

Papel de las aflatoxinas en la aflatoxicosis y el cáncer hepático

Si bien ha habido un extenso enfoque sobre el papel de la exposición a las aflatoxinas en el carcinoma hepatocelular (CHC), en los últimos años han sido reportados varios casos de aflatoxicosis aguda en humanos en varias regiones situadas en países en desarrollo (Shank et al., 1971).

La intoxicación aguda por aflatoxina

Las manifestaciones clínicas de la aflatoxicosis incluyen vómitos, dolores abdominales, edema pulmonar, infiltraciones grasas y necrosis del hígado. En la década de 1970, en el oeste de la India, se produjo un brote de lo que se cree una intoxicación por aflatoxinas provocada por el consumo de maíz fuertemente enmohecido. Este episodio ocasionó al menos 97 víctimas

mortales, las cuales ocurrieron en su totalidad en los hogares donde se había consumido el maíz contaminado. La histopatología practicada a las muestras de hígado reveló una proliferación intensa del conducto biliar, una lesión que es observada a menudo en los animales de laboratorio tras una exposición aguda a la aflatoxina (Krishnamachari et al., 1975; Bhat y Krishnamachari, 1977). Un brote de aflatoxicosis aguda ocurrido en Kenia en 1981 también fue asociado al consumo de maíz altamente contaminado con aflatoxina (Ngindu et al., 1982). Se contaron 20 hospitalizaciones, con una mortalidad del 60%. En un reporte más reciente (Lye et al., 1995), el consumo de fideos contaminados con aflatoxinas ocasionó una encefalopatía hepática aguda en niños en Malasia. Se sospechó la presencia

de cerca de 3 mg de aflatoxina en una sola porción de fideos contaminados.

En abril de 2004, uno de los mayores brotes de aflatoxicosis que hayan sido reportados ocurrió en zonas rurales de Kenia, produjo 317 casos y 125 muertes. La principal fuente del brote fue la contaminación con aflatoxina del maíz producido localmente. En un estudio realizado en 65 mercados y 243 vendedores de maíz, se recogieron 350 muestras de productos de maíz en los distritos más afectados. De éstas muestras, un 55% tenía niveles de aflatoxinas superiores al límite reglamentario de 20 ppb establecido en Kenia, 35% tenía niveles superiores a 100 ppb y el 7% a 1.000 ppb. En Makueni, distrito que registró el mayor número de casos de aflatoxicosis, los niveles de aflatoxinas en el maíz vendido en los mercados fueron

significativamente más elevados que en Thiaka, el distrito estudiado que presentó el menor número de casos (media geométrica de aflatoxina, 52,91 ppb contra 7,52 ppb; $P = 0,0004$). La probabilidad de niveles de aflatoxina superiores a 20 ppb fue mayor para el maíz proveniente de granjas locales situadas en las zonas afectadas que para el maíz comprado en otras regiones de Kenia o en otros países (odds ratio [OR]: 2,71; intervalo de confianza [IC] del 95%: 1,12–6,59). Además del estudio sobre la exposición a las aflatoxinas efectuado en los mercados, este brote de 2004 representó la primera vez en la que los niveles de aductos de aflatoxina–albúmina (AF–alb) permitieron confirmar de forma independiente la exposición en individuos (CDC, 2004; Azziz-Baumgartner et al., 2005; Lewis et al., 2005; Strosnider et al., 2006; Probst et al., 2007).

Carcinoma hepatocelular

Durante décadas, se ha sabido que la exposición a la aflatoxina es responsable de cánceres del hígado en los seres humanos y en numerosas especies animales. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha evaluado la carcinogenicidad de las aflatoxinas en varias ocasiones, iniciando en 1972 con el Volumen 1 de las Monografías de la IARC sobre la Evaluación de los Riesgos Carcinogénicos para Humanos. Desde entonces, muchos estudios en humanos y animales de laboratorio han aportado información adicional, y las mezclas de aflatoxinas de origen natural ahora son clasificadas como Grupo 1, del que hacen parte los carcinógenos para los humanos (IARC, 1993). Además, como se describe más adelante, la exposición simultánea a la aflatoxina y al virus de la hepatitis B (VHB) es común

en los países en desarrollo, lo que aumenta en gran medida el riesgo de un CHC (Wu et al., 2013). Las personas expuestas a ambos carcinógenos tienen un mayor riesgo de desarrollar CHC en comparación a las personas expuestas solamente a la aflatoxina (Wogan et al., 2012).

