



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
U. M. A. E. "DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA"
CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA"

"Aflatoxina B1 en sueros sanguíneos por espectrometría de
masas MALDI-TOF"

T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALIDAD EN:

PATOLOGÍA CLÍNICA

PRESENTA:

DRA. ANA DELIA REYES PÉREZ

ASESORA DE TESIS.

DRA. VERÓNICA ALEJANDRA GAONA FLORES
MÉDICO INTERNISTA E INFECTÓLOGA
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA CMN LA RAZA

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DR. RITA GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ

TITULAR DEL CURSO UNIVERSITARIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA
U.M.A.E. "DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA"
CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA", IMSS

DRA. MA. TERESA RAMOS CERVANTES

ENC DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN MÉDICA
U.M.A.E. "DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA"
CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA", IMSS

DRA. VERÓNICA ALEJANDRA GAONA FLORES

ASESOR DE TESIS
MEDICO INTERNISTA E INFECTÓLOGA
COORDINADOR CLÍNICO DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA DE CMN LA RAZA IMSS

DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS

COASESOR DE TESIS
INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

TÍTULO

“Aflatoxina B1 en sueros sanguíneos por espectrometría de
masas MALDI-TOF”

AGRADECIMIENTOS.

A *Dios* por acompañarme en cada momento.

Gracias con todo mi amor a los míos, por estar incondicionalmente a mi lado, *Papá, Mamá, Came, Faby, Angie, Lety, Toñita, Laura, Rosy, Telita, Rafa, Gaby, Guty*, ustedes han hecho que todo esto sea posible; gracias por su apoyo, los amo con todo mi ser.

Gracias a mi esposo *Edmundo*, mi ingeniero, que con su amor y ayuda mejoró significativamente este trabajo. Te amo amor mío.

Gracias a mi excelente asesora, Dra. Verónica Gaona que con su paciencia y vocación por la enseñanza hizo fácil lo difícil.

Gracias Dr. Roberto Arreguín, por sus conocimientos, por su disposición, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme todo lo necesario para lograr este trabajo.

Gracias al Instituto de Química, donde encontré a personas increíbles, que colaboraron en este trabajo, enriqueciéndolo con sus conocimientos, gracias Esteban, Miguel, Ulises, Fer, Ivette, además hicieron de mi estancia en el Instituto amena y divertida.

ÍNDICE

Investigador y asesor metodológico.....	6
Resumen.....	7
Marco teórico.....	10
Planteamiento del problema	20
Justificación	21
Objetivos.....	22
Tipo de estudio.....	22
Universo de trabajo.....	23
Criterios de selección.....	23
Variables.....	24
Diseño del estudio.....	25
Material y Método.....	25
Aspectos éticos.....	27
Aspectos de bioseguridad.....	28
Recursos y factibilidad.....	29
Análisis estadístico.....	29
Resultados.....	29
Discusión.....	34
Conclusión.....	36
Bibliografía.....	37

“Aflatoxina B1 en sueros sanguíneos por espectrometría de
masas MALDI-TOF”

Investigador Principal:

Dra. Verónica Alejandra Gaona Flores.

Hospital general “Dr. Gaudencio González Garza” Centro Médico Nacional “La Raza”.

Calzada Vallejo y Jacarandas s/n Colonia La Raza Delegación Azcapotzalco, cp. 02990 México, D.F.

Tel: 5724 5900 ext. 24427

E. mail: ygaona2@yahoo.com.mx

Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez

Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología. Centro Médico Nacional “La Raza”.

Calzada Vallejo y Jacarandas s/n Colonia La Raza Delegación Azcapotzalco, cp. 02990 México, D.F.

Tel: 5724 5900 ext. 24422

E. mail: bekkermendez@yahoo.com

Dra. Maria de la Luz Martinez Rodríguez

Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología. Centro Médico Nacional “La Raza”.

Calzada Vallejo y Jacarandas s/n Colonia La Raza Delegación Azcapotzalco, cp. 02990 México, D.F.

Tel: 5724 5900 ext. 24422

E. mail: lumaro61@yahoo.com.mx

“Aflatoxina B1 en sueros sanguíneos por espectrometría de masas MALDI-TOF”

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos, producidos principalmente por hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, durante reacciones bioquímicas al interrumpirse la reducción de grupos cetónicos en la ruta de ácidos grasos utilizados por los hongos como fuente de energía. Se caracterizan por ausencia de inmunogenicidad, amplio espectro de toxicidad y termoestabilidad; son contaminantes naturales de los alimentos y materias primas, como: maíz, soya, sorgo, arroz, trigo, entre otros.

El término micotoxinas, proviene de raíces griegas "mukes" refiriéndose a los hongos o mohos del fango y toxina del latín "toxicum"; haciendo referencia a un veneno utilizado en las flechas. Se han identificado más de 300 micotoxinas, las más frecuentes son: aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona; entre otras. Los metabolitos tóxicos son cancerígenos, teratogénicos e inmunosupresores; producen toxicidad hepática, afectando al igual a otros órganos y sistemas, los mecanismos propuestos por los que producen daño es el estrés oxidativo y la genotoxicidad.

En 1912 se describen a las aflatoxinas; estas micotoxinas fueron llamadas así; debido a que son producidas por hongos del grupo *Aspergillus flavus*; en 1960 en Escocia, cobraron importancia a partir de la muerte repentina de cien mil pavos que fueron alimentados con maní infectado con este metabolito fúngico, el cual provenía del Brasil.

Las aflatoxinas son inodoras, insípidas e incoloras, se han identificado al menos 20 tipos de aflatoxinas. Las más importantes por su toxicidad son: B1, B2, M1, M2, G1 y G2; sus efectos se producen al encontrarse con el complejo enzimático del citocromo P450 para su siguiente activación.

La exposición a la aflatoxina B1 (AFB1), ocurre principalmente a través de la vía enteral y vía aérea. El Instituto Internacional de Investigación en Cáncer, ha clasificado a la AFB1 como un carcinógeno Clase 1, toda vez que en este grupo están considerados los agentes carcinogénicos para los humanos. La medición de AFB1, permite evaluar su exposición crónica, las tecnologías utilizadas para ésta medición incluyen inmunoensayos, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y recientemente espectrometría.

La espectrometría de masas es una tecnología analítica esencial, debido a su alta capacidad de análisis, sensibilidad analítica y precisión en la determinación de las masas moleculares, así como los espectros de fragmentación que proporcionan.

La espectrometría de masas de desorción / ionización láser asistida por matriz (MALDI), se utiliza con éxito en el genoma, proteoma, metaboloma, y en la investigación de diagnóstico clínico. Nuevas pruebas han mostrado que no sólo son útiles en los análisis cualitativos y cuantitativos de proteínas, sino también de otros tipos de biomoléculas, tales como ADN, glicanos, y metabolitos.

Objetivo: Identificar la presencia de AFB1 en suero sanguíneo humano, de la colección de estudio en la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Centro Médico Nacional La Raza. (UIII CMN La Raza).

Estudio: Transversal, prolectivo, analítico, se llevó a cabo en la UIII CMN La Raza y en el Instituto de Química de la UNAM, en la Ciudad de México, durante los meses de Enero a Mayo de 2016.

Se incluyeron 25 muestras del Banco de sueros sanguíneos, ubicado en UIII CMN Raza, colectados durante 2015.

Método: De los sueros sanguíneos almacenados a menos 70°C; se tomaron al descongelarse 100µm. Se dispuso de una solución patrón de AFB1, a una concentración de 1mg/500µL, de ésta, se obtuvieron 6 alícuotas para obtener las soluciones de trabajo de 0.16mg/83.33µL. Las soluciones preparadas se mantuvieron congeladas a menos 80°C. La metodología empleada para el proceso de extracción de aflatoxinas es la propuesta por la A.O.A.C. Para la detección de

AFB1 se empleó espectrómetro de masas MALDI TOF Bruker Daltonics, constituido por un láser de nitrógeno, operando a 337 nm con una salida máxima de 500 mW. Todas las muestras fueron preparadas usando una solución de 5µL de α- ciano-4 ácido hidroxicinámico (CHCA) como matriz y 1 µm de la muestra. Los 6 µm fueron colocados en una placa de acero inoxidable, hasta su secado, para su identificación por espectrometría de masas.

RESULTADOS.

Se logró una detección eficiente del estándar de aflatoxina B1 realizado por MALDI TOF , los espectros de masa/ carga (m/z) de interés fueron obtenidos. Se observó pico molecular de AFB1 con PM de: 312.8808 así como su aducto con sodio, potasio y el dímero más un Na+. Con respecto a las muestras biológicas, la AFB1 fue detectada en 5 muestras de un total de 24, 3 de estas 5 muestras mostraron además en cada uno de sus espectros picos moleculares adicionales para la que presumiblemente sería AFG1 o AFM1 y AFG2 o AFM2. Mientras que 4 muestras más, aunque no mostraron la presencia de AFB1 si revelaron picos moleculares para los que posiblemente serían AFG1, AFM1, AFG2 y AFM2.

