



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Determinación de niveles de aflatoxina M1 en leche materna: estudio observacional descriptivo en muestras recolectas en un hospital pediátrico de referencia de la ciudad de Bogotá, durante el año 2013

Marlib Paloma Sánchez Torres

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología
Bogotá D.C., Colombia
2014

Determinación de niveles de aflatoxina M1 en leche materna: estudio observacional descriptivo en muestras recolectas en un hospital pediátrico de referencia de la ciudad de Bogotá, durante el año 2013

Marlib Paloma Sánchez Torres

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Toxicología

Director:

MSc. PhD. PD. Gonzalo J. Díaz González

Codirector:

MD. MSc. Myriam del Carmen Gutiérrez

Línea de Investigación:

Toxicología de Alimentos

Salud Pública

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología

Bogotá D.C., Colombia

2014

*Creating a safer and healthier world by
advancing the science of toxicology!*

SOT Council

Agradecimientos

A los guías y maestros que Dios puso en mi camino, a mi director de tesis el Dr. Gonzalo Díaz por aceptarme en su laboratorio, en sus clases e introducirme al mundo de la ciencia y la investigación. A la Dra. Myriam Gutiérrez mi codirectora por ser mi inspiración, por estar siempre pendiente de mí, atender todas mis llamadas y mensajes y por asesorarme durante los momentos de encrucijadas.

A la Dra. Alba Isabel Rodríguez mi tutora en la maestría por escucharme, por su apoyo, su cariño y sus sabios consejos. Al Dr. Jairo Téllez coordinador académico de la maestría por atender todos mis requerimientos, por sus asesorías y por brindarme sus cálidas palabras en todo momento.

A Milena Cepeda y Julie Sánchez analistas del laboratorio por su maravillosa acogida y por el tiempo que dedicaron para explicarme, ayudarme y responder todas mis preguntas.

A mis padres por su paciencia y su fé, a Rodri por ser mi apoyo incondicional mi despertador y mi diseñador gráfico a Mariam y a José, gracias por ser mi ejemplo y mis asesores de protocolo científico en la distancia y a Juan Camilo por sus valiosas contribuciones, por ser siempre positivo y por transitar conmigo este camino de principio a fin.

A la Vicedecanatura de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional por apoyar este proyecto y contribuir con los recursos económicos para su financiación.

Y finalmente a todas las madres que aceptaron participar en el proyecto, muchas gracias por su amorosa donación y a las instituciones y a sus profesionales por su colaboración y disposición.

Resumen

Las aflatoxinas son metabolitos fúngicos secundarios que contaminan fuentes de alimento como cereales, granos, frutos oleaginosos y especias. Los hongos metabolizan principalmente cuatro aflatoxinas, de las cuales la aflatoxina B1 (AFB1) es la más común y la más tóxica. La AFB1 es el carcinógeno hepático de ocurrencia natural más potente que se conoce en humanos, la exposición crónica causa carcinoma hepatocelular y la prevalencia de este es 16 a 32 veces más alta en países en vías de desarrollo donde la presencia de la toxina es mayor que en países industrializados, es por esto que se hace necesario monitorizar la exposición a AFB1 ya que es un importante problema de salud pública. La aflatoxina M1 (AFM1) es un metabolito hidroxilado de la AFB1 que se elimina en leche y puede ser utilizado como biomarcador de exposición a AFB1. La ingestión de alimentos contaminados durante la gestación y la lactancia pueden exponer el feto y el recién nacido a los efectos adversos de las aflatoxinas durante estas etapas críticas del desarrollo y crecimiento. Por estas razones, los esfuerzos realizados para determinar toxinas en leche materna son determinantes para establecer la contribución de las aflatoxinas en la salud pública, especialmente en la salud del recién nacido, porque esta información puede servir de dosímetro de exposición prenatal a estas sustancias.

El objetivo del presente estudio fue determinar los niveles de AFM1 en muestras de leche materna utilizando una columna de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a un detector de fluorescencia. Para esto fue necesario realizar primero una validación intralaboratorio del método ISO para leche de vaca y posteriormente se recolectaron 50 muestras de leche de madres lactantes que acudían al lactario del Hospital de la Misericordia de Bogotá, Colombia. Las voluntarias llenaron un cuestionario dando su consentimiento para la toma y el análisis de las muestras e información socioeconómica, demográfica y clínica relevante en el estudio. Para evaluar las fuentes de exposición a AFB1 se utilizó un cuestionario sobre la alimentación.

Se evidenció que el 90% de las muestras analizadas fueron positivas para AFM1 con una media de 5.2 ng/L y un rango de 0.9 a 18.5 ng/L. Este estudio demuestra la alta exposición de madres y recién nacidos a AFB1 y a AFM1 y destaca la necesidad de regular más estrictamente la presencia de estas toxinas en alimento para consumo humano. Se necesitan más estudios para determinar la presencia de estas toxinas en alimento y en fluidos biológicos y para proponer y optimizar estrategias de protección y prevención de la población en el país.

Palabras Clave: Aflatoxina B1, Aflatoxina M1, Exposición, Leche materna

Abstract

Title: Determination of aflatoxin M1 in breast milk as a biomarker of maternal and infant exposure in Colombia

Authors (first initial, last name): M.P. Sánchez

Institutions: Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología, Universidad Nacional de Colombia.

Abstract Body: Aflatoxins are secondary fungal metabolites that frequently contaminate human food supplies. Four different aflatoxins are produced by fungi, being aflatoxin B1 (AFB1) the most common and toxic. AFB1 is considered to be the most potent naturally occurring liver carcinogen known to humans. Chronic exposure causes hepatocellular carcinoma with prevalence 16–32 times higher in developing countries compared to first-world countries. Aflatoxin M1 (AFM1) is a monohydroxylated metabolite from AFB1 that is secreted in milk and can be used as a biomarker of exposure to AFB1. Ingestion of contaminated food during pregnancy and lactation may expose the fetus or the newborn to the deleterious effects of aflatoxins during these critical development and growth periods. For these reasons, efforts made to measure toxins in breast milk are important for defining the contribution of these mycotoxins to public health, especially to the health of the newborn because it might provide a dosimeter of prenatal exposure to these toxins.

The aim of the present study was to determine AFM1 levels in human breast milk using immunoaffinity column cleanup with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. An in-house validation of the ISO method used for cow's milk was performed. Breast milk samples were obtained from 50 nursery mothers chosen from those attending The Mercy Hospital Foundation located in Bogota, Colombia. Volunteers filled in a questionnaire giving their consent to analyse their samples as well as details of their socio-economical, demographical and clinical data. The intake of dietary sources of aflatoxins was assessed using a food frequency questionnaire.

Close to 90% of the samples tested positive for AFM1 with a median of 5.2 ng/L and a range of 0.9 to 18.5 ng/L. The present study demonstrates a high exposure of mothers and neonates to AFB1 and AFM1 in Colombia, and points out the need to regulate the presence of aflatoxins in human foods. Further research is needed in order to determine the presence of mycotoxins in foods and biological fluids as well as to device protection strategies in a country where mycotoxins in human foods are not yet regulated properly.

Keywords: Aflatoxin B1, Aflatoxin M1, Exposure, Breast Milk

Contenido

	Pág.
Resumen.....	IX
Lista de Figuras	XIV
Lista de Tablas	XVI
Lista de Siglas y Abreviaturas	XVIII
Lista de Imágenes.....	XIX
Introducción	1
Capítulo 1	5
1.1 Planteamiento del Problema.....	5
1.1.1 Reglamentación.....	6
1.1.2 Salud Pública.....	8
1.1.3 Contaminación.....	9
1.2 Antecedentes y Justificación	11
1.3 Objetivos	15
1.3.1 Objetivo General.....	15
1.3.2 Objetivos Específicos.....	15
1.4 Pregunta de Investigación	15
2. Marco Teórico	17
2.1 Micotoxinas	17
2.2 Aflatoxinas.....	19
2.2.1 Toxicocinética y Toxicodinamia	22
2.2.2 Aflatoxina B1	25
2.2.2.1 Carcinogénesis.....	32
2.2.3 Aflatoxina M1 y Exposición Temprana	36
2.3 Reglamentación	41
3. Metodología.....	43
3.1 Tipo de Estudio	43
3.2 Área de Conocimiento.....	43
3.3 Estructura General del Estudio.....	43
3.3.1 Población.....	44
3.3.2 Criterios de Inclusión	44
3.3.3 Criterios de Exclusión	44
3.3.4 Fuentes de Información de los Individuos	44
3.3.5 Estrategias de Muestreo y Manejo de las Muestras	45
3.3.6 Tamaño de la Muestra	45
3.3.7 Recolección de Datos.....	46
3.3.8 Definición Operacional de las Variables.....	46
3.3.9 Técnicas de Investigación y Criterios de Análisis.....	47
3.3.9.1 Aplicación del Cuestionario.....	47

3.3.9.2	Determinación de AFM1 y AFM2 por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.....	47
3.3.9.1	Análisis Estadístico	54
3.4	Consideraciones Éticas	55
3.5	Propiedad Intelectual	57
4.	Validación del Método Analítico.....	59
4.1	Principio.....	59
4.2	Columna de Inmunofinidad	59
4.3	Parámetros de la Validación	60
4.3.1	Especificidad y Selectividad	61
4.3.2	Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)	62
4.3.3	Rango de trabajo y rango lineal.....	64
4.3.4	Sensibilidad.....	66
4.3.5	Exactitud	67
5.	Resultados.....	69
5.1	Resultados Univariados	70
5.2	Resultados de Estadística Bivariada.....	77
5.3	Características sociodemográficas de las mujeres con muestras positivas por encima del percentil 75	83
6.	Discusión.....	95
6.1	Discusión de Resultados	95
6.2	Limitaciones del Estudio	104
6.3	Recomendaciones	105
7.	Conclusiones.....	107
A.	Anexo: Cuestionario	109
B.	Anexo: Importancia de la Lactancia Materna	113
C.	Anexo: Consentimiento Informado	115
D.	Anexo: Protocolo OMS	117
E.	Anexo: Aprobación Comité de Ética.....	119
F.	Anexo: Plan de Validación.....	120
G.	Anexo: Espectros.....	129
	Bibliografía	134

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 2-1. Estructuras químicas de la AFB1 y la AFG1 (Díaz y Murcia 2010)	21
Figura 2-2. Formación de Aflatoxicol a partir de AFB1	27
Figura 2-3. Metabolitos hidroxilados de la AFB1	28
Figura 2-4. Epoxidación de la AFB1. Modificado de (Díaz y Murcia, 2010).....	29
Figura 2-5. Rutas metabólicas del AFBO	29
Figura 2-6. Reacciones de conjugación de los metabolitos hidroxilados de la AFB1	30
Figura 2-7. Reducción de la AFQ1	31
Figura 2-8. Estructura química de la AFM1	36
Figura 3-1. Determinación de AFM1 y AFM2 utilizando una columna de inmovofinidad. Fuente autor.	52
Figura 4-1. Muestra de leche materna sin valores detectables de aflatoxina	61
Figura 4-2. Selectividad del método analítico	62
Figura 4-3. Curva de calibración AFM1	66
Figura 4-4. Curva de calibración AFM2	66
Figura 5-1. Cromatograma de una muestra con niveles de AFM1	69
Figura 5-2. Histograma de frecuencias muestras positivas AFM1	70
Figura 5-3. Distribución del estrato socioeconómico y el área de procedencia	73
Figura 5-4. Histograma de frecuencias muestras positivas por encima del percentil 75	83
Figura 5-5. Distribución de la escolaridad en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.	84
Figura 5-6. Distribución del estrato en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.	85
Figura 5-7. Distribución del área en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.....	86
Figura 5-8. Distribución del género en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.	86
Figura 5-9. Distribución de la paridad en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.	87
Figura 5-10. Distribución del consumo de maíz en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.	88
Figura 5-11. Distribución del consumo de derivados del maíz en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.	88
Figura 5-12. Distribución del consumo de arroz en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.	89

Figura 5-13. Raciones consumidas de arroz por las mujeres con concentraciones por encima del percentil 75.....	89
Figura 5-14. Distribución del consumo de otros cereales en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.	90
Figura 5-15. Consumo de otros cereales en mujeres con concentración de AFM1 por encima del percentil 75.....	91
Figura 5-16. Distribución del consumo de oleaginosas en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.	91
Figura 5-17. Distribución del consumo de derivados de la harina de trigo en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.	92
Figura 5-18. Consumo de derivados de la harina de trigo.....	92
Figura 5-19. Frecuencia de consumo por combinación de alimentos.....	93

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 2-1. Tabla de niveles máximos permitidos de Aflatoxinas en alimento para consumo humano. Tomado (NTC 3581)	42
Tabla 3-1. Resumen del método analítico para determinación de AFM1 y AFM2 en muestras de leche materna.....	54
Tabla 4-1. Determinación de LOD AFM1 y AFM2.....	64
Tabla 4-2. Exactitud de la AFM1 y la AFM2.....	67
Tabla 5-1. Estadística descriptiva de las variables continuas registradas al momento de la toma de muestra.....	71
Tabla 5-2. Distribución absoluta y relativa de la edad (años) de las madres lactantes del estudio.....	71
Tabla 5-3. Distribución absoluta y relativa del peso de los bebés (gramos) registrado el día de la toma de muestra.....	72
Tabla 5-4. Distribución absoluta y relativa de la edad de los bebés (días), registrado el día de la toma de muestra.....	72
Tabla 5-5. Distribución absoluta y relativa del estrato socio-económico, el número de hijos y área de residencia	73
Tabla 5-6. Distribución absoluta y relativa del origen de las madres lactantes participantes en el estudio.....	74
Tabla 5-7. Distribución absoluta y relativa de los antecedentes patológicos y ginecológicos de las madres	75
Tabla 5-8. Distribución absoluta y relativa del número de raciones tomadas por las madres lactantes en los tres días anteriores a la toma de muestra de leche materna.....	76
Tabla 5-9. Estadística descriptiva de la concentración de AFM1 (ng/l) en las categorías de edad de la madre.....	77
Tabla 5-10. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) en las categorías de peso del recién nacido.....	77
Tabla 5-11. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) en las categorías de edad del recién nacido.....	78
Tabla 5-12. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) en las categorías de estrato socioeconómico de la madre lactante.....	78
Tabla 5-13. Estadística descriptiva de AFM1 (ng/l) en las categorías del área de procedencia de la madre lactante	79
Tabla 5-14. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) en las categorías de lugar de residencia de la madre lactante	79

Tabla 5-15. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) de acuerdo al nivel de escolaridad de la madre lactante.....	79
Tabla 5-16. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) de acuerdo al número de hijos de la madre lactante.....	80
Tabla 5-17. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) de acuerdo al embarazo normal de la madre lactante al momento de la toma de muestra de leche materna.....	80
Tabla 5-18. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) de acuerdo al tipo de parto de la madre lactante al momento de la toma de muestra de leche materna.....	80
Tabla 5-19. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) de acuerdo al género del bebe de la madre lactante al momento de la toma de muestra de leche materna.....	80
Tabla 5-20. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) en relación al número de raciones de almendras, arepa de maíz, arepa de trigo, arroz, avena y cebada, consumidas por las madres lactantes.....	81
Tabla 5-21. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) en relación al número de raciones de cereales al desayuno, maíz, maní, pan y pasta, consumidas por las madres lactantes..	82
Tabla 5-22. Concentraciones de AFM1 (ng/l) por encima del percentil 75.....	84
Tabla 5-23. Lugar de procedencia de las mujeres con concentraciones de AFM1 por encima del percentil 75.....	85
Tabla 5-24. Raciones consumidas de arroz por las mujeres con concentraciones de AFM1 por encima del percentil 75.....	90
Tabla 5-25. Tabla consumo de combinación de alimentos.....	93

Lista de Siglas y Abreviaturas

Abreviatura	Término
DNMTs	ADN-metiltransferasas
AFS	Aflatoxinas
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFM1	Aflatoxina M1
AFM2	Aflatoxina M2
AFQ1	Aflatoxina Q1
AFBO	AFB1-exo-8,9-epoxido
AFL	Aflatoxicol
CAST	Council of Agricultural Science and Technology
CCCF	Sub comité del codex de contaminantes de los alimentos
CDESC	Comité de Derecho Económicos, Sociales y Culturales de las Naciones Unidas
CFS	Comité de Seguridad Alimentaria Mundial
CHC	Carcinoma hepato celular
CNCA	Comité Nacional de Códex Alimentarius
DL50	Dosis letal 50
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura
GLOBOCAN	The Global Cancer Atlas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
ICONTEC	Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación
INS	Instituto Nacional de Salud
GSTs	Glutation transferasas
SIgA	Inmunoglobulina A secretora en saliva
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
MADR	Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
Min CIT	Ministerio de Comercio, Industria y Turismo de Colombia
minARNs	ARN de interferencia
OMS	Organización Mundial de la Salud
OSAN	Observatorio de Seguridad Alimentaria y Nutricional
PGRS	Silenciamiento génico post-transcripcional
SAM	S-adenosil-metionina
ppb	Partes por billón

Lista de Imágenes

	Pág.
Imagen 3-1. Columnas de Inmunofinidad. Fuente: el autor	48
Imagen 3-2. Calentamiento de las muestras	49
Imagen 3-3. Procedimiento de filtrado	50
Imagen 3-4. Preparación de la columna de inmunofinidad.....	51
Imagen 3-5. Elusión de la AFM1 y AFM2.....	52
Imagen 3-6. Cromatógrafo Shimadzu Prominence sistema HPLC	53

Introducción

Una toxina es una sustancia sintetizada por un microorganismo, una planta o un animal, que causa efectos adversos en otro organismo (Turner et al., 2009). Las micotoxinas son metabolitos tóxicos secundarios de bajo peso molecular producidos por hongos, principalmente por los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Fusarium*, aunque constituyen un grupo toxicológica y químicamente heterogéneo están agrupados por su capacidad para producir enfermedad y muerte en seres humanos y en animales cuando son consumidas, inhaladas o entran en contacto con la piel (Zain, 2001).

Las micotoxinas entran en la cadena alimenticia debido a que el hongo infecta la planta durante el periodo de crecimiento cuando esta es más susceptible y las condiciones ambientales son favorables, o contamina los alimentos durante la cosecha y después de esta en las etapas de secado y almacenamiento (CAST, 2003). Adicionalmente, debido a que el metabolismo de estas toxinas puede dar como resultado la acumulación en tejido y órganos, pueden ser ingeridas a través del consumo de alimentos de origen animal como leche y sus derivados, carne y huevos (Marín et al., 2013). Los principales productos afectados por la infestación del hongo son cereales, nueces, frutas secas, semillas oleaginosas, especias, legumbres, café, cacao y algunas frutas, en especial la manzana. Las micotoxinas pueden ser encontradas también en productos terminados que utilicen las materias primas antes mencionadas como por ejemplo en la cerveza y el vino (Turner et al., 2009) en parte porque son termoestables y resisten el horneado, la esterilización y otros procesos térmicos (Sirot et al., 2013).

Por todo lo anterior y por su impacto negativo en la salud pública, la seguridad alimentaria y la economía de los países, especialmente países en vía de desarrollo, las micotoxinas son consideradas como uno de los contaminantes de alimentos más importantes en el mundo y son estrictamente reguladas y monitoreadas.

En cuanto a sus implicaciones en salud pública, la exposición a micotoxinas puede producir toxicidad aguda o crónica dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición, causando alteraciones a nivel del sistema nervioso central, cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal y en algunos casos la muerte. Las micotoxinas pueden también ser agentes cancerígenos, mutagénicos, teratógenos e inmunodepresores (FAO, 2003) y su toxicidad depende del tipo de toxina, las aflatoxinas (AFs) por ejemplo, son los agentes cancerígenos y genotóxicos de ocurrencia natural más potentes que se conocen (Squire, 1981).

Las AFs son un grupo de aproximadamente 20 metabolitos fúngicos relacionados, sin embargo sólo 4 de ellos son producidos por hongos, las aflatoxinas B1, B2, G1, y G2 producidas principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, (I.E. Yates, 1985). Estos hongos son más prevalentes en zonas geográficas con climas húmedos como en los países tropicales y la exposición por medio de la ingesta en la dieta es especialmente importante en poblaciones con un alto consumo de cereales como es el caso de Colombia (Williams et al., 2005).

Existe evidencia epidemiológica suficiente que demuestra que el consumo de AFB1 contribuye significativamente con la alta incidencia de cáncer hepático en países en desarrollo, esto tiene una gran relevancia debido a que el cáncer hepático es la tercera causa de muerte por cáncer alrededor del mundo y tiene una prevalencia 16 a 32 veces más alta en países no industrializados que en países desarrollados (World Health Organization, 2008). El riesgo de padecer cáncer hepático aumenta aún más en pacientes que padecen hepatitis B o C, las aflatoxinas en asociación con el virus de la hepatitis C son responsables de miles de muertes al año, principalmente en países no industrializados como Colombia (Pitt, 2000). Investigaciones demuestran que en adición a los problemas de salud mencionados, las aflatoxinas pueden causar retardo del crecimiento en niños (Gong et al., 2004; Khlangwiset et al., 2011), supresión inmunológica, especialmente en la respuesta inmunológica mediada por células (Jiang et al., 2008) y efectos adversos sobre el sistema reproductivo (Shuaib et al., 2010). El metabolismo de fase 1 de la AFB1 es llevado a cabo principalmente por miembros de la súper familia de enzimas citocromo P450. Al menos tres metabolitos monohidroxilados son producidos a partir de la AFB1, llamados aflatoxinas M1 (AFM1), Q1 (AFQ1), y B2a (AFB2a) (Diaz and Murcia, 2011). La AFM1 puede ser eliminada en la leche, por lo que la

ingesta de alimentos contaminados durante el embarazo y la lactancia puede exponer al feto o al recién nacido a los efectos deletéreos de las aflatoxinas durante estos periodos tan importantes de desarrollo y de crecimiento (Abdulrazzaq et al., 2003).

Debido a su alta toxicidad, se han establecido límites máximos permitidos de AFs en alimentos en la mayoría de países en el mundo para prevenir la exposición; sin embargo, en Colombia la regulación existente para este tipo de sustancias no es de obligatorio cumplimiento y los productores de alimentos no tienen que realizar análisis para determinación de niveles de aflatoxinas antes de comercializar sus productos, ya sean estas materias primas o alimento terminado. Por esta razón es necesario realizar investigación sobre exposición a estas micotoxinas, para obtener una aproximación epidemiológica a este problema de salud pública y la leche materna constituye una matriz única para biomonitorización porque, en adición a que cumple con todos los requisitos para este uso, también sirve como fuente de alimento (Needham y Wang, 2002).

En consecuencia, los análisis en leche materna para metabolitos fúngicos tienen un gran interés científico, y los esfuerzos realizados para determinar toxinas en leche materna son importantes para establecer la verdadera contribución de las aflatoxinas a la salud pública, especialmente a la salud del recién nacido, ya que sirve como dosímetro de exposición prenatal a estas toxinas. Por otra parte, la leche materna es un espécimen conveniente para biomonitorización porque relativamente grandes volúmenes (50–100 mL) pueden ser recolectados de manera no invasiva y es posible hacer un muestreo adecuado en las poblaciones de interés.

Este tipo de estudio nunca antes realizado en Colombia, tuvo como objetivo determinar los niveles de AFM1 en muestra de leche materna obtenidas de madres que asistieron al lactario del Hospital de la Misericordia en el periodo comprendido entre mayo y noviembre de 2013.

Capítulo 1

1.1 Planteamiento del Problema

Los seres humanos estamos permanentemente expuestos a gran cantidad de sustancias tóxicas y esto sucede aún sin que seamos plenamente conscientes de ello. El desempeño de funciones vitales como la respiración o la alimentación son fuentes potenciales de exposición a compuestos que pueden tener efectos negativos en la salud e incluso inducir la aparición de cáncer (Vereb et al., 2011). Mediante la alimentación por ejemplo, sustancias altamente tóxicas presentes en los alimentos pueden ingresar al torrente sanguíneo tras haber sufrido procesos de digestión y absorción en el tracto gastrointestinal y estar virtualmente en contacto con cada tejido del organismo causando efectos adversos (Sutandyo, 2010).

Ya que el consumo de alimento es indispensable para obtener los nutrientes y la energía necesarios para vivir, todas las personas deben tener garantizado el acceso a una alimentación adecuada e inocua. Esto es un derecho plenamente reconocido a nivel mundial dentro del marco de seguridad alimentaria. Por esta razón el Comité de Derechos Económicos, Sociales y Culturales de las Naciones Unidas (CDESC) establece: “El derecho a la alimentación adecuada se ejerce cuando todo hombre, mujer o niño, ya sea solo o en común con otros, tiene acceso físico y económico, en todo momento, a la alimentación adecuada o a medios para obtenerla. El contenido básico del derecho a la alimentación adecuada comprende (...) la disponibilidad de alimentos en cantidad y calidad suficientes para satisfacer las necesidades alimentarias de los individuos, sin sustancias nocivas y aceptables para una cultura determinada” (CFS, 2012). Así mismo, la Organización Mundial del Comercio en el acuerdo de medidas sanitarias y fitosanitarias direccionado a los gobiernos, establece medidas relativas a la inocuidad de los alimentos y según reza en el anexo A, estas medidas tienen la finalidad de: “proteger la vida y la salud de las personas y de los animales en el territorio de los países miembros, de los riesgos resultantes de la presencia de aditivos, contaminantes, toxinas u organismos patógenos en los productos alimenticios, las bebidas o los piensos” (OMC, 2005). Finalmente, la FAO en su marco programático de FAO Colombia ha

priorizado cuatro áreas de cooperación técnica para los próximos 10 años entre los que se encuentra la sanidad agropecuaria e inocuidad de alimentos (Zavala, 2013).

Como puede evidenciarse, constituye un deber de los gobiernos y de la sociedad en general garantizar a todos los ciudadanos el acceso a alimentos inocuos, que contribuyan de forma integral con la satisfacción de sus necesidades, con el mejoramiento de la calidad de vida y con el mantenimiento de buenas condiciones de salud. El estado colombiano, como estado miembro fundador de la Organización de las Naciones Unidas, junto con todos los entes que componen la sociedad están en la obligación de garantizar este derecho a todos los colombianos.

1.1.1 Reglamentación

Como parte de los esfuerzos internacionales para garantizar la inocuidad y la seguridad alimentaria, en 1943 se reunieron representantes de los gobiernos de 44 países quienes se comprometen a fundar una organización dedicada a la alimentación y a la agricultura. Es así como en 1945 se establece la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) (FAO, 2014). Posteriormente, en 1962 se constituye la comisión mixta del Códex Alimentarius, un programa conjunto de la FAO y la Organización Mundial de la salud (OMS), cuyos objetivos principales son la protección de la salud de los consumidores, asegurar unas prácticas de comercio claras y promocionar la coordinación de todas las normas alimentarias acordadas por las organizaciones gubernamentales y no gubernamentales para garantizar alimentos inocuos a todas las personas en cualquier lugar (Codex Alimentarius, 2014). Consecutivamente, en 1974 se crea el Comité de Seguridad Alimentaria Mundial, órgano intergubernamental destinado a proporcionar apoyo al sistema de las Naciones Unidas en todo lo relacionado a políticas de seguridad alimentaria, que incluyen la producción de alimentos y el acceso físico y económico a los mismos (CFS, 2014). Entre los múltiples aportes que estas entidades realizan en materia de reglamentación se encuentran la elaboración de documentos, de normas, de códigos y directrices de prácticas alimentarias internacionales que se convierten en referentes obligados y que deben ser seguidos por los países miembros de la Organización Mundial del Comercio entre los que se encuentra Colombia, esto dentro del marco de los acuerdos sobre Obstáculos Técnicos al Comercio y sobre Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (Min CIT, 2007).

Los códigos emitidos por la comisión mixta FAO/OMS del Códex Alimentarius son un punto de referencia mundial para los consumidores, los productores de alimentos, los organismos nacionales de control de los alimentos y el comercio alimentario internacional. En el marco del códex, unas de las sustancias más estrictamente reglamentadas son las aflatoxinas (AFs), que son metabolitos fúngicos producidos por los hongos en diferentes sustratos, pero que generalmente ocurren en granos y cereales comúnmente utilizados en nutrición humana y animal. Son estrictamente monitoreadas a nivel internacional porque son el grupo de micotoxinas más tóxico que se conoce, siendo la más tóxica de estas la aflatoxina B1, que es cancerígena, es uno de los agentes causantes de cáncer de hígado más potentes que se conocen y el consumo de alimentos contaminados con esta micotoxina se considera un importante problema de salud pública, especialmente en países no industrializados (IARC, 1993). Por todo lo anterior, se han realizado grandes y constantes esfuerzos a nivel mundial para combatir la contaminación de alimentos con AFs dentro del marco de inocuidad y seguridad alimentaria. Estos esfuerzos incluyen la colaboración internacional de entidades y agencias intergubernamentales como las anteriormente mencionadas, de la industria de alimentos y de grupos de investigación provenientes de la academia (Kensley et al., 2010).

En el ámbito nacional, la responsabilidad sobre la elaboración, vigilancia y cumplimiento de la reglamentación en seguridad alimentaria recae sobre el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), el Instituto Nacional de Salud (INS), el Ministerio de Salud y Protección Social, el Ministerio de Comercio, Industria y Turismo, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), el Comité Nacional del Codex Alimentarius (CNCA), el subcomité del códex de contaminantes de los alimentos (CCCF) y el Observatorio de Seguridad Alimentaria y Nutricional (OSAN). Se han establecido adicionalmente unos niveles máximos permitidos de AFs en los alimentos, que están consignados en las normas técnicas colombianas elaboradas por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC (NTC 3581, 2006). Sin embargo, estos niveles son una recomendación y no son de obligatorio cumplimiento, lo que hace que Colombia sea un país mucho más permisivo en comparación con otros países, tanto en los valores máximos tolerables en alimentos como en la implementación y el cumplimiento de los mismos. El que la reglamentación contenida en las normas técnicas colombianas sea una recomendación, constituye una

grieta en la legislación y va en contra de los esfuerzos que se han desarrollado en el mundo para el control de la ocurrencia de AFs en alimentos, esfuerzos destinados a proteger la vida y la salud de las personas mediante el control de la exposición a estas sustancias a través de la alimentación.

1.1.2 Salud Pública

Según la OMS en el reporte sobre carga mundial de morbilidad, el cáncer de hígado es una de las tres primeras causas de muerte por cáncer en el mundo, el tipo histológico de cáncer más común es el carcinoma hepatocelular (CHC) que tiene una prevalencia del 80 al 90% (OMS, 2008). De acuerdo a las estadísticas reportadas en “The Global Cancer Atlas” (GLOBOCAN), el cáncer de hígado presenta una incidencia de 5.6% con 782.451 nuevos casos al año y tiene una alta mortalidad, siendo la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial después del cáncer de pulmón, por lo que el cáncer de hígado se considera como una patología común y letal (Ferlay et al., 2012).

La exposición crónica a AFs mediante el consumo de alimentos contaminados es un factor de riesgo significativo para la aparición de cáncer hepático, ya que estas toxinas son mutagénicas y cancerígenas en humanos. Se ha evidenciado que existe una mutación específica del gen TP53 en pacientes con CHC provenientes de áreas geográficas con alta incidencia de AFs (Wild y Torner, 2002). Datos obtenidos de evaluaciones de riesgo estiman que del total de casos nuevos de CHC que se presentan al año 25,200 a 155,000 pueden ser inducidos por el consumo de AFs y se destaca el caso específico de México, en donde la exposición a AFs es un factor de riesgo significativo para la aparición de CHC con un estimado de 152–924 casos de CHC al año por cada 100,000 habitantes (Liu y Wu, 2010). De acuerdo con la base de datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) para mutaciones del gen TP53, en los casos de CHC se encuentran mutaciones en el 31.4% de los casos y la más común es en el codón 249, mutación que se asocia con la exposición a AFB1 (Petitjean et al., 2007). Un estudio realizado para determinar la prevalencia de biomarcadores para factores de riesgo en una serie de casos de CHC provenientes de Colombia, se evidenció que la mutación en el gen TP53 codón 249, característica de la exposición a AFB1, se presentó en 4 de las 38 muestras de tejido hepático analizado, lo que corresponde al 10.5% (Navas et al., 2011). Esto evidencia que la contaminación de

alimentos con AFs es un problema de salud pública serio, particularmente en países en vías de desarrollo, en los cuales no se implementan las estrategias de control para prevenir la exposición, aun cuando se conoce que el consumo de alimentos contaminados con AFs es un factor de riesgo controlable y que adoptar medidas obligatorias para prevenir la exposición es crucial en salud pública (Wu y Khlangwiset, 2010).

1.1.3 Contaminación

En el último pronóstico de la FAO para la producción mundial de cereales, las estimaciones confirman un gran aumento en la producción de cereales durante el 2013. Se produjeron 2 500 millones de toneladas, 8,4% más que el año pasado y un 6% por encima del récord previo en 2011. En Sur América la producción alcanzó las 180 millones de toneladas, 11% más que el año pasado y uno de los cereales que más aumentó su producción fue el maíz con 123 millones de toneladas, 18% más que en el 2012 (FAO, 2013). Estos datos indican que los cereales son la fuente de alimento más importante en los seres humanos. Tres cereales, el maíz, el trigo y el arroz representan en conjunto el 75% de la producción de granos en el mundo y se depende por completo de ellos para el suministro de la mayor parte del alimento (Simopoulos AP, 2002).

Como se discutió anteriormente, las micotoxinas se encuentran entre los contaminantes más importantes en los cereales y desde el descubrimiento de las AFs como agentes causantes de enfermedad en humanos y en animales, las micotoxinas han sido reconocidas como biotoxinas de la cadena alimenticia. Son metabolitos secundarios producidos por diferentes especies del género *Aspergillus* y no tienen importancia bioquímica para el crecimiento o desarrollo del hongo (Hussein y Brasel, 2001). La contaminación por micotoxinas se presenta principalmente en cereales. Estudios han estimado que hasta un 25% de los cultivos en el mundo pueden estar contaminados con micotoxinas (Fink-Gremmels, 1999). Esto significa que, si la producción mundial estimada de cereales para el 2013 es de alrededor de 2 500 millones de toneladas, hay potencialmente alrededor de 625 millones de toneladas contaminadas con micotoxinas en la provisión de alimentos que entran en la cadena alimenticia. Adicionalmente, de acuerdo con la posible transferencia de cada toxina, los alimentos de origen animal y los productos terminados que utilizan cereales como materias primas pueden contribuir a la ingesta total de micotoxinas (Turner et al., 2009). Esto evidencia el gran riesgo en

seguridad alimentaria que representan la micotoxinas mediante la exposición por consumo de cereales contaminados, ya que estos son alimentos altamente consumidos alrededor del mundo.

Un estudio para determinar la contaminación con AFs en alimentos destinados para el consumo humano fue llevado a cabo en Colombia, durante un periodo de 12 meses se recolectaron un total de 248 muestras, las cuales fueron obtenidas de supermercados, tiendas minoristas y centros de acopio. Entre los alimentos seleccionados se incluyeron maíz y productos derivados, granos de cereales, arroz, semillas de leguminosas, y cereales para el desayuno. Se detectaron AFs en 22 muestras de las cuales 12 superaron el máximo nivel tolerable de AFB1 equivalente a 5ng/g, con una media de 12 ng/g, lo que es más del doble del límite máximo permisible adoptado por la mayoría de los países. Es de resaltar que la contaminación con AFs fue significativa en el maíz y los productos derivados de este, ya que de las 22 muestras positivas, 14 provenían de este grupo de alimentos. Adicionalmente, en 10 de estas 14 muestras positivas en maíz se encontraron concentraciones por encima de 5µg/kg y en 2 se obtuvieron concentraciones por encima de 30 µg/kg (Diaz et al., 2001). Dado que el maíz es parte de la dieta común de los habitantes de Colombia, es probable que la exposición a AFB1 sea significativa en la población, por lo que hace necesario realizar investigación enfocada en evaluar la importancia de esta exposición.

Como se ha evidenciado, la exposición a AFs es un problema de salud pública a nivel mundial, ya que muchos de los alimentos seriamente contaminados son la base de la pirámide alimentaria de millones de personas. Es por eso que la mayoría de países industrializados ya cuentan con políticas y directrices sanitarias en miras de prevenir la contaminación de los alimentos con este tipo de sustancias. Colombia debe tomar conciencia de la importancia del control de las AFs e implementar reglamentos de buenas prácticas agrícolas, establecer niveles máximos permitidos de AFs en alimentos de consumo tanto humano como animal y desarrollar e implementar protocolos de monitoreo y promoción de investigación. Esto solo es posible a través de un esfuerzo en común tanto de los entes gubernamentales, como la empresa privada y las instituciones académicas.

1.2 Antecedentes y Justificación

A partir de su descubrimiento en 1960, las AFs han sido extensamente estudiadas, en especial desde el punto de vista toxicológico debido a su capacidad para producir efectos adversos en la salud tanto de los seres humanos como de los animales. Inicialmente estos metabolitos fúngicos fueron aislados de extractos contaminados con el fin de hacer la caracterización físico-química de los compuestos. Posteriormente, en otros estudios de investigación se describieron sus propiedades toxicológicas y se evidenció la necesidad de establecer biomarcadores para evaluar la exposición a AFs en seres humanos, ya que la exposición crónica representa un riesgo para la salud (Kensler et al., 2010). La información obtenida mediante estudios de biomonitorización es empleada en el establecimiento de medidas de control para disminuir la exposición por el consumo de alimentos contaminados y aporta información valiosa en el campo de la salud pública. En conjunto, todos los avances científicos que se han realizado hasta el momento han sido posibles gracias al esfuerzo colaborativo entre las organizaciones intergubernamentales, los gobiernos de los países, la empresa privada y la extensa investigación proveniente de la academia, lo cual demuestra la importancia de estas micotoxinas a nivel mundial y plantea la necesidad de generar información e investigación a nivel local.

Garantizar la seguridad de los alimentos ha sido una prioridad Internacional en los últimos años. En un mundo cambiante como en el que vivimos asegurar alimentos inocuos, libres de riesgos químicos o microbiológicos se convierte en una necesidad humana básica (FAO, 2004). Entre los riesgos químicos, las micotoxinas han recibido la mayor atención, debido a que en varias áreas geográficas, especialmente en países en vías de desarrollo representan un importante problema de seguridad alimentaria. Adicionalmente, las micotoxinas han sido consideradas como una causa significativa de enfermedades de transmisión alimentaria por la OMS (OMS, 2002). Debido al conocimiento de los efectos adversos que causan las micotoxinas sobre la salud de los seres humanos, los países han establecido límites máximos permitidos de micotoxinas en alimentos que protegen la salud de sus ciudadanos, así como los intereses económicos de productores y comerciantes.

En 2002, una investigación internacional sobre existencia o ausencia de límites específicos para las micotoxinas y reglamentos en los alimentos fue iniciada por el Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente en 119 países. En el caso de la

AFB1 el límite máximo permitido en la mayoría de países es de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (FAO, 2004). En Colombia no hay límites establecidos para AFB1 en alimentos. En cuanto a los límites para la suma de las aflatoxinas B1, B2, G1, y G2 el valor más frecuentemente adoptado a nivel mundial es de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en Colombia el valor establecido para alimento destinado a consumo humano es de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y no es obligatorio para productores de alimento (ICONTEC, 2006). Esto evidencia que en Colombia la reglamentación en AFs es débil y menos restrictiva que en la mayoría de países en el mundo, lo que aumenta la exposición a estas toxinas. Para establecer en Colombia unos límites máximos permisibles de AFs en alimentos que estén en concordancia con la tendencia mundial y que protejan adecuadamente los intereses de los consumidores y de los productores de alimentos, el gobierno nacional o las entidades competentes deben fomentar y financiar actividades que contribuyan con la evaluación de la exposición a AFs.

Se requiere que desde la academia se desarrollen metodologías analíticas validadas y disponibles que aporten información científica significativa sobre la ocurrencia y exposición a AFs. Sólo a través del estímulo de este tipo de investigaciones se logrará la articulación y cooperación entre las instituciones científicas, entes gubernamentales e industria para alcanzar estándares de inocuidad alimentaria que aseguren una protección realista.

La incidencia y niveles de contaminación con aflatoxinas en alimentos para humanos o para animales es continuamente monitoreada a nivel mundial (Jelinek et al., 1989; Streit et al., 2013). Sin embargo, mientras decenas de estudios de monitoreo son llevados a cabo cada año en países industrializados, poca información es generada en países en desarrollo.

En Colombia hay estudios que reportan la presencia de aflatoxina B1 en alimentos para consumo animal y para consumo humano. En 200 muestras de materias primas y alimentos terminados empleados en nutrición animal que se analizaron para determinar la presencia de AFs, se encontró que la AFB1 fue el mayor contaminante con una incidencia del 29% (58 de 200 muestras), con concentraciones de hasta 66.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Céspedes y Diaz, 1997). En 280 muestras de alimentos para consumo humano (granos, cereales y oleaginosas), la incidencia de AFB1 fue del 8.9%, las concentraciones encontradas fueron elevadas, con un rango de 1.0 a 103.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y una media de 12.6

µg/kg (Díaz et al., 2001). Se ha investigado también la prevalencia de la contaminación de alimentos por el hongo del género *Aspergillus spp*, el estudio evidenció contaminación en el 54.5% de las muestras. El substrato más contaminado fue el maíz (100%), se aislaron 50 cepas de *Aspergillus spp*, de las cuales el 56% pertenecían a la sección *Flavi*, en estos últimos se midió la capacidad para producir AFs y el 76.5% eran productores de AFB1 y aflatoxina B2 (AFB2) (Díaz et al., 2009). Así mismo, se han realizado estudios para evaluar la presencia de AFM1 en muestras de leches para consumo humano en la ciudad de Bogotá por un periodo de dos años. La prevalencia de niveles detectables de AFM1 durante el primer y segundo año fue de 69.2% y 79.4% respectivamente, lo que sugiere que la mayoría de la muestras presentan contaminación y que esta puede deberse a consumo de alimentos contaminados con AFB1 por parte los bovinos (Díaz G et al., 2006). Todos estos resultados indican que es necesario realizar un monitoreo continuo de los niveles de AFs en Colombia y que este debe hacerse utilizando métodos analíticos confiables, debido a que se están analizando sustancias carcinogénicas (Díaz et al., 2004). Finalmente, se han desarrollado proyectos de investigación como tesis de grado, una de ellas en la Universidad Nacional de Colombia, para establecer la prevalencia y distribución de AFs y ocratoxina A en cereales para consumo humano utilizando para el análisis cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). En este trabajo de investigación se obtuvo una ocurrencia para AFB1 del 6% (Urrego, 2005). Estos estudios demuestran la presencia de AFs en alimentos para consumo humano, sin embargo hasta el momento en el país no se ha realizado investigación para determinar el impacto de esta posible exposición en seres humanos.

A nivel internacional se han publicado estudios que evidencian la presencia de AFs en fluidos biológico incluyendo la leche materna (El-Nezami et al., 1995; Navas et al., 2005; Galvano et al., 2008). Se considera que la leche materna puede ser utilizada como biomarcador de exposición a AFB1, y en este caso en particular se habla de un biomarcador con una característica única, debido a que no solamente indica exposición en la madre, sino también en el recién nacido, ya que la principal fuente de alimentación durante los 6 primeros meses de vida es la lactancia materna (Gürbay et al. 2010).

En el mundo se han publicado varios estudios que determinaron la presencia de AFM1 en leche materna. En Emiratos Árabes se analizaron 140 muestras para determinación de AFM1 utilizando HPLC, encontrándose presencia de la toxina en el 92% de las

muestras analizadas. Estas muestras fueron recolectadas en un periodo de un año (Abdulrazzaq et al., 2003). Otros estudios han sido conducidos en países europeos, África y Australia (Wild et al., 1987; El-Nezami et al., 1995; Jonsyn et al., 1995; Saad et al., 1995; Alla et al., 2002; Abdulrazzaq et al., 2003; Turconi et al., 2004). Los niveles de contaminación fueron los siguientes: Francia 0%, Italia 0,4%, Australia 15%, y Zimbabwe 11%. Los estudios realizados en Tailandia y Sierra Leona evidenciaron incidencias de 45 y 31% respectivamente. En Egipto la prevalencia fue del 56%. Entre los artículos más recientes se encuentran dos del 2010, uno publicado en Turquía, en el que aproximadamente el 75% de las muestras fueron positivas para concentraciones de AFM1 en niveles mayores o iguales a 99 µg/kg (Gürbay et al., 2010). El otro fue un estudio llevado a cabo en Irán, en el cual se reclutaron 91 madres de zonas rurales y 91 madres de zonas urbanas. Se encontró presencia de AFM1 en el 22% de la muestras de leche materna provenientes de madres de zona rural, probablemente por consumo de leche de vaca contaminada (Mahdavi et al., 2010). Las conclusiones de la mayoría de los estudios señalan que los biomarcadores de AFs son parte integral en el establecimiento del papel etiológico de estas toxinas en las enfermedades humanas, esto a través de una mejor estimación de la exposición, mayor conocimiento de los mecanismos de patogénesis de la enfermedades, y como herramientas para la implementación y evaluación de las intervenciones preventivas.

Por lo anterior se considera que el conocimiento generado por este proyecto de investigación contribuye con el desarrollo de investigación en micotoxicología humana y toxicología analítica, con la construcción de programas de control de AFs en concordancia con los esfuerzos internacionales y aporta información que puede ser utilizada con el objetivo de establecer políticas de regulación y reglamentación de contaminantes en los alimentos, según las exigencias establecidas por la FAO

Los resultados de este trabajo favorecen la generación de conocimiento en el campo de la toxicología de alimentos, área que se está desarrollando en Colombia. Este proyecto de investigación continúa además una sólida línea de investigación establecida en micotoxinas en la Universidad Nacional de Colombia y hace parte de una nueva generación de investigación en la que se pretende la cooperación entre distintas dependencias de la Universidad Nacional, que en este caso son el Departamento de

Toxicología de la Facultad de Medicina y el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar los niveles de AFM1 en las muestras de leche materna recolectadas, mediante el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de AFM1 en las muestras de leche materna.
- Realizar la cuantificación de los niveles de AFM1 encontrados en las muestras analizadas.
- Estimar la prevalencia de AFM1 en las muestras de leche materna.
- Determinar la frecuencia de la ingesta diaria de alimentos susceptibles de sufrir contaminación con aflatoxinas en las mujeres participantes en el estudio y describir patrones de consumo de alimentos potencialmente contaminados con AFB1 en las mujeres participantes en el estudio.
- Determinar si existe exposición a AFB1 en mujeres lactantes y exposición a AFM1 en lactantes.
- Realizar una revisión del estado del arte sobre la contaminación de alimentos con AFB1 y los efectos de esta exposición en la salud.

1.4 Pregunta de Investigación

¿Existen niveles detectables y cuantificables de Aflatoxina M1 como biomarcador de exposición materna a AFB1 en muestras de leche materna recolectadas en un lactario de la ciudad de Bogotá?

2. Marco Teórico

2.1 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos secundarios, es decir son compuestos sintetizados por el hongo en el medio en el que se encuentra creciendo y no son utilizados por el organismo como componentes esenciales para su supervivencia, crecimiento o reproducción. La palabra micotoxina significa toxina producida por hongos y deriva del término micotoxicosis, que se refiere a la enfermedad producida por una toxina de hongo (Forgacs y Carll, 1955). La micotoxicosis más antigua de la que se tenga reporte histórico es el ergotismo, conocida también con el nombre de fuego de San Antonio, enfermedad de gran importancia en salud pública en la edad media, producida por el consumo de centeno u otros cereales contaminados con el hongo *Clavisep purpurea*. El cuadro clínico se caracteriza por necrosis de las extremidades que lleva a amputación debido a vasoconstricción, estimulación del sistema nervioso central debido a la acción agonista sobre los receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos y adrenérgicos de la ergotamina y en otros casos sintomatología gastrointestinal y muerte súbita (Alm y Elvevåg, 2013).

Las micotoxinas son un grupo diverso y amplio de estructuras orgánicas que se caracterizan por presentar diferentes átomos y grupos funcionales. La mayoría de estos potentes químicos orgánicos se encuentran en alimentos contaminados con hongos (Marroquín-Cardona et al., 2014). Las micotoxinas ocurren naturalmente y han sido reconocidos como agentes causantes de enfermedad en seres humanos y en animales. El mecanismo por el cual son metabolizados no ha sido completamente dilucidado, sin embargo, se sabe que son producidos al final de la fase de crecimiento exponencial del hongo y su formación está altamente influenciada por la composición del medio. Se calcula que existen potencialmente alrededor de 20.000 a 300.000 micotoxinas y que los mecanismos de toxicidad serían igual de extensos (Martín et al., 2005).

Los hongos que producen estos metabolitos son ubicuos en la naturaleza y la contaminación aunque es inevitable, puede controlarse. Es por esta razón que en medicina existe un creciente interés sobre las implicaciones de estas toxinas en

diferentes enfermedades. La contaminación de la planta por estos hongos puede presentarse en campo y se incrementa durante la cosecha y los procesos de secado y almacenamiento de los frutos. En cuanto a la contaminación en campo, las condiciones climáticas de temperatura y humedad relativa juegan un papel determinante, que en el caso de las AFs se incrementa durante épocas de sequía, bajas precipitaciones y temperaturas altas. En otros casos la contaminación se ve favorecida en áreas geográficas con temperaturas húmedas tropicales o subtropicales (Wilson y Abramson, 1992). La infestación por insectos y el uso de fertilizantes y fungicidas también influyen en la colonización fúngica y la producción de micotoxinas. Estas toxinas persisten durante las diferentes transformaciones que sufre la planta y son resistentes a los procesos de esterilización y cocción.

La exposición se presenta principalmente por ingestión de alimentos contaminados, no obstante, según el tipo de micotoxina la exposición puede ser también por vía dérmica o inhalatoria. Las manifestaciones clínicas dependen de la dosis y del tiempo de exposición y pueden ser agudas (alteraciones de la función renal o hepática, irritación de la piel, neurotoxicidad y muerte de forma rápida en algunos casos) o crónicas, como la inducción de neoplasias, mutagénesis y teratogénesis (Paterson y Lima (a), 2010). Cuando la toxina tiene como uno de sus órganos blanco el sistema inmune la etiología es difícil de dilucidar, ya que las manifestaciones clínicas estarán relacionadas con aumento de la susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

Las células están continuamente expuestas a agentes que causan daño en al ADN o ARN como la radiación UV, radiaciones ionizantes, cancerígenos de origen químico, bacterias, toxinas fúngicas y radicales libres generados como subproductos de la respiración aerobia. Los errores que se producen durante la replicación del ADN pueden causar daños como sustitución, inserción o delección de bases, rupturas de cadena, dimerización de pirimidinas, introducción de enlaces covalentes entre bases de cadenas opuestas y la adición de aductos. Estas lesiones pueden ser reparadas o reemplazadas debido a que los organismos han desarrollado evolutivamente mecanismos de reparación del ADN como la reparación directa, reparación por escisión de bases o de nucleótidos, des-apareamiento de bases, fotoreactivación, y reparación de rupturas en la doble hebra del ADN por recombinación homóloga o fusión no homóloga de extremos. Si el daño

persiste, esto lleva a inestabilidad del genoma, mutaciones, carcinogénesis y muerte celular (Sancar et al., 2004).

El mecanismo de acción de las micotoxinas más extensamente estudiado es su interacción e inhibición de biomoléculas. Tienen efectos mutagénicos en los ácidos nucleicos que pueden ser directos (acción sobre bases nitrogenadas) o indirectos (por inhibición enzimática) con el consecuente daño en el ADN. Estas toxinas reaccionan con macromoléculas celulares mediante activación enzimática. Los compuestos parentales tienen la potencialidad de ser activados a sus formas cancerígenas, sin embargo, algunos compuestos no se unen directamente al ADN y su mecanismo de daño consiste en alterar la expresión de proteínas con una función importante en el mantenimiento de la homeostasis tisular como el crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Paterson y Lima (b), 2009). Entre las micotoxinas con efectos cancerígenos se encuentran la sterigmatocistina, ocratoxinas, fumonisinas, zearalenona, citrulina, patulina, ácido penicílico y las aflatoxinas, estas últimas las de mayor importancia en salud pública.

La ocratoxina A se considera un agente nefrotóxico, puede presentarse nefropatía por el consumo de carne animal, principalmente de pollo y cerdo alimentados con cereales y plantas forrajeras contaminadas. El consumo de fumonisina B1 se ha asociado con la aparición de cáncer de esófago en humanos y cáncer hepático en ratas, se considera además nefrotóxica y tiene efecto sinérgico con la ocratoxina A. Cuando las fumonisinas son consumidas durante la gestación aumentan significativamente el riesgo de defectos del tubo neural y otras alteraciones del SNC. Los tricotecenos tienen efecto inmunosupresor (Stoev, 2013).

2.2 Aflatoxinas

Las aflatoxinas fueron descubiertas a finales de los años 50 e inicios de la década de los 60, cuando se les identificó como el agente etiológico de la “enfermedad X” de los pavos, patología que causó la muerte a más de 100,000 pavos jóvenes en Inglaterra en 1960, los cuales habían sido alimentados con granos contaminados procedentes de América del Sur (Blount, 1961). Investigaciones posteriores, evidenciaron que la toxicidad estaba relacionada con la presencia del hongo *Aspergillus flavus* en el alimento, por tal razón se

realizaron cultivos y los extractos obtenidos fueron capaces de inducir la “enfermedad X” en los animales utilizados en el estudio. Se les denominó de acuerdo al hongo que las produce, toxina de *Aspergillus flavus* (aflatoxina) (Kensler et al., 2010).

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por los hongos del género *Aspergillus* spp, desde el punto de vista micológico existen diferencias cuantitativas y cualitativas en cuanto a la capacidad para producir metabolitos entre las diferentes cepas de hongos que son aflatoxigénicas. Las aflatoxinas son producidas en su mayoría por hongos del género *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y ocasionalmente por otras especies como *Aspergillus nonius*, *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus ochraceoroseus* y *Aspergillus pseudotamari*. Se reconocen al menos 14 metabolitos pero solo 4 son producidos por los hongos de manera natural y en consecuencia son los más estudiados desde el punto de vista toxicológico, se denominan aflatoxina B1, B2, G1 y G2. (Turner et al., 2009) *A. flavus* produce únicamente aflatoxinas B, mientras que el *A. parasiticus* produce aflatoxinas B y G (Creppy, 2002). La detección de estos compuestos en extractos de alimentos contaminados fue facilitada por la fluorescencia que presentan a la luz ultravioleta, las aflatoxinas B (blue) son azul-fluorescentes y las G (green) son verde-fluorescentes. Posteriormente los metabolitos purificados fueron aislados para estudio, y hacia el año 1963 ya se había logrado la caracterización y la síntesis de la mayoría de estos metabolitos. El origen, la caracterización química y la toxicología de las aflatoxinas han sido extensamente estudiados (Leeson et al., 1995). En su estructura contienen un núcleo cumarina fusionado a un bifurano y una estructura pentanona en el caso de aflatoxinas B, que está sustituida por una lactona de seis miembros en las aflatoxinas G (Carrillo, 2003). La aflatoxina B1 (AFB1) y la aflatoxina G1 (AFG1) poseen un enlace insaturado entre los carbonos 8-9, (Figura 2-1) y se ha demostrado que la epoxidación en esta posición tiene un papel crítico en su potencial carcinogénico (Groopman and Kensler, 2005).

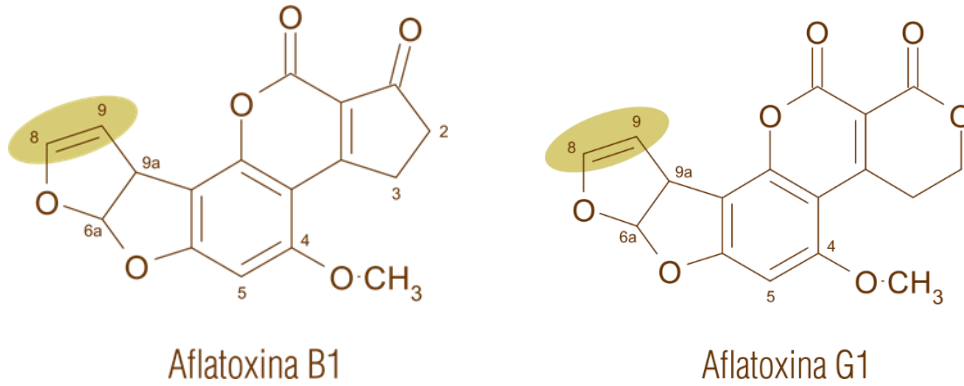


Figura 2-1. Estructuras químicas de la AFB1 y la AFG1 (Díaz y Murcia 2010)

Las Aflatoxina B2 (AFB2) y G2 (AFG2) son menos tóxicas, a menos que se produzca su oxidación a AFB1 y AFG1 respectivamente. Las fórmulas moleculares de cada una de las aflatoxinas fueron descritas por (Hartley et al., 1963). La aflatoxina B1 es C₁₇H₁₂O₆, aflatoxina G1 es C₁₇H₁₂O₇; aflatoxina B2 C₁₇H₁₄O₆ y finalmente la estructura química de la aflatoxina G2 es C₁₇H₁₄O₇.

Estos contaminantes afectan un amplio rango de productos agrícolas, incluyendo cereales, frutos secos, nueces, granos, especias y semillas oleaginosas (Khlanguiswet y Wu, 2010). Los factores que influyen la producción de aflatoxinas durante la cosecha pueden ser de tipo físico, químico o biológico: entre los físicos se encuentran la temperatura, las condiciones climáticas y la humedad (9-18%), el estrés que sufre la planta en sequía, las precipitaciones y el clima tropical y subtropical. Los factores químicos incluyen la composición del aire, el tipo de suelo y la naturaleza del sustrato. Los biológicos están asociados a las características de la especie huésped, cuyo genotipo por ejemplo, puede hacerla más susceptible a los cambios de temperatura (Dhanasekaran et al., 2011). También se describe que el daño producido por insectos y el tipo de prácticas agrícolas que se pongan en práctica inciden positivamente en la producción de toxinas. Estos hongos pueden también producir aflatoxinas durante las fases de post-cosecha, que incluyen el transporte, almacenamiento y procesamiento de los alimentos.

2.2.1 Toxicocinética y Toxicodinamia

La exposición en su mayoría se presenta en población general (no ocupacional) mediante la dieta, la ingesta de AFs oscila entre nanogramos (ng) y microgramos (μg) por día. El maíz y las semillas oleaginosas representan la mayor fuente de exposición en humanos, esto debido a su gran distribución y consumo en el mundo y a que tienen una alta susceptibilidad a sufrir contaminación (Strosnider et al. 2006). La exposición ocupacional puede presentarse durante el procesamiento y manejo de frutos contaminados, especialmente en personas que manipulan insumos destinados para consumo animal. En las personas ocupacionalmente expuestas se ha visto aumento en el riesgo de presentar cáncer de pulmón (He et al., 2006). Las concentraciones en aire usualmente son del orden de ng/m^3 , sin embargo se han reportado concentraciones de $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (IARC, 2012). No se han desarrollado hasta el momento estudios rigurosos que comparen la ingesta de aflatoxinas y posteriormente la concentración de metabolitos en sangre y otros fluidos tras los procesos de absorción y distribución. Sin embargo, hay disponibles algunos datos de estudios en animales y en voluntarios humanos.

Después de aplicación por vía dérmica se ha evidenciado absorción de AFB1 en ratas, también hay absorción por vía inhalatoria y esta es más rápida que la absorción gastrointestinal, sin embargo la distribución y eliminación no presentan diferencias cualquiera que sea la vía de exposición. Otros estudios en animales evidencian que tras la administración por vía oral las aflatoxinas se absorben en el intestino y pasan al torrente sanguíneo para ser llevadas al hígado donde se encuentra una mayor concentración horas después. Un estudio realizado en voluntarios humanos muestra que la absorción de la AFB1 es rápida y tiene una cinética de primer orden (Jubert et al., 2009).

En cuanto a la carcinogenicidad de la AFB1, esta se debe a que la toxina es metabolizada por el sistema enzimático citocromo P450 a 8,9-epóxido y este tiene la capacidad de formar aductos con el ADN. Se calcula que el 3% de la aflatoxina consumida se une de forma irreversible al ADN (Sherif et al., 2009). Existe variabilidad interindividual y también diferencias entre niños y adultos en la tasa de activación enzimática de la AFB1, lo que puede tener relevancia en la toxicocinética de las aflatoxinas. También existen diferencias en la formación de metabolitos de detoxificación

y en la prevalencia de rutas metabólicas que llevan a la producción de metabolitos conjugados que son eliminados con facilidad disminuyendo la mutagenicidad y la citotoxicidad en el individuo. La eliminación se presenta de 24 a 72 horas después de la ingesta y esta puede ser por vía renal o fecal. Los conjugados con glutatión se eliminan en su mayoría en la bilis, los conjugados con ácido glucurónico y sulfato se eliminan por vía renal (IARC, 2012).

Las aflatoxinas constituyen una importante preocupación en salud ya que son reconocidos carcinógenos y juegan un importante papel en la elevada incidencia de carcinoma hepatocelular en ciertas áreas del mundo (Choy, 1993; Stern et al., 200). Estos compuestos pueden además inducir alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Reducen el glucógeno hepático mediante la inhibición de la glucógeno sintetasa y la fosfoglucomutasa (enzima que cataliza la conversión de glucosa-1-fosfato a glucosa-6-fosfato) aumentando los niveles de glucosa en sangre (McLean y Dutton, 1995). Aunque es poco frecuente, cuando se consumen en grandes cantidades pueden causar una aflatoxicosis aguda que se caracteriza por emésis, dolor abdominal, hemorragia, falla hepática, necrosis hepática aguda, proliferación ductal biliar, edema pulmonar, letargia e incluso puede producirse la muerte si se consumen dosis extremadamente altas (Azziz et al., 2005). Todas las dosis sean agudas o crónicas tienen un efecto acumulativo en el riesgo de cáncer.

La exposición a aflatoxinas se ha asociado también con alteraciones en el sistema inmunológico: afectan la respuesta inmune celular y humoral y reducen la respuesta inmune primaria y secundaria, disminuyen la actividad de linfocitos T y linfocitos B, causan daño en las funciones efectoras de macrófagos y neutrófilos, alteran la función fagocítica en monocitos, modifican la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias e inmunoglobulinas (Turner et al., 2003), suprimen procesos de citólisis mediados por células NK (natural killers), inducen la reactivación de enfermedades crónicas y disminuyen la inmunidad activa inducida por vacunas. Se considera entonces que son compuestos inmunotóxicos (Jiang et al. 2008). Hay estudios en los que se han investigado las causas de la rápida progresión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA): la población objeto de estudio estuvo constituida por individuos con adicción a la heroína en Holanda y Escocia, esto debido a que la heroína adquirida en las calles se encontraba contaminada con AFs. Se

realizaron biomarcadores de exposición a AFs en sangre y estos fueron positivos en la mayoría de los sujetos, por lo cual se sugiere un efecto sinérgico inmunosupresor entre el VIH y las AFs (Jaffar et al., 2004). Las AFs acentúan cambios en los linfocitos T y linfocitos B en pacientes VIH positivos, alteran la función de los linfocitos T CD8, la capacidad de expresión de CD69 en los linfocitos B y disminuyen los linfocitos T supresores. En pacientes con niveles de AFs en sangre, la estimulación constante del sistema inmune puede llevar a depleción de los linfocitos T CD8, así como de la molécula CD28. Esto impide que se lleven a cabo funciones celulares como la citólisis, lo que aumenta la replicación viral y del número de virus mutantes que causan una disminución en el conteo de células CD4 y una depresión aún mayor del sistema inmune (Jiang et al. 2008).

Las aflatoxinas atraviesan la barrera feto-placentaria: la detección de AFs en sangre de cordón umbilical evidencia que hay exposición durante la gestación. De hecho, las concentraciones en cordón umbilical son mayores que las detectadas en sangre materna (Lamplugh et al., 1988). La exposición del feto puede darse por consumo de alimentos contaminados por la madre y posteriormente mediante la alimentación con leche materna y otros alimentos contaminados. La exposición temprana a AFs se ha asociado de forma significativa con retraso en el crecimiento y a otros indicadores de deterioro del crecimiento y desarrollo. Esto es importante debido a que el retraso en el crecimiento causa alteraciones en el desarrollo cognoscitivo y mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas. Estos efectos pueden persistir durante varios años en los pacientes pediátricos. Se estima que el 21% de las muertes y de años de vida ajustados en función de la discapacidad (AVAD) en niños menores de 5 años se deben a retraso del crecimiento, emaciación grave y retraso del crecimiento intrauterino (Black et al., 2008). Se han realizado estudios para determinar la eficacia del metabolismo fetal comparado con el adulto y se ha encontrado expresión similar de la enzima Citocromo P450 3A7 y lipooxigenasas, enzimas que pueden activar la AFB1. Adicionalmente la tasa de formación de aductos aflatoxina-ADN y aflatoxina-proteína es similar en tejido hepático adulto y fetal. Sin embargo, la expresión de enzimas microsomales de detoxificación como la epóxido hidrolasa y la glutatión S-Transferasa (GST) es menor en el feto (Khlanguiset et al., 2011). La presencia de AFs y específicamente de AFM1 en leche materna indica exposición de recién nacidos y lactantes en varias regiones del mundo.

No se han dilucidado el mecanismo por el cual las AFs causan retraso en el crecimiento. Algunos estudios sugieren que esto puede estar relacionado con la inmunomodulación que causa infecciones recurrentes y también produce cambios en la integridad de la mucosa intestinal. Otro mecanismo puede ser la modulación de genes implicados en la producción de energía y el metabolismo de ácidos grasos, alteración en la síntesis de proteínas y cambios en el metabolismo de vitaminas y micronutrientes (Yarru et al., 2009).

Las Aflatoxinas causan también daño en el ADN, afectan negativamente los procesos de reparación y alteran la composición de base del ADN en los genes. Adicionalmente, las aflatoxinas contienen un anillo de furano terminal insaturado que puede unirse covalentemente al ADN formando un aducto que induce mutaciones de tipo transición y transversión (Paterson y Lima (b), 2009).

Las AFs causan alteración en la síntesis de proteínas y en los ácidos nucleicos, debido a que se unen a la ARN polimerasa, a la ARN-polimerasa dependiente de ADN, a otras enzimas y sustratos esenciales en los procesos de iniciación, transcripción y traslación y causan degranulación del retículo endoplásmico rugoso, lo que en conjunto inhibe la síntesis de proteínas y disminuye el contenido proteico en tejidos como el músculo esquelético, corazón, hígado y riñón, lo que se ha relacionado con aumento de necrosis hepática y renal. Estas micotoxinas son agentes mutagénicos, carcinogénicos, teratógenos e inmunotóxicos que además de inhibir la síntesis de proteínas interfieren con vías metabólicas importantes en las funciones de órganos como el corazón, el riñón y el hígado, bloquean el flujo de información genética desde el ADN, ARN y proteínas y las vías de señalización en los procesos de crecimiento y proliferación celular (Bbosa, 2013).

2.2.2 Aflatoxina B1

La aflatoxina B1 (AFB1) es la más común (60-80% del total de aflatoxinas) y la que presenta mayor toxicidad (Leeson et al. 1995). Es una sustancia altamente tóxica, la DL50 es de 1-50 mg/kg en la mayoría de las especies animales. Los efectos son dependientes de la dosis y del tiempo de administración, pudiendo causar aflatoxicosis aguda que se caracteriza por síntomas gastrointestinales inespecíficos y falla hepática o,

aflatoxicosis crónica secundaria a la ingesta regular de bajas dosis, que puede inducir la aparición de carcinoma hepatocelular (Díaz y Murcia, 2011). Las enzimas del sistema citocromo P450 son las principalmente implicadas en el proceso de biotransformación de la AFB1. La mayor concentración se encuentra en el retículo endoplásmico de los hepatocitos, sin embargo, se considera que pueden estar presentes virtualmente en cualquier tejido. Su nombre se debe a que estas proteínas presentan una absorción máxima del espectro de luz a 450 nm. Estas enzimas están clasificadas en familias y se les identifica con un número (1, 2, 3 y 4), en subfamilias identificadas con una letra (2A, 2B, 2D y 2E) y en miembros individuales a los que se les asigna un número (2A6, 2A1). En conjunto, estas enzimas participan en una gran cantidad de reacciones cuyo sustrato son xenobióticos lipofílicos o compuestos endógenos y que incluyen hidroxilación de carbonos alifáticos o aromáticos, epoxidación de dobles enlaces, oxigenación, N-hidroxilación, delaquilación, transferencia de grupos oxidativos, unión de ésteres y dehidrogenación (Guengerich, 2006).

El proceso de biotransformación de la AFB1 es complejo y sucede en su mayoría en el hígado, en él intervienen una amplia variedad de procesos enzimáticos que comprenden tanto reacciones de fase I como de fase II y su comprensión es fundamental en el estudio las propiedades toxicológicas de esta sustancia. Las reacciones de fase I están catalizadas por enzimas pertenecientes al sistema citocromo P450, principalmente las subfamilias 1A2, 2B6, 3A4, 3A5 y 3A7, la contribución final de cada enzima depende no solamente de su afinidad por el sustrato, si no de la expresión en tejido hepático (Díaz y Murcia, 2011).

Existe una reacción en la que intervienen reductasas citosólicas, que reducen la AFB1 a aflatoxicol, este metabolito se considera reservorio de AFB1, ya que puede ser oxidado y formar el compuesto original (Figura 2-2). El citocromo P450 cataliza la producción de tres metabolitos hidroxilados, las aflatoxinas M1 (AFM1), Q1 (AFQ1), y B2 α (AFB2 α) (Díaz et al., 2010). Los dos últimos son considerados metabolitos de detoxificación, de hecho, la AFQ1 es 18 veces menos tóxica que la AFB1. Por el contrario, la aflatoxina M1 tiene propiedades carcinogénicas y citotóxicas, es un agente cancerígeno demostrado en animales y un posible cancerígeno en humanos, se clasifica en el grupo 1 de la IARC como parte de las aflatoxinas de ocurrencia natural (IARC, 2002)



Figura 2-2. Formación de Aflatoxicol a partir de AFB1

La aflatoxina M1 fue aislada inicialmente en leche de vacas que consumían alimento contaminado con AFB1, se le llamó toxina de la leche, por lo que la letra M proviene de la palabra en inglés “milk”. Sin embargo, este metabolito no es exclusivo de mamíferos, puede ser aislado de microsomas hepáticos de otras especies como el *Gallus gallus* y se elimina en leche materna y orina.

La AFQ1 es considerada el mayor metabolito de la AFB1 en humanos (estudios in vitro), es el resultado de la 3 α -hidroxilación de la AFB1, metabolizada en microsomas hepáticos por la encima citocromo P3A4 y P1A2 y se elimina en orina (Rawal y Coulombe, 2011). El metabolito AFB2 α (Figura 2-3), resulta de la hidratación del doble enlace vinil éter (C8-C9), puede ser producido enzimáticamente, por degradación fotoquímica o por tratamiento de la AFB1 con ácido y es mucho menos tóxico que el compuesto parental. Las especies capaces de seguir esta vía de detoxificación presentan cierta resistencia a la acción de las aflatoxinas (Diaz et al., 2010). Otra reacción mediada por las Citocromo P450 es la 4-O-Desmetilación de la AFB1, el compuesto fenólico que se origina fue aislado inicialmente en orina de primate, por lo que se denominó AFP1, se considera un producto de detoxificación porque se conjuga con facilidad con el ácido glucorónico. La AFP1 puede ser hidroxilada en la posición 9a formándose 4,9a-dihidroxi aflatoxina B1.

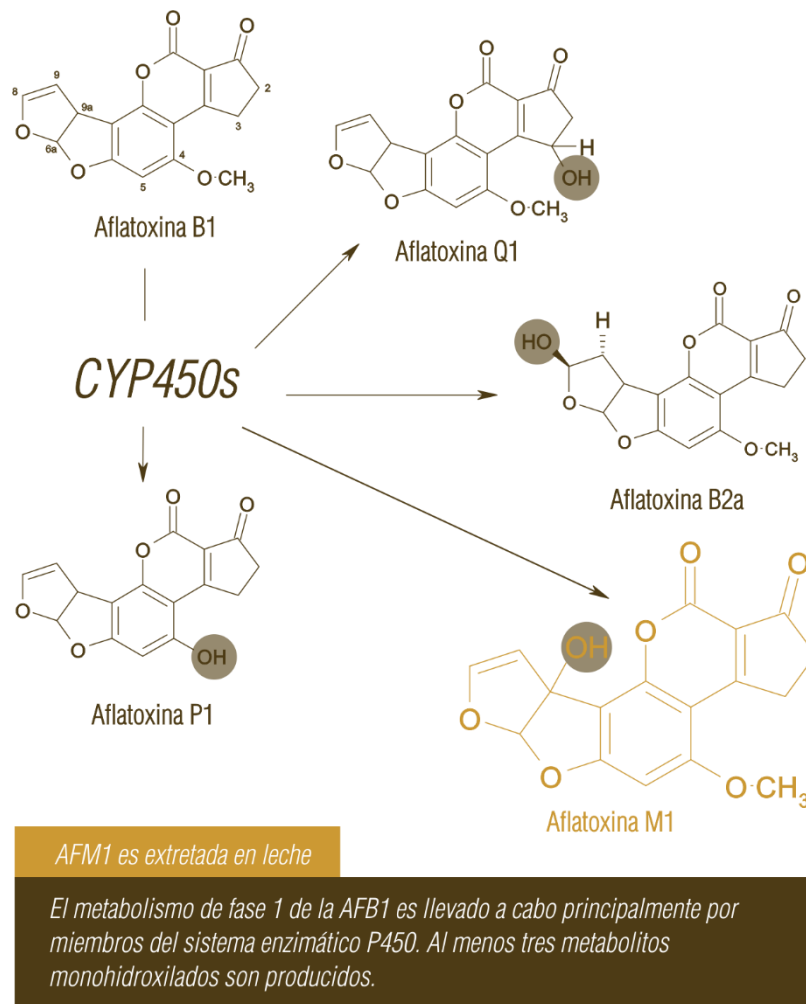
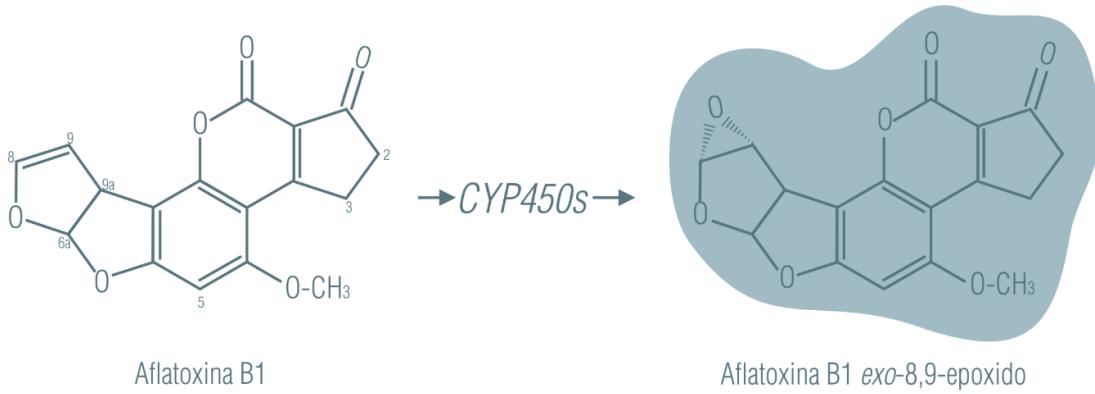


Figura 2-3. Metabolitos hidroxilados de la AFB1

Otra ruta metabólica es la epoxidación del enlace insaturado presente en el anillo furano terminal de la AFB1, lo que da como resultado la formación de AFB1-exo-8,9-epóxido (AFBO), un compuesto inestable, de reactividad alta y que tiene una vida media de aproximadamente un segundo (Figura 2-4). En los microsomas hepáticos también puede metabolizarse el 8,9-endo-epóxido que no es reactivo. El metabolito AFBO tiene la capacidad de unirse a componentes celulares, especialmente a proteínas y formar aductos con nucleótidos del ADN y ARN, siendo el responsable de la carcinogenicidad y mutagenicidad de la AFB1.



● Epoxidación de la aflatoxina B1. El producto resultante, AFB1-exo-8,9-epoxido (AFBO), es un compuesto inestable y altamente reactivo responsable de la carcinogenicidad y mutagenicidad de la AFB1

Figura 2-4. Epoxidación de la AFB1. Modificado de (Diaz y Murcia, 2010)

El AFBO puede ser hidrolizado catalítica o espontáneamente formando AFB1-8,9-dihidrodiol (AFB1-dhd), o puede ser conjugado con glutatión y eliminado, esta reacción es catalizada por la enzima glutatión transferasa. El AFB1-dhd puede sufrir apertura del anillo furano, lo que da lugar a la formación del aldehído AFB1 α -hidroxi-dialdehído, (Figura 2-5) el cual es capaz de unirse a los residuos de lisina de las proteínas, en especial de la albúmina, formando aductos AFB1-Lys. (Guengerich et al., 2001).

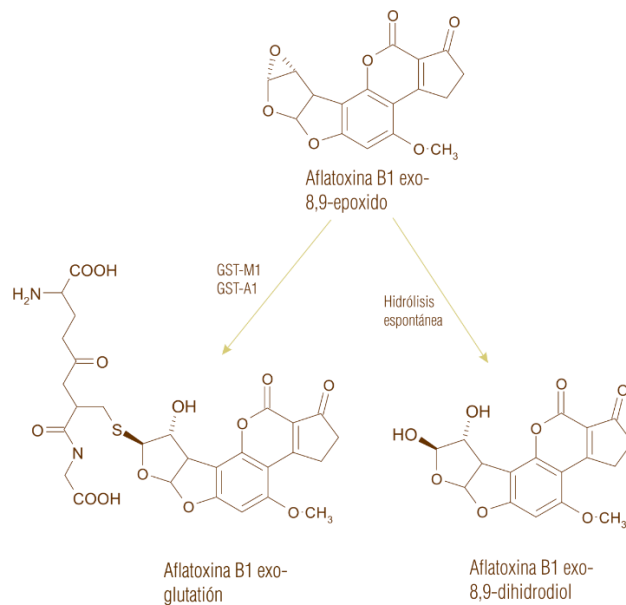


Figura 2-5. Rutas metabólicas del AFBO

La AFB1 puede ser también reducida: el grupo carbonilo presente en el anillo de la ciclopentanona puede ser reducido a un grupo hidroxilo para formar el correspondiente ciclopentanol aflatotoxicol (AFL). Esta reacción no es catalizada por enzimas microsomales, sino por enzimas citosólicas dependientes de NADPH. El aflatotoxicol es un reservorio de AFB1, ya que puede ser oxidado de nuevo al compuesto original en el citosol de los hepatocitos. El AFL tiene la capacidad de formar aductos con el ADN porque el doble enlace entre los carbono C8 y C9 está presente en este metabolito. El aflatotoxicol puede ser conjugado con el ácido glucurónico o con sulfato para ser eliminado, esta se considera una vía de detoxificación ya que el AFL no podría ser oxidado a AFB1 (Díaz y Murcia, 20010).

Los metabolitos hidroxilados AFM1 y AFQ1 pueden también sufrir reducción citosólica en el grupo carbonilo del carbono C1 en una reacción análoga a la de la AFB1 a AFL, los metabolitos resultantes se denominan aflatotoxicol M1 (Figura 2-6) y aflatotoxicol H1 respectivamente. El aflatotoxicol H1 es uno de los metabolitos de la AFB1 más metabolizado en humanos (Figura 2-7). El aflatotoxicol M1 puede ser producido a partir de AFL y puede ser oxidado para formar de nuevo AFM1 por una NADPH deshidrogenasa microsomal.

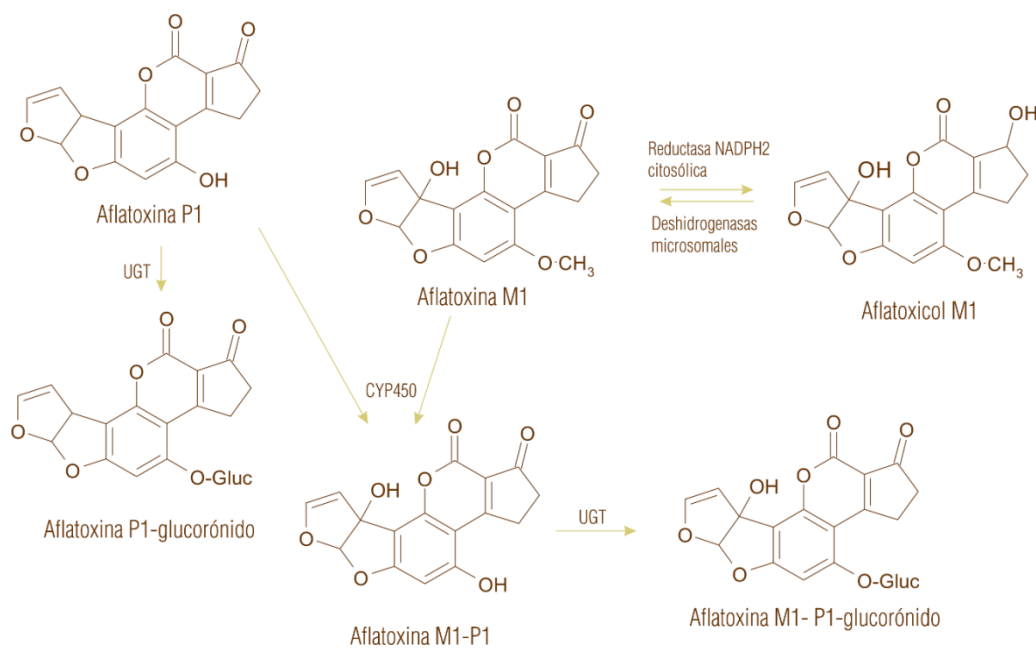


Figura 2-6. Reacciones de conjugación de los metabolitos hidroxilados de la AFB1



Figura 2-7. Reducción de la AFQ1

Ahora pasando al metabolismo de fase II, la reacción de biotransformación más estudiada es la captura nucleofílica en la cual el glutatión reacciona con el metabolito electrofílico AFBO. Esta reacción es catalizada por glutatión transferasas (GSTs), una súper familia de enzimas responsable de gran cantidad de reacciones en las cuales el anión tiolato de glutatión actúa como nucleófilo. Estas proteínas intracelulares se encuentran en la mayoría de células eucariotas y las protegen contra los efectos tóxicos inducidos químicamente debido a que catalizan la conjugación del grupo tiol, (-SH libre) una molécula electrofílica del glutatión con sustratos no polares que contienen un carbón, nitrógeno o un átomo de sulfuro. Las GSTs son consideradas las enzimas más importantes involucradas en el metabolismo de agentes alquilantes y se encuentran presentes en la mayoría de los tejidos con altas concentraciones en hígado, intestino, riñones, testículo, glándulas adrenales y pulmón. Las GSTs se dividen en sub-familias por un sistema de clasificación análogo al de las citocromo P450: las principales familias incluyen GST citosólicas, GST mitocondriales y GST microsomales que están asociadas a proteínas de membrana y son importantes en el metabolismo de eicosanoides y de glutatión (Hayes et al., 2005). La acumulación de AFB1 y sus metabolitos tóxicos que incluyen especies reactivas de oxígeno pueden causar depleción de las reservas de glutatión aumentando la toxicidad hepática por aflatoxinas y por otros compuestos a los que esté expuesto el individuo.

Otra reacción de conjugación de los metabolitos de la AFB1 reportada en estudios en animales es la conjugación de la AFP1 y la 4,9a-dihidroxi aflatoxina B1 con ácido

glucurónico, que lleva a la síntesis de productos de detoxificación. Esta reacción es catalizada por UDP-glucuronosil transferasas, sin embargo las enzimas específicas que participan en la reacción no han sido identificadas aún (Díaz y Murcia, 2011).

2.2.2.1 Carcinogénesis

En el cuerpo humano suceden daños en el ADN de forma natural 10.000 veces por día por célula, estos daños son reparados normalmente. Sin embargo, en el caso de la exposición a AFB estos pueden ser exagerados por la toxina y sus metabolitos por la formación de aductos. Cuando la formación aductos entre AFBO, AFB1-ADN y el ARN supera la capacidad de reparación del material genético, se inducen mutaciones. Ensayos in-vitro han reportado la capacidad de la AFB1 de unirse de forma covalente a la citosina y a la guanina en la posición N7 formando aductos pro-mutagénicos (aflatoxina-N7-guanina), los aductos AFB1 y ADN causan resistencia a los mecanismos de reparación de daño del ADN, se producen procesos de depurinación, errores en la replicación (error-prone), rupturas de una sola cadena, sustitución de pares de bases y mutaciones por desplazamiento del marco de lectura (tipo de mutación causada por la inserción o deleción de un número de nucleótidos que no es múltiplo de tres en una secuencia de ADN). La unión de la AFB1 al ADN causa también inhibición en la síntesis del ARN, el cual está implicado en la expresión genética. La AFB1 induce mutaciones GC-TA y GC-AT cuando es metabolizado por los microsomas hepáticos a epóxido o como 8,9-dicloruro. Los puntos calientes “hot spots” para mutaciones de AFB1 fueron identificados predominantemente en regiones del DNA ricas en GC.

Los metabolitos de AFBO son altamente reactivos y se unen de forma covalente a biomoléculas formado aductos de lisina con la albúmina, aductos pro-mutagénicos con el ADN y aductos N7-guanina que causan daño en las enzimas de reparación del ADN, lo que causa daños somáticos, especialmente cuando los aductos se localizan en regiones del ADN activas para la transcripción. La AFB1 y el AFBO causan cambios estructurales en la mitocondria. El 8,9-epoxido puede unirse al ADN mitocondrial (mitADN) lo que dificulta la producción de ATP y la función de enzimas NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa. El daño producido en la mitocondria se ha relacionado con procesos de envejecimiento celular y adicionalmente la formación de aductos con el mitADN produce

mutaciones, alteraciones en la membrana mitocondrial, incrementa la apoptosis e interferencia con la producción de energía.

La AFB1 y sus metabolitos inducen además sobre regulación de receptores nucleares, que son considerados defensas evolutivas contra xenobióticos, ya que actúan como sensores para detectar dichas sustancias. La ingestión crónica de AFB1 lleva a la activación de la síntesis de ARNm y esto a su vez aumenta la expresión del ARNm de los receptores nucleares como el receptor X de pregnano (PXR), el receptor constitutivo de androstano (CAR) y el receptor de aril hidrocarburos (AhR), implicados en la modulación de los genes de las enzimas que intervienen en el metabolismo de fase I y de fase II. La aflatoxina activa estos receptores nucleares para aumentar la cantidad de enzimas mediante aumento en la transcripción genética y acelerar la producción de epóxido y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que incrementa la toxicidad. La activación del receptor AhR puede producir también alteraciones en los mecanismo de señalización que regulan la proliferación, diferenciación y apoptosis celular, la respuesta inmune y se ha implicado en los mecanismos de carcinogénesis (Bbosa et al., 2013).

Otros mecanismos de carcinogénesis incluyen la capacidad de la AFB1 para inducir peroxidación lipídica. En células tumorales hepáticas humanas, de áreas geográficas con alta incidencia de contaminación por aflatoxinas, se ha evidenciado una mutación de transversión guanina por timina (GT) en el codón 249 y una mutación en el exón 7 del gen *TP53*, por lo que la exposición a AFB1 se asocia con la aparición de cáncer hepático. Esta asociación está ampliamente documentada y demostrada en la literatura científica (Ravinayagam et al., 2012; Stern, 2001). Las proteínas derivadas de tumores por mutación del gen p53 contribuyen con la carcinogénesis a través de tres mecanismos que se sobreponen, pérdida de la función, predominio de efectos negativos y ganancia de función. Por ejemplo, se ha demostrado que p.R249S (una mutación del codón 249 de AGG a AGT, arginina a serina) ha perdido la capacidad de unirse a elementos de respuesta del gen p53 y la capacidad de transactivar genes blanco en las líneas celulares de carcinoma hepato celular. Por otro lado, p.R249S no muestra ganancia de función por sí mismo; sin embargo, interactúa con el gen X del VHB, confiriéndole una ventaja de crecimiento durante el proceso temprano de transformación cancerosa. La interacción entre los aductos mutagénicos AFB1-DNA y la proteína X del VHB podrían explicar los efectos carcinogénicos en hepatocitos de la AFB1 en pacientes con hepatitis B.

En estudios más recientes se ha demostrado que la proteína E2F1 es un factor de transcripción que actúa en genes promotores de la regulación durante el ciclo celular y está implicado en la regulación transcripcional de varios genes, cuyos productos participan en la progresión del ciclo celular y la síntesis de ADN y cuya expresión está sobre-regulada en la transición G1/S del ciclo celular. La expresión de la proteína E2F1 estimula el crecimiento y la invasión celular en el CHC y se ha demostrado que la AFB1 promueve la expresión de esta proteína en los hepatocitos, lo que constituye otro mecanismo de carcinogénesis de la AFB1 (Lv et al., 2014).

El cáncer de hígado, principalmente el carcinoma hepatocelular es común y mortal, sin embargo, existen notables variaciones en la incidencia de CHC alrededor del mundo. Esto se debe a la distribución de los patrones de prevalencia, en relación a los factores etiológicos primarios que son principalmente la infección por VHB, VHC y la exposición a aflatoxinas. El CHC es el tumor primario de hígado más común y tiene un pronóstico pobre con el menor tiempo de supervivencia que cualquier otro cáncer tanto en hombres y como en mujeres. Causa más de medio millón de muertes al año en el mundo y el número de casos nuevos cada año se calcula en 750.000 (Kirk et al., 2006; Kew, 2012). En Colombia, según las estadísticas del Instituto Nacional de Cancerología, el cáncer hepático es la cuarta causa de muerte por cáncer en hombres y la tercera en mujeres, sin embargo se estima que esta cifra es mucho mayor ya que existen muchos casos en los cuales el paciente fallece sin que se hubiera realizado el diagnóstico, sobretodo en regiones del país con mayor índice de pobreza como la Amazonía y el Pacífico (INC, 2014).

En estudios diseñados para evaluar la relación entre el virus la hepatitis B (HBV), la exposición a AFB1 y el riesgo de carcinoma hepatocelular, han encontrado que en pacientes con hepatitis B la exposición a aflatoxinas aumenta el riesgo de presentar CHC. Un estudio realizado en Japón evidenció que pacientes con infección por VHB presentaron un riesgo relativo de 4.8 a 17.4 veces para CHC, mientras que los pacientes con dos factores de riesgo VHB y exposición a AFB1 tuvieron un riesgo de 59.4 a 70 veces. Esto evidencia que la AFB1 aumenta la hepatocarcinogénesis en pacientes con hepatitis B (Shirabe et al., 2011; Cullen et al., 2009). Cuando se analiza la exposición a AFs como único factor de riesgo único, se estima que la exposición contribuye con

aproximadamente el 28.2% de todos los casos de CHC en el mundo, lo que puede aumentar en países en desarrollo con climas tropicales y sub-tropicales, en los que se considera la población está expuesta de forma ubicua y permanente a niveles moderados y altos de AFs (Liu y Wu, 2010)

Estudios epidemiológicos han mostrado una asociación positiva entre la ocurrencia de cáncer de pulmón y del sistema respiratorio y la exposición a AFB1 por inhalación. Este tipo de exposición se debe principalmente a inhalación de polvo de granos y cereales contaminados en personas ocupacionalmente expuestas. La concentración más alta registrada de AFB1 en polvo es de 55 ppm y esto sucede principalmente en plantas procesadoras de alimentos.

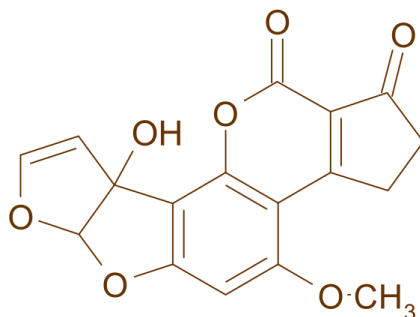
En humanos también aumenta el riesgo de cáncer de pulmón por la exposición a AFB1 vía oral y en estudios en animales de experimentación la AFB1 también induce la aparición de tumores en pulmón. Para que se presenten los efectos tóxicos es necesaria la activación enzimática de la AFB1 por enzimas del sistema citocromo P450, las enzimas 1A2 y 3A4 son las principalmente implicadas en la activación de la AFB1 en cáncer hepático, produciendo los metabolitos AFB1-8,9-epóxido and AFM1-8,9-epóxido, responsables de la carcinogénesis y mutagénesis. Aunque algunas enzimas como lipooxigenasas y prostaglandina H sintetasa tienen la capacidad de activar la AFB1, su actividad es mucho menor comparada con la enzimas citocromo P450 y se presenta cuando las concentraciones del sustrato son altas, mientras que las enzimas 1A2 y 3A4 tienen una afinidad mayor por la toxina cuando esta se encuentra en concentraciones bajas que son más relevantes en exposición ambiental.

En el pulmón humano la AFB1 puede ser activada. Cultivos de tejido bronquial también han mostrado esta capacidad, sin embargo la enzima citocromo P450 1A2 se expresa de manera casi exclusiva en tejido hepático, por lo que fue necesario el diseño de estudios experimentales para determinar las enzimas implicadas en la activación de la AFB1 en el sistema respiratorio, encontrándose que la enzima citocromo P450 2A13 expresada predominantemente en sistema respiratorio con el nivel más alto en mucosa nasal, seguido de pulmón y tráquea es capaz de metabolizar eficientemente la AFB1. Esta enzima también es la responsable de la activación de uno de los agentes cancerígenos específicos del tabaco más importantes, el NNK (4-(n-metil-n-nitrosamino)-4-(3-piridil)-

butanal). Esta enzima tiene una actividad metabólica significativa metabolizando la AFB1 y formando los metabolitos tóxicos AFB1-8,9-epóxido y AFM1-8,9-epóxido cuando el sustrato se encuentra en bajas concentraciones de 15 μM y también a concentraciones más altas de hasta 150 μM (He et al., 2006).

2.2.3 Aflatoxina M1 y Exposición Temprana

Como se ha descrito, la AFM1 es uno de los metabolitos hidroxilados más importantes de la AFB1, no se considera metabolito de detoxificación, ya que conserva propiedades toxicológicas de la molécula parental (10% de carcinogenicidad) y algunos estudios sugieren que es además hepatotóxica e inmunotóxica (Denning et al., 1995). Mujeres lactantes que consumen AFB1 eliminan AFM1 en la leche materna. La tasa de conversión de AFB1-AFM1 es altamente variable, puede ir de 0.5% hasta 6% (Neal et al., 1998). La toxina es termoestable y no se presentan cambios en la concentración tras procesos de pasteurización. El número CAS es 6795-23-9, tiene un peso molecular de 328 Da y su fórmula molecular es $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$ (Figura 2-8)



Aflatoxina M1

Figura 2-8. Estructura química de la AFM1

La Unión Europea establece como niveles máximos de AFM1 en leche para consumo humano 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$, diez veces menos que la legislación en nuestro país y 0.025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en leches o alimentos a base de leche para consumo pediátrico, con la propuesta de disminuir esta concentración a 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Caloni et al., 2006). Una de las razones para ser tan estrictos con los niveles permitidos en lactantes y en niños, es que la evidencia

que demuestra una relación entre la exposición a aflatoxinas y el retraso en el crecimiento es cada vez más fuerte, pues estudios en animales y estudios epidemiológicos respaldan esta asociación (Khlangwiset, 2011).

El metabolismo hepático fetal es muy diferente al metabolismo adulto debido a menor flujo sanguíneo e inmadurez en el desarrollo, lo que los hace más susceptibles a los efectos adversos producidos por xenobióticos. Así mismo, los pacientes pediátricos se encuentran en una etapa de rápido desarrollo y por consiguiente presentan también mayor susceptibilidad a la agresión por sustancias tóxicas, lo que evidencia la importancia de la exposición a aflatoxinas en estos periodos críticos. Estudios en niños han demostrado disminución en inmunoglobulinas en saliva tras la exposición a aflatoxinas, como la inmunoglobulina A secretora en saliva (slgA), la cual juega un importante papel en la defensa de primera línea en mucosas ante agentes patógenos antes de que estos ingresen al torrente sanguíneo. Se considera que la exposición temprana y repetitiva a aflatoxinas en útero puede predisponer a cáncer de hígado más adelante durante la vida y que la inmunosupresión causada por el consumo de AFs es un factor contribuyente. Las AFs pueden aumentar la susceptibilidad a presentar infecciones como neumonía y pueden también interferir con la eficacia de las inmunizaciones (Sherif et al., 2009). El consumