maíz		Oleaginosas	
	Valores de P					
	con CHA	sin CHA	con CHA	sin CHA	con CHA	sin CHA
F global	0.0004	0.0005	0.0005	0.011	0.014	0.019
Kruskall-Wallis	0.0007	0.0013	0.0002	0.0068	0.025	0.023

CHA: Cirrosis hepática alcohólica.

a: Se incluyen alimentos vegetales (cereales, oleaginosas, condimentos y sus derivados).

1.4 Prueba de Tukey:

Sólo cuando hubo diferencias significativas en la prueba de F, se realizó la prueba de Tukey. Se mencionan sólo las diferencias entre medias que fueron significativas. En el c.veg. 24-48, Figura 12 A, los pacientes del grupo de hepatitis B viral (HBV) consumieron más raciones, siendo estadísticamente significativos al compararlos con HCV, CHV, IR y S pero no resultó significativo para CHA y ECNH. Al eliminar CHA los resultados no cambiaron (Figura 12 A').

En el consumo del maíz el grupo de CHA difiere significativamente de los grupos control (IR, ECNH y S) y no del resto de riesgo. El HBV difiere significativamente de IR y no del resto de los grupos estudiados (ver Figura 12 B). Eliminado CHA el grupo HBV es diferente del S y de IR (Figura 12 B').

En el caso de las oleaginosas; el grupo de HCV difiere significativamente del grupo HBV y S pero no del resto de los grupos (ver Figura y 12 C). Esto ocurre tanto con CHA como sin él (Figura 12 C').

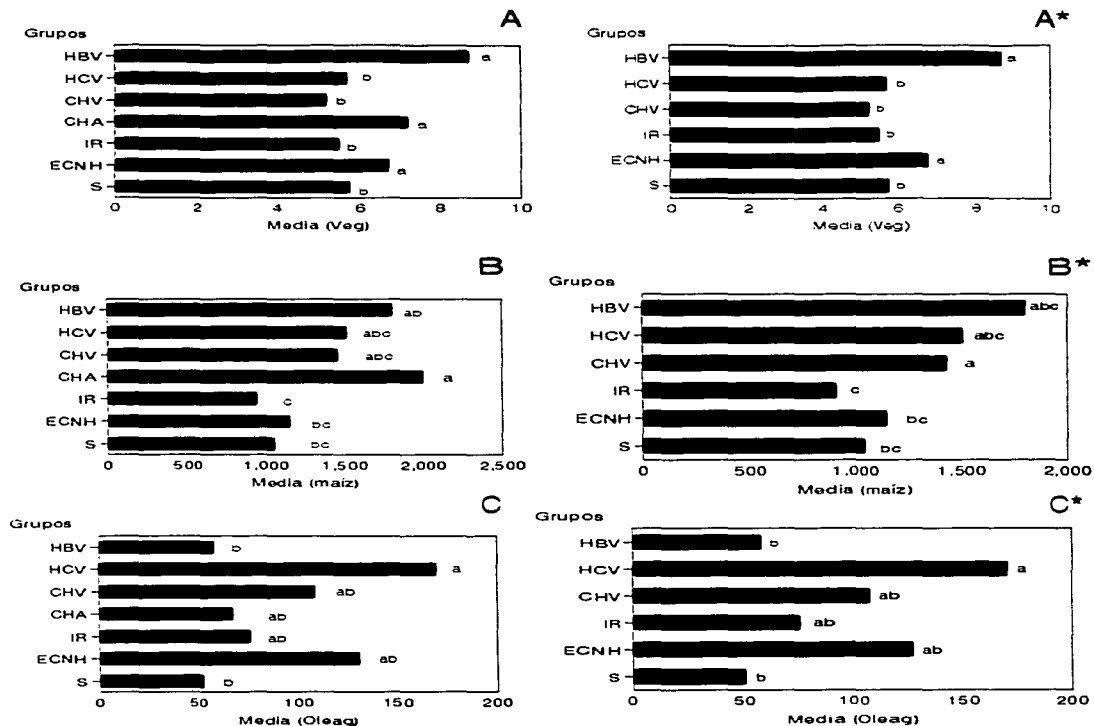


Figura 12: Prueba de Tukey de la encuesta de alimentos. A = Vegetales (de un año), B = Maíz y C = Oleaginosas. Los esquemas A, B y C de la izquierda incluyen al grupo CHA y los esquemas A*, B* y C* de la derecha son equivalentes pero sin incluir al grupo CHA.

1.5 Contrastes

El contraste de padecimientos de origen viral que afectan al hígado y de origen viral contra el resto fue significativo para el consumo animal ($P \leq 0.014$), maíz ($P \leq 0.0005$), condimentos ($P \leq 0.028$) y para el logaritmo de AF ($P \leq 0.0009$). Para este tipo de padecimientos cuando se incluye el grupo de CHA fue tan sólo significativo el logaritmo de AF ($P \leq 0.0002$).

Para los contrastes de los sanos con el resto (CHV, CHA, HBV, HCV, IR, ECNH) resultó significativo únicamente el contraste de lácteos de ($P \leq 0.012$), con menor consumo de lácteos para los sanos. Resultó marginalmente significativo ($P \leq 0.065$) para el consumo de oleaginosas, siendo éste menor en el grupo de sanos que en el resto. Cuando se incluyó CHA fue significativo sólo para los lácteos ($P \leq 0.029$).

El contraste que compara la CHV contra las hepatitis C y B sólo resulta significativo ($P \leq 0.005$) para el c.veg. 24-48 horas, siendo menor el consumo en los cirróticos que en los que tienen hepatitis. Ver Tabla 3 de Contrastes.

1.6 Conglomerados.

Se formaron 8 conglomerados de acuerdo al patrón de consumo y se eliminaron 2 de ellos por tener pocas observaciones. Ver Tabla 4 de Conglomerados.

En el análisis por conglomerados tanto anual como de consumo de 24 a 48 horas, se ordenan de mayor a menor consumo de alimentos: maíz, lácteos, trigo, cárnicos, condimentos, arroz, oleaginosas y alcohol.

Tabla 3. Contrastes entre grupos, consumo de alimentos y logaritmo de aflatoxinas.

Análisis de varianza seguido de prueba de contrastes	Valores de P por Variable (Con cirrosis alcohólica)											log AF ^a
	Consumo de 24 a 48 hrs			Consumo Anual								
	Ani	Veg	OH	Maíz	Trig	Arroz	Oleag	Cond	Lac	Car	Alc	
(CHV, CHA, HBV y HCV) vs (IR, ECNH y S)	.014	.524	.155	.032	.390	.810	.139	.105	.288	.651	---	.0002
S vs el resto	.130	.257	.365	.032	.625	.09	.025	.104	.029	.350	---	.0002
Valores de P por Variable (Sin cirrosis alcohólica)												
(CHV, HBV y HCV) vs (IR, ECNH y S)	.014	.211	.159	.0005	.343	.279	.263	.028	.146	.617	.363	.0009
S vs el resto	.106	.368	.528	.109	.620	.184	.065	.139	.012	.368	.689	.500
CHV vs (HBV y HCV)	.463	.005	.159	.400	.773	.477	.874	.528	.785	.225	.787	.558

a: Logaritmo de aflatoxina.

CHV = Cirrosis hepática viral

HBV = Hepatitis B viral

HCV = Hepatitis C viral

IR = Insuficiencia renal

ECNH = Enfermos crónicos no hepáticos

CHA = Cirrosis alcohólica

S = Sanos

Tabla 4. Conglomerados por consumo de alimentos.

Conglomerados	Promedios de raciones consumidas.											
	Nº de pacientes	Consumo de 24-48 hrs			Consumo anual							
		Ani	Veg	OH	Maíz	Trigo	Arroz	Oleag	Espicias	Lácteos	Cárnicos	OH
1	69	2.1	6.1	0	1105.7	625.8	162.4	46.9	187.8	613.7	353.7	0
2	45	4.6	4.7	0	1205.6	381.0	126.6	51.6	177.2	609.8	459.9	0.5
3	11	3.7	13	0	2929.0	412.9	316.6	69.8	169.0	1310.3	387.6	0
5	8	1.7	7.7	0	2887.7	497.5	184.2	92.1	409.5	664.2	317.3	91.5
7	15	3.3	5.9	0	1247.4	875.0	190.7	485.6	327.5	1134.8	603.6	1.6
8	22	4.6	6.4	0	1283.0	704.4	163.7	113.6	748.4	1324.2	713.5	2.1

Ani = Comprende productos cárnicos, lácteos y derivados.

Veg = Productos vegetales en general.

OH = Alcohol ingerido las últimas 24-48 hrs.

Maíz, trigo y arroz = Cereales mencionados y sus derivados.

Oleag = Oleaginosas.

Cond = Condimentos y especias.

Lác = Lácteos y sus derivados.

Cár = Productos cárnicos y sus derivados.

Alc = Alcohol anual.

1.6.1 Análisis de correspondencia

Se hizo el análisis de correspondencia (método para asociar dos variables categóricas) entre conglomerados y diagnósticos. El conglomerado 3 que se caracterizó por alto consumo de vegetales totales (Veg), maíz, arroz y lácteos (Lác) y bajo en trigo (Trig), oleaginosas (Oleag) y condimentos (Con) se asocia con HBV. El conglomerado 7 que se caracterizó por consumo alto de trigo, especias, lácteos y oleaginosas, e intermedio en el resto; se asocia con HCV. El conglomerado 1 con consumo intermedio de todos los alimentos se asocia con el grupo control (Sano). Los demás conglomerados no se asociaron claramente con los otros diagnósticos, por eso no se mencionan. La Figura 13 muestra el análisis de correspondencia y la Tabla 5 la caracterización de conglomerados y patrón de consumo.

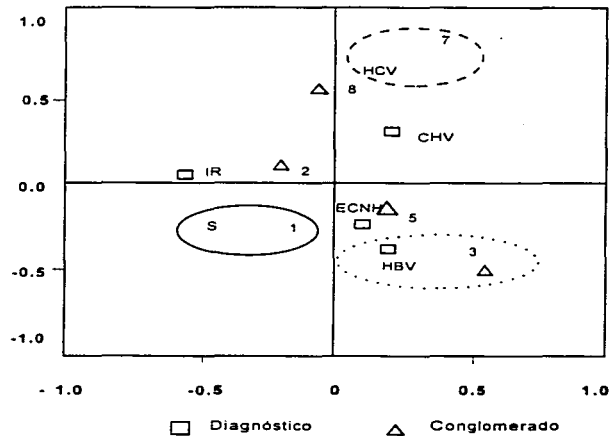


Figura 13. Análisis de correspondencia.

- CHV = Cirrosis hepática viral
- HBV = Hepatitis B viral
- HCV = Hepatitis C viral
- IR = Insuficiencia renal
- ECNH = Enfermos crónicos no hepáticos
- CHA = Cirrosis alcohólica
- S = Sanos

Tabla 5. Caracterización de conglomerados y sus correspondencias más claras, con los diagnósticos.

Conglomerados y correspondencias	Tipo de Alimento y Patrón de consumo	
	Consumo alto	Consumo bajo
1 (Sanos)	Consumo medio	
2	Productos animales y derivados de 24 a 48 horas.	Productos vegetales de 24 a 48 horas. Trigo, arroz, oleaginosas, lácteos y condimentos/especias anuales.
3 (HBV)	Vegetales de 24 a 48 horas. Maíz, arroz y lácteos anuales.	Trigo, oleaginosas y condimentos/especias anuales.
5	Maíz, condimentos/especias y alcohol anuales.	Productos animales de 24 a 48 horas. Lácteos anuales.
7 (HCV)	Trigo y oleaginosas anuales.	Consumo medio de alimentos.
8	Productos animales y vegetales de 24 a 48 horas. Trigo, condimentos/especias, lácteos y cárnicos anuales.	Consumo medio de alimentos.

Diagnósticos y conglomerados ubicados cercanamente y alejados del origen, se consideran asociados

1.7 Análisis discriminante.

Se realizó un análisis discriminante con selección de variables, para caracterizar los seis grupos de enfermedades (incluyendo los sanos y excluyendo CHA) (Tabla 6) tienen poder discriminante sólo 6 variables de consumo ($P \leq 0.00025$) que son: veg. 24-48, oleaginosas (oleag), maíz, condimentos (cond.), lácteos (lác) y cárnicos (cár.). No tuvieron poder discriminante los que no se asocian con las enfermedades y fueron los consumos de productos animales (24-48 horas) y el trigo, arroz y alcohol anuales. Hay que considerar que el alcohol no resultó significativo porque en este análisis no se incluyó al grupo CHA.

Con el análisis discriminante se compararon por parejas todos los padecimientos, para valorar si existían diferencias en el patrón de consumo de alimentos; así se obtuvieron los valores de P , para estas comparaciones de la Tabla 6.

Así podemos señalar las diferencias significativas al 5 % entre grupos con base en su consumo: c.veg 24-48, oleaginosas, maíz, condimentos y cárnicos consumidos de 24-48 hrs. Tabla 7.

El grupo HBV fue diferente del resto. Son iguales estadísticamente: CHV, ECNH, IR y S y también: HCV, CHV, IR y S.

Los coeficientes de las funciones discriminantes estandarizadas están en la Tabla 8, las dos primeras funciones explican un 74.58 % de las variaciones entre los grupos.

Tabla 6: Análisis Discriminante.

Análisis Discriminante	Niveles de P					
	Diagnóstico	HBV	HCV	CHV	ECNH	IR
HBV	--	0.0008	0.003	0.009	0.007	0.012
HCV	0.0008	--	0.276	0.043	0.058	.0029
CHV	0.003	0.276	--	0.097	.029	0.077
ECNH	0.009	0.043	0.097	--	0.314	0.160
IR	0.007	0.058	0.290	0.314	--	0.824
S	0.012	0.002	0.077	0.160	0.824	--

HBV = Hepatitis por virus B.

HCV = Hepatitis por virus C.

CHV = Cirrosis hepática viral.

ECNH = Enfermos crónicos no hepáticos.

IR = Insuficiencia renal; **S** = Sanos.

Tabla 7. Grupos de igualdad estadística al 5 % basados en el análisis discriminante.

Enfermedades	Grupos de igualdad estadística al 5%
1. HBV	c
2. HCV	b
3. CHV	a b
4. ECNH	a
5. IR	a b
6. S	a b

HBV = Hepatitis por virus B.

HCV = Hepatitis por virus C.

CHV = Cirrosis hepática viral.

ECNH = Enfermos crónicos no hepáticos.

IR = Insuficiencia renal.

S = Sanos.

Tabla 8. Coeficientes de las Funciones Discriminantes.

Grupos de alimentos y patrón de consumo	Coeficientes estandarizados	
	1º Función discriminante	2º Función discriminante
Vegetal (24 a 48 hrs)	0.815	0.244
Oleaginosas (anual)	0.415	0.214
Maíz (anual)	0.201	0.703
Condimentos (anual)	0.003	0.384
Lácteos (anual)	0.320	0.157
Cárnicos (anual)	0.256	0.104
Eigenvalor	0.168	0.126
Proporción de explicación acumulada	0.425	0.745

Las tendencias de asociación obtenidas del análisis discriminante al determinar que variables son las que discriminan con más claridad a los diagnósticos se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9: Alimentos asociados.

Diagnóstico	Tipos de asociación por alimento y consumo	
	Alto	Bajo
Hepatitis por virus B	De 24-48 hrs: Vegetal.	Anual: Oleaginosas, lácteos, cárnicos y maíz.
Hepatitis por virus C	Anual: Oleaginosas, lácteos, cárnicos, maíz, condimentos/ especias.	De 24-48 hrs: Vegetal.
Cirrosis hepática viral.	Anual: Oleaginosas, lácteos, cárnicos, maíz, condimentos /especias.	De 24-48 hrs: Vegetal.
Enfermedades crónicas no hepáticas	No es marcada la preferencia	
Insuficiencia renal		Ligera en cárnicos, no asociación con otros.
Sanos		No asociación, tendencia a más vegetales.

Para que quede más clara la relación de las enfermedades hepáticas virales (HBV, HCV y CHV) con el control S respecto al consumo de alimentos se hizo un Análisis Discriminante (Correlación canónica) con los consumos de alimentos en raciones (eliminando alcohol) como variables numéricas, con los diagnósticos como variables categóricas.

El grupo cuyo círculo está más cerca del eje de un alimento, consumió más ese alimento. Los alimentos que están en el centro de la Figura 14 (Cárnicos de 24 a 48 horas, trigo, condimentos y productos animales anuales) significa que no presentaron diferencias en el consumo con los diagnósticos. El consumo de oleaginosas, arroz, maíz y vegetales sí tienen una asociación con los diagnósticos de enfermedades hepáticas virales, pero no con el control Sano. La lejanía de un alimento del centro significa más cantidad de raciones consumidas.

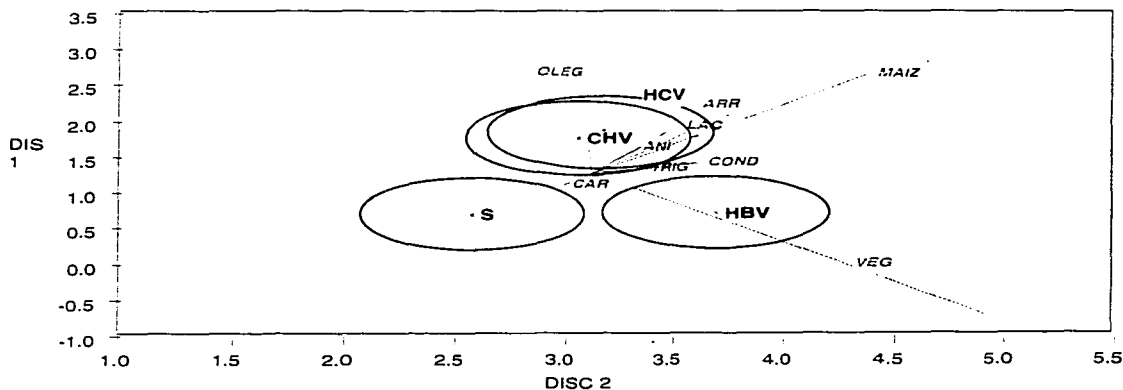


Figura 14: Tendencias de Asociación entre alimentos y los diagnósticos de enfermedades hepáticas virales y el control sano.

Diagnóstico	Promedios de raciones de alimentos consumidos por diagnóstico								
	Consumo de 24-48 hrs		Consumo anual						
	Animal	Vegetal	Maíz	Trigo	Arroz	Oleaginosas	Condimentos	Lácteos	Cárnicos
HBV	3.4	8.8	1823.6	590.5	185.5	56.8	305.8	748.0	387.8
HCV	3.8	5.8	1505.2	583.7	187.2	169.1	354.1	927.8	615.3
CHV	3.9	5.2	1465.5	609.4	212.8	107.6	293.4	868.5	401.7
S	2.9	5.8	1034.6	541.5	144.9	52.2	211.2	582.0	399.5

2. Muestreo y análisis de orina.

2.1 Recolección de muestras.

Se estudiaron 210 pacientes incluyendo los individuos sanos, de los cuales 198 casos fueron seleccionados de la consulta de Gastroenterología del INN-SZ y se incluyeron 12 pacientes de la consulta de hígado del Hospital de Infectología del Centro Médico "La Raza". Se les recepcionó la orina de 24 horas y se les aplicó la encuesta sobre alimentos.

La distribución de ellos se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10. Características de las muestras de orina.

Grupos de riesgo	Nº de pacientes	Sexo: Fem/Masc	Rango de Edad
Hepatitis B	30	11/19	(26-68)
Hepatitis C	30	19/11	(34-64)
Cirrosis viral	30	18/12	(30-72)
Cirrosis OH	30	10/20	(41-74)
Grupos Control	Nº de pacientes	Sexo: Fem/Masc	Rango de Edad
Sin enfermedad hepática	30	19/11	(34-69)
Insuficiencia renal	30	17/13	(35-71)
Sanos	30	15/15	(26-72)
Total	210	109/101	(26-74)

3. Implementación de la técnica inmunoenzimática de ELISA.

La evaluación molecular y el monitoreo de la exposición humana a cancerígenos ambientales, como son las AF, requiere de técnicas sensibles, específicas, accesibles y aplicables a un gran número de muestras.

Este estudio de la exposición humana a AF ha aprovechado las ventajas inherentes de las técnicas de ELISA y HPLC, además se incrementó la selectividad con la utilización de columnas de inmutioafinidad con Ac monoclonales.

3.1 Síntesis de aductos.

Con referencia a la electroforesis realizada al aducto AFB₁-ADN y su hidrolizado, el primero corrió en forma paralela al estándar de ADN, pero se observaron unas

pequeñas bandas de desnaturalización del ADN en la parte inferior, a diferencia del ADN de referencia. Esto fue benéfico pues la hidrolización trae rompimiento del ADN y esto se requiere para ser captado por la columna de inmunoafinidad.

En la síntesis del aducto AFB₁-Cl-Ov, el 100 % de AFB₁ se convirtió a derivado clorado a los 30 min (Figura 15). Simultáneamente se midió la absorbancia del derivado AFB₁-Cl y del aducto AFB₁-Cl-Ov a una longitud de onda de 280, 354 y 410 nm, con una eficiencia del 76 % y una concentración de 1.5 mg/mL. La recuperación molar fue adecuada para utilizarlo como aducto de recubrimiento.

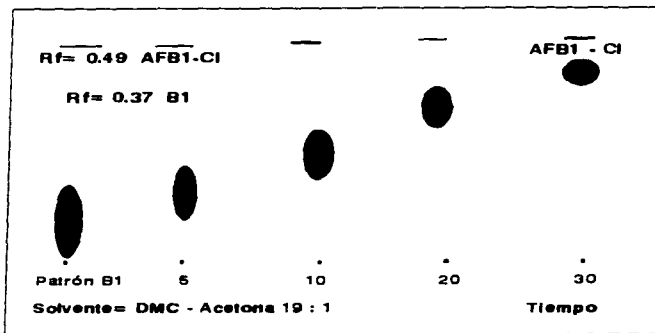


Figura 15: Cromatografía de capa fina del derivado clorado AFB₁-Cl.

Los espectros de absorción obtenidos tanto para la AFB₁, la ovalbúmina y el aducto AFB₁-Cl-Ov son similares a los descritos por Sizaret *et al.*, (1982). Figura 16.

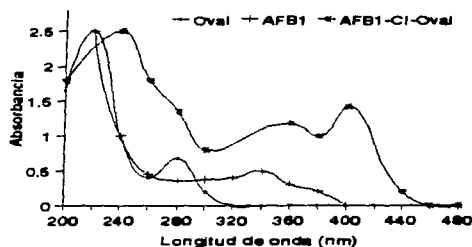


Figura 16: Espectros de absorción de Ovalbúmina, AFB₁ y AFB₁-Cl-Ov.

Ya concluida la síntesis del aducto de recubrimiento se purificó a través de una columna de Sephadex G 25. Se obtuvieron 2 picos cromatográficos, saliendo primero el aducto AFB₁-Cl-Ov en la fracción 6 y 7, y la AFB₁, que no reaccionó salió en la fracción 13 y 14 (Tabla 11).

Tabla 11: Purificación del aducto AFB₁-Cl-Ov (*) por columna de Sephadex 25.

Fracción	Absorbancia	
	280 nm	410 nm
1	0.108	0.041
2	0.084	0.034
3	0.089	0.033
4	0.031	0.013
5	0.283	0.210
6	2.842 *	2.248 *
7	1.486 *	1.188 *
8	0.280	0.195
9	0.070	0.069
10	0.078	0.065
11	0.092	0.104
12	0.217	0.254
13	0.483 **	0.543 **
14	0.438 **	0.525 **
15	0.050	0.034
16	0.077	0.043

* Aducto AFB₁-Cl-Ov. ** AFB₁.

Todo el ADN fue hidrolizado y tuvo una corrida similar a la del ARN lo que se constató por electroforesis (Figura 17).

Para la síntesis del aducto AFB-N⁷-Gua se midió la absorbancia de UV a 260 y 280 nm, usando el blanco a 260 nm, se obtuvo su espectro de 150 nm a 350 nm antes y después de la hidrólisis y también se midió la proteína a 280 nm. Dio como resultado una relación de 1.85, considerada como óptima pureza.

Se usó la HPLC para conocer la pureza y la concentración del aducto AFB₁-ADN después de la hidrólisis ácida. El tiempo de retención del aducto AFB-N⁷-Gua fue de 22 min, la altura de la señal obtenida fue de 7, similar a lo descrito por Croy *et al.*, (1978) y Groopman *et al.*, (1985).

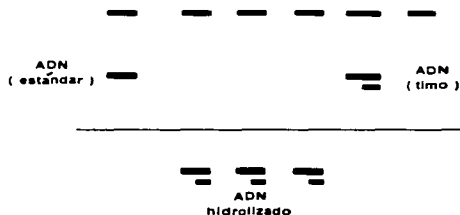


Figura 17: Electroforesis de ADN y de ADN hidrolizado.

El tiempo de retención de las AF con la mezcla de solventes utilizada fue de 10 minutos para AFB₂, 12 min para la AFG₁ y 15 min para la AFB₁. La altura de la señal de la AFB₁ fue de 15.5 cm con un rango de 4 para una concentración de 100 ng/mL. Se aplicaron 20 μ L de muestra a la columna, que dieron una sensibilidad de 2 ng/20 μ Ls con un detector de fluorescencia, y con un detector UV la sensibilidad fue de 45 ng/20 μ L (Figura 18).

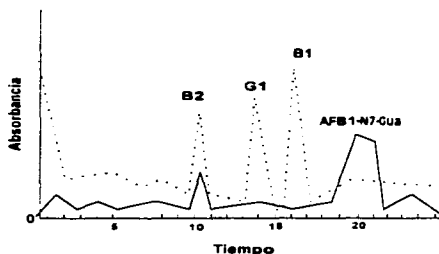


Figura 18: HPLC de hidrolización del ADN que dio al aducto AFB-N₇-Gua, y espectros de los estándares de AFB₂, AFG₁ y AFB₁.

4. Estandarización de la Técnica inmunoenzimática de ELISA.

4.1. Optimización del tipo de placa.

Entre las fases sólidas que se emplean en los ensayos inmunoenzimáticos están: los tubos de poliestireno y las placa de 96 pozos que pueden ser de polivinilo o poliestireno (Chu, 1984), la membrana de nitrocelulosa (Singh & Jang, 1987). Sin embargo, las placas más empleadas son de 96 pozos.

En la Figura 19 se muestra el efecto de los cuatro tipos de placas sobre el % inh. en las concentraciones de 0.1 y 1000 ng de AF/militro (AF/mL). La mayor diferencia entre el % inh. de 0.1 y 1000 ng/mL con respecto al cero (100%) se obtiene con la placa Costar de alta adherencia (Costar HG). Le sigue la placa Nunc Maxisorp (NUNC-MS) con un % inh. de 80 ± 3 % y con la última concentración de 1000 ng/mL su % de inh. fue inferior al 10 %, y con esto se logró un buen desplazamiento. En la Figura 19, se pueden observar las curvas de desplazamiento obtenidas a partir de las placas Costar de baja adherencia (Costar LW) y Flow. Las cantidades de AF que se detectaron con 50 % de inhibición en las curvas obtenidas en las placa Costar de baja adherencia y Flow fueron de 8.5 ± 0.5 y 10 ± 1 ng/mL respectivamente. La HPLC de las AF tuvo un límite de detección de 2 ng cuando se aplicaron 20 μ Ls de muestra.

Con la placa Nunc Polysorp para medio de cultivo (no se muestra en la Figura 19) se obtuvieron porcentajes de unión muy bajos. La pobre adsorción del aducto a la placa se observó cuando la densidad óptica del cero no sobrepasó el valor de 0.45 ± 0.05 .

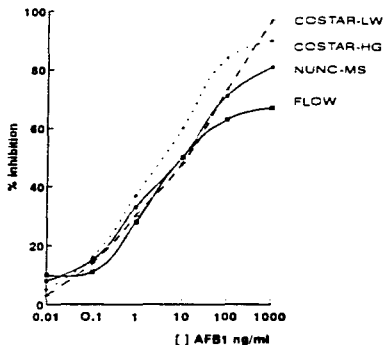


Figura 19: Diferentes marcas de placas de ELISA y tipo de adherencia.

El bajo poder de adsorción puede deberse a las características del plástico. En la placa Nunc Polysorp predominan grupos hidrófobos, mientras en las placas Costar y Nunc Maxisorp, además de los grupos hidrófobos, están los grupos hidrófilos. Esto permite que las placas Costar y Maxisorp presenten un mayor porcentaje de unión con respecto a la Polysorp. No se conocen las especificaciones del fabricante de las placas Flow, pero por los resultados obtenidos es posible que presenten una característica intermedia entre la Nunc Polysorp y la Nunc Maxisorp. Las placas Costar y Maxisorp son de poliestireno y este material de placa muestra la más baja coloración de fondo y esto aumenta la diferencia entre la señal y el fondo. La placa de elección para este estudio fue la Costar HG.

4.2. Evaluación del recubrimiento de las placas.

Para seleccionar la máxima señal de concentración de 1000 ng/mL del Ag se realizó una titulación cruzada de los reactantes, las condiciones óptimas fueron de 10 ng/pozo (200 ng/mL) para el recubrimiento y una dilución de 1:1000 para el conjugado peroxidasa.

La curva describe un ángulo de 45° con un recubrimiento de 10 ng/pozo. La Figura 20 corresponde a las concentraciones de los componentes del sistema. Las 6 diluciones del estándar de AFB₁ muestran un comportamiento similar según el intervalo de concentración de 0.01 a 1000 ng.

Al recubrir con la concentración de 10 ng/pozo; no se forman multicapas que puedan ser desprendidas ni uniones univalentes que por impedimento esteárico hagan más débil la interacción antígeno-anticuerpo.

La concentración de 200 ng/mL de AFB₁-Cl-Ov es indispensable para obtener una señal de cerca de 1.080 de absorbancia, a mayores concentraciones de recubrimiento (0.8 y 1 µg/mL) el sistema se hace independiente para las diluciones del Ac.

4.3. Evaluación de la dilución de los Ac policlonal y monoclonal y de los conjugados de peroxidasa correspondientes.

Muchos métodos analíticos como las técnicas inmunológicas y cromatográficas se han desarrollado para la cuantificación de AF y sus metabolitos en alimentos y en diversas muestras biológicas.

Para el montaje de la técnica inmunoenzimática ELISA se utilizaron dos tipos de Ac uno policlonal y otro monoclonal para cuantificar los metabolitos de AF. Para la purificación de las muestras se utilizaron columnas de Sep-pak C₁₈ y para concentrar las AF columnas de inmunoafinidad.

La Figura 21 *a*, trata de la titulación de la anti-AFB₁ policlonal y la Figura 21 *b* de la dilución óptima del conjugado de peroxidasa anti-conejo que fue de 1:1000. Se logró un buen desplazamiento de la curva a esa dilución.

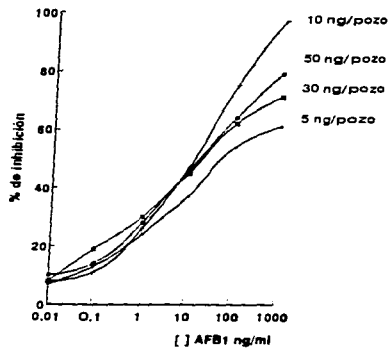


Figura 20. Concentraciones del aducto AFB₁-Cl-Ov de recubrimiento.

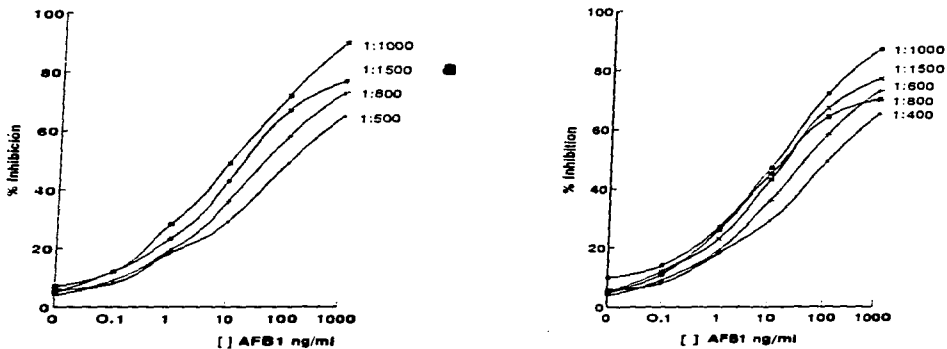


Figura 21: *a.* Titulación del Ac policlonal (anti-AFB₁).
b. Titulación del segundo Ac (conjugado de peroxidasa anti-conejo).

En la Figura 22 **a** se muestra la titulación del Ac monoclonal (de cultivo celular) y la dilución óptima de 1/300 de acuerdo al mejor desplazamiento de la curva y la mejor concentración para el conjugado peroxidasa anti-ratón fue de 1:1000 (Figura 22 **b**), se aprecia que disminuyó la pendiente a menor concentración del conjugado unido a la molécula del primer Ac y la señal de extinción medida fue asintótica.

Las curvas se analizaron mediante un sistema de regresión logarítmica, se determinó que el intercepto fue de 1.03 con una pendiente de 0.10 para la curva patrón de (0.01 ng/mL a 1000 ng/mL).

El Ac monoclonal reconoció a las AFB₁, AFM₁, AFP₁, AFB₁-Cl-Ov y al aducto de AFB-N⁷-Gua lo cual es básico en este ensayo, cuyo objetivo fue medir la exposición del paciente a la AFB₁ a través de sus metabolitos en orina.

El desarrollo del ELISA para la determinación de AF tipo B en orina fue reportado por Wild *et al.*, (1987), obtuvo curvas de calibración del Ac con un rango lineal entre 0.01 y 10 ng/ml que detectaron 0.17 ng/mL dando 50 % de inh. Con respecto a este estudio, nuestro sistema dió mayor % de inhibición.

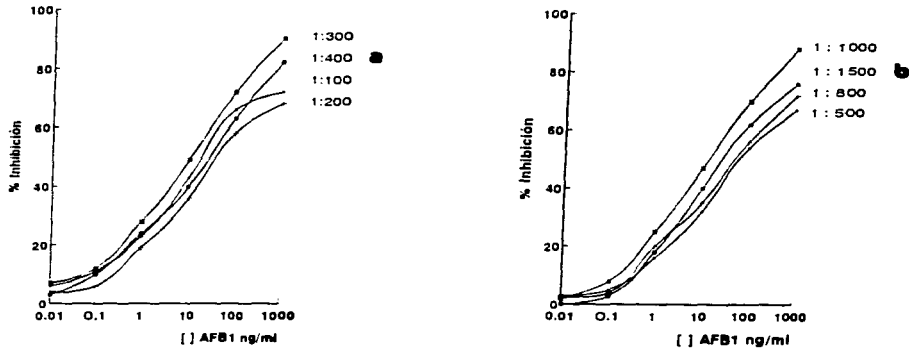


Figura 22: **a.** Titulación del Ac monoclonal (anti-AFB₁).
b. Titulación del segundo Ac (conjugado de peroxidasa anti-ratón).

4.4 Evaluación del Ac monoclonal

Se contó con 2 presentaciones del Ac monoclonal (Biocode) una de cultivo celular y otra purificada, con objeto de establecer cuál se utilizará en el análisis de ELISA de las muestras. Las diluciones óptimas fueron 1/1000 para el purificado y 1/300 para el de cultivo celular y los mejores resultados de las absorbancias y del % de inh. a la mitad de la curva estándar (que corresponde a un 50%) lo dió el Ac monoclonal de cultivo celular. Tabla 12.

Tabla 12: Comparación entre la eficacia de los Ac monoclonales anti-AF y el conjugado anti-ratón peroxidasa por ELISA.

Monoclonal	Con conjugado peroxidasa anti-ratón 1/1000		Control sin anti-ratón (X)	Coeficiente de variación
	Concentración de estándar de AFB ₁	Media de Absorbancia de 3 repeticiones		
Purificado 1/1000	500 ng	0.317		4.505
	100 ng	0.472		6.492
	10 ng	0.784		5.996
	1 ng	0.871		8.086
	--	0.194	X	6.696
De cultivo 1/300	500 ng	0.198		4.361
	100 ng	0.405		9.682
	10 ng	0.769		2.582
	1 ng	0.993		8.067
	--	0.130	X	7.122
Control sin monoclonal	--	0.118		6.169
	--	0.117		3.419

4.5 Curvas estándar de AFB₁-ADN y de AFB₁ libre.

La linealidad es otro parámetro para evaluar el efecto que pueden provocar tanto el poliestireno como el recubrimiento en la optimización de las curvas estándar de AFB₁-ADN y de AFB₁ libre. En la Figura 23 se muestra el rango lineal de la curva de calibración obtenida en orina con los aductos desarrollados. El mejor coeficiente de correlación (r) se obtuvo hasta 50 ng/mL con una r de 0.996, una ecuación con intersección 6.5 y una pendiente de 9.14. En todo el rango de la curva analizada se observan correlaciones por encima de 0.95, lo que nos indica que valores por debajo de 0.05 ng/mL o superiores a 550 ng/mL corresponden a los extremos de la curva.

Estos puntos son muy variables debido, a que la curva es una senoide (Figura 23). El perfil de precisión muestra que en los extremos de la curva están las mayores variaciones, destacándose además que para concentraciones superiores a 1 000 ng/mL el sistema de medición se satura. Se seleccionó la concentración 1000 ng/mL como límite superior con un 94 % de inhibición de la curva establecida.

Los resultados del perfil de precisión nos indican que con un CV < 10 %, el rango lineal de la curva está entre 0.1 y 500 µg/mL. Estos resultados son similares a los obtenidos en el desarrollo del ELISA para la determinación del aducto AFB₁-N⁷-Gua.

La coincidencia de resultados en su linealidad y el perfil de precisión con los obtenidos en la determinación de AFB₁, se debe a que el Ac monoclonal tiene similar afinidad para ambos (AFB₁ y el aducto AFB-N⁷-Gua).

Comparado con otros métodos, el ELISA es muy sensible y de elevada reproducibilidad, su sensibilidad depende en gran medida de la calidad y estructura del conjugado y de la enzima utilizada, además su instrumentación es simple y el método puede automatizarse (Gosling, 1990).

El Ac monoclonal, en ELISA, reconoció y cuantificó tanto a la AFB₁ libre como a sus metabolitos y aducto (AFB-N⁷-Gua); por lo que fue necesario realizar el análisis por HPLC para separar, identificar y cuantificar el aducto y los metabolitos de la AFB₁, que son AFP₁ y AFM₁, (Figura 23).

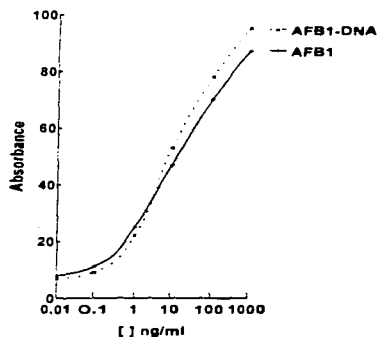


Figura 23: Curvas estándar de la AFB₁ y aducto AFB-N⁷-Gua.

4.6 Sensibilidad y límite de detección.

La sensibilidad y el límite de detección de un ensayo inmunoenzimático se determinaron a través de una curva de calibración entre la densidad óptica y el logaritmo de la concentración del analito. El perfil de precisión de la curva de calibración de los reactivos presentaron un intervalo lineal entre 0.1 y 500 ng/mL, una sensibilidad de 0.01 y un límite de detección de 0.01 ng/mL (10 pg por pozo), Figura 23. Estos datos coinciden con Wilkinson *et al.* (1989) y Stubblefield *et al.* (1991)

Estos últimos autores modificaron un juego de reactivos inmunoenzimáticos para la determinación de AFB₁ en alimentos (EZ Screen card test) para detectar AFB₁ en orina humana y animal, y obtuvieron un límite de detección de 2.3 ng/mL al tratar la muestra con tierra de diatomeas. Al concentrar y purificar la muestra por columna de Sep-pak y de inmunoafinidad, el límite de detección disminuyó hasta 0.05 ng/mL.

5. Validación del ensayo inmunoenzimático de AFB en orina.

5.1 Exactitud

El procedimiento más utilizado para evaluar la exactitud son los experimentos de recuperación y constituyen uno de los controles de calidad más importantes.

En la Tabla 13 se muestra la recuperación de AFB, en orina contaminada artificialmente. Puede verse que existió una media de recuperación superior a 96 % cuando se utilizó el Ac monoclonal y el intervalo de recuperación para los tres niveles de AF estuvo entre 94.6-98.4% muy cercano al 100 %. En el caso del Ac policlonal se obtuvo una media de 107.6 % de recuperación debido a falsos positivos, y el intervalo entre los tres niveles fue de 92-116.4.

Para la optimización de nuestro sistema se incluyeron ambos Ac (policlonal y monoclonal) resultando elegido el Ac monoclonal. Además, de acuerdo a lo previsto, obtuvimos un incremento de 10 veces más en la sensibilidad con un límite de detección de 10 pg/mL en comparación al Ac policlonal donde el límite de detección fue de 100 pg/mL. Como el Ac monoclonal no tuvo falsos positivos, se decidió usarlo para la evaluación de las muestras de orina.

Debido a que las muestras no requieren de una purificación extensiva antes de ser analizadas, el porcentaje de pérdida por manipulación disminuyó y la recuperación de AF por procedimientos inmunológicos se acercó al 100 %, superior a la obtenida por HPLC.

Chapot & Wild (1991) y Groopman & Donahue (1988) utilizaron el método inmunoenzimático ELISA inhibitoria para cuantificar las AF en diferentes fluidos biológicos (orina, leche y suero) para la determinación de conjugados albúmina- AF, con Ac monoclonales en su sistema y recuperación similar a la de nuestro estudio.

Tabla 13: Porcentaje de recuperación de AFB₁ (ng/mL) en ELISA.

Orina basal (ng/mL)*	AFB ₁ añadida (ng/mL)	AFB ₁ recuperada con Ac		% de recuperación con Ac	
		Policlonal (ng/mL)	Monoclonal (ng/mL)	Policlonal	Monoclonal
0.0	5	4.6	4.8	92	96.0
0.0	15	17.2	14.2	114.6	94.6
0.0	500	582	492.0	116.4	98.4
Promedio				107.6	96.3

* Se cuantificó la AFB₁ (basal) de muestras compuestas (pull) de orinas normales.

5.2 Precisión

Otros parámetros para evaluar un sistema son el coeficiente de variación (CV) intra-ensayo que en nuestro caso no excedió el 10.3 % (Tabla 14). Se muestran los CV intra e inter-ensayo para la determinación de AFB₁ en muestras de orinas contaminadas artificialmente. En el extremo superior de la curva de calibración la precisión del ensayo disminuye, aumentando el CV. Las mayores variaciones se encontraron en la concentración de 1000 ng/mL.

El perfil de precisión inter-ensayo, dió también la mayor fluctuación en el extremo superior de la curva (Tabla 15) con la dilución de 1000 ng de AFB₁ y el CV se incrementó también. Los CV obtenidos en nuestro sistema fueron menores de 10.3 %, para los intra-ensayos fueron entre 6.7-10.3 % y el CV para los inter-ensayos fue de 6.8-9.4 %, límites idóneos de precisión en este sistema.

Tabla 14. Coeficiente de variación intra-ensayo.

Concentración de AFB ₁ *	Media de Absorbancia	Desviación Estándar	% Coeficiente de Variación
1000	0.260	0.127	10.3
10	0.490	0.047	6.9
1	0.810	0.062	8.6
0.1	1.220	0.034	6.7

* Con 8 repeticiones en relación a la curva estándar.

Tabla 15. Coeficiente de variación inter-ensayo.

Concentración de AFB ₁ *	Media de Absorbancia	Desviación Estándar	% Coeficiente de Variación
1000	0.286	0.103	9.4
10	0.524	0.043	6.8
1	0.790	0.082	8.3
0.1	1.130	0.064	7.8

* Con 8 repeticiones en relación a la curva estándar.

6. Procesamiento de las muestras de orina

6.1. Cuantificación de aflatoxina en las muestras de orina por ELISA.

Los niveles de AF de las 210 muestras estudiadas se determinaron por ELISA entre grupos de riesgo y control, 35 resultaron positivas y fueron un 16.6 %.

En la Tabla 16 se presentan los grupos de riesgo a CHC positivos a AF (ng AF/mL) y su concentración corregida en ng de AF/mg de creatinina (ng AF/mg cr).

El número de controles positivos a AF en orina, con sexo, edad y concentración de AF se presentan en la Tabla 17.

Las características principales de cada grupo como son la relación entre sexos, positivos/negativos, el porcentaje de positivos del total y los límites o rangos de concentración de AF se presentan en la Tabla 18.

Al analizar los grupos de riesgo y controles por separado se observó que en el grupo HBV crónica hubo 15 orinas positivas a AF (50 %), y 7.1 % del total de muestras estudiadas, con una concentración máxima de 1389 ng de AF/mg cr. En el grupo CHV, fueron 8 pacientes con orinas positivas a AF (26.6 %) y un 3.8 % del total de casos estudiados; uno de estos pacientes presentó la concentración máxima registrada con 4106.2 ng de AF/mg cr. La paciente falleció al poco tiempo de la toma de orina. HCV sólo presentó 5 orinas positivas (16.6 %) con concentraciones menores en un rango de 3.03 a 54.3 ng AF/mg cr.

Los grupos CHA y el S tuvieron 3 muestras positivas a AF cada uno (10%), con concentraciones de (1.25 a 8.5 ng AF/mg cr) el primero, y con 6.9 a 33.6 ng AF/mg cr el segundo. El grupo control de IR presentó una sola orina positiva con 1.61 ng de AF/mg de cr y los ECNH sin AF.

El contenido de AF de las diferentes enfermedades se valoró mediante el logaritmo de la AF en un análisis de varianza y fue estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$) con CHA, y sin CHA fue de ($P \leq 0.033$). Al realizar la comparación entre los grupos de enfermos de origen viral HBV, HCV y CHV contra el resto, la diferencia fue altamente significativa ($P \leq 0.0002$) cuando se comparó con los grupos de CHA, IR, ECNH y S el contenido de AF fue también altamente significativo ($P \leq 0.0002$). De aquí se concluye que hay una coincidencia entre las presencias de virus y de AF.

Tabla 16: Pacientes del grupo de riesgo a carcinoma hepatocelular, positivos a aflatoxina en orina, por ELISA.

Grupos por enfermedad	Nº de paciente	Sexo	Años de edad	ng AF/ml de orina	Volumen orina 24 hr	Creatinina en orina	
						mg cr	ng AF/mg cr
Hepatitis B crónica	123	Masc.	60	960	780	539	1389
	128	Fem.	61	595	920	567	965.4
	130	Masc.	27	1.92	1250	1034	2.32
	138	Masc.	49	780	930	1080	671.6
	139	Fem.	52	0.7	1200	1020	0.823
	140	Masc.	54	1.6	835	985	1.35
	141	Fem.	43	0.09	1250	918	0.12
	142	Masc.	36	0.17	1100	950	0.19
	143	Masc.	41	0.15	990	880	0.168
	144	Masc.	49	2.7	753	825	2.46
	146	Fem.	40	0.51	810	780	0.54
	147	Masc.	32	0.64	1020	740	0.88
	148	Masc.	38	7.8	970	943	8.02
149	Masc.	47	0.16	1270	1050	0.19	
150	Masc.	38	0.1	1000	780	0.13	
Hepatitis C crónica	41	Fem.	64	38.5	1200	850	54.3
	43	Masc.	44	16	850	540	25.1
	44	Fem.	47	2.1	1300	900	3.03
	52	Masc.	33	13.5	1550	1240	16.8
	54	Fem.	37	11.1	1100	810	15.1
Cirrosis Viral	56	Fem.	51	4000	850	828	4106.2
	66	Masc.	58	62	900	1202	46.4
	74	Masc.	61	325	745	756	320.2
	76	Fem.	60	0.150	1150	856	0.201
	77	Fem.	53	840	800	505	1330.6
	78	Masc.	67	135	1050	1164	121.7
	80	Fem.	23	0.8	1350	560	1.44
	82	Masc.	58	1.6	980	1103	1.42
Cirrosis OH	108	Fem.	54	0.95	1000	756	1.25
	118	Fem.	52	5.5	735	476	8.49
	119	Masc.	58	5.25	860	584	7.7

Tabla 17: Número de controles positivos a aflatoxina en orina por ELISA

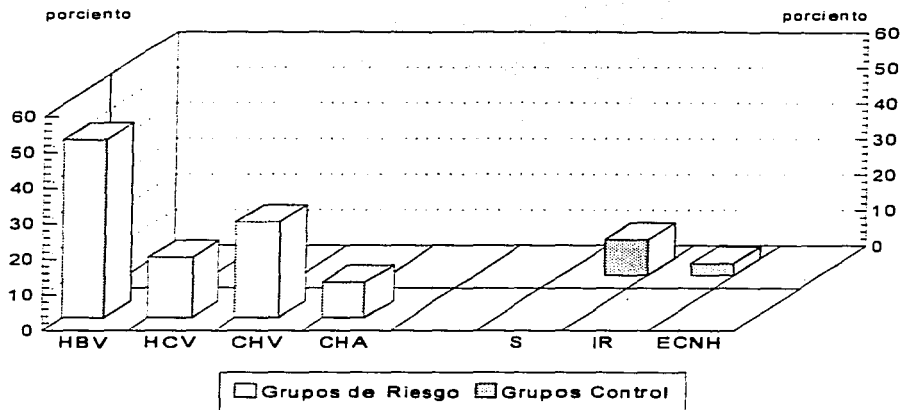
Grupos	No. de pacientes	Sexo	Edad años	ng AF/mL de orina	Volumen orina 24 hr	Creatinina en orina	
						mg cr	ng AF/mg cr
Insuficiencia renal	164	Fem.	60	1.25	455	352	1.61
Sano	184	Fem.	40	5.5	1250	985	6.9
Sano	191	Mas.	43	17	980	835	20.0
Sano	192	Fem.	44	28.5	980	830	33.6

Los pacientes con enfermedades crónicas no hepáticas fueron negativos a AF.

Tabla 18: Niveles de Aflatoxina en los grupos control y de riesgo para carcinoma hepatocelular.

Grupos estudiados	No. de casos	Sexo fem/masc	Rango de edad	Relación positivo/negativo intra-grupo	% Positivos del total	Concentración ng AF/mg creatinina
Grupos de riesgo						
Hepatitis B	30	11/19	26-68	15/15 (50%)	7.1	0.12 - 1389
Hepatitis C	30	19/11	34-64	5/25 (16.6%)	2.4	3.03 - 54.3
Cirrosis viral	30	18/12	30-72	8/22 (26.6%)	3.8	0.201 - 4106.2
Cirrosis OH	30	10/20	41-74	3/27 (10%)	1.4	1.25 - 8.5
Grupos control						
Insuficiencia renal	30	17/13	35-71	1/29 (3.3%)	0.5	1.51
Sin enfermedad hepática	30	19/11	34-69	0/30 (0%)	0	0
Sano	30	15/15	26-72	3/27 (10%)	1.4	6.9 - 33.6
Total	210	109/101	26-74	16.6 %	16.6%	0.12 - 4106.2

No se detectaron diferencias significativas al comparar al grupo S y al CHA contra HBV, HCV y CHV, con relación a los niveles de AF, pero sí hubo diferencia significativa en la frecuencia de casos positivos. Al comparar las orinas positivas a AF de los grupos de riesgo y control (Figura 24) los niveles más altos fueron de las enfermedades virales HBV crónica con 50 % de casos positivos, seguido de CHV y HCV. Coinciden con los datos de China (Groopman & Sabbioni, 1991) y África (Wild *et al.*, 1988) que asocian la AF con el virus de HB. Nosotros incluimos orinas de HCV crónica y CHV y parece haber una asociación entre la presencia AF y la enfermedad viral crónica.



HBV = Hepatitis B viral; **HCV** = Hepatitis C viral; **CHV** = Cirrosis hepática viral;
CHA = Cirrosis hepática alcohólica.
S = Sanos; **IR** = Insuficiencia renal; **ECNH** = Enfermedad crónica no hepática.

Figura 24. Porcentaje de pacientes con orina positiva a aflatoxina en grupos de riesgo y controles.

Wild *et al.* (1988) analizaron muestras de orina de diferentes personas en distintos poblados de África y encontraron niveles de AF en un rango de 100 a 1000 ng/L de orina.

En nuestro estudio el promedio de AF en orina de grupos de riesgo estuvo entre 0.12 y 4106.2 ng/mg cr que fueron niveles muy altos.

Dragsted *et al.* (1988) en muestras de orina de humanos sanos de Dinamarca, encontraron concentraciones máximas de 6.5 ng AFB₁/mg cr y además observaron un incremento de la excreción de AF cuando incluyeron cerveza en la dieta. Nuestro grupo control de mexicanos sanos equivalente, tuvo niveles de 6.9 a 33.6 ng AF/mg cr que son 5 veces mayores a los de los daneses.

Es importante determinar las AF en orina para el diagnóstico de enfermedades hepáticas, pues este potente tóxico ambiental se relaciona con ellas (Wild *et al.*, 1993) y debería ser incluida en los estudios epidemiológicos de cáncer hepático y de otras patologías como tecnología avanzada en el diagnóstico médico.

6.2 HPLC del aducto AFB-N⁷-Gua, AFM₁, AFP, y AFB, en las muestras de orina.

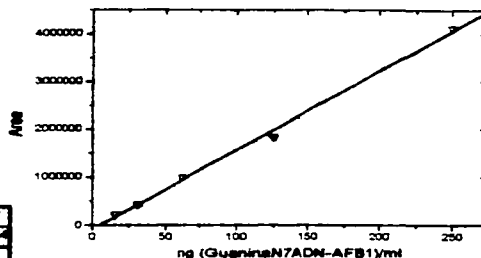
Para la determinación de los niveles del aducto AFB-N⁷-Gua, de los metabolitos AFM₁, AFP, y de AFB, libre, se realizaron curvas estándares individuales para asignar los tiempos de retención de los picos, hubo buen coeficiente de correlación de 0.99 (Figuras 25 a y b).

ng (GuanineN7ADN-AFB1) ml	Área prom.	desv. estándar
250	4,122,265	361
125	1,831,820	20,152
62.5	1,000,169	4,711
31.25	433,284	13,183
15.625	207,584	22,261

Regresión lineal: $Y = A + B \cdot X$

Parámetro	Valor	Error	t-Student	Prob> t
A	-99129.27	42982.59	-2.08	0.07134
B	16800.54	332.40	49.94	<0.0001

R	R ²	R ² ajustada	RMSE	N
0.9984	0.9968	0.9964	9959.7	10



ng AFM1/ml	Área prom.	desv. estándar
250	3,756,463	101,356
125	1,694,690	127,301
62.5	907,997	7,197
31.25	391,930	27,132
15.625	215,291	5,468

Regresión lineal: $Y = A + B \cdot X$

Parámetro	Valor	Error	t-Student	Prob> t
A	-102233.4	40985.63	-2.50	0.027
B	15169.9	317.47	47.78	<0.0001

R	R ²	R ² ajustada	RMSE	N
0.99716	0.99434	0.9938	10480.8	15

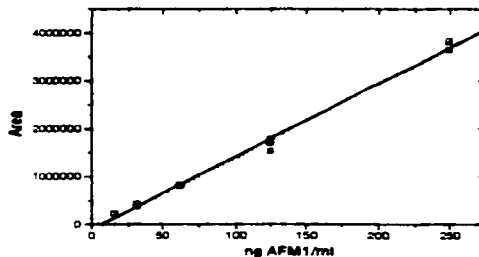
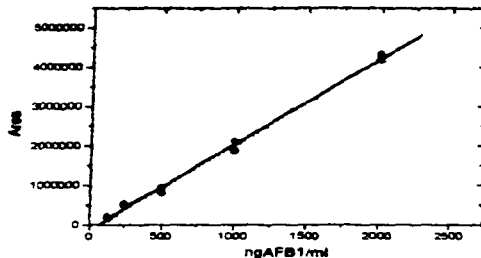


Figura 25 a. Áreas, desviación estándar, regresión lineal y curvas de los estándares del aducto AFB-N⁷-GUA y de AFM₁.

ng AFB ₁ ml	Área prom.	desv. estd.
2,000	4,261,110	81,732
1,000	1,942,843	134,582
500	852,019	73,277
250	502,298	6,475
125	187,612	33,840

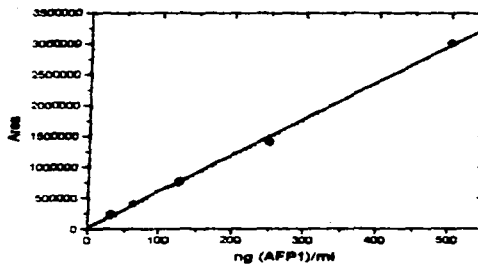


Regresión lineal: $Y = A + B \cdot X$

Parámetro	Valor	Error	t-Stat.	Prob> t
A	-	43629.46	-2.98	0.01067
B	129862.70	42.17	51.38	<0.0001

R	R ²	R ² ajustado	RMSE	N
0.99756	0.9951	0.99472	111388	15

ng AFP ₁ /ml	Área prom.	desv. estd.
500	3,018,510	7,686
250	1,415,028	23,188
125	770,874	29,640
62.5	413,234	1,182
31.25	243,406	19,297



Regresión lineal: $Y = A + B \cdot X$

Parámetro	Valor	Error	t-Stat.	Prob> t
A	29270.21	25738.6	1.14	0.2889
B	5984.30	69.95	89.39	<0.0001

R	R ²	R ² ajustado	RMSE	N
0.99996	0.99772	0.99743	53769.6	10

Figura 25 b. Áreas, desviación estándar, regresión lineal y curvas de los estándares de AFB₁ y de AFP₁.

Como el aducto **AFB-N⁷-Gua** usado como estándar lo sintetizamos en laboratorio, fue necesario correr diferentes pruebas tanto de su espectro de absorción (UV-Vis) de 200 a 450 nm (Figura 26 **a**), como de HPLC (Figura 26 **b**) para comprobar su pureza.

El tiempo de retención del pico cromatográfico y el espectro del aducto **AFB-N⁷-Gua** obtenido por HPLC fueron similares a los reportado por Essigmann *et al.* (1977) y Groopman *et al.* (1992).

Para corroborar con certeza la interpretación de los cromatogramas tanto del aducto **AFB-N⁷-Gua**, como de los metabolitos de **AFB₁** (**AFM₁** y **AFP₁**) en orina y se necesitó usar estándar interno en HPLC.

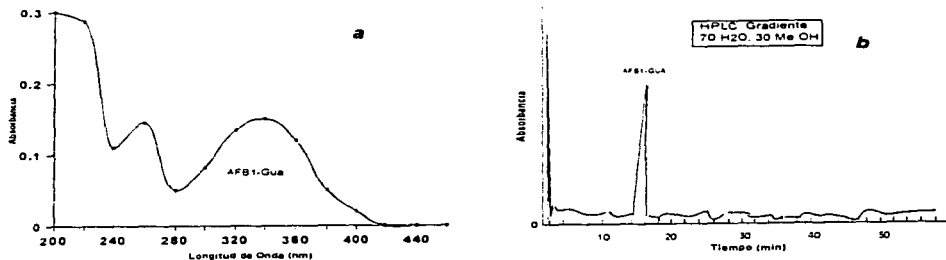


Figura 26. a: Espectro UV - visible del aducto AFB-N⁷-Gua. b: HPLC del aducto AFB₁-N⁷-Gua.

Con objeto de separar el aducto **AFB-N⁷-Gua**, la **AFB₁**, y sus metabolitos (**AFM₁** y **AFP₁**) por HPLC, se siguió un esquema de elución por gradientes, pero este análisis resultó muy tardado (55 min por muestra/estándar), con tiempos de retención entre 14 y 41 min, saliendo el aducto a los 14 min, la **AFM₁** a los 27 min, la **AFP₁** a los 36 min y la **AFB₁** a los 41 min. Figura 27 **a**.

Se decidió probar la separación de las toxinas de la muestra/estándar por análisis isocrático que redujo el tiempo de aparición de los picos a 10 minutos, tanto del aducto como de la **AFB₁** y de sus metabolitos, y se obtuvo una buena separación, con los siguientes tiempos de retención: el aducto salió a los 3.9 min, la **AFM₁** a los 4.8.min, la **AFP₁** a los 6.1 min y la **AFB₁** a los 7.4 min. Figura 27 **b**.

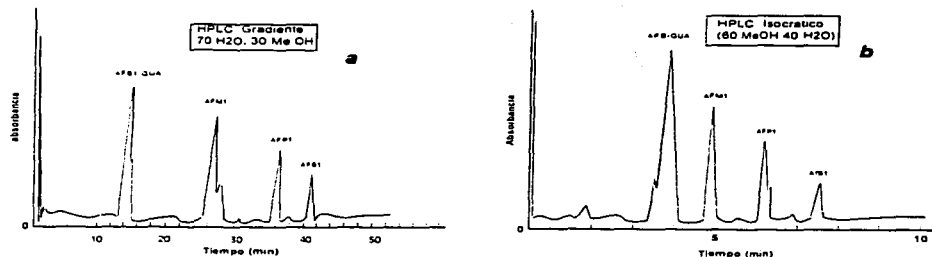


Figura 27. HPLC de estándares del aducto AFB-N⁷-Gua, de AFM₁, AFP₁ y AFB₁.
a: Sistema de elución por gradientes con metanol 30% en 50 min
b: Sistema isocrático con metanol (60 %), agua (40%) en 10 min.

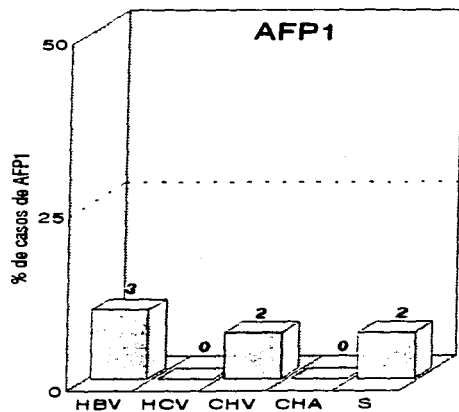
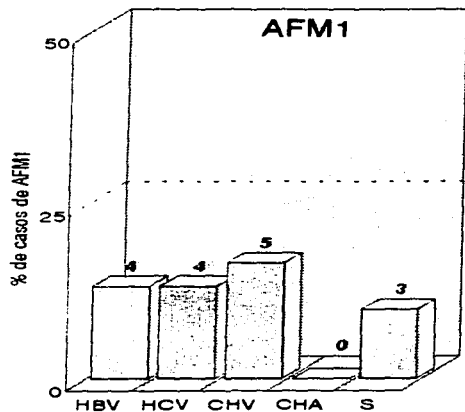
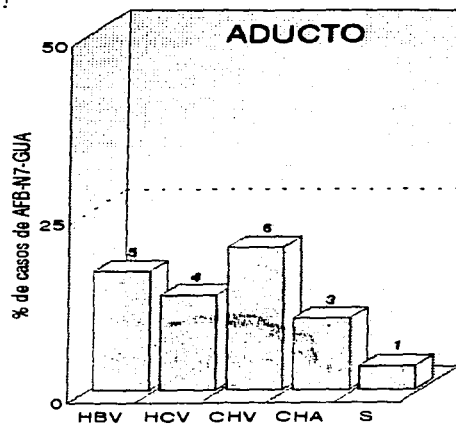
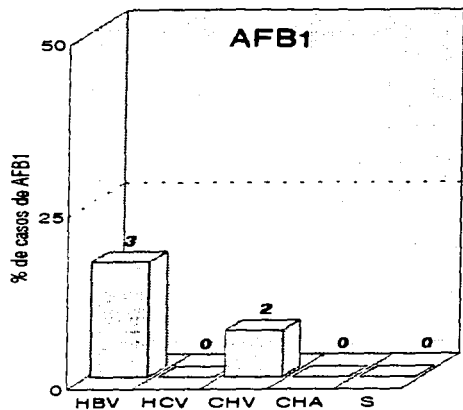
6.3 Recuperación de aflatoxinas por los métodos de HPLC y ELISA.

De las 210 muestras de orina analizadas por ELISA, tanto de grupos de riesgo como control, 35 fueron positivas a AF. Este método inmunoenzimático tuvo mejor recuperación de AF totales que el de HPLC, que sólo detectó AF en 24 de las 35 muestras positivas, es decir que detectó el 69% de AF con relación al ELISA. Este es un problema técnico, dado que sería deseable tener un análisis químico con la precisión cuantificadora del ELISA (1 pg/mL) y que identificara los diferentes tipos de AF como el HPLC.

Las muestras positivas a AF, detectadas por HPLC, presentaron 4 tipos de AF excretada (como aducto AFB-N⁷-Gua, AFM₁, AFP₁ y AFB₁), con la frecuencia mostrada por cada grupo. Figura 28.

La AFB₁ se presentó sólo en 5 orinas que correspondieron 2 al grupo de CHV y 3 al de HBV. Con respecto al aducto AFB-N⁷-Gua fue el metabolito más excretado 19/35 y que se presentó con mayor frecuencia en enfermos hepáticos virales que en personas sanas. El segundo metabolito más excretado fue la AFM₁ que se presentó en 16/35 muestras positivas. En nuestro estudio los niveles de excreción de AFP₁ (7/35) revelaron dosis y el número de muestras positivas bajas y no se excretaron en los grupos de HCV y CHA. Los grupos ECNH e IR no se pusieron porque no presentaron ninguna muestra con AF.

Entre los pacientes del grupo de HBV se encuentran las orinas con más bajos niveles de AF detectadas por ELISA, de 15 muestras positivas sólo 6 fueron cuantificadas por HPLC, en 3 de ellas se excretaron todas las AF evaluadas, y del resto 2 excretaron al aducto y una a la AFM₁.



□ ENFERMEDADES

□ ENFERMEDADES

Figura 28: Frecuencia de excreción de AFB₁, AFM₁, AFP₁ y el aducto AFB-N⁷-Gua, por grupos.

En la HCV en 4 de 5 casos positivos se excretó al aducto y a la AFM₁, pero nada de AFP₁ ni AFB₁ libre. En los grupos CHV y HBV la AF ingerida estuvo transformada tanto en aducto como en sus metabolitos o bien en su forma libre. Tabla 19 a. Los cirróticos alcohólicos tuvieron 3 casos positivos con el aducto y no metabolizaron la AFB₁ a AFM₁ ni a AFP₁, teniendo más probabilidad de desarrollar un CHC que los sanos. Fue interesante encontrar los diferentes niveles de metabolismo de AF en los grupos CHA y CHV. El grupo CHA no metabolizó las AF a AFM₁ ni a AFP₁.

En el grupo de CHV el metabolismo de las AF dió los 2 metabolitos estudiados (AFM₁, AFP₁) y una alta presencia de aductos 6/8. No hubo AFP₁, es posible que toda se haya eliminado por la bilis, y como debió estar a niveles muy bajos no pasó a orina. No apareció AFB₁ libre los días previos a la toma de la muestra.

Es curioso observar que de los 30 individuos del grupo de los Sanos sólo hubo 3 casos positivos a AF y de ellos 1/3 tuvo al aducto en dosis bajas (1.38 ng/mL), con buena detoxificación metabólica de las AFB a AFM₁ (3/3) y a AFP₁ (2/3).

Tabla 19: Resumen de la excreción de los diferentes tipos de aflatoxina por HPLC.

Grupos	Casos AF positivos	Concentración ng/mL				HPLC ng AF/mg cr	ELISA ng AF/mg cr
		AFB-N ⁷ -Gus	AFM ₁	AFP ₁	AFB ₁		
Grupos de riesgo							
HBV	50%	1.0 - 38.8	1.7 - 80.3	18.2 - 32.1	152.6 - 292.2	1.1 - 530.6	0.1 - 1389
HCV	16.6 %	1.2 - 4.1	1.4 - 40.3	0	0	1.7 - 56.8	3.03 - 54.3
CHV	26.6 %	0.4 - 290.7	12.5 - 90.5	42.6 - 113.5	380.5 - 451.9	0.3 - 1524	0.2 - 4106.2
CHA	10 %	0.9 - 1.7	0	0	0	0.3 - 2.6	1.25 - 8.5
Rango	10- 50 %	0.4 - 290.7	1.4 - 90.5	18.2 - 113.5	152.6 - 451.9	0.3 - 1524	0.12 - 4106.2
Grupos control							
IR	3.3 %	-	-	-	-	-	1.61
ECNH	0 %	-	-	-	-	-	-
Sano	10 %	1.38	1.1 - 3.7	2 - 2.8	0	1.4 - 8.6	6.9 - 33.6

Tabla 19 a. Determinación del aducto AFB-N⁷-Gua y metabolitos de AF por HPLC.

Diagnóstico del paciente	Nº de muestra	Concentración (ng/mL)					Conc AF/mg Cr
		AFB-N ⁷ -Gua	AFM ₁	AFP ₁	AFB ₁	Conc.total	
HCV	41	0	40.26	0	0	40.26	56.83
	43	2.5	15.44	0	0	17.94	28.24
	44	1.18	0	0	0	1.18	1.7
	52	2.11	1.36	0	0	3.47	4.31
	54	4.09	4.48	0	0	8.58	11.65
CHV	56	290.71	90.53	113.5	451.93	946.67	1523.99
	66	4.39	29.24	0	0	33.63	25.18
	74	0	53.59	0	380.52	434.11	427.79
	77	180.73	12.45	42.63	0	235.8	125.34
	78	18.87	39.54	0	0	58.41	52.69
	80	2.1	0	0	0	2.1	5.06
CHA	82	0.38	0	0	0	0.38	0.34
	108	0.21	0	0	0	0.21	0.28
	118	1.69	0	0	0	1.69	2.61
HBV	119	0.86	0	0	0	0.86	1.27
	123	34.7	39.23	32.14	244.55	350.61	507.38
	128	1.38	3.72	29.72	292.19	327.01	530.6
	138	38.83	80.34	18.18	152.6	249.67	248.74
	139	1.62	0	0	0	1.62	1.90
	147	0	1.72	0	0	1.72	1.87
S	148	1.03	0	0	0	1.03	1.06
	184	0	1.09	0	0	1.09	1.38
	191	1.38	3.65	2.8	0	7.83	8.60
	192	0	1.94	2	0	3.94	4.65

La concentración corregida se expresó en AF por mg de creatinina.

Tabla 19 b: Análisis estadístico de las concentraciones del aducto AFB-N⁷-Gua y metabolitos de AF entre los casos positivos.

Prueba estadística	AFB-N ⁷ -Gua	AFM ₁	AFP ₁	AFB ₁
Valor de P en prueba de F *	0.277	0.0532	0.0013	0.036
n = individuos positivos	19	16	7	5
Valores de P en contrastes *	ninguno significativo al .05	(CHV vs S), .019 (CHV + HBV + HCV) vs S .029	CHV vs. S, 0.002 HBV vs. S, 0.023 (CHV + HBV) vs. S, 0.0005	CHV vs. HBV, 0.036

a = Siempre promedios menores en S.

* = Con los datos previamente transformados usando el método de Box y Cox.

En la Figura 19 b se muestra que a pesar de que el aducto AFB-N⁷-Gua fue el metabolito más excretado, la cantidad de aducto de los diferentes grupos no presentó diferencia significativa dado el tamaño pequeño de la muestra. La AFM₁ se presentó en un 46 % (16/35) de las muestras positivas y se encontraron diferencias significativas entre los grupos con enfermedad viral y los sanos con una $P \leq 0.029$, considerando sólo los que tienen el metabolito AFM₁.

Para la AFM₁ y la AFP₁ hubo diferencias estadísticamente significativas, siendo los individuos sanos los que tuvieron una menor concentración en todos los contrastes. Los sanos no presentaron diferencias significativas en su concentración de aductos con respecto a los individuos con los diferentes padecimientos, sin embargo la frecuencia de aductos en los individuos enfermos fue mayor que en los sanos, donde sólo 3 casos los presentaron. Esto indica que en los individuos enfermos hay más moléculas de AF (mutágeno) pegadas a su ADN, que éste está siendo más agredido y por lo tanto se incrementa su reparación y elimina los aductos por la orina.

Estos datos confirman los resultados obtenidos por Groopman *et al.*, 1992 y Wild *et al.*, 1993 en orinas de ratas y humano utilizando HPLC con la excreción de AFB₁ libre, el aducto AFB-N⁷-Gua y los metabolitos AFM₁ y AFP₁, con proporciones similares a este estudio.

En la Tabla 20 se compara la determinación de AFB₁ por HPLC y por ELISA. Se encontró que un 28.5 % de las muestras positivas (11/35) por HPLC no contenían AF y sí fueron positivas con ELISA en un intervalo de 0.13-1.61 ng/mL, quizá el HPLC no puede detectar estos límites tan bajos. No se presentaron falsos positivos en HPLC, y la especificidad fue del 100 %. La comparación de ELISA con HPLC dio 4 muestras no coincidentes, con 11 falsos negativos en ELISA con respecto a HPLC, con una

Tabla 20: Comparación entre aflatoxinas totales por HPLC y ELISA.

Paciente	Muestra	HPLC (ng AF/mg Cr)	ELISA (ng AF/mg Cr)
HCV	41	56.83	54.3
	43	28.24	25.1
	44	1.7	3.03
	52	4.31	16.8
	54	11.65	15.1
CHV	56	1523.99	4106.2
	66	25.18	46.4
	74	427.79	320.2
	76	0	0.201
	77	125.34	1330.6
	78	52.69	121.7
	80	5.06	1.44
	82	0.34	1.42
CHA	108	0.28	1.25
	118	2.61	8.49
	119	1.27	7.7
HBV	123	507.38	1389
	128	530.6	965.4
	130	0	2.32
	138	248.74	671.6
	139	1.90	0.823
	140	0	1.35
	141	0	0.12
	142	0	0.19
	143	0	0.168
	144	0	2.46
	146	0	0.54
	147	1.87	0.88
	148	1.06	8.02
	149	0	0.19
150	0	0.13	
IR	164	0	1.61
S	184	1.38	6.90
	191	8.60	20.0
	192	4.65	33.6

eficacia del 95.5 %. Harrison *et al.* (1991), demostraron una correlación directa entre las cuantificaciones de AFB₁ por HPLC y por ELISA.

Existe una buena correspondencia lineal entre la determinación por ELISA y HPLC. Los datos obtenidos por HPLC para el total de los metabolitos oxidativos en la orina AFM₁, AFP₁, AFB₁ y los aductos AFB-N⁷-Gua en orina en comparación con los resultados obtenidos por ELISA mostraron un coeficiente de correlación de 0.95 y el valor de r^2 fue de 0.90. No obstante podemos observar que los niveles de AF totales que se obtuvieron por la técnica de HPLC fueron ligeramente menores a los obtenidos por ELISA.

Se ha comparado el ELISA con HPLC en la determinación de AFB₁ en orina, con correlaciones > 0.90, cuando las concentraciones de AF fueron > de 10 ng/kg (Groopman *et al.*, 1992; Wild *et al.*, 1993).

Regresión lineal: $y = m * x$

Parámetro	Valor	Error	t-Stud.	Prob> t
m	2.55011	0.13162	19.37473	<0.0001

R	R ²	R ² ajustada	RMSE(SD)	N
0.95227	0.90682	0.90682	232.17809	35

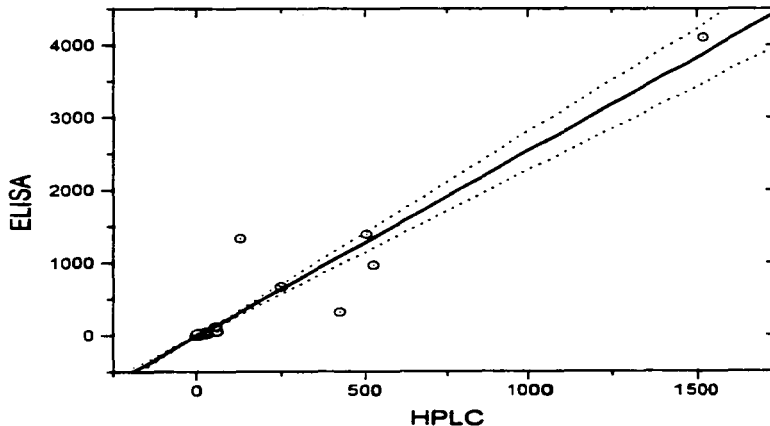


Figura 29: Regresión logarítmica (correlación) entre ELISA y HPLC.

El desarrollo y la validación de estos procedimientos nos ayudó a purificar e identificar estos metabolitos y simplificó la cuantificación de AF en pacientes de alto de bajo riesgo, y en controles.

Discutiremos en primer lugar la AFB₁ libre, después al aducto AFB-N⁷-Gua obtenido y finalmente a sus metabolitos AFM₁ y AFP₁.

Con relación a la AFB₁ libre en orina (Tabla 19 a) se presentó sólo en 5 muestras que correspondieron 2 al grupo de CHV y 3 de HBV. La AFB₁ presentó las concentraciones más altas de AF excretadas, que fluctuaron de 152.6 ng/mL (en el grupo HBV) hasta 451.9 ng/mL (en el grupo CHV). La AFB₁ libre entra y sale del organismo sin mayor cambio y no tiene importancia cuando se relaciona con las enfermedades, dado que no está activada, aunque su toxicidad en pruebas *in vitro* es mucho mayor a la de sus metabolitos.

Sin embargo, la AFB₁ se puede metabolizar, por medio del citocromo p-450, al epóxido 8,9 AF que es altamente reactivo ya activada se puede fijar al ADN. El ADN se repara y la elimina en diferentes tipos de aducto. Así tenemos que la importancia de la AFB₁ en la toxicidad es por su formación de aductos con el ADN (Hayes, *et al.*, 1991). La expresión constitutiva de estas enzimas se puede modificar por la acción de sustancias inductoras que controlan diferentes regiones del genoma, con profundos efectos en la respuesta tóxica a la AFB₁ (Neal, 1995).

El sistema del citocromo P-450 es también importante para la destoxicación, estas enzimas al formar el epóxido pueden ser hidrolizados y suministrar centros de conjugación con moléculas muy polares (glucuronato o sulfato) dando lugar a compuestos suficientemente solubles para ser excretados.

Hay procesos metabólicos de destoxicación como son la glucuronización, sulfonación y acetilación que tienen como sustrato a los metabolitos hidroxilados primarios de la AFB₁ (AFM₁, AFP₁ y AFQ₁), cuyos potenciales tóxicos y cancerígenos son mucho menores a los de la AFB₁.

De las AF excretadas y detectadas por HPLC el 90% se metabolizaron a uno o varios tipos de AF y sólo el 10% salió como AFB₁ libre.

El principal metabolito AFB-N⁷-Gua se identificó en 19/35 muestras positivas, esto equivale a un 9% de las 210 muestras de orinas, este porcentaje es inferior al reportado por Autrup *et al.* 1983 y en 1987 de Kenya, quienes dan un porcentaje de 12.6% de aductos en 1000 muestras de orina, esto se explica quizá por el alto consumo de cacahuate y sorgo en países africanos en general.

Hay marcadas diferencias respecto a sus concentraciones excretadas en los grupos de riesgo, que van de 0.21 ng/mL en CHA a 290.7 ng/mL en CHV y fue de 1.38 ng/mL en una sola muestra de control S.

Groopman *et al.*, (1992) compararon la cantidad de aductos en el ADN del hígado de ratas, y su excreción como aductos AFB-N⁷-Gua en la orina de 24 horas que mostró un $r = 0.98$ y un valor de r^2 de 96.3. Lo cual reflejó un daño causado por AF en ADN en el sitio primario que es el hígado. Estos autores concluyeron que la presencia de estos biomarcadores son medida de reparación de ADN y por tanto de daño hepático.

Ya se ha establecido en estudios anteriores (Wright, 1991) que los animales tratados con dosis altas de cancerígenos genotóxicos no reflejan la realidad dado que pueden aumentar la incidencia de tumores por mecanismos no específicos pues el daño tisular trae una proliferación celular compensatoria, mecanismo que no opera a dosis bajas. Por lo tanto la extrapolación de tratamientos con dosis altas a los de dosis bajas no revela el verdadero riesgo.

Groopman *et al.* (1992) comprobaron la relación del aducto AFB-N⁷-Gua y la ingestión de AFB, del día previo con una correlación significativa de 0.65 y $P < 0.000001$ e indicaron que la asociación entre exposición y dosimetría molecular fue estrecha. Hubo un alto coeficiente de correlación 0.80 y $P < 0.000001$ entre la cantidad de aductos excretados en orina y la ingestión de AFB, (Groopman *et al.*, 1992). Así, la cuantificación del aducto AFB-N⁷-Gua en orina es un buen biomarcador de la ingestión de AFB, de los alimentos y en forma indirecta puede estimar el nivel de riesgo del individuo a desarrollar un cáncer.

La detección del aducto AFB-N⁷-Gua es importante porque los modelos animales indicaron que este metabolito es producto de la reparación rápida del ADN y se excreta exclusivamente por orina (Bennett *et al.*, 1981). Los aductos de ADN reflejan daño genético. Alrededor del 0.2 % de la dosis ingerida de AFB, se excreta como AFB-N⁷-Gua en orina. De la cantidad de AFB₂ ingerida, el 0.6 % se transforma al aducto mencionado, que es estable al pH de la orina. Por los aductos excretados se puede calcular la cantidad de AFB, y de la AFB₂ de los alimentos contaminados ingeridos.

Las concentraciones (ng/mL) de aducto AFB-N⁷-Gua excretado, que se encontraron en nuestro estudio (de una alícuota de 25 mL de orina) fueron inferiores a las encontradas por Groopman *et al.*, (1992) de 2 alícuotas de 25 mL de orina, en China que llegaron a presentar 400 ng de aducto/día. Pero si los datos de estos autores se ajustan a la mitad (una alícuota de 25 mL de orina que fue nuestro tamaño de muestra), los datos obtenidos fueron de 200 ng/día en China, y en nuestro caso el promedio fue de 31 ng de aducto en las 19 muestras positivas, esto significa que aunque las cantidades de maíz consumidas en China y México son similares por alguna razón las personas de Guangxi, China debieron consumir maíz más contaminado con AF, ya que excretaron más aductos y es una región que presenta una alta mortalidad del 51 % por CHC primario (Yeh, *et al.*, 1989), a diferencia de México donde este tipo de cáncer es un 1.2 % (Dir. Gral. de Epidem., 1994). Quizá el tratamiento alcalino del maíz o nixtamalización ayude al mexicano a tener niveles más bajos de CHC primario y contribuya a esta diferencia.

La medición de AFB-N⁷-Gua en orina se realizó en pacientes con CHC en China y en el Sur de África, y revelaron un punto de mutaciones en la posición 249 del exón

7 del gen supresor p⁵³, en donde casi la mitad de los tumores examinados tuvieron sólo una mutación puntual, una transversión de una guanina por una timina. Estos tumores fueron aislados en diferentes regiones del mundo con alta exposición a AF (Fujimoto *et al.*, 1992; Hsieh & Atkinson, 1995). Esto sugiere que estas mutaciones son el resultado de daño causado por la AFB₁ al ADN. Por otro lado, se sabe que existen mutaciones en el gen p⁵³ en un amplio número de tumores humanos (Hsieh & Atkinson, 1995).

Kensler *et al.* (1990) reportan que el grupo 1, 2 ditiol-3 tiona son compuestos que contienen una clase de azufre cíclico con propiedades antioxidantes y quimioprotectoras y están en las crucíferas; un derivado de estos compuestos llamado Oltipraz es un potente inhibidor de la AFB₁ y decrece la formación de aductos en ratas. Además aumenta la conjugación de la AFB₁ con el glutatión y su eliminación por la bilis. Groopman *et al.*, 1994 reporta que el Oltipraz disminuye la cantidad de aductos excretados en orina y en sangre.

Aunque los aductos AFB-N⁷-Gua requieren de métodos moleculares para su cuantificación, son biomarcadores útiles en la investigación epidemiológica para examinar el papel de las enfermedades virales crónicas del hígado y su asociación con la presencia de AF en los fluidos biológicos.

El metabolito AFM₁ reviste gran importancia dado que el 46% de las muestras de nuestro estudio la presentaron y como ya se estableció anteriormente, se encontró una diferencia significativa entre los grupos con enfermedad hepática viral (rango de excreción de 1.4 a 90.5 ng/mL) y el control sano (rango de excreción de 1.1 a 3.7 ng/mL) con una $P \leq 0.029$, y el único grupo de riesgo que no excretó AFM₁ fue el CHA.

Zhu *et al.* (1987) reportaron que un promedio de 1.7% de la AF total de la dieta se excreta como AFM₁ en orina, con una correlación de $r = 0.66$ entre la AF total ingerida en la dieta y la AFM₁ total excretada en la orina.

La AFM₁ es un producto de la detoxificación de la AFB₁ pero también es un potente cancerígeno en animales experimentales (Cullen *et al.*, 1987). Sin embargo, como tampoco está asociada al ADN no se le puede adjudicar un poder mutágeno activo dentro del cuerpo, sino sólo está como metabolito de excreción. La AFM₁ aumenta su producción con anti-oxidantes fenólicos que pueden ser un agente quimioprotector potencial. La inducción de AFM₁ por AFB₁ es una protección contra el CHC.

Los efectos de la AFM₁ han sido estudiados, encontrándose la inducción de lesiones hepáticas en patitos, similares a las provocadas por la AFB₁, así como el desarrollo de tumores hepáticos en ratas y truchas (Wakhisi, 1980); por su parte Pier (1987) reporta que tras la inyección de cantidades subtóxicas de AFM₁ se ha provocado aplasia del timo.

En la India, el grupo de Suryanarayana (1983) alimentó a crías de búfalo y bovinos con niveles distintos de AFM₁, al hacer el seguimiento del estado en que se encontraban estos animales por medio de pruebas de función hepática, se presentaron aumentos en los niveles de fosfatasa alcalina, bilirrubinas, transaminasa oxálico-

glutámica, así como disminución en las proteínas plasmáticas, todos estos datos son indicativos de daño hepático, siendo mayor en las crías de búfalo que en las de ganado bovino.

Existe evidencia molecular acerca de la mutagenicidad de la AFM₁ en ratas, Lutz *et al.*, en 1980 reportaron que tras la administración oral de una dosis elevada de AFM₁, se fijaba al DNA de las células hepáticas de estos animales con un índice de fijación de 2100 de donde concluyen que esta sustancia es un carcinógeno potente en las ratas.

El efecto de la AFM₁ sobre la inmunidad no ha sido bien estudiado, ya que es difícil poder establecer en que grado participa este compuesto en la inmunodeficiencia, la información existente sugiere que aunque la AFM₁ es mucho menos potente que la AFB₁, existe un riesgo potencial muy serio especialmente para los animales jóvenes.

Fue interesante encontrar que las 2 cirrosis tanto viral como alcohólica no excretaron AFP, quizá el hígado endurecido y su fisiología coincidieran y eliminaran la AFP, como glucurónido por bilis y ya no se encontró un excedente en orina.

La AFP₁ es menos tóxica que la AFB₁, y Groopman *et al.* (1992) no encontraron una relación directa entre la ingestión de AFB₁ y la excreción de AFP₁. No obstante la frecuencia de la AFP₁ en orina, su concentración no tiene una relación dosis-exposición. La falta de linealidad en la excreción de la AFP₁ puede explicarse porque utiliza la vía de glucuronización. Es bien sabido que esta vía puede saturarse y que a dosis bajas de AFP₁ y AFB₁, puede ser predominantemente un glucurónido que se excreta por la bilis (Holeski *et al.*, 1987), y sólo a altas dosis, cuando se satura esta vía, es cuando la AFP₁ es excretada como un compuesto libre en la orina (Groopman, *et al.*, 1992).

Sin embargo, Kirby *et al.* (1993) correlacionaron la presencia de la AFP₁ en orina con el desarrollo de cáncer primario de hígado, ya que en estudios *in vitro* la formación de la AFP₁ a partir de la AFB₁ fue muy elevada en las fracciones microsomales aisladas del tejido del tumor maligno, comparado con el tejido control.

Con los resultados presentados y discutidos se han cumplido los objetivos que nos fijamos en este trabajo. Se analizó estadísticamente la cantidad y tipo de raciones de alimentos especificados, obteniéndose una asociación con las enfermedades hepáticas. Se determinó la tecnología de ELISA y HPLC con precisión para analizar AF en orina humana de grupos de riesgo de desarrollar hepatoma y de grupos control, donde se ingirieron AF en los alimentos de modo crónico. Se encontró una correlación entre las enfermedades hepáticas virales y la presencia de AF en orina. El análisis de HPLC identificó los diferentes tipos de AF donde se determinó la presencia AFB₁ libre (como medida de exposición reciente de 24 a 48 horas), los metabolitos AFM₁ y AFP₁ como medida de detoxificación metabólica y de aductos AFB-N⁷-Gua (como medida de reparación del ADN) en la orina humana.

V. CONCLUSIONES.

1. El sistema ELISA montado con Ac monoclonal resultó ser específico y 10 veces más sensible que el policlonal, se determinaron sus condiciones óptimas. Los parámetros de calidad como los coeficientes de variación intra e inter-ensayo, así como los porcentajes de recuperación estuvieron dentro de los límites aceptables de precisión de estos métodos.
2. Existe una buena correspondencia lineal entre la cuantificación de AF por ELISA y por HPLC con un coeficiente de correlación de 0.95. La detección de AF por ELISA fue más sensible que la de HPLC.
3. En el análisis de estadístico se obtuvo que los únicos alimentos que se asocian significativamente ($P \leq 0.0004$) con las enfermedades son los derivados del maíz, oleaginosas, vegetales y lácteos. El grupo sano consumió menos lácteos, con respecto a los grupos enfermos con una significancia de $P \leq 0.012$.
4. Los grupos de enfermedad viral presentaron una mayor excreción de AF y en orden decreciente fueron: HBV (50 %), CHV (26 %) y HCV (16.6%). El grupo de riesgo CHA presentó (10%). Los grupos control tuvieron: IR (3.3%), ECNH (0%) y Sanos (10%).
5. Los grupos de riesgo de CHC excretaron con mayor frecuencia los siguientes tipos de AF en orden decreciente: el aducto AFB-N⁷-Gua, los metabolitos AFM₁ y AFP₁, y en último lugar se encontró la AFB₁ libre. El grupo control Sano metabolizó las AF a AFM₁ y AFP₁, presentó un solo caso con aductos y nada de AFB₁ libre.
6. Se confirmó al aducto AFB-N⁷-Gua en orina humana, es una medida de riesgo (biomarcador molecular) de enfermedades hepáticas por AF.
7. La presencia del aducto AFB-N⁷-Gua en orina de los pacientes de los grupos de riesgo estudiados sugiere un papel etiopatogénico de las AF hacia CHC.
8. La participación del aducto AFB-N⁷-Gua puede ser directa o asociada a la infección viral y al desarrollo de la cirrosis hepática.
9. La contaminación de alimentos por AF debe ser vista como un problema potencial de salud en nuestro país.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., Lishman, A.H. and Pober, J.S. 1994. Antibodies and antigen *In: Cellular and Molecular Immunology*. 2cd Ed. W.B. Saunders Company a Division of Harcourt Brace & Company. 33-64.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson J.D. 1994. Most cancers are probably initiated by a change in the cell's DNA sequence. *In: Cancer. Molecular Biology of the Cell*. 3rd Ed. Garland, New York. 1259-1260.
- Ademoyero, A.A. and Dalvi, R.R. 1983. Efficacy of activated charcoal and other agents in the reduction of hepatotoxic effects of a single dose of aflatoxin B₁. *Toxicol. Letters*, 16: 153-157.
- Akano, D.A. and Atanda, O.O. 1990. The present level of aflatoxin in Nigeria groundnut cake ("Kulikuli"). *Lett. Appl. Microbiol.*, 10: 187-189.
- Allcroft, R., Rogers, H., Lewis, G., Nabney, J. and Best, P.E. 1966. Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the "milk toxin". *Nature* (London), 209: 154-155.
- Alpert, M.E., Hutt, M.S.R., Wogan, G.N. and Davidson, C.S. 1971. Association between aflatoxin content of food and hepatoma frequency in Uganda. *Cancer*, 28: 253-260.
- Alter, M.J. 1993. The detection, transmission, and outcome of hepatitis C virus infection. *Infectious Agents and Disease*, 2 (3): 155-163.
- Álvarez, M.T., Escobar, A. y Macías, R. 1990. Prevalencia de aflatoxina en 2 Municipios de la Ciudad de la Habana. *Boletín Epidemiológico. MINSAP*. Vol. 8: 13-15.
- Álvarez, M.T., Castañeda, C.A., Escobar, A. y Fragoso, T. 1991. Detección de aflatoxina en la orina en enfermedades hepáticas en la infancia. *Rev. Gen. Soc. Ven. Gastro.*, 45 (3): 205-209.
- Alvarez, M.T., Castañeda, C., Ruisánches, N. y Fragoso, T. 1994. Valor de la determinación de aflatoxina en orina de niños con enfermedades del hígado por virus B de la hepatitis. *Cancerología. IMSS*. Vol. 40 (4): 186-189.
- Apeageyi, F., Lamplugh, S. M., Hendrickse, R.G., Afframy, K. and Lucas, S. 1982. Aflatoxins in the livers of children with kwashiorkor in Ghana. *Tropical and Geographical Medicine Home. Med. Biol. Environ.* Sep-Dec.: 9-12.
- Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L. and Wogan, G.N. 1965. The structures of aflatoxins B and G₁. *J. Am. Chem. Soc.*, 87: 882-886.

- Ashihara, Y., Nishizono, I., Suzuki, H. and Kasahara, Y. 1987. Homogeneous enzyme immunoassay for macromolecular antigens using hybrid antibody. *J. Clin. Lab. Anal.*, 1:77-79.
- Astrup, H., Bradley, K.A. Shamsuddin, A.K.M., Wakhisi, J. and Wasunna, A. 1983. A detection of putative adduct with fluorescence characteristics identical to 2,3-dihydro-2-(7'-guanyl)-3-hydroxyafatoxin B1 in human urine collected in Murangá District, Kenya. *Carcinogenesis* (Lond.), 4:1193-1195.
- Astrup, H., Serement, T. and Wakhisi, J. 1990 Evidence for human antibodies that recognize an aflatoxin epitope in groups with high and low exposure to aflatoxin. *Arch. Environ. Health*, 45(1): 31-34.
- Austin, H., Delzell, E., Grufferman, S., Levine, R., Morrison, A.S., Stolley, P.D. and Cole, P. 1986. A case-control study of hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus, cigarette smoking and alcohol consumption. *Cancer Res.*, 46: 962-966.
- Avila-Castro, R.M. 1991. Detección de aflatoxinas y zearalenona en cacahuete y sus productos derivados. *Tesis de Licenciatura de Biología, UNAM*. México. 62.
- Balaraman, N. and Arora, S.P. 1987. Effects of aflatoxin on immunoglobulin status in blood serum of neonatal calves. *Ind. J. Anim. Sci.*, 57: 61-63.
- Beasley, R.P. 1982. Hepatitis B virus as the etiologic agent in hepatocellular carcinoma: epidemiologic considerations. *Hepatology*, 2(2): 21 S-26 S.
- Beasley, R.P. 1988. Hepatitis B virus. The mayor etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 61: 1942-1956.
- Becroft, D.M.O. 1966. Syndrome of encephalopathy and fatty degeneration of viscera in New Zealand children. *Br. Med. J.*, 2: 135-140.
- Bennett, R.A., Essigmann, J.M. and Wogan, G.N. 1981. Excretion of an aflatoxin-guanine adduct in the urine of AFB₁-treated rats. *Cancer Res.*, 41: 650-654.
- Bilgrami, S.K., Prasad, T. and Sahay, M. 1985. Influence of vitamins on aflatoxin production. *Indian Phytopath.*, 38(4): 700-703.
- Bilgrami, K.S. and Sinha, K.K. 1992. Aflatoxin: their biological effects and ecological significance. In: *Mycotoxins in Ecological Systems. Handbook of Applied Mycology Vol. 5.*, Editors: Bhatnagar D., Lillehoj, E. B. and Arora D.K. Marcel Dekker, Inc. Ed. New York, Basel and Hong Kong. 59-86.
- Blumerg, B.S. 1985. Hepatitis B virus and prevention of primary cancer liver. *J. Natl. Cancer Inst.*, 74 (2): 27-273.

- Bosch, F.X. and Muñoz, N. 1988. Prospects of epidemiological studies on hepatocellular cancer as a model for assess viral and chemical interactions. *In: Methods for detecting DNA damaging agents in humans: applications to cancer epidemiology and prevention. IARC Scientific Publication N° 89*, Eds. Bartsch, H., Hemminki, K. and O'Neill, I.K., IARC, Lyon, France. 427-438.
- Büchi, G., Spitzner, D., Paglialonga, S. and Wogan, G.N. 1973. Synthesis and toxicity evaluation of aflatoxin P₁. *Life Sci.*, 13: 1143-1149.
- Bulatao, J.J. 1982. A case-control dietary study of primary liver cancer risk from exposure. *Int. J. Epidemiol.*, 11: 113-119.
- Butler, W.H. 1974. Aflatoxin. *In: Purchase, I.F.H. Ed. Mycotoxins*. Amsterdam, Elsevier. pp. 1-28.
- C.A. Cancer Statistics. 1994. *Cancer Journal for Clinicians*, 44 (1): 7-26.
- Calvin, J., Burling, K., Blow, C., Barnes, I., and Price, C.P. 1986. Evaluation of fluorescence excitation transfer immunoassay for measurement of specific proteins. *J. Immunol. Methods*, 86: 249-256.
- Campbell, T.C. and Salamat, L. 1971. Aflatoxin ingestion and excretion by humans. *In: I.F.H. Purchase Ed. Symposium on mycotoxins in human health*. Mac Millan Press, London. 271-280.
- Carnaghan, R.B.A. 1965. Hepatic tumors in ducks fed on low level of toxic groundnut meal. *Nature* (London), 208:308.
- Carvajal, M. 1987. Mycotoxin carryover from grain to tortillas in Mexico. *In: Zuber, M.S., E.B. Lillehoj and B.L. Renfro. Aflatoxin in Maize: A Proceeding of the Workshop. CIMMYT/USAID/UNDP*. Mexico, D.F. 318-319.
- Carvajal, M., Mulholland, F. and Garner, R.C. 1990. Comparison of the EASI-EXTRACT immunoaffinity concentration procedure with the AOAC CB method for the extraction and quantitation of aflatoxin B₁ in raw ground unskinned peanuts. *Journal of Chromatography*, 511: 379-383.
- Carvajal, M. and Irvin, T.R. 1988. Mycotoxins of 'tortillas, their carcinogenic and cytotoxic effects. Section XVI. Poster 1-17. *V International Congress of Plant Pathology. Kyoto, Japan, August 20-27, 1988*. 450.
- Chalkias, A. 1989. Interim report on the sex distribution of hepatocellular carcinoma. *IARC Scientific publications*. 1-18.
- Chan, D.W. and Perstein, M.T. 1987. Immunoassay. A practical guide New York: Academic Press. 1-36.

- Chang, S.B., Abdel-Kader, M.M., Wick, E. L. and Wogan, G. N. 1963. Aflatoxin B₂: Chemical identity and biological activity. *Science*, 142: 1191-1192.
- Chapot, B. and Wild, C.P. 1991. ELISA for quantification of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. *In*: Bullock, G.R., Van Velzen, D. and Warhol, M. *Techniques in diagnostic pathology*. Academic Press, Ltd. London, 2: 135-155.
- Chevel, B. 1989. Eléments d'Epidemiologie des maladies digestives. *Med. Clin. Diag.* Tome 18, suppl 8:1-8.
- Chu, F.S. 1984. Immunoassays for analysis of mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 47 (7): 562-569.
- Chu, F.S., Fan, T.S.L., Zhang, G-S. and Xu Y-C. 1987. Improved enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B₁ in agricultural commodities. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70(5):854-857.
- Crespo, J., Lozano, J. L., De la Cruz, F., Rodrigo, L., Rodríguez, M., San Miguel, G., Artiñano, E. and Pons-Romero, F. 1994. Prevalence and significance of hepatitis C viremia in chronic active hepatitis B. *The American Journal of Gastroenterology*, 89 (8): 1147-1151.
- Croy, R.G., Essigmann, J.M., Reinhold, V.N. and Wogan, G.N. 1978. Identification of the principal aflatoxin B₁-DNA adduct formed 'in vivo' in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75 (4): 1745-1749.
- Cullen, J.M., Ruebner, B.H., Hsieh, L.S., Hyde, D.M. and Hsieh, D.P. 1987. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M₁ in male Fisher rats compared to aflatoxin B₁. *Cancer Res.*, 47: 1913-1917.
- Dalezios, J.I., Wogan, G.N. and Weinreb, S.M. 1971. Aflatoxin P₁: A new aflatoxin metabolite in monkeys. *Science*, 171: 584-585.
- Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. 1993. Cáncer. Carcinógenos químicos. Naturaleza de la carcinogénesis; múltiples causas y múltiples etapas. *En: Biología Celular y Molecular*. Eds. Omega. Barcelona. 1053-1071.
- Deger, G.E. 1976. Aflatoxin: human colon carcinogenesis. *Ann. Intern. Med.* 85: 204-208.
- De Hoyos, A., De la Mora, G., Mondragón, G., Chevaile, A., Pérez, G.R., Boccicchio, T., Sixtos, S., Herrera, J. y Uribe, M. 1993. Características de la infección por virus B y C de hepatitis en pacientes en hemodiálisis crónica. *Rev. Gastroenterol. Méx.*, 58 (2): 327.

- De longh, H., Beerthuis, R.K., Vles, R.O., Barrett, C.B. and Ord, W.O. (1962). Investigation of the factor in groundnut meal responsible for turkey X disease. *Biochim. Biophys Acta*, 65: 548-551.
- De Miguel, J.A. 1987. Rapid detection of aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* group isolated from mixed feed and cereal grain in Spain. *J. Sci. Food Agric.*, 40: 11-15.
- Detroy, R.W. and Hesseltine, C.W. 1970. Aflatoxicol: Structure of a new transformation product of aflatoxin B₁. *Can. J. Biochem.*, 48: 830-832.
- Dhavan, A.S. and Choudary, M.R. 1995. Incidence of aflatoxins in animal feedstuffs: a decade's scenario in India. *Journal of AOAC International*, 78(3): 693-698.
- Díaz, L.M., Lisker, M.M., Meléndez, N., Sixtos, S. y Ramírez, T. 1993. Anticuerpos anti-hepatitis C (anti-HCV) en pacientes transfundidos con productos sin escrutinio serológico. *Rev. Gastroenterol. Méx.*, 58 (2): 326.
- Diener, U.L., Davis, N.D. and Danilson, D.A. 1985. Detoxification of aflatoxin-contaminated corn makes grain safe for feeding. *Highlights of Agricultural Research*, 32(2): 235.
- Dirección General de Epidemiología. 1993. Veinte principales causas de mortalidad, Estados Unidos Mexicanos, 1991. *SSA*. s/p.
- Dirección General de Epidemiología. 1994. Mortalidad 1993. *SSA*. México. 383 pp.
- Dichter, C.R. 1984. Risk estimates of liver cancer due to aflatoxin exposure from peanut products. *Food Chem. Toxicol.*, 22: 431-436.
- Di Paolo, J.A., Elis, J. and Erwin, H. 1967. Teratogenic response by hamsters, rats and mice to Aflatoxin B₁. *Nature* 215(5): 638-639.
- Dvorácková, I., Kusák, V., Veseley, D., Veselá, J. and Nesnídal, P. 1977. Aflatoxin and encephalopathy with fatty degeneration of viscera (Reye). *Ann. Nutr. Aliment.*, 31: 977-989.
- Dvorácková, I., Stora, C. and Ayraud, N. 1981. Evidence for aflatoxin B₁ in two cases of lung cancer in man. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 100: 221-224.
- Dragsted, L.O., Bull, I. and Autrup, H. 1988. Substances with affinity to a monoclonal aflatoxin B₁ antibody in Danish urine samples. *Fd. Chem. Toxicol.*, 26(3):233-242.

- Dutton, M.F., Ehrlich, K. and Bennett, J.W. 1985. Biosynthetic relationship among aflatoxins B1, B2, M1 and M2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 (6):1392-1395.
- Ehrlich, K. and Ciegler, A. 1985. Effect of phytate on aflatoxin formation by *Aspergillus parasiticus* grown on different grains. *Mycopathologia*, 92:3-6.
- Essigmann, J.M., Croy, R.G., Nadzan, A.M., Busby, W.F., Reinhold, V.N., Büchi, G. and Wogan, G.N. 1977. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B₁ *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74 (5):1870-1874.
- Escobar, A., Margolles, E. and Acosta, A. 1991. Synthesis and characterization of three aflatoxin B₁-protein conjugates. *Food and Agricultural Immunology*, 3: 57-61.
- Escobar, A., Mella, C. y Acosta, A. 1990. Cuantificación de aflatoxina por un método inmunoenzimático. *Salud Anim.*, 12: 294-298.
- Esteban, J.L., Vidalomiu, L., González, A., Roget, M. and Genesca, J. 1989. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet*, 2: 294-297.
- Fan, T.L. and Chu, F. 1984. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of aflatoxin B₁ in corn and peanut butter. *Journal of Food Protection*, 47 (4): 263-266.
- Fay, O. 1990. Hepatitis B Latin America epidemiological pattern and eradication strategy. The Latin American regional Study group. *Vaccine*, 8: S100.
- Fay, O., Schtzmayer, H., Visona, C., Brahn, J., Garassini, N., Russi, C., Rey, J. and Chiera, A. 1994. Prevalence of HCV antibodies in Latin America Hepatology. *IASL*. Abstract: 92.
- Fujimoto, Y., Hampton, L. L., Luo, L., Wirth, P.J. and Thorgeirsson, S.S. 1992. Low frequency of p⁵³ gene mutation in tumors induced by aflatoxin B₁ in nonhuman primates. *Cancer Res.*, 52: 1044-1046.
- Garner, R.C. 1985. Assessment of carcinogen exposure in man. *Carcinogenesis*, 6: 1071-1078.
- Garner, R.C., Ryder, R. and Montesano, R. 1985. Monitoring of aflatoxins in human body fluids and application to field studies. *Cancer Res.*, 45: 922-928.

- Garner, R.C., Whattam, M.M., Taylor, P.J.L. and Stow, M.W. 1993 Analysis of United Kingdom purchased spices for aflatoxins using an immunoaffinity column clean-up procedure followed by high-performance liquid chromatographic analysis and post-column derivatisation with pyridinium bromide perbromide. *Journal of Chromatography*, 648: 485-490.
- Giralt-Pont, J., Javierre-Jordana, J.A., Piñol-Campanera, J.M. y Ramallo-Arroyo T. 1989. El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos. *Lucta*, S.A. 2ª Edición. Barcelona, España. 57-80.
- González, M., Molerio, J. y Muñoz, M.C. 1990. Evaluación de la acción fungicida del ozono frente a *A. flavus* a productos vegetales contaminados con este hongo. *I Congreso Ibero Latinoamericano de Aplicaciones del ozono. C. de la Habana Cuba*. 12 pp.
- Gopalan, C., Tulpule, P.G. and Krishnamurthi, D. 1972. Induction of hepatic carcinoma with aflatoxin in the rhesus monkey. *Food Cosmet. Toxicol.*, 10: 519-521.
- Gosling, J.P. 1990. A decade of development in immunoassay methodology. *Clin. Chem.*, 36 (8): 1408-1427.
- Groopman, J.D., Haugen, A., Goodrich, G.R., Wogan, G.N. and Harris, C.C. 1982. Quantitation of aflatoxin B₁ modified DNA using monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 42: 3120-3124.
- Groopman, J.D., Donahue, P.R., Zhu, J., Chen, J. and Wogan, G.N. 1985. Aflatoxin metabolism in humans: Detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 6492-6496.
- Groopman, J.D. and Donahue, K.F. 1988. Aflatoxin, a human carcinogen: Determination in foods and biological samples by monoclonal antibody affinity chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71 (5): 861-867.
- Groopman, J.D. and Sabbioni, G. 1991. Molecular dosimetry of human aflatoxin exposure. Epidemiological analytical and social consideration. *CRL Press*. Boston. 263-280.
- Groopman, J.D., Jiaqi, Z., Donahue, P.R., Pikul, A., Lisheng, Z., Jun-shi, C. and Wogan, G. N. 1992. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi autonomous region, People's Republic of China. *Cancer Res*. 52: 45-52.

- Groopman, J.D., Wild, C.P., Hasler, J., Junshi, C., Wogan, G.N. and Kensler, T.W. 1993. Molecular Epidemiology of aflatoxin exposure: Validation of aflatoxin-N⁷-Guanine levels in urine as a biomarker in experimental rat models and humans. *Environmental Health Perspectives*, 99:107-113.
- Groopman, J.D., Wogan, G.N., Roebuck, B.D. and Kensler, T.W. 1994. Molecular biomarkers for aflatoxins and their application to human cancer prevention. *Cancer Res.* (suppl). 54: 1907 s -1911 s.
- Guattocchi, O.A. 1992. Introducción a la HPLC. (Aplicación Práctica) *Artes Gráficas Farro*. Buenos Aires. 50-110.
- Geldner, R.C., Wilson, D.M. and Heidt, A.R. 1985. Volatile compounds inhibiting *Aspergillus flavus*. *J. Agric. Food Chem.*, May/June, 411-413.
- Hadler, S.C., Fay, O.H., Pinheiro, F. y Maynard, J.E. 1987. Las hepatitis en las Américas. Informe del grupo colaborador de la OPS. *Bol. of Sanit. Panam.*, 103: 185-209.
- Hagler, W.M., Hutchins, J.E. and Hamilton, P.B. 1982. Destruction of aflatoxin in corn with sodium bisulfite^{1,2,3}. *Journal of Food Protection*, 45(14):1287-1291.
- Hair, J.F., Anderson, R.E., Tatham, R.L. and Black, W.C. 1995. Multidimensional scaling *In: Multivariate data analysis*. Fourth Ed. *Prentice Hall*, Englewood Cliffs, New Jersey. 484-491.
- Harcharan, D., Tandon, M.D., Badri, N. and Velimiri, R. 1978. Epidemic of toxic hepatitis in India of possible mycotoxic origin. *Arch. Pathol Lab. Med.* 102: 372-374.
- Harper, H.A. 1971. Manual de Química Fisiológica. 3a Ed. *El Manual Moderno*, S.A. 621 pp.
- Harrison, J.C., Carvajal, M. and Garner, R.C. 1991. Immunological detection of AFB1-DNA and AFB1- serum albumin adducts in rat and human tissues. *In: Human Carcinogen Exposure: Biomonitoring and Risk Assessment*. *Oxford University Press, Oxford*. 255-265.
- Harrison, J.C., Carvajal, M. and Garner, R.C. 1993. Does aflatoxin exposure in the United Kingdom constitute a cancer risk? *Environmental Health Perspectives*, 99: 99-105.
- Hartley, R.D., Nesbitt, B.F., and O'Kelly, J. 1963. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, 198: 1056-1058.

- Hayes, J.D., Judah, D.J., McLellan, L.I. and Neal, G.E. 1991. Contribution of the glutathione S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B₁. *Pharmacol. Ther.* 50. 443-472.
- Heathcote, J.G., Dutton, M.F. and Hibbert, J.R. 1976. Biosynthesis of aflatoxins. *Chem. Ind. (London)*, (6): 270-272.
- Hendrickse, R.G., Maxwell, S.M., Young, D.M. and Yourtee, H.G. 1989. Aflatoxins and heroin. Proc. of the Int. Symp. on Agric. and Biol. Aspects of aflatoxin related health Hazards. *J. Toxicol. Toxin Review.* 89-94.
- Hesseltine, C.W. 1967. Aflatoxins and other mycotoxins. *Health Laboratory Science*, 4(4): 222-228.
- Hill, R.A., Blankenship, P.D., Cole, R.J. and Sanders, T.H. 1983. Effect of soil moisture and temperature of preharvest invasion of peanuts by the *Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin development. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 629-633.
- Holeski, C.J., Eaton, D.L., Monroe, D.H. and Bellamy, G.M. 1987. Effects of phenobarbital on the biliary excretion excretion of aflatoxin P₁-Glucuronide and aflatoxin B₁-S-glutathione in the rat. *Xenobiotica*, 17: 139-153.
- Holzappel, C.W., Steyn, P.S. and Purchase, I.F.H. 1966. Isolation and structure of aflatoxins M₁ and M₂. *Tetrahedron Lett.*, 25: 2799-2803.
- Hsieh, L.L., Hsu, S.W., Chen, D.S. and Santella R.M. 1988. Immunological detection of aflatoxin B₁-DNA adducts formed '*in vivo*'. *Cancer Res.*, 48: 6328-6331.
- Hsieh, D.P.H. and Atkinson, D.N. 1995. Recent aflatoxin exposure and mutation at codon 249 of the human p⁵³ gene: lack of association. *Food additives and contaminants.* 12 (3):421-424.
- Irvin, T.R. 1987. Development of DNA adduct technology to monitor human exposure to cancer-causing mycotoxins. *In: Aflatoxin in Maize: A Proceeding of the Workshop.* Eds. Zuber, M.S., E. B. Lillehoj and B.L. Renfro. *CIMMYT/ USAID/ UNDP.* Mexico, D.F. 79-91.
- Ishikawa, E. and Kato, K. 1977. Ultrasensitive enzyme immunoassay. *Blackwell Scientific Publications.* 155 pp.
- Jones, B.D. 1977. Chemistry of mycotoxins. *In: Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook. Vol.1.*, T.D. Willie y L.G. Morehouse Eds. New York and Basel. 136-143.

- Jones, H.G. 1987. Correction for non-specific interference in competitive immunoassays. *Physiol. Plantarum.*, 70: 146-154.
- Jones, R.K. 1983. Minimizing the impact of corn aflatoxin. *Plant. Disease.*, 67 (11): 1297-1298.
- Jones, B.D., Kenneford, S., Nagler, M.J., Meadley, J. and Buangsuwan, D. 1986. Efforts to control the levels of aflatoxin in South-East Asian maize. *International Biodeterioration Supp.*, 22: 89-94.
- Joshua, H. 1993. Determination of aflatoxins by reversed-phase high-performance liquid chromatography with post-column in line photochemical derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, 654: 247-254.
- Kaveri, S.V., Fremy, J.M., Lapeyre, C., and Strosberg, A.D. 1987. Immunodetection and immunopurification of aflatoxins using a high affinity monoclonal antibody to aflatoxin B₁. *Letters in Applied Microbiology*, 4:71-75.
- Kenichi, K. 1982. The correlation of non A, non B, hepatitis virus with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2: 117.
- Kensler, T.W., Davidson, N.E., Egner, P.A., Guyton, K.Z., Groopman, J.D., Curphey, T.J., Liu, Y. and Roebuck, B.D. 1990. Chemoprotection against aflatoxin-induced hepatocarcinogenesis by dithiolethiones. In: *Mycotoxins, Cancer, and Health. Vol. 1*. Bray, G.A. and Ryan, D.H. (Eds). Louisiana State University Press. Baton Rouge and London. 238-252.
- Kemeny, D.M., Richards, D., Durnin, S. and Johansson, A. 1989. Ultrasensible enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of picogram quantities of Ig E. *J. Immunol. Methods*, 120: 251-258.
- Kirby, G.M., Wolf, C.R., Neal, G.E., Judah, D.J., Henderson, C.J., Srivatanakul, P. and Wild, C.P. 1993. *In vitro* metabolism of aflatoxin B₁ by normal and tumorous liver tissues from Thailand. *Carcinogenesis*, 14: 2613-2620.
- Kok, W.T. 1994. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.*, 659: 127-137.
- Krishnamachari, K.A.V.R., Bhat, R.V., Nagarajan, V. and Tilak, T.B.G. 1975. Hepatitis due to aflatoxicosis. *The Lancet*, 1: 1061-1066.
- Kumagai, S. 1989. Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 97: 88-97.

- Langone, J.L. and Van Vunakis, H. 1976. Aflatoxin B₁: specific antibodies and their use in radioimmunoassay. *J. Natl. Cancer Inst.*, 56(3): 591-595.
- Laurosze, B. and London, W.T. 1976. Host responses to hepatitis B infection in patients with primary hepatic carcinoma and their families: A case control study in Senegal West Africa. *Lancet*, 11: 534.
- Lawellin, W., Grant, D.W. and Joyce, B.K. 1977. Enzyme-linked immunosorbent analysis for aflatoxin B₁. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 94-96.
- Lee, H. A. and Morgan, M.R.A. 1993. Food immunoassay: applications of polyclonal, monoclonal and recombinant antibodies. *Trends in Food Science & Technology*, 4 (5): 129-134.
- Lehtonen, O.P. and Viljanen, M.K. 1980. Antigen attachment in ELISA. *Journal of Immunol. Methods*, 34: 61-70.
- Lillehoj, E.B., McMillian, W.W., Widstrom, N.W., Guthrie, W.D., Jarvis, J.L., Barry, D. and Kwolek, W.F. 1984. Aflatoxin contamination of maize kernels before harvest. *Mycopathologia*, 86: 77-81.
- Lin, J.K., Miller, J.A. and Miller, E.C. 1977. 2,3-dihidro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy-aflatoxin B₁, a major acid-hydrolysis product of AFB₁-DNA or ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsome mediate reactions and in rat liver *in vivo*. *Cancer Res.* 37(12): 4430-4438.
- Lisker-Melman, M., Martin, P. and Hoofnagle, J.H. 1989. Conditions associated with hepatocellular carcinoma. *Medical Clinics of North America*, 73(4): 999- 1009.
- Lisker-Melman, M., Chan, C., Borovoy, J., Sixtos, S., Ramírez, T., Malé R., Trejo, R., Morales, M. y Guevara, A. L. 1990. Marcadores serológicos de hepatitis B en residentes médicos en el área metropolitana. *Rev. Gastroenterol. Méx.*, 56: 65.
- Llewelyn, G.C., Stephenson, G.A. and Hoffman, J.W. 1977. AFB₁ toxicity and teratogenicity in Japanese Medaka eggs (*Oryzias latipes*). *Toxicol.* 15: 582-587.
- Lovborg, U. 1982. Monoclonal antibodies, production and maintenance. *Heinemann Medical Books*. London. 245 pp.
- Mandell, G.L., Douglas, R.G. and Bennett, J.E. 1992. Hepatitis crónica *En: Parte I. Principios básicos en el diagnóstico y manejo de las enfermedades infecciosas. Médica Panamericana*. México. 1054-1065.

- Martin, C.N. and Garner, R.C. 1977. Aflatoxin-B oxide generated by chemical or enzymic oxidation of aflatoxin B₁ causes guanine substitution in nucleic acids. *Nature*, 267: 863-865.
- Masri, M.S., Booth, A.N. and Hsieh, D.P.H. 1974. Comparative metabolic conversion of aflatoxin B₁ to aflatoxin M₁ and aflatoxin Q₁ by monkey, rat and chicken liver. *Life Sci.*, 15:203-212.
- Massey, T. E., Stewart, R.K., Daniels, J.M. and Liu, L. 1995. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B₁ carcinogenicity. *The Society for Experimental Biology and Medicine*. 208: 213-227.
- Mast, E.E. and Alter, M.J. 1993. Epidemiology of viral hepatitis: overview. *Seminars in Virology*, 4: 273-283.
- Maynard, J.E. 1990. Hepatitis B: global importance and need for control. *Vaccine*, 8: S18-S20.
- Meléndez, N., Cifuentes, O. J., Díaz, L., Guadarrama, E., Chávez, B., Hernández, L., Hurtado, R. y Lisker, M.M. 1993. Prevalencia de marcadores de hepatitis en la población de donadores del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. (1991-1993). *Rev. Gastroenterol. Mex.*, 58 (2): 326.
- Meléndez, N., González, M., Almazán, J., Marín, E., Lisker, M. y Poo, J.L. 1992. Historia natural del carcinoma hepatocelular en el Instituto Nacional de la Nutrición. *Rev. Gastroenterol. Méx.*, 57 (S3): 277-278.
- Miller, D.M., Clark, J.D., Hatch, R.C. and Jain, A.V. 1984. Caprine aflatoxicosis; serum electrophoresis and pathologic changes. *Am. J. Vet. Res.*, 45: 1136-1141.
- MMWR. 1993. Deaths and hospitalizations from chronic liver disease and cirrhosis-United States, 1980-1989. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Vol. 41, N° 52 & 53: 969-973.
- Morgan, M.R.A. 1989. Mycotoxin immunoassays (with special reference to ELISAs). *Tetrahedron*, 45 (8):2237-2249.
- Narro-Robles, S., Gutiérrez, A.H., López, C.M., Phil, M., Borges, G. y Rosovsky, H. 1992. La mortalidad por cirrosis hepática en México I. Características epidemiológicas relevantes. *Salud Pública de México*, 34 (4): 378-387.

- Narro-Robles, S., Meneses, G.F. y Gutiérrez, A.H. 1994. Consecuencia comunitaria del consumo de alcohol en: Las adicciones: Dimensión, impacto y perspectivas. *Manual Moderno*, México-Santa Fé, Bogotá, Colombia. 231-236.
- Neal, G.E. 1987. Influences of metabolism: aflatoxin metabolism and its possible relationships with disease. Chap. 5: *Natural toxicants in food. Progress and Prospects*. D.H. Watson Ed. Ellis Horwood Ltd. Chichester (England).
- Neal, G.E. 1995. Genetic implications in the metabolism and toxicity of mycotoxins. *Toxicology Letters* 82/83: 861-867.
- Norred, W.P. 1982. Ammonia treatment to destroy aflatoxins in corn. *Journal of Food Protection*, 45(10): 972-976.
- Nyathi, C.B., Mutiro, C.F., Hasler, J.A. and Chetsanga, C.J. 1987. A survey of urinary aflatoxin in Zimbabwe. *Int. J. Epidemiol.*, 16: 516-519.
- Olsen, J.H., Dragsted, I., and Astrup, H. 1988. Cancer risk and occupational exposure to aflatoxins in Denmark. *British Journal of Cancer*, 58: 236-250.
- OMS. 1988. Situación actual de la hepatitis vírica en el mundo. *Bol. of Saint Panam*, 105: 314-317.
- OPS-OMS. 1983. Criterios de salud ambiental 11: *Micotoxinas*. Publicación Científica. 453.
- Park, D.L. and Rua, S.M. 1991. Sample collection and sample preparation techniques for aflatoxin determination in whole cottonseed. *J. Assoc Off. Anal. Chem.*, 74 (1): 73-75.
- Parkin, D.M. 1988. Cancer occurrence in developing countries (*IARC Scientific Publications N° 75*). International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. 235 pp.
- Patey, A.L., Sharman, M. and Gilbert, J. 1990. Determination of aflatoxin B1 levels in peanut butter using an immunoaffinity column clean-up procedure: inter-laboratory study. *Food Additives and Contaminants*, 7(4):515-520.
- Patterson, D.S.P. 1977. Aflatoxins and related compounds. *In: Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook. Vol. I.*, T.D. Willie and L.G. Morehouse Eds. New York and Basel. 136-189.
- Peckok, R.L. and Shields, D. 1983. Métodos de análisis químicos. *Limusa*. México. 487 pp.

- Peers, F.G. and Linsell, C.A. 1973. Dietary aflatoxins and liver cancer a population based study in Kenya. *Br. J. Cancer*, 27: 473-484.
- Peers, F., Bosch, X., Kaldor, J., Linsell, A. and Pluijmen, M. 1987. Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland. *Int. J. Cancer*, 39: 545-553.
- Phillips, T.D., Clement, B.A., Kubena, L.F. and Harvey, R.B. 1988. Mycotoxin: Detection and detoxification. Proc. 23rd Natl. Meet. Poultry Health and Condemnations. Ocean City, MD. Delmarva Poultry Industry, Inc. 94-106.
- Pier, A.C., Fitchner, R.E. and Cysewski, S.J. 1977. Effect of aflatoxin on the cellular immune system. *Ann. Nutr. Anim.*, 34: 781-788.
- Price, R.L. and Jorgensen, K.V. 1985. Effects of processing on aflatoxin levels and on mutagenic potential of tortillas made from naturally contaminated corn. *J. Food Sci.*, 50: 347-349.
- Purchio, A.W., Gambale, C.P. and Barbieri, M. 1988. Survey of mycotoxins (aflatoxins, patulin, ochratoxin, and sterigmatocystin) and correlate fungi in dietary cattle feedstuffs. *Rev. Microbiol.*, 19: 172-176.
- Rausuddin, R., Singh, K.P., Zaidi, S.I.A. and Saxena, A.K. 1990. Effects of aflatoxin of lymphoid cells of weanling rats. *J. Appl. Toxicol.*, 10: 245-250.
- Reye, R.D.K., Morgan, G. and Baral, J. 1963. Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera: A disease entity in childhood. *Lancet*, 2: 749-752.
- Rodricks, J.V., Stoloff, L., Pons, W.A. Jr. Robertson, J.A. and Goldblatt, L.A. 1970. Molar absorptivity values for aflatoxins and justification for their use as criteria of purity of analytical standard. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 53:96-101.
- Rodríguez, C. 1988. Identificación de la micoflora y análisis de las micotoxinas en pastas para sopa. *Tesis de Licenciatura en la carrera de Biología, UNAM. México, 54 pp.*
- Rosiles-Martínez, R. 1979. Las aflatoxinas en las tortillas. *Veterinaria Méx.*, 10:37-44.
- Roy, A.K. and Chourasia, H. K. 1989. Effect of temperature on aflatoxin production in macuna pruriens seeds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 531 - 532.
- Samarajeewa, U., Sen, A.C., Fernando, S.Y., Ahmed, E.M. and Wei, C.I. 1991. Inactivation of aflatoxin B1 in corn meal, copra meal and peanuts by chlorine gas treatment. *Food Chem. Toxic.*, 29 (1): 41-47.

- Sánchez-Regueiro, O., García-Pino, C. y Grata-González, E. 1984. Niveles de aflatoxina B en arroz, trigo y algunos de sus derivados. *Rev. Cub. Hig. Epid.*, 22: 92-97.
- Scott, P.M. 1990 Natural Poisons. *AOAC Official Methods of Analysis*, 49:1184-1199.
- Secretaría de Salud. 1993a. Información epidemiológica de Morbilidad. Tomo II. México, 135 pp.
- Secretaría de Salud. 1993b. Registro de Neoplasias Malignas: (Resultados) México. s/p.
- Shank, R.C., Bourgeois, C.H., Keschamras, N. and Chandavimol, P. 1971. Aflatoxins in autopsy specimens from Thai children with an acute disease of unknown ethiology. *Food Cosmet. Toxicol.*, 9: 501-507.
- Shank, R.C., Wogan, G.N., Gibson, J.B. and Nondasuta, A. 1972. Dietary aflatoxins and human liver cancer. II. Aflatoxins in market foods and foodstuffs of Thailand and Hong Kong. *Food Cosmet. Toxicol.*, 10: 61-69.
- Shayig, R. M. and Avadhani, N. G. 1989. Purification and characterization of a hepatic mitochondrial cytochrome P-450 active in aflatoxin B1 metabolism. *Biochemistry*, 28(19): 7546-7554.
- Sherlock, S. 1989. Diseases of the liver and biliary system. 8th Ed. *Blackwell Scientific Publications*, 584-617.
- Shih, C. N. and Martin, E.H. 1974. Aflatoxin formation, lipid-synthesis and glucose-metabolism by *A. parasiticus* during incubation with and without agitation. *Biochim. Biophys. Acta*, 338 (1): 286-296.
- Singh, P. and Jang, L. 1987. A membrane-based enzyme immunoassay test for aflatoxin B₁. *Journal of Food Microbiology*, 5:73-80.
- Singh, A. and Sinha, K.K. 1983. Biochemical changes and aflatoxin production in guava fruits by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Indian Phytopathol.*, 36: 365-366.
- Sizaret, P., Malaveille, C.H., Montesano, R. and Frayssinet, C.H. 1982. Detection of aflatoxin and related metabolites by radioimmunoassay. *J.N.C.L.*, 69 (6): 1375-1381.

- Skinner, H.A. 1961. The Origin of Medical terms. *The Williams and Wilkins Co. U.S.A.*, 110.
- Steyn, P.S., Vlegaar, R. and Wessels, P.L. 1980. The Biosynthesis of aflatoxin and its congeners. Chap. 4. *In: The Biosynthesis of Mycotoxins*. Steyn, P.S. Ed. *Academic Press*. New York, U.S.A. 105-155.
- Stoloff, L. 1983. Aflatoxin as a cause of primary liver- cell in the United States: a probability study. *Nutr. Cancer*, 5: 165-186.
- Stora, C., Dvorácková, I. and Ayraud N. 1982. L'inhalation de poussière polluée par l'*Aspergillus flavus*. Une voie de contamination pour l'homme. *Médecine. Biologie. Environnement.*, Sep-Dec.:9-12.
- Stubblefield, R.D., Shotwell, O.L., Hesseltine, C.W., Smith, M.L. and Hall, H.H. 1967. Production of aflatoxin on wheat and oats: measurement with a recording densitometer. *Appl. Microbiol.* 15(1):186-190.
- Stubblefield, R.D., Shannon, M. and Shotwell, O.L. 1970. Aflatoxins M₁ and M₂: preparation and purification. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 47: 389-390.
- Stubblefield, R.D., Shotwell, O.L. and Shannon, G.M. 1972. Aflatoxins M₁ and M₂ and parasiticol: Thin layer chromatography and physical and chemical properties. *Journal of the AOAC.*, 55 (4): 762-767.
- Stubblefield, R.D., Greer, J.I., Shotwell, O.L. and Aikens, A.M. 1991. Rapid immunochemical screening method for aflatoxin B₁ in human and animal urine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74(3):530-532.
- Swenson, D.H., Lin, J.K., Miller, E.C. and Miller, J.A. 1977. Aflatoxin B₁-2, 3 oxide: as a probable intermediate in the covalent binding of aflatoxins B₁ and B₂ to rat liver DNA and ribosomal RNA 'in vivo'. *Cancer Res.*, 37: 172-181.
- Taguchi, S., Fukushima, S., Sumimoto, T., Yoshida, S. and Nishimune, T. 1995. Aflatoxins in foods collected in Osaka, Japan, from 1988 to 1992. *Journal of AOAC International*, 78 (2): 325-327.
- Torres, E., Naccha, L., Montoya, R. y Muñoz, L.E. 1994. Aflatoxina B₁ en fluidos biológicos, en pacientes con hepatocarcinoma. Abstr. 12. *Memorias del V Congreso Nacional de Micología*. Guanajuato, Guanajuato, 27 a 30 de noviembre de 1994.
- Townsend, R.J. 1967. Toxic moulds and their metabolites. *Int. Biodet. Bull.*, 3: 47-58.

- Treviño, G.M.N., Cabral, S.J., Escandón, R.C., Benítez, M.M.G., Ruiz, M.L., Fernández, G.I., Vázquez, M.J.L. y Coreño, J.M.O. 1994. Vigilancia epidemiológica y conceptos actuales en hepatitis viral. Jefatura de Servicios de Salud Pública. Subjefatura de *Epidemiología*. IMSS. 3-8.
- Trichopoulos, D. and Day, N.E. 1987. Hepatitis B virus, tobacco smoking and ethanol consumption in the etiology of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer*, 39: 45-49.
- Trinder, D.W. 1988. A survey of aflatoxins in industrially brewed South African sorghum beer and beer strainings. *J. Inst. Brew.*, 95: 307-309.
- Trucksess, M. W., 1994. Committee on natural toxins. Mycotoxins. General Referee Reports: *Journal of AOAC International*, 77 (1): 135-141.
- Tsuruta, O., Kawasugi, S., Saito, M. and Manabe, M. 1985. An examination on *Aspergillus flavus* infection of Thailand maize. *Proc. Japan. Assoc. Mycotoxicol.*, 21: 32-33.
- Tsuruta, O. 1987. Quality deterioration of cereal grains caused by fungal infection during storage. Corn and milo imported for feed. *JARQ.*, 20(4): 276-281.
- Tuite, J. 1977. The genus *Aspergillus*. In : *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook. Vol.1.*, T.D. Willie y L.G. Morehouse Eds. New York and Basel. 21-39.
- Tuma, D., Sinhinha, R.N., Muir, W.E. and Abramson, D. 1989. Volatiles associated with microflora in damp ventilated and non ventilated bin store bulk wheat. *Int. J. Food Microbiol.*, 8:103-119.
- Tumen, H.J. y Cohn, E.M. 1968. Cirrosis. *Gastroenterología*. Bockus, M.L. Recopil. T.III, Cap. 98. *Salvat Ed.* España. 312-422.
- Tyczkowski, J.K. and Hamilton, P.B. 1987. Altered metabolism of carotenoids during aflatoxicoses in young chicken. *Poultry Sci.*, 66: 1184-1188.
- Ulloa, M. y Herrera, T. 1970. Persistencia de las aflatoxinas durante la fermentación del pozol. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* Vol. 12:19-25.
- Van Rensburg, S.J. and VanDer Watt, J.J, Purchase, I. F. H., Pereira Coutinho, L. and Markham, R.S. 1974. Primary liver cancer rate and aflatoxin intake in high cancer area. *South African Medical Journal*, 48: 2508 a-d.
- Wei, C. and Hsieh, D.P.H. 1980. Aflatoxin in human and animal health. *Proc. of the 84 th. Annual Meeting of the US Animal Health Ass.* Louisville. Kentucky. USA.

- Wheeler, J.L., Harrison, M.A. and Koehler, P.E. 1987. *In vitro* metabolism of aflatoxin B1 with microsomal enzymes in the presence of selected nutrients. *Journal of Food Science*, 52(5): 1432-1433.
- Wild, C.P., Pionneau, F., Montesano, R., Mutiro, C.P. and Chetsanga, C.J. 1987. Aflatoxin in human breast milk. *Int. J. Cancer*, 40: 328-333.
- Wild, C.P., Chapot, B., Scherer, E., Den Engelse, L. and Montesano, R. 1988. The application of antibody methodologies to the detection of aflatoxin in human body fluids. In: *Methods for detecting DNA damaging agents in humans: Applications in Cancer Epidemiology and Prevention* (H. Bartsch, K. Hemminki, and I.K. O'Neill, Eds.). *IARC Scientific Publication N° 89*, International Agency for Research on Cancer, Lyon. 67-74.
- Wild, C.P., Jiang, Y.Z., Sabbioni, G., Chapot, B. and Montesano, R. 1990. Evaluation of methods for quantitation of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. *Cancer Res.*, 50: 245-251.
- Wild, C.P., Rasheed, F.N., Jawla, M.F.B., Hall, A.J., Jansen, L.A.M. and Montesano, R. 1991. In-utero exposure to aflatoxin in West Africa. *The Lancet*, 337:1602.
- Wild, C.P., Jansen, L.A.M., Cova, L. and Montesano, R. 1993. Molecular dosimetry of aflatoxin exposure: contribution to understanding the multifactorial etiopathogenesis of primary hepatocellular carcinoma with particular reference to hepatitis B virus. *Environmental Health Perspectives*, 99: 115-122.
- Wilkinson, A.P., Denning, D.W. and Morgan, M.R.A. 1989. Immunoassay of aflatoxin in food and human tissue. *Toxicol. Toxin Reviews*. 8(1&2): 69-79.
- Wogan, G.N. 1992. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Res.*, (suppl) 52: 2114s-2118s.
- Wright, A.S. 1991. Emerging strategies for the determination of human carcinogens: detection, identification, exposure monitoring, and risk evaluation. *In: Human Carcinogen Exposure: Biomonitoring and Risk Assessment*. Oxford University Press, Oxford. 3-23.
- Yadgiri, B., Reddy, V., Tulpule, P.G., Srikantia, S.G. and Gopalan, C. 1970. Aflatoxin and Indian childhood cirrhosis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 23: 94-98.
- Yang, S.S., Taub, J.V., Modali, R., Vieira, W., Yasei, P. and Yang G.C. 1985. Dose dependency of aflatoxin B1 binding on human high molecular weight DNA in the activation of proto-oncogene. *Environmental Health Perspectives*, 62: 231-238.

- Yeh, F.S., Mo, C.C., Luo, S., Henderson, B.E., Tong, M.J. and Yu, M.C. 1985. A serological case-control study of primary hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *Cancer Res.*, 45: 872-873.
- Yen, I. C. and Bidasee, K. R. 1993. Liquid chromatographic determination of aflatoxins in animal feeds and feed components. *Journal of AOAC International*, 76 (2): 366-370.
- Yoshizawa, H., Uchimaru, R., Kamataki, T., Kato, R. and Ueno, Y. 1982. Metabolism and activation of aflatoxin B₁ by reconstituted cytochrome P-450 system of rat liver. *Cancer Res.*, 42: 1120-1124.
- Yu, F.L., Render, W. and Geronimo, I.H. 1990. Base and sequence specificities of aflatoxin B₁ binding to single and double stranded DNAs. *Carcinogenesis*, 11(3): 475-478.
- Zuckerman, J., Clewley, G., Griffiths, P. and Cockcroft, A. 1994. Prevalence of hepatitis C antibodies in clinical health-care workers. *The Lancet*, 343: 1618-1619.
- Zhu, J., Zhang, L., Hu, X., Xiao, Y., Chen, J., Xu, Y., Fremy, J., and Chu, F.S. 1987. Correlation of Dietary Aflatoxin B₁ levels with excretion of aflatoxin M₁ in human urine. *Cancer Research*, 47: 1848-1852.

APÉNDICE 1: Encuesta sobre alimentos.

Fecha...../...../..... (dd/mm/aa)

Nº de Encuesta.....

Nº de Expediente..... Edad:..... Sexo:.....

Nombre

Diagnóstico:

Hepatitis B () Hepatitis C () Cirrosis Viral () Sano ()

Cirrosis alcohólica () Deficiencia renal () Enfermedad crónica no hepática ()

Diagnóstico histológico

Dieta de 24 y 48 horas

Desayuno

.....

.....

.....

.....

Comida

.....

.....

.....

.....

Cena

.....

.....

.....

.....

DIETA HABITUAL

Tipo de alimento	Cantidad (Unidad o gramos)	Frecuencia de ingestión				
		Rara vez o nunca	Veces x día	Veces x semana	Veces x mes	Veces x año
Productos derivados del maíz:						
Tortillas						
Tamales						
Pozole						
Tacos, quesadillas, sopes						
Totopos						
Botanas (fritos, doritos)						
Cereales de caja (Corn flakes, Zucaritas, etc.)						
Atoles, champurrados						
Productos derivados de trigo:						
Pastas (spaguetti, ravioli, etc.)						
Tortillas de harina						
Pan (bolillo, galletas, hot dogs, sandwiches, etc.)						
Sopas (aguadas), fideos, letras, etc.						
Pasteles						
Productos derivados del arroz:						
Arroz cocido						
Dulce de arroz						
Agua de horchata						
Cereal de arroz (Rice krispies)						

DIETA HABITUAL

Tipo de alimento	Cantidad Unidad o gramos	Frecuencia de ingestión				
		Rara vez o nunca	Veces x día	Veces x semana	Veces x mes	Veces x año
Semillas oleaginosas:						
Cacahuete dulce, salado, crema o en chocolates.						
Amaranto (alegría)						
Ajonjolí						
Nueces (dulces, saladas, en helado o postre)						
Almendras (dulces, saladas, en helado o postre)						
Piñones						
Avellanas						
Pepitas						
Pistaches						
Semilla de girasol						
Granola						
Coco fresco, en granola, dulces, cocada, postres, agua.						
Condimentos:						
Chiles secos, ancho, morita, mulato, etc.						
Adobos						
Moles						
Pepián						
Chocolate						
Mayonesa						
Mostaza						
Clavo, canela, pimienta.						

DIETA HABITUAL

Tipo de alimento	Cantidad (Unidad o gramos)	Frecuencia de ingestión				
		Rara vez o nunca	Veces x día	Veces x semana	Veces x mes	Veces x año
Productos lácteos:						
Leche						
Crema						
Quesos						
Yogourt						
Mantequilla						
Flanes, postres o dulces.						
Helado						
Productos cárnicos						
Pollo						
Huevo						
Vísceras: hígado y molleja.						
Res						
Vísceras: hígado, riñones, pancita, corazón, etc.						
Puerco						
Vísceras: hígado, riñones, piel, patitas, salchichas, jamón, etc.						

CONSUMO DE BEBIDAS ALCOHOLICAS

1) Acostumbra beber algún tipo de bebida alcohólica: Si () No ()

2) Desde hace cuánto tiempo tiene usted ese hábito: Años () Meses ()

Bebidas alcohólicas	Cantidad Unidad o gramos	Frecuencia de ingestión				
		Rara vez o nunca	Veces x día	Veces x semana	Veces x mes	Veces x año
Lata de cerveza						
Vaso de vino						
Una medida de Ron						
Una medida de Brandy						
Una medida de Cognac						
Una medida de Ginebra						
Una medida de Vodka						
Una medida de Tequila						
Un vaso de Pulque						
Otros						
Total						