“Aflatoxina B1 en sueros sanguíneos por espectrometría de masas MALDI-TOF”

MARCO TEÓRICO

Los antecedentes de la existencia de las micotoxinas y sus efectos son conocidos por el hombre desde la edad media, al presentarse epidemias que causaron la muerte a miles de personas sin causa explicada. Las micotoxinas son metabolitos tóxicos, producidos principalmente por hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, durante reacciones bioquímicas al interrumpirse la reducción de grupos cetónicos en la ruta de ácidos grasos utilizados por los hongos como fuente de energía. Se caracterizan por: ausencia de inmunogenicidad, amplio espectro de toxicidad y termoestabilidad; son contaminantes naturales de los alimentos y materias primas, como: maíz, soya, sorgo, arroz, trigo, entre otros [1].

El término micotoxinas, proviene de la raíz griega "mukes" refiriéndose a los hongos o mohos del fango y toxina del latín "toxicum"; haciendo referencia a un veneno utilizado en las flechas. las micotoxinas han ganado reputación por ser potencialmente perjudiciales para la salud y el bienestar de un organismo que las consume, ya sea animal o humano. Desafortunadamente, las micotoxinas son un factor omnipresente en el ciclo de vida natural [2].

Las micotoxinas se forman al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del hongo; se han identificado más de 300 micotoxinas, las que se encuentran con mayor frecuencia como contaminantes de alimentos son: aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, fumomisin, tricotecenas, citrinina, patulina, alcaloides del cornezuelo del centeno, rubratoxinas A y B entre

otras. Todas ellas en mayor o menor grado provocan cuadros clínicos patológicos, con efectos tóxicos agudos o crónicos en seres humanos y en animales.

Las micotoxinas son compuestos ubicuos que difieren en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas. Los primeros casos de micotoxicosis conocidos en la Edad Media fueron debidos a la contaminación del centeno con *Claviceps purpurea*. La formación de las micotoxinas refleja que los hongos tienen diferenciación bioquímica, fisiológica y morfológica. Los metabolitos tóxicos son cancerígenos, teratogénicos e inmunosupresores; producen toxicidad a nivel hepático, renal, pulmonar y médula ósea; así como en sistema nervioso central y sistema endócrino, los mecanismos propuestos para estas manifestaciones son el estrés oxidativo y la genotoxicidad inducida por micotoxinas [3].

En 1912 Quevedo, en Argentina, describió la acción de los metabolitos tóxicos de *Aspergillus spp* del maíz sobre varias especies animales, lo que constituye la primera observación científica de las micotoxicosis en Sudamérica. *Aspergillus* es un género de hongos filamentosos, hialinos, saprofitos, ubicuos, pertenecientes al phylum *Ascomycota*. Este hongo está formado por hifas hialinas y tienen reproducción sexual, con formación de ascosporas en el interior de las ascas y reproducción asexual, con formación de conidios. El hongo es un contaminante habitual de alimentos almacenados como granos y cereales, las condiciones óptimas para la producción de micotoxinas son a temperatura de 25 °C con humedad relativa del 95 %. Los micelios de éste hongo, productores de aflatoxinas, son capaces de colonizar semillas de maní, girasol, algodón, soya, avellanas, almendras, cereales y sus derivados.

Las aflatoxinas al ser producidas por especies de *Aspergillus flavus*; en 1960 cobran importancia en Escocia, a partir de la muerte repentina de cien mil pavos que fueron alimentados con maní infectado con este metabolito fúngico, el cual provenía del Brasil. Fue entonces que a principio de la década de 1960 comenzaron aparecer publicaciones en las que se ponía de manifiesto la

presencia de una sustancia tóxica, en la harina de cacahuate procedente de África, Brasil y otras zonas.

Las aflatoxinas son inodoras, insípidas e incoloras; son estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales, es difícil eliminarlas una vez que se producen. Las aflatoxinas, tienen como estructura básica un anillo dihidrofurano o tetrahidrofurano unido a una cumarina con un anillo de cinco o seis átomos, se han identificado al menos 20 tipos de aflatoxinas, pertenecientes a la familia de las difurano-cumarinas, las cuales se clasifican en dos grandes grupos en relación a su estructura química; la serie 1 difuro-cumarciclo-pentanonas (AFB1, AFB2, AFB2A, AFM1, AFM2, AFM2A y aflatoxicol) y la serie 2 difuro-cumaro-lactonas (AFG1, AFG2) (Tabla 1). Son dos las principales especies de *Aspergillus* que producen aflatoxinas son: *A. flavus* que origina únicamente aflatoxinas B1 y B2 y *A. parasiticus* podría producir aflatoxinas B y G. Sin embargo, las más importantes por su toxicidad son: B1, B2, G1 y G2, distinguidas por su color fluorescente bajo la luz ultravioleta (B: “blue”, azul y G: “green”, verde). Las aflatoxinas M1 y M2 son respectivamente productos hidroxilados del metabolismo oxidativo de las aflatoxinas B1 y B2 estos metabolitos pueden eliminarse en la leche (tanto de humanos como de animales). Las aflatoxinas B2, G1 y G2 son menos frecuentes y casi nulas en ausencia de AFB1 [4].

Tabla 1. Características fisicoquímicas de las principales aflatoxinas [1].

Tipo Aflatoxina	Fórmula Estructura I	Peso Molecular (g/mol)	Punto Fusión °C	Absorción Ultravioleta (ϵ)		Emisión de fluorescencia (nm)
				265nm	360-362 nm	
B 1	$C_{17}H_{12}O_6$	312	268-269	12,400	21,800	425
B 2	$C_{17}H_{14}O_6$	314	286-289	12,100	24,000	425
G 1	$C_{17}H_{12}O_6$	328	244-246	9,600	17,100	450
G 2	$C_{17}H_{14}O_7$	330	237-240	8,200	21,250 (357 nm)	450
M 1	$C_{17}H_{12}O_7$	328	299	14,150	22,900 (357 nm)	425
M 2	$C_{17}H_{14}O_7$	330	293	12,100(264 nm)	15,400 (362 nm)	-----

Como metabolito tóxico secundario la AFB1, es un potente mutágeno, teratógeno y cancerígeno, causa afección inmunológica y nutricional; además participa en la modulación de enfermedades infecciosas. Su efecto se produce al activarse en presencia del citocromo P450, como una molécula inestable 8,9 epóxido AFB1, que se liga al N7 de la guanina, y se transforma en cancerígenos activos o aductos AFB1-Gua y finalmente, en los aductos AFB1-FAPY [5]. El mecanismo toxicológico de AFB1, guarda relación con su radical epóxido, el cual interactúa con proteínas de conjugación, generando toxicidad, inhibición en la síntesis de proteínas e inmunosupresión y además es capaz de producir genotoxicidad e inducir procesos cancerígenos, debido a la mutación del gen *P53*, donde se produce la transversión de una guanina a tiamina en el codón 249 [3].

La exposición en la población humana y animales a la AFB1 ocurre principalmente a través de la vía enteral; en ámbitos ocupacionales a la inhalación de polvo de grano contaminado [6]. El principal sitio de absorción de AFB1 es a través de difusión pasiva hacia el enterocito; la fase inicial del metabolismo de AFB1 ocurre en el epitelio intestinal y en el respiratorio; las aflatoxinas al incorporarse a la circulación sanguínea son transportadas al hígado, que es el principal órgano del metabolismo, siendo también detectadas en tejidos extrahepáticos [7,8].

Las aflatoxinas y su mecanismo de patogenicidad fueron estudiados en modelos animales; el metabolismo y la toxicidad de AFB1 han sido investigados en sistemas celulares humanos en estudios de hígado [9]. Debido al conocimiento actual sobre la patogenicidad de las micotoxinas, se inquietan intervenciones preventivas que enfatizan la necesidad de desarrollar regulaciones y respetar los estándares sustentados en la mínima concentración, almacenamiento y conservación adecuada del maíz y otros cereales a fin de evitar la contaminación [10].

La intoxicación aguda a aflatoxinas en la dieta, llamada aflatoxicosis aguda puede causar falla hepática aguda; con respecto a la exposición crónica en la dieta con niveles bajos de aflatoxinas, ésta se ha asociado con trastornos en la digestión, la absorción y/o el metabolismo de los nutrientes, con cirrosis y con el desarrollo de carcinoma hepatocelular [11]. El Instituto Internacional de Investigación en Cáncer, ha clasificado a la AFB1 como un carcinógeno Clase 1, ya que en este grupo están considerados los agentes carcinogénicos para los humanos [12].