El CHC representa el 5,6% de todos los casos de cáncer reportados y es el sexto cáncer diagnosticado con mayor frecuencia en todo el mundo (Ferlay et al., 2013). La incidencia mundial de cáncer de hígado varía enormemente, y la carga de esta enfermedad, casi siempre mortal, es mucho mayor en los países menos desarrollados de Asia y África subsahariana. En total, se calcula que cada año se presentan más de 780.000 nuevos casos de cáncer de hígado y más de 745.000 muertes (Ferlay et al., 2013). A diferencia de la mayoría de los cánceres frecuentes en los países desarrollados, donde más del 90% de los casos se diagnostica en personas de 45 años y más, en las regiones de alto riesgo el cáncer de hígado comienza a aparecer en los hombres y mujeres desde la edad de 20 años, alcanzando un pico máximo en el grupo de edad de 40–49 años en los hombres y de 50–59 años en las mujeres (Parkin et al., 2005; Chen et al., 2006). Esta diferencia de edad al momento de la aparición del CHC, puede ser atribuida a exposiciones significativas y continuas a lo largo de la vida. Las diferencias entre hombres y mujeres en la incidencia de cáncer de hígado también han sido descritas; la tasa de incidencia anual estandarizada por edad (población mundial) es del 15,3 por 100.000 entre los hombres y del 5,4 por 100.000 entre las mujeres (Ferlay et al., 2013). Estos resultados epidemiológicos también corresponden a los datos obtenidos en animales de laboratorio con la aflatoxina: la

aparición temprana del cáncer es mayor en las ratas macho que en las ratas hembra (Wogan y Newberne, 1967).

Durante más de 50 años, la relación entre la exposición a la aflatoxina y el cáncer de hígado en los humanos ha sido abordada utilizando estudios ecológicos, transversales, estudios caso–control (testigo) y las investigaciones de cohortes prospectivas en poblaciones expuestas. Los primeros estudios, realizados en las Filipinas, demostraron que era posible detectar en la orina un metabolito oxidativo de la aflatoxina, que podía servir como marcador de la dosis ingerida (Campbell et al., 1970). En estudios posteriores realizados en Kenia, Astrup et al. (1983, 1987) reportaron la presencia de aductos de la aflatoxina B₁ (AFB₁) y de ADN (aductos AFB₁–ADN) en muestras de orina humana. Trabajos ulteriores efectuados en China y Gambia (África Occidental), regiones en las que la incidencia de CHC es elevada, examinaron tanto la ingesta alimentaria de aflatoxinas como los niveles de biomarcadores urinarios de la aflatoxina (Groopman et al., 1992). Los estudios que utilizaron como marcadores las tasas de aductos AFB₁–ADN y de aflatoxina M₁ (AFM₁) presentes en la orina, mostraron una relación dosis–dependiente entre la ingesta y la excreción de aflatoxina. Gan et al. (1988) y Wild et al. (1992) monitorearon las variaciones en los niveles AF–alb en el suero y observaron una asociación altamente significativa entre la ingesta de aflatoxinas y el nivel de aductos.

Numerosos estudios caso–control publicados han explorado la relación entre la exposición a la aflatoxina y el CHC. En uno de los primeros estudios caso–control realizado en las Filipinas, Bulatao-Jayme et al. (1982) compararon la ingesta de aflatoxina en los

pacientes con CHC con la ingesta de controles, emparejados por edad y sexo. Así encontraron que la exposición media por día a las aflatoxinas en los pacientes con CHC era 4,5 veces mayor que la de los controles; sin embargo, el consumo de alcohol puede haber aumentado este efecto. Van Rensburg et al. (1985) y Peers et al. (1976) efectuaron estudios similares en Mozambique y Suazilandia, respectivamente. Una vez más, el aporte cotidiano/diario de aflatoxinas en la alimentación estaba correlacionado a la incidencia del CHC, y los datos sugerían igualmente una relación dosis-dependiente entre la enfermedad hepática y la ingesta de aflatoxina.

En la Región Autónoma Zhuang de Guangxi en China, Yeh y Shen (1986) y Yeh et al. (1989) examinaron la interacción entre la infección por el VHB y la exposición a la aflatoxina, distinguiendo dos grupos según los niveles (bajo o elevado) de contaminación. En las personas cuyo suero mostraba la presencia del antígeno de superficie VHB (HBsAg) y que estaban expuestas a altos niveles de aflatoxinas, la incidencia del CHC era 10 veces más elevada que en aquellas personas que vivían en zonas donde la contaminación por aflatoxinas era baja. Aquellas que eran negativas para HBsAg y que consumían alimentos altamente contaminados por aflatoxinas tuvieron una tasa de CHC comparable a la de las personas con HBsAg positivo cuya alimentación estaba poco contaminada por la aflatoxina (Yeh et al., 1989). En un estudio caso-control en Taiwán, dos biomarcadores, AF-alb y aductos de ADN-aflatoxina, fueron medidos en muestras de tejido hepático (Lunn et al., 1997). La proporción de sujetos con un nivel detectable de AF-alb fue mayor en los pacientes que padecían de

CHC que en los controles emparejados (OR: 1,5). Igualmente se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la detección de AF-alb y el riesgo de CHC en los hombres de menos de 52 años (OR ajustado por multivariable: 5,3).

En otro estudio, realizado en Qidong, China, 145 hombres que padecían una infección crónica por el VHB fueron seguidos durante 10 años para determinar si la exposición a la aflatoxina, o la exposición concomitante al virus de la hepatitis C (VHC), o el hecho de tener antecedentes familiares de CHC estaba asociado a un aumento del riesgo de desarrollar CHC. Ocho muestras de orina recogidas mensualmente antes del inicio de la fase de seguimiento fueron agrupadas para buscar la presencia de AFM₁. La AFM₁ fue detectada en 78 (54%) de los sujetos, y el riesgo de CHC se incrementó 3,3 veces (IC 95%: 1,2–8,7) en aquellos que presentaban niveles de AFM₁ detectables (> 3,6 ng/L). El riesgo atribuible a la exposición a las aflatoxinas, definido por la presencia de AFM₁, fue de 0,553 (IC 95%: 0,087–0,94). El riesgo relativo de cirrosis fatal para las personas cuya orina contenía niveles elevados de AFM₁ fue de 2,8 (IC 95%: 0,6–14,3). La infección concomitante por el VHC aumentó el riesgo de CHC en 5,8 veces (IC 95%: 2,0–17), después de ser ajustado por edad y por estado relativo a la AFM₁. Este estudio demuestra que la exposición a la aflatoxina, identificada por la presencia de AFM₁ en la orina, puede dar cuenta de una parte sustancial del riesgo de CHC en los hombres con una hepatitis B crónica (Sun et al., 1999).

Dos grandes estudios de cohortes que incorporan los biomarcadores de las aflatoxinas, han demostrado claramente el papel etiológico de este carcinógeno en

el CHC. El primer estudio, que involucraba más de 18.000 hombres que vivían en Shanghái, China, examinó si los biomarcadores del VHB y los biomarcadores de la aflatoxina eran marcadores independientes e interactivos del riesgo de CHC. El estudio caso-control anidado en esta cohorte, reveló un aumento estadísticamente significativo en el riesgo relativo de CHC de 3,4, para las personas que presentaba el biomarcador urinario de la aflatoxina (AFB₁-N7-guanina). Para los hombres cuyo suero fue positivo para el antígeno HBsAg pero cuya orina no indicaba exposición a la aflatoxina, el riesgo relativo fue de 7,3, pero en los sujetos que tenían tanto el biomarcador urinario de la aflatoxina como el antígeno HBsAg, el riesgo relativo fue de 59,4 (Ross et al., 1992; Qian et al., 1994). Estos resultados apoyan firmemente la existencia de una relación causal entre la presencia de biomarcadores específicos del agente cancerígeno y del virus y el riesgo de CHC. El segundo estudio de cohorte, efectuado posteriormente en Taiwán, China, confirmó la veracidad de los resultados del estudio de Shanghái. Wang et al. (1996) efectuaron un estudio de casos de CHC y controles anidado al interior de la cohorte y encontraron, en las personas infectadas por el VHB, un odds ratio ajustado de 2,8, para la presencia de AF-alb detectable en comparación con la ausencia de AF-alb detectable, y un odds ratio ajustado de 5,5 para las tasas elevadas de metabolitos de aflatoxina en la orina frente a tasas más bajas. La misma cohorte dio lugar a un segundo estudio caso-control, que mostró una relación dosis-respuesta entre los niveles de AFM₁ urinaria y el riesgo de CHC en los portadores crónicos de VHB (Yu et al., 1997). Al igual que en la cohorte de Shanghái, el riesgo de CHC asociado a la

exposición a la AFB₁, fue mucho más importante entre los portadores del VHB que tenían niveles detectable de AFB₁-N⁷-guanina en la orina.

Asimismo, la relación entre la exposición a la aflatoxina y el desarrollo del CHC ha sido demostrada por los estudios de biología molecular sobre el gen supresor de tumores *p53*, gen que muta frecuentemente en múltiples cánceres humanos (Greenblatt et al., 1994). Muchos estudios sobre las mutaciones de *p53* en los CHC producidos en las poblaciones expuestas por su alimentación a altos niveles de aflatoxina, han identificado la presencia de frecuencias elevadas de transversiones de G:C → T:A, esencialmente a nivel del codón 249 (Bressac et al., 1991; Hsu et al., 1991). Por el contrario, no se encontró ninguna mutación del codón 249 de *p53* en los CHC censados en Japón y otras regiones donde la exposición a la aflatoxina es baja (Ozturk, 1991; Aguilar et al., 1994).

Por tanto, parece que la transversión G → T en la tercera base del codón 249 de *p53* está asociada a la exposición a la aflatoxina. Esto es lo que indican los estudios que comparan la prevalencia de las mutaciones del codón 249 de *p53* en los CHC, producidos en las poblaciones de las regiones donde la exposición a la aflatoxina es elevada con aquellos presentados en las regiones donde la exposición es baja. Los datos *in vitro* parecerían confirmar esta hipótesis. La utilización de estas mutaciones específicas como biomarcadores de detección precoz ofrece perspectivas interesantes para la prevención del CHC (Sidransky y Hollstein, 1996). En un estudio pionero, Kirk et al. (2000) reportaron por la primera

vez la detección de mutaciones en el codón 249 del gen *p53*, en el plasma de pacientes con cáncer de hígado residentes en Gambia; sin embargo, el tipo de mutaciones de sus tumores no fue determinado. Los autores también reportaron la presencia de esta mutación en el plasma de un pequeño número de pacientes con cirrosis. Dada la estrecha relación entre la cirrosis y el desarrollo ulterior del CHC es conveniente explorar la posibilidad de utilizar esta mutación como un marcador de detección precoz. Jackson et al. (2001) examinaron 25 tumores primitivos de hígado a la búsqueda de mutaciones específicas de *p53*. El análisis de 20 pares adicionales de muestras de tumor-plasma mostraron que 11 muestras de tumores y 6 muestras de plasma contenían la mutación específica. Este mismo grupo (Jackson et al., 2003) ha intentado encontrar el momento en el que es posible detectar esta mutación en el plasma, efectuando el análisis en muestras tomadas en los mismos pacientes antes y después del diagnóstico clínico del CHC. Este estudio fue facilitado por la disponibilidad de muestras de plasma recogidas longitudinalmente de una cohorte de 1.638 individuos de alto riesgo que han estado en seguimiento desde 1992 en Qidong, China. Los resultados mostraron que en las muestras recogidas antes del diagnóstico del cáncer de hígado, el 21,7% (IC 95%: 9,7–41,9%) de las muestras de plasma tenían niveles detectables de mutaciones en el codón 249 de *p53*, mientras que en las muestras de plasma recogidas después del diagnóstico de hígado cáncer, esta mutación estaba presente en el 44,6% (IC 95%: 21,6–70,2%) de dichas muestras.

Este porcentaje de muestras positivas después del diagnóstico de cáncer de hígado representa alrededor del 50% de todos los tumores de hígado en Qidong, lo que sugiere una concordancia de casi el 90% de los resultados obtenidos en cuanto a la mutación del codón 249 de *p53* a partir del plasma y del tumor.

Por último, los trabajos recientes se han beneficiado de los registros de cáncer de base poblacional para conocer la mortalidad por cáncer primario de hígado en Qidong, China, ciudad de 1,1 millones de habitantes. Esta base de datos muestra una reducción superior al 50% en las tasas de mortalidad por CHC en los habitantes menores de 35 años, pertenecientes a las cohortes de nacimiento situadas entre 1960 y 1980. La prevalencia de la infección por el VHB no mostró cambios ya que todos habían nacido antes de la vacunación universal de los recién nacidos. Se analizaron los biomarcadores de la aflatoxina en muestras de suero seleccionadas al azar en los bancos de productos biológicos tomadas desde la década de 1980 hasta la actualidad y correspondientes a estas cohortes. La mediana de AF-alb, biomarcador de la aflatoxina, pasó de 19,3 pg/mg en 1989 a no detectable (< 0,5 pg/mg) en 2009. Esta reducción de un 65% de la mortalidad por cáncer primario de hígado en la población, puede explicarse por la abolición de la obligación impuesta por el gobierno de consumir maíz producido localmente y la sustitución del maíz por el arroz. Estos datos muestran la importancia del rol que juegan las aflatoxinas en las regiones donde la exposición es elevada, con poblaciones en alto riesgo por el CHC (Chen et al., 2013).