En un estudio realizado en pacientes mexicanos, se identificaron mutaciones en el codón 249 del gen *p53* en células de carcinomas hepáticos humanos; en tres de 16 casos se encontró la mutación en el gen *p53* y la concentración de aductos AFB1-lisina en los 16 pacientes fue de 0.54 a 4.64 pmol AFB1-lisina/mg de albúmina. Los antígenos para virus de la hepatitis B y/o C fueron positivos en 12

de 20 casos. Los autores concluyeron que la población mexicana está expuesta a la aflatoxina y que debido al alto consumo de maíz en la dieta, aún a concentraciones relativamente bajas de AFB1, pueden resultar en una situación de alto riesgo, debido a la exposición diaria; datos obtenidos han señalado la necesidad de destacar las implicaciones en la seguridad alimentaria en países donde los cereales son el principal substrato de la alimentación [13]. The Cancer Journal for Clinicians a través de su reporte estadístico del año 2015 estimó que 1,658,370 nuevos casos de cáncer pueden ser diagnosticados de todos los sitios anatómicos en niños y adolescentes de los Estados Unidos de América [14].

En países como África, Asia y Latinoamérica cuya alimentación es a base de cereales se identifican tasas altas de cáncer de boca, esófago, laringe, estómago, hígado, cérvix y colon [15]; en México los tumores de órganos digestivos en 2006 sumaron 10,998 casos [16]. La medición de AFB1 permite evaluar su exposición crónica, las tecnologías utilizadas para ésta medición incluyen inmunoensayos, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y recientemente espectrometría [17].

Los métodos de análisis para las aflatoxinas han evolucionado desde la década de 1960; por ello, los requerimientos se han establecido en el ámbito nacional e internacional a través, del Comité Europeo de Normalización (CEN) o la Asociación Oficial de Químicos Analíticos Internacional (A.O.A.C International). Recientes avances en química analítica como la disponibilidad de columnas de inmunoafinidad para las aflatoxinas y las nuevas técnicas de derivación post-columna de HPLC mejoran significativamente los resultados analíticos [18]. Otros métodos de detección han permitido identificar elementos fúngicos y metabolitos susceptibles de ser estudiados por espectrometría de masas [19].

La espectrometría de masas es una tecnología de alta capacidad de análisis, sensibilidad analítica y de precisión en la determinación de las masas moleculares, así como los espectros de fragmentación que proporcionan información de secuencia [20,21].

Un tipo de espectrometría de masas es el de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), empleada por primera vez en 1985. Desde entonces, esta tecnología ha evolucionado y se utilizan con éxito en la identificación del genoma, proteoma, metaboloma, y la investigación de diagnóstico clínico. Estas tecnologías son de alto rendimiento y sensibles; nuevas pruebas ha demostrado que no sólo son útiles en los análisis cualitativos y cuantitativos de proteínas, sino también de otros tipos de biomoléculas, tales como ADN, glicanos, y metabolitos [22].

MALDI-TOF es una metodología de ionización suave utilizada en espectrometría de masas que representa una técnica analítica instrumental de alta sensibilidad capaz de identificar cuali y cuantitativamente cualquier tipo de mezclas de sustancias. Asimismo, esta técnica también permite determinar la masa molecular de un compuesto, y la de los diversos fragmentos que resultan de la ruptura del mismo, proporcionando una información muy valiosa sobre la estructura de la molécula.

La denominación "MALDI" deriva de las siglas de las palabras en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz) y "TOF" alude al detector de iones que se acopla al MALDI, que es del tipo de tiempo de vuelo (Time of Flight).

Su desarrollo se remonta a finales de la década de los 80, cuando se observó que utilizando una fuente de láser ultravioleta y embebiendo la muestra en una matriz formada por moléculas aromáticas se conseguía una ionización blanda, proporcionando la fragmentación adecuada para la identificación de moléculas lábiles como proteínas, péptidos, azúcares y oligonucleótidos. MALDI-TOF es una técnica muy utilizada en proteómica para la identificación de microorganismos mediante el método de la huella peptídica.

La espectrometría de masas, es una técnica analítica que permite identificar y cuantificar la masa molecular de iones libres, por lo que requiere trabajar en condiciones de alto vacío. Los espectrómetros de masas están formados por tres elementos básicos. En primer lugar la "fuente de iones", donde a partir de la

muestra se forma un haz de iones en estado gaseoso. En segundo término el "separador de masas" o "tubo de vuelo", que separa los iones formados en función de su relación "masa/carga" (m/z) y en tercera instancia el "detector" de los iones previamente separados.

La información final que nos proporciona esta técnica es la relación m/z de los distintos iones formados y en qué cantidad relativa están presentes.

Principio de ionización MALDI. Para conseguir una ionización, la muestra previamente depositada sobre la placa metálica que contiene los biopolímeros a identificar, se colocan en disolución con una sustancia matriz que debe contener en su estructura anillos aromáticos. Después se evapora el disolvente a temperatura ambiente produciéndose la co-cristalización de la muestra y matriz de tal forma que, las moléculas de la muestra quedan incorporadas dentro de la estructura de los cristales de la matriz. Esta etapa del procedimiento resulta esencial para conseguir una posterior desorción/ionización eficiente.

A continuación, la placa se introduce en la cámara de alto vacío, donde la superficie cristalina de la muestra es expuesta a disparos de radiación láser de longitud de onda del espectro ultravioleta, con lo que las moléculas orgánicas aromáticas de la matriz absorben una gran cantidad de energía por excitación de los electrones de dobles y triples enlaces, produciéndose la sublimación del analito y matriz depositado sobre la placa.

Ya en fase gaseosa, la estabilización de estas moléculas aromáticas tiene lugar por adición de protones que, en parte son captados por los analitos de la muestra. Posteriormente, mediante un electrodo situado a unos pocos milímetros en frente de la placa se aplica un campo eléctrico que acelera los iones formados desde las proximidades de la muestra hacia el analizador de masas, donde los iones formados se separarán en función de su relación masa/carga (m/z). Para que se produzca una ionización eficiente de la muestra los pulsos del láser deben ser de energía entre 106 y 107 W/cm cuadrados, y de una duración de 1 a 5 ns.

Análisis de las masas de los iones con el analizador de tiempo de vuelo. El analizador de tiempo de vuelo es básicamente un tubo (de 1 a 4 metros) donde entran los iones generados por el láser siguiendo una trayectoria lineal. En estas condiciones todos los iones que entran en el tubo tienen la misma energía cinética.

Donde la relación m/z es proporcional al cuadrado del tiempo de vuelo, por tanto al ser menor la relación m/z de los iones, menor es el tiempo necesario para recorrer el tubo de longitud L , es decir, los iones de menor m/z "vuelan" más rápido. En la práctica estos tiempos varían desde unos pocos microsegundos a 100 microsegundos.

Poder de resolución. Una cualidad del analizador de masas es el poder de resolución. Representa la capacidad del espectrómetro para distinguir entre iones de distinta masa/carga próxima. Si m_1 es la m/z del pico que nos interesa cuantificar, y m_2 la del pico más próximo que podemos diferenciar de m_1 , matemáticamente la resolución se define como:

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{m_1}{m_2 - m_1}$$

De este modo, un espectrómetro con un poder de resolución de 20000 (que es el que tienen los MALDIs incorporados a la red asistencial de diagnóstico) nos permite diferenciar entre dos picos de masas de 200,000 y 200,010 Da, pero no entre picos más próximos.

En los analizadores de tiempo de vuelo la resolución se calcula con la misma fórmula pero a partir de un solo pico considerando que el incremento de m de los dos picos ($m_2 - m_1$) es la anchura del pico a la mitad de la altura.

Detector de iones. El detector de iones consiste básicamente en una superficie de materiales semiconductores sobre la que impactan los iones positivos (procedentes de los analitos) que salen separados del tubo analizador. Como consecuencia de cada impacto contra la superficie semiconductor se emiten electrones, que por la geometría del detector, se proyectan contra otros puntos de la superficie del detector provocando la emisión de un mayor número de

electrones secundarios (los electrones primarios son los que resultan del impacto de los iones positivos, mientras que los electrones secundarios son los que se generan por el impacto de los electrones primarios). Por este motivo estos detectores se conocen con el nombre de "Sistemas Multiplicadores de Electrones Secundarios".

De esta forma se genera un "output de electrones" o pulso de electrones, cuya carga (es decir número de electrones) depende del número de iones con la misma masa que impactan en un mismo instante contra la superficie detectora.

Como los iones salen del tubo analizador separados en el tiempo por orden creciente de su m/z para cada disparo láser tendremos una serie de output de carga en función del tiempo que tarde en llegar al detector que, aplicando la fórmula $\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2} t^2$ el tiempo se transforma en la relación m/z de los distintos iones formados.

La carga de cada "output", que es proporcional al número de iones que en un mismo instante impactan contra el detector, se designa como "intensidad". La representación de la intensidad frente a la relación m/z es lo que se conoce como espectro de masas. Si $z=1$, como es habitual en la ionización blanda de la técnica MALDI, en el espectro de masas se representa la intensidad frente a la masa.

En el espectro de masas, el pico de mayor intensidad recibe el nombre de "pico base", y el de mayor masa se llama "pico molecular", ya que suele representar la molécula sin fragmentar. Normalmente las intensidades se expresan en términos relativos como porcentaje del pico base, por ello la escala de intensidades va de cero a 100. Dependiendo de cómo esté calibrado el equipo, los valores de las masas de los iones formados en la técnica MALDI va de 2000 a 20000 Da.

Debido a que con un disparo obtenemos un espectro de masas, podemos asumir que con los disparos realizados sobre la misma muestra se obtienen espectros. Para conseguir un único espectro, se representan todos los picos obtenidos en un solo espectro de masas sumando las intensidades de los picos idénticos [23].

Con respecto a la técnica la conocida como espectrometría de masas MALDI-TOF, es preciso decir que responde al hallazgo, relativamente reciente, de que si los fragmentos de las moléculas analizadas se mezclan con una matriz de naturaleza orgánica, la luz del láser resulta absorbida de forma más eficiente y los espectros tienen mayor intensidad en su fragmentación [24].

El hecho de que la ionización por MALDI permita detectar moléculas termolábiles, como las proteínas de forma intacta, la incluye dentro de los métodos de ionización suave. El análisis de los iones que se producen mediante este fenómeno proporciona una información estructural de la molécula original muy útil, si bien se hace necesario separar estos fragmentos [25]. De esta forma ha sido descrita la tecnología MALDI-TOF y estudiadas las aflatoxinas con respecto a su mecanismo de acción y actividad, sin embargo aún existen interrogantes sobre su acción, localización y que otros métodos podrían ser de utilidad para su detección y cuantificación. En un futuro, se propone un biomarcador para la identificación a través de microRNA [26].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las aflatoxinas, son las micotoxinas más estudiadas ya que constituyen una importante preocupación en la salud humana debido a que son reconocidas principalmente como carcinógenos.

La AFB1, es una de las principales aflatoxinas producidas en la naturaleza, es la más abundante, potente y tóxica. Encontrándose en alimentos, por lo que, la exposición del hombre a ella es continuo, está en cereales (maíz, arroz, trigo, sorgo, cebada, avena, mijo, centeno y sus productos derivados como tortillas, cereales, harinas, pastas, etc.), en semillas oleaginosas (cacahuate, nueces, avellanas, pistaches, piñones, semillas de girasol, de algodón, ajonjolí y almendras), en especias (chiles, condimentos, paprika, comino, mostaza, etc.), higos y frutas secas. Las aflatoxinas son las micotoxinas más tóxicas y dañan a todos los animales (ganado bovino, aviar, equino, porcino, peces, ratas y mascotas como perros y gatos, etc.); contamina los productos derivados como

huevos, lácteos (leche, yogurt, quesos y crema), también derivados cárnicos como salami, jamón, pechugas de pollo, patés, embutidos y cervezas, en alimentos balanceados para animales y humanos, sólo hay trazas en vinos. La contaminación por aflatoxinas en alimentos se produce durante su almacenamiento, aunque especialmente si la cosecha está húmeda [1].

La falta de adecuadas técnicas y métodos para su detección así como laboratorios equipados, recursos humanos y económicos puede ser una de las causas de la limitada información sobre la presencia de aflatoxinas en suero de humanos. Otro factor importante es la carencia de regulaciones, la ausencia de vigilancia y control por parte de los organismos que deberían realizar estas labores. Hoy en día, algunos países desarrollados tienen una legislación clara en cuanto a las concentraciones de AFB1 permitidas en sus alimentos, la cual no puede superar las 20 partes por billón (ppb). Adicionalmente, algunos expertos coinciden en que es fundamental trabajar en estrategias preventivas para evitar la exposición a esta toxina, siendo la más importante la tecnificación del sector agrícola y evitar así la contaminación de los cereales con hongos productores de micotoxinas. Por tal razón se plantea la necesidad de identificar la presencia en suero sanguíneo de AFB1, por medio de espectrometría de masas: MALDI TOF, al ser una tecnología de alto rendimiento y sensible, útil en el análisis cualitativo y cuantitativo de biomoléculas.

JUSTIFICACIÓN

Métodos actuales como la espectrometría de masas en la tipificación de microorganismos y la identificación de metabolitos de bajo peso molecular como son las aflatoxinas; lo apunta como una herramienta de apoyo en el ejercicio del diagnóstico médico, principalmente en la micología médica, basado en el conocimiento de estructuras específicas y otros metabolitos fúngicos, pudiéndose encontrar in vitro o in vivo.

Las aflatoxinas representan un grupo de metabolitos secundarios, actualmente se ha reconocido su importancia como un marcador clínico [27].

Al considerar el riesgo que las aflatoxinas representan para los seres humanos por su capacidad de carcinogénesis, teratogénesis, inmunosupresión y cuadros clínicos de neurotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, mielotoxicidad, toxicidad pulmonar y endocrina, los resultados analíticos de los diversos estudios han identificado la presencia de aductos Aflatoxinas B1 en orina, y en tejidos, desconocemos si están presentes en forma libre sin formar aductos, de ahí que buscamos identificarlas en suero sanguíneo, se ha mencionado que la exposición a AFB1 puede estar asociada con la progresión de varias enfermedades, los resultados de este estudio podrían orientar a su identificación utilizando MALDI TOF y contribuir a diagnósticos.

OBJETIVO GENERAL:

Identificar la presencia de AFB1 en suero sanguíneo humano de la colección de estudio en la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología de CMN La Raza; utilizando espectrometría de masas: MALDI TOF.

OBJETIVO ESPECIFICO

Cuantificar la presencia de AFB1 en suero sanguíneo humano de la colección de estudio en la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología de CMN La Raza; utilizando espectrometría de masas: MALDI TOF.

TIPO DE ESTUDIO :

Por incluir un grupo de sueros sanguíneos analítico; comparativo con un estándar de AFB1. Por la finalidad del estudio, evidenciar presencia de aflatoxinas, observacional. Por el número de mediciones, transversal. Por el control de la asignación de los factores de estudio y la captura de datos: prolectivo. Por el inicio

del estudio en relación a la cronología de los hechos: retrospectivo. Tipo de muestreo. Muestreo no probabilístico consecutivo.

UNIVERSO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Centro Médico Nacional La Raza (UIII CMN “La Raza”) , en la Ciudad de México, durante los meses de Enero a Mayo de 2016. Banco de sueros, colectados en el 2015, almacenados a menos 80°C, en oscuridad en la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza”.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de Inclusión

- Sueros sanguíneos de la colección ubicada en la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza”.
- Conservadas en congelación a menos 80 ° C.
- Seres humanos adultos mayores a 18 años.
- Sin importar el género, raza o condición social.
- Que se tenga físicamente el suero de la colección.
- Cuento con consentimiento informado para estudio del mismo.

Criterios de Exclusión. Partiendo del punto en que la UIII se desempeña con altos estándares de calidad, por lo que los criterios abajo mencionados son únicamente por fines académicos del alumno.

- Cuya preservación no sea adecuada.
- Muestra que no posea la cantidad de micro litros necesarios para la técnica de espectrofotometría de masas.
- Aquel que no cuente con consentimiento informado para estudio del mismo.

VARIABLES

Variable 1 de interés : Aflatoxina B1

Definición conceptual: Cristal sólido de color que va del blanco al amarillo, sin olor, sin sabor e incoloro, es insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos (metanol, cloroformo, acetona, acetonitrilo y dimetilsulfóxido), en cloroformo o benceno es estable por años en refrigeración y oscuridad. La aflatoxina en solución es sensible a la luz, se descompone en el aire, oxígeno, soluciones alcalinas o de ácidos suaves y se nombra según el color de la fluorescencia que emana con luz UV de onda larga, en color azul B (blue), con anillo de ciclopentano, lo que permite detectarla en trazas de 0.5 ng o menos, en cromatografía de capa fina. El número 1 que le sigue a su abreviación, indica la movilidad que tiene en la cromatografía de capa fina según su peso molecular, de 312. Dentro de sus propiedades fisicoquímicas presenta máximos picos de absorbancia de luz UV de 265 nm a 362 nm, resiste altas temperaturas; se descompone de 237 °C a 306 °C, según el tiempo de calentamiento, la humedad del alimento y el pH. Así, la AFB1 no se rompe con la ultrapasteurización, cocción, freído o hervido, nixtamalización, ni fermentación, pero se puede destruir si se calienta en autoclave con amonio o hipoclorito de sodio. Actúan en trazas de millonésimas de gramo (microgramos por kilogramo = $\mu\text{g kg}^{-1}$) o menos [1].

Definición operacional: Toxina detectada a partir de una desproteinización del suero con acetonitrilo, enseguida de su extracción con cloroformo en particiones y detección por espectrometría de masas con tecnología de MALDI-TOF

Tipo de variable: Cualitativa.

Variable 2 de interés : Suero sanguíneo (muestra biológica).

Definición conceptual: Porción líquida de la sangre , con ausencia de anticoagulantes, de color amarillo translúcido, compuesto 90% de agua, 10% restante contiene minerales, hormonas, electrolitos, residuos y nutrientes.

Definición operacional: Suero obtenido de la centrifugación de sangre total a 3500 rpm.

Tipo de variable: Cualitativa

DISEÑO DEL ESTUDIO.

CALCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Los sueros sanguíneos que se encuentren en el banco de la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza”. Disponibles para estudio y no mayor de 50 muestras.

MATERIAL Y MÉTODO

EQUIPOS

La identificación de AFB1 se llevó a cabo por medio de un espectrómetro de masas Microflex Bruker Daltonics. Se utilizó centrifuga para eppendorff Modelo PVC-2400, marca Boekel, una estufa General Purpuse Incubator modelo 150 marca Thermo Scientific además de agitador Vortex y pipetas de diversos volúmenes.

REACTIVOS

Estándar A6636 Sigma Aflatoxin B1 Sigma, los disolventes Cloroformo Sigma-Aldrich grado HPLC, Acetonitrilo Sigma-Aldrich grado HPLC , Agua filtrada con sistema Mili-Q, Benceno Sigma-Aldrich grado HPLC, α -ciano-4 ácido hidroxicinamico MBT Galaxy HCCA Matrix GPR, Hipoclorito de Sodio y agua destilada se adquirieron de forma comercial .

PREPARACIÓN DE ESTÁNDAR.

Para la preparación del estándar de AFB1: A6636 Sigma Aflatoxin B1 de *Aspergillus flavus*, nivel de calidad Premium, 98% de pureza, con un peso molecular 312.27, el cual fue reconstituido con benceno: acetonitrilo 9:1, en un volumen de 500 μ L. Se dispuso de una solución patrón de AFB1, a una concentración de 1mg/500 μ L, de ésta, se obtuvieron 6 alícuotas para obtener las

soluciones de trabajo de 0.16mg/83.33 μ L. Las soluciones preparadas se conservaron en congelación a -80°C.

EXTRACCIÓN DE AFLATOXINA

La metodología empleada para el proceso de extracción de aflatoxina es la propuesta por la A.O.A.C. [28]. Se tomó 100 μ L de las muestras de suero, se le adicionó 1.5 ml de acetonitrilo, el cual permitió eliminar las proteínas contenidas en la muestra, posteriormente fue centrifugada durante 5 min a 3500 rpm y el sobrenadante fue separado, para la extracción de aflatoxinas.

Las aflatoxinas en el sobrenadante se extrajeron en 3 particiones, con cloroformo (2, 1 y 1 mL), agitándose durante un minuto, cada porción, para posteriormente centrifugarse y unir los extractos clorofórmicos en un vial de vidrio, protegido de la luz con papel aluminio. El extracto clorofórmico fue llevado a desecación empleando una estufa a 40 ° C, debido a la estabilidad y no volatilidad de estas toxinas a esta temperatura. El extracto seco se disolvió con 100 μ L de acetonitrilo. Para garantizar una adecuada y correcta extracción, intencionalmente se contaminó una muestra con estándar de aflatoxina, verificando así que durante el procedimiento se conservará la AFB1 y al final del proceso de extracción, se logrará identificar.

PURIFICACIÓN

El acetonitrilo siendo un disolvente polar, que no da ni aceptan protones, se utiliza como disolvente de polaridad media que es miscible con agua, con dipolo de 3.84 Da, el acetonitrilo disuelve una amplia gama de compuestos iónicos y no polares, ayudando a la purificación de la muestra.

DETECCIÓN

Para la detección de AFB1, se empleó espectrometría de masas con tecnología de MALDI-TOF. La fuente MALDI TOF está constituida por un láser de nitrógeno, operando a 337 nm con una salida máxima de 500 mW dirigido a la muestra a una frecuencia de 17.75 Hz a 71 pulsos. Todas las muestras fueron preparadas

usando una solución de 5 μ L de α -ciano-4 ácido hidroxicinámico como matriz y 1 μ L de la muestra. Los 6 μ L fueron colocados en una placa de acero inoxidable, hasta su secado; produciéndose la cristalización de la muestra y matriz de tal forma que, las moléculas quedan incorporadas dentro de la estructura de los cristales de la matriz. Esta etapa del procedimiento fue esencial para conseguir una eficiente desorción/ionización.

ASPECTOS ÉTICOS

El trabajo de investigación no interfirió con la atención del paciente, los procedimientos estuvieron de acuerdo con las normas del IMSS y éticas del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, De acuerdo al artículo 17, donde se considera investigación sin riesgo para el paciente; y con base en la reforma del artículo 79 de la LGS, todos los participantes para el ejercicio del proyecto de investigación se encuentran calificados, con diplomas emitidos por Institución y Universidad. En relación a la declaración de Helsinki, adoptada en la 64^a Asamblea General, realizada en Fortaleza, Brasil en octubre de 2013, dirigida principalmente a médicos, con instancia a involucrados en la investigación en seres humanos, con respecto a conservar la confidencialidad de los datos, así como lo relacionado a contar con Consentimiento informado para el estudio.

CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

El estudio fue factible desde el punto de vista bioético ya que solo se trabajó con sueros sanguíneos de la unidad de investigación de inmunología e Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza” y ya se contaba con el consentimiento informado. No se incluyeron muestras nuevas para esta investigación. Con motivo de organización de la información para mantener la confidencialidad y discreción, no se capturó el nombre y número de afiliación de cada paciente en la hoja de recolección de datos, no se tomó registro de ningún otro dato personal como dirección o teléfono. Los datos de los pacientes fueron guardados en una carpeta encriptada en la computadora del investigador principal que se mantuvo siempre

bajo resguardo del investigador principal por lo que nadie excepto él tendrá acceso a los datos

ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD

Las muestras se manipularon con base en el conocimiento y uso de las normas de manejo de biológicos-infecciosos y de laboratorio clínico: NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo, quien establece la clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos así como las especificaciones para su manejo y con base en los lineamientos generales recomendados para la utilización de sustancias químicas peligrosas y tóxicas e Isótopos radiactivos, emitido por la Coordinación de Investigación en Salud y la comisión de Bioseguridad.

Así como por la NORMA Oficial Mexicana NOM-166-SSA1-1997, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos, quien establece los requisitos que deben satisfacerse para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

Con base en la NOM-005-STPS-1998 y su modificación relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas, que quedó como PROY-NOM-005-STPS-2004. De igual forma y con base en NOM-047-SSA1-2011, con respecto a la Salud ambiental-Índices biológicos de exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a sustancias químicas, publicado en el DOF en Junio 6 de 2012.

La agencia internacional de investigación en cáncer considera a las aflatoxinas como carcinógeno humano, subgrupo A (alto grado de evidencia) por lo cual para el manejo de esta clase de compuestos se requiere experiencia y ser manipulados de acuerdo a procedimientos y medidas de seguridad de la A.O.A.C [28].

Se realiza la preparación de la solución estándar mediante dilución. Por lo que recomiendan como mínima protección uso de campana de extracción, lentes de seguridad, cubre boca, bata de laboratorio, guantes de látex y hule.

FACTIBILIDAD Y RECURSOS.

El Instituto de Química de la UNAM cuenta con los recursos materiales y humanos para llevar a cabo el estudio, se cuenta con la infraestructura necesaria y personal altamente calificado y la colección de sueros sanguíneos de la unidad de investigación en inmunología e Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza” de donde se obtuvieron los sueros sanguíneos, permitieron el pleno desarrollo de esta investigación. No hubo financiamiento para la realización del trabajo. Se someterá a concurso para obtenerlo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Debido a la naturaleza de las variables cualitativas, se utilizaron: frecuencias y porcentajes. Con base a los datos obtenidos de las muestras, y para responder al objetivo planteado, para la parte descriptiva de la información (Tabla 2).

Tabla 2. Cuadro de frecuencia y porcentajes

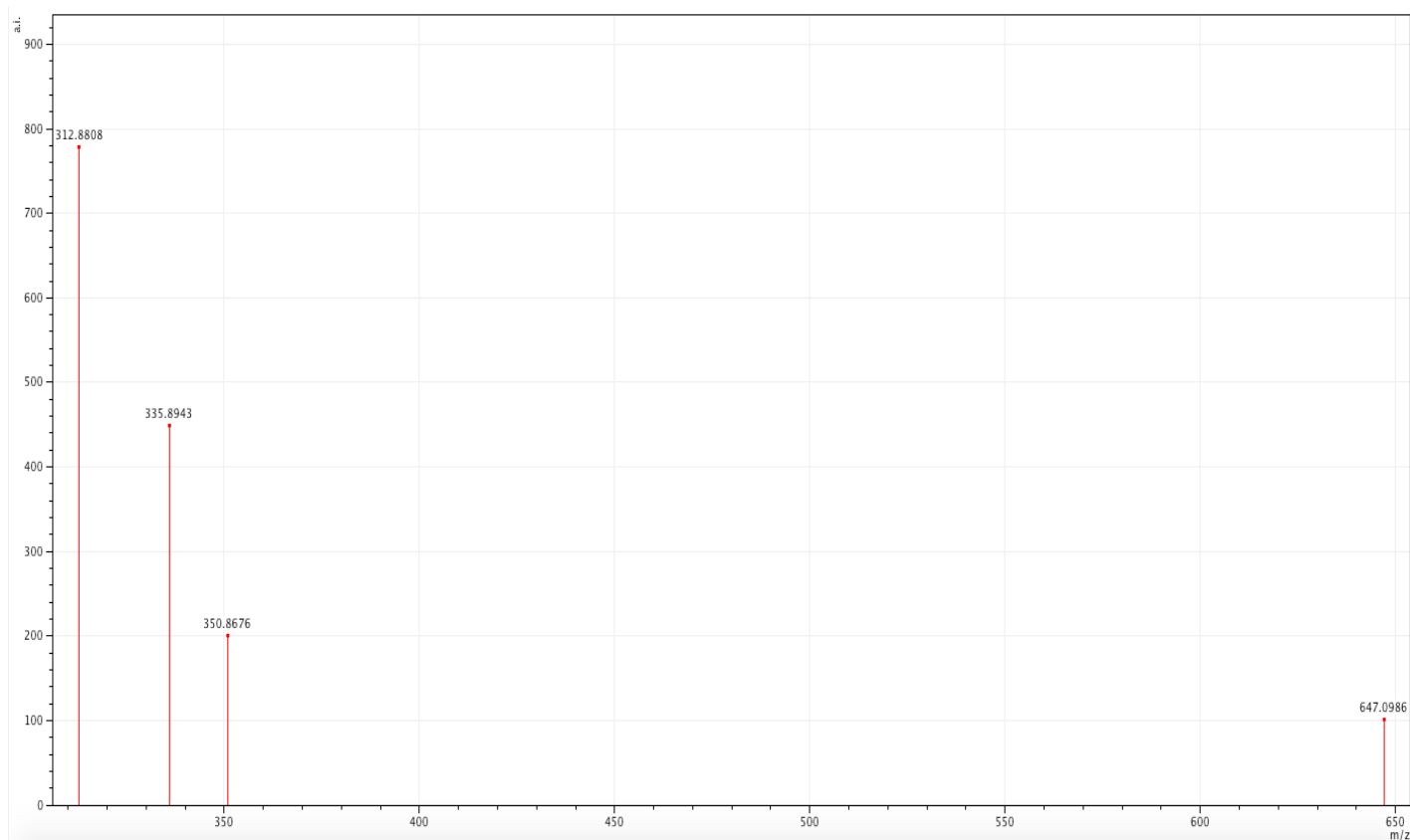
CATEGORIA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Presencia de AFB1	5	20.8%
No presencia de AFB1	19	79.2%
TOTAL	24	100 %

RESULTADOS

Se logró una detección eficiente del estándar de aflatoxina B1 realizado por MALDI TOF la adición de NaCl mejoró la sensibilidad analítica a través de cationización con Na⁺, usando como matriz α -ciano -4 -hidroxicinámico (CHCA). La óptima detección del estándar AFB1 sigma , por MALDI-TOF fue exitosa, se observó pico molecular de AFB1 con PM de: 312.8808 Da , los principales iones detectados en el espectro corresponden al Na⁺ y K⁺ resultado de la cationización

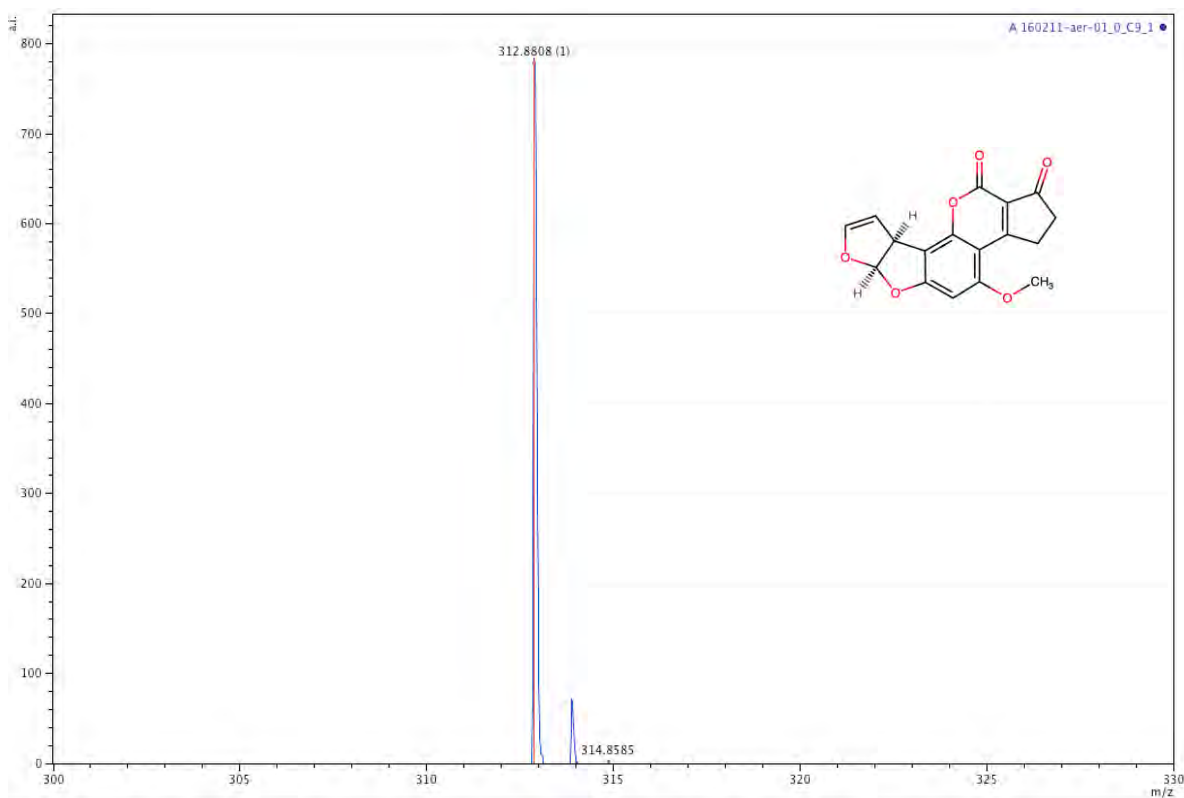
de la matriz con el estándar de AFB1; es decir, los aductos de m/z 335 para [B1 + Na⁺]; aducto de Na⁺, m/z 350 para [B1 + K⁺]; aducto de potasio y m/z 647 para [B1 + B1 + Na⁺]; el dímero más el Na⁺ (Grafica 1).

Grafica 1.



No obstante, aun cuando el estándar fue con calidad Premium, con 98% de pureza en el espectro del mismo, se observó otro pico molecular de m/z 314.8585 que posiblemente correspondería a la AFB2. (Grafica 2)

Grafica 2.



Con respecto a las muestras biológicas, la aflatoxina de mayor frecuencia fue la AFB1, lo cual coincide con la mayoría de estudios reportados a nivel internacional. La AFB1 fue detectada en 5 muestras de un total de 24. De estas 5 muestras con presencia de AFB1; 3 de ellas mostraban en cada uno de sus espectros picos moleculares adicionales; m/z 328 para la que presumiblemente sería AFG1 o AFM1 , y m/z 330 para AFG2 o AFM2. Mientras que 4 muestras, aunque no demostraron la presencia de AFB1 si mostraron picos moleculares para los que posiblemente serían AFG1, AFM1, AFG2 y AFM2. Deducimos lo anterior solo con probabilidades ya que no contamos con los estándares de cada aflatoxina. **Gráfica 3 y tabla 3.**

Para un segundo control de calidad a la muestra número 25*, se le adicionó intencionadamente estándar AFB1 sigma, el cual evaluó el sistema de extracción de la aflatoxina en las muestras biológicas, confirmando la adecuada y correcta

método de extracción. La técnica toma poco tiempo, requirió poca preparación de la muestra y no derivatización o separación cromatográfica.

Grafica 3.

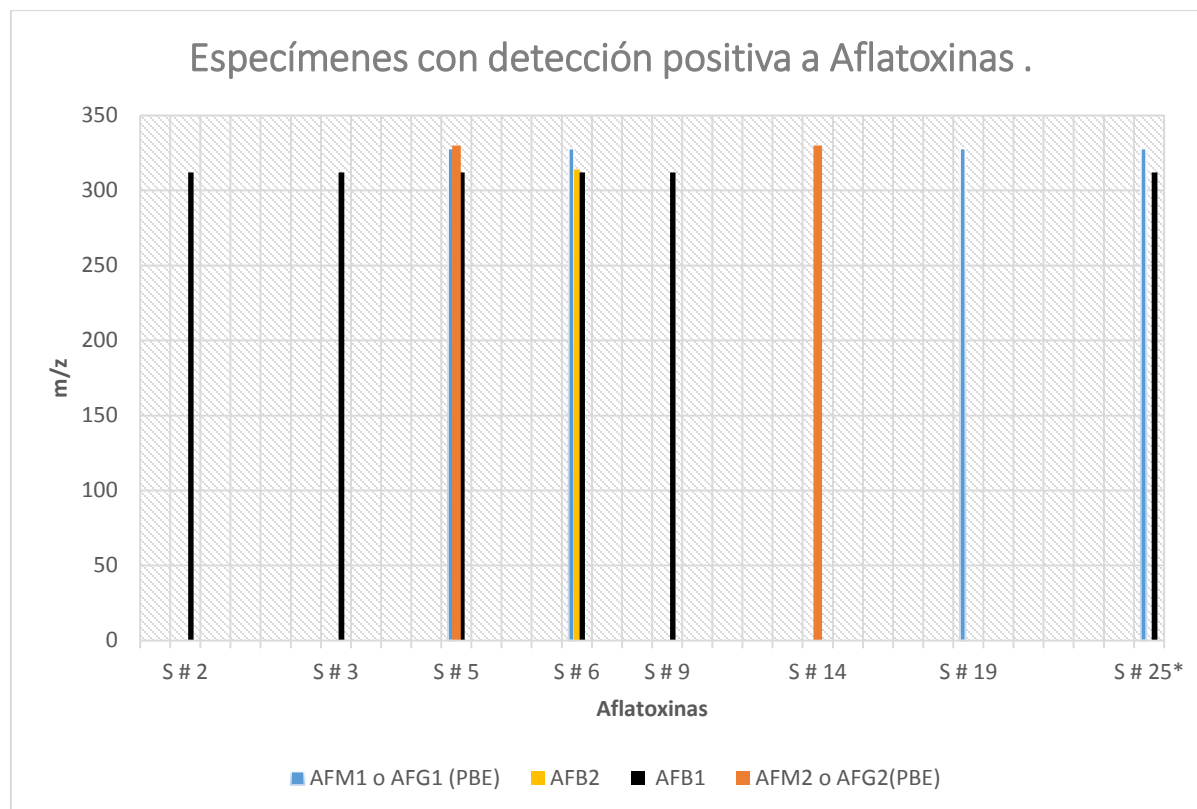


Tabla 3. Descripción de los picos con representación de Aflatoxinas

No de SUERO	AFLATOXINA PRESENTE
2	AFB1
3	AFB1
5	AFB1, AFB2, AFM1 o G1 Y AFM2 o G2
6	AFB1, AFB2 y AFM1 o G1
9	AFB1
14	AFM2 O G2
16	AFB2
19	AFM1 O G1
25	AFM1 O G1

Análisis cuantitativo de AFB1.

El espectro del análisis cuantitativo de AFB1 en suero sanguíneo, es medido relativamente en comparación con el estándar de AFB1.

Las concentraciones de analito en este caso se obtienen directamente a partir de las alturas de los picos de los espectros de masas, que permiten el análisis cuantitativo gracias a la existencia de picos únicos para cada componente y cada valor de m/z . A una intensidad relativa una concentración relativa con base a la altura del pico del espectro de masas. El estándar de AFB1 a una concentración de 1mg en 500 μl , se dividió en 6 viales de 83.33 μL cada uno con 166.66 μg de estándar AFB1, con una concentración conocida del estándar 416.65 μg a una intensidad relativa de 782 a.i., se calculó la concentración de los sueros sanguíneos de la intensidad relativa conocida por el espectro de masas. Tabla 2.

Estándar	Intensidad Relativa (a.i.)	Concentración
AFB1 (A)	782	416.65 μg
Suero	Intensidad Relativa (a.i.)	Concentración calculada
2	1	0.532 μg
3	.99	0.526 μg
5	3	1.569 μg
6	10	5.321 μg
9	.97	0.516 μg

Intensidad relativa: La intensidad relativa de un pico representa su intensidad en comparación con el pico base. Por beneficio, este dato se indica en la izquierda del espectro de masas.

Pico base: Es el pico más intenso en el espectro de masas. Es usado como base para normalizar las intensidades de los otros picos. Al pico base se le asigna una intensidad relativa de 100%

Relación masa/carga: Esta expresión, abreviada m/z , es la relación del número de masa (m) de una partícula conocida entre el número (z) de unidades cargadas electrostáticamente (e) que posee la partícula. Así, m/z es una relación adimensional que es el parámetro medido por el analizador de masas. La masa de una partícula dada es igual a la suma de sus masas atómicas (en Daltons) de todos los elementos que componen la partícula. El símbolo para las unidad de masa es u , y corresponde a 1/12 de la masa del ^{12}C , al que se la ha asignado un valor de 12.000000 por convención.

DISCUSIÓN

El análisis de aflatoxinas es relevante en términos de Salud Pública, las micotoxinas han sido estudiadas en las recientes décadas debido a sus efectos tóxicos en los seres humanos y en animales en relación con: citotoxicidad, carcinogenicidad, mutagenicidad, hepatotoxicidad y neurotoxicidad [29,30,31].

La aflatoxina B1 es la más importante en aspectos de toxicología y por estudios epidemiológicos de cáncer de hígado debido su representación como biomarcador [32,33]. Las aflatoxinas ingeridas con los alimentos se absorben por la mucosa intestinal, con posterior distribución hematogena al hígado, logrando llegar a otros órganos.

La AFB1 activada se liga a proteínas formando conjugados o aductos que se pueden detectar en sangre, orina y tejidos del organismo. La albúmina es una proteína sintetizada en los hepatocitos, sitio donde muchos cancerígenos se metabolizan a sus formas reactivas [1]. La confirmación de éste marcador mutagénico y cancerígeno, descrito generalmente en su origen concerniente con la contaminación de alimentos y semillas, y por otro lado la identificación de aductos de aflatoxinas en hepatocarcinomas de población mexicana [13], orientó la realización de este trabajo; para identificar la presencia de AFB1 en suero sanguíneo, aprovechando que se cuenta con una colección de estos especímenes, los cuales se han utilizado como control para otros estudios.

Los autores lograron observar en principio que la Aflatoxina B1 es termoestable, estuvo congelada a -80 °C durante un año; característica también informada en su trabajo por Scholl y colaboradores. [17].

En este estudio, los autores detectaron la AFB1 en 5 muestras de un total de 24 especímenes. Se ha propuesto que la diferencia en la potencia del efecto de las aflatoxinas entre las especies puede ser parcialmente atribuida a las diferencias en el metabolismo, así como el tipo y cantidad de la ingesta [10,34].

También se encontró que 3 de los 5 especímenes mostraron en cada uno de sus espectros picos moleculares adicionales; m/z 328 para la que presumiblemente

sería AFG1 o AFM1, y m/z 330 para AFG2 o AFM2; sin que pudiese confirmarse por no contar con el estándar al respecto.

Con relación al análisis cuantitativo de la Aflatoxina B1 en suero sanguíneo, se identificó que debido a que se conoce el espectro de masas de la aflatoxina se pudo confirmar su presencia y calcular la cantidad relativa presente en la muestra, debido a la existencia de picos únicos para cada componente y cada valor de m/z ; ya que a una intensidad relativa una concentración relativa, interpretado por la altura del pico del espectro de masas. Las concentraciones relativas menor y mayor fueron de $0.516\mu\text{g}$ y $5.321\mu\text{g}$ respectivamente. El nivel máximo tolerado de Aflatoxina B1 en alimentos es de 1 a $20\mu\text{g}/\text{kg}$, este límite es aplicado en países regulados por la Unión Europea, también en países de Latinoamérica en particular los que conforman el Mercado común del Sur (Mercosur) [35]. Estos datos son iniciales, se requiere contar con mayor número de ellos para establecer otras propuestas de estudio, si bien los autores consideran que estos hallazgos ofrecen racional y eficiente apoyo en la detección de la Aflatoxina B1 a través de la espectrometría de masas MALDI-TOF.

Al respecto, se han utilizado varios métodos analíticos desarrollados para la detección y cuantificación de micotoxinas en semillas y alimentos, con el fin de controlar los contenidos residuales de éstas, entre ellos se ha usado ampliamente la cromatografía [1,36] y en recientes años el uso de la desorción/ionización asistida por matriz (MALDI) junto con el analizador de tiempo de vuelo (TOF) [37]. Esta técnica ha emergido como una rápida, precisa y sensible herramienta para la identificación de aflatoxinas, requiere poco tiempo y no necesita derivatización o extracción líquida, lo que lo hace un método reproducible en investigación diagnóstica clínica. Esta tecnología tiene alto y sensible rendimiento, útil en el análisis cuantitativo y cualitativo de proteínas, así como de otras biomoléculas como DNA, glicanos y metabolitos para el descubrimiento y cuantificación de biomarcadores en especímenes biológicos, especialmente aquellos como plasma/suero, la real aplicación de tecnologías sustentadas en MALDI para el diagnóstico clínico de hongos está próximo [38].

Existe la necesidad de eficiente y efectivo muestreo y métodos analíticos que puedan ser usados para la detección y análisis de micotoxinas en países con economía en transición o donde la dieta está sustentada en el maíz como ocurre con México [10,36].

La toxicidad de la micotoxina varía considerablemente, la especie animal expuesta a ésta, el tiempo de exposición, edad y estado nutricional. La mayoría de los efectos tóxicos de las micotoxinas son limitadas a órganos específicos, aunque varias toxinas afectan varios órganos. Las micotoxinas son compuestos altamente estables, el hongo que las produce es ubicuo y la contaminación de los alimentos o semillas ocurre antes y después de la cosecha.

En este caso estamos ofreciendo resultados iniciales, ya que tenemos considerado llevar a cabo el estudio con 50 muestras de suero sanguíneo; lo que en este caso puede identificarse como una debilidad del estudio el tamaño de muestra.

CONCLUSIÓN

Las micotoxinas siguen siendo un problema real que afecta silenciosamente la salud pública en países en vía de desarrollo. La investigación en este tema es fundamental para mitigar su impacto, dado los efectos mutagénicos y carcinogénicos causados por estas sustancias tóxicas.

Los hallazgos de este estudio ofrecen racional y eficiente apoyo en la detección de la Aflatoxina B1 a través de espectrometría de masas MALDI-TOF.

Se requiere contar con mayor número de especímenes estudiados para establecer otras propuestas relacionadas con la presencia de la AFB1 en suero.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carvajal, M. Transformación de la Aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. *TIP Rev Esp Cienc Quim Biol* 2013;16(2): 109-120.
2. DeVries, J., Trucksess, M., Jackson, L. Aflatoxin, Hepatitis and Worldwide Liver Cancer Risks. En: Henry, S. Bosh F. and Bowers, J. Eds. *Mycotoxins and food safety; advances in experimental medicine and biology*. Wa D.C., USA: RR Kluwer Academic/ Plenum Publishers; 2002. p. 229-233.
3. Serrano-Coll HA, Cardona-Castro N. Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Rev CES Med* 2015;29(1):143-152
4. Urrego J., Díaz G. Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* 2006. Vol. 54. No 2. 108-116.
5. Williams J, Phillips T, Jolly P, Stiles J, Jolly C , Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr*. 2004;80:1106 –22.
6. Phillips TD, Lemke SL, Grant PG. Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. *Adv Exp Med Biol* 2002; 504:157-171.
7. Kumagai S. Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 97:88-97
8. Fernández A, Belio R, Ramos JJ, Sanz MC, Sáez T. Aflatoxins and their metabolites in the tissues, faeces and urine from lambs feeding on an aflatoxin contaminated diet. *J Sci Food Agric* 1997; 74:161-168.
9. Kensler TW, Roebuck BD, Wogan GN, Groopman JD. Aflatoxin: a 50 year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *J. Toxicol Sci*. 2011; 120 (S1) S28-S48.

10. Guzmán PD, Peña-Cabriaes JJ. Regulatory consideration of aflatoxin contamination of food in Mexico. *Rev Latinoam Microb* 2005; 47:160-164.
11. Guengerich FP, Ueng YF, Kim BR, Langouet S, Coles B, Iyer RS et al. Activation of toxic chemicals by cytochrome P450 enzymes: region-and stereoselective oxidation of Aflatoxin B1. *Adv Exp Med Biol* 1996;387:7-15
12. International Agency for Research on Cancer, Aflatoxins (Naturally occurring mixtures). *Monogr Eval. Carcinogenic Risks Hum.* 2002;82. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr> Consultado 20 de Junio 2016.
13. Martínez H, Hernández S, Reyes A, Vázquez G. El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Rev Mex fitopatol* 2013; 31(2) : 126-146.
14. Siegel R, Miller K, Jemal A. *Cancer Statistics, 2015.* *Cancer J Clin* 2015;65:5-29.
15. McGlynn K, Hunter K, LeVoyer T, Roush J, Wise P, Michielli R, et al. Susceptibility to aflatoxin B1-related primary hepatocellular carcinoma in mice and humans. *Cancer Res* 2003; 63:4594-4601.
16. Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. SINAVE. SSA. Disponible en:
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2011/monografias/P_EPI_DE_LOS_TUMORES_MALIGNOS_México.pdf Consultada 20 de Junio 2016
17. Scholl PF, Groopman JD. Long-term stability of human aflatoxin B1 albumin adducts assessed by isotope dilution mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-fluorescence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17:1436-1439.
18. Stroka J. Determination of aflatoxins in food and feed with simple and optimised methods. Disponible en: <http://elpub.bib.uni->

wuppertal.de/edocs/dokumente/fb09/diss2000/stroka/d090031.pdf

Consultada 20 de Junio 2016.

19. Vladimir H.; Lemr K. Fungal metabolites for microorganism classification by mass spectrometry *Am. Chem. Soc.* 2011. 4: 51-57

20. Yates JR. Mass spectrometry –from genomics to proteomics. *Trends in Genetics.*2000;16:5-8

21. Beavis RC, Chait BT. Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins. *Methods in Enzymol.* 1996;270:519

22. Wong MY, Poon TC. Advances in MALDI mass spectrometry in clinical diagnostic applications. *Top Curr Chem.* 2014;336:139-75.

23. Tanaka K, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. Detection of high mass molecules by laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Proceed 2nd Japan-China Joint Symp Mass Spectrom* 1987; 185-188.

24. Spengler B, Kirsch D, Kaufmann R. Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1991;5:198

25. Vorm O, Roepstorff P, Mann M. Improved resolution very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. *Anal Chem.* 1994;66:3281

26. Valencia-Quintana R, Sanches-Alarcon J, Tenorio-Arvide MG, Deng Y, Montiel-Gonzalez JM, Gomez-Arroyo S, et al. The micro RNAs as potential biomarkers for predicting the onset of aflatoxin exposure in human beings: a review. *Front Microbiol* 2014;5:1-14.

27. Barba Evia J. Laboratorio clínico y oncología: De los aspectos básicos del cáncer a los tumores más frecuentes y la utilidad de los marcadores tumorales como métodos diagnósticos. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab.* 2013; 60 (3): 166-196.

28. AOAC: Association Of Official Analytical Chemists. Kenneth Helrich, editor. Official Methods Of Analysis Of The AOAC. Fifteenth edition. Washington, DC. 1990. p. 1184-1205.
29. Bouhet S, Oswald IP. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2005; 108: 199–209.
30. Ayed-Boussema I, Bouaziz C, Rjiba K, Valenti K, Laporte F, et al. The mycotoxin Zearalenone induces apoptosis in human hepatocytes (HepG2) via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Toxicology in Vitro* 2008; 22: 1671–1680.
31. Bryden WL Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology* 2012; 173: 134–158.
32. Magnussen A, Mansour AP. Aflatoxins, hepatocellular carcinoma and public health. *World J Gastroenterol* 2013;19:1508-1512.
33. Kensler TW, Egner PA, Wang JB, et al. Strategies for chemoprevention of liver cancer. *Eur J Cancer Prev* 2002;11:S58-S64.
34. Wagacha JM, Muthomi JW. Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *Int J Food Microbiol* 2008;124:1-12. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.008.Epub 2008
35. Van Egmond HP, Schothorst RC, Jonker MA. Regulations relating to mycotoxins in Food Perspectives in a global and European context. *Anal Bioanal Chem* 2007;389:147-157
36. Felicio JD, Freitas TE, Rossi MH, Gonzalez E. Mycotoxin detection by chromatography. *Recent Pat Food Nutr Agric* 2011; 3:204-211.

37. Ramos CR, Azevedo ML, Santos SL, Baptista AS, Gloria EM. Aflatoxin Screening by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2005;77:8155-8157

38. Ng EW, Wong MY, Poot TC. Advances in MALDI mass spectrometry in clinical diagnostic applications. *Top Curr Chem* 2014;336:139-175. Doi: 10.1007/128_2012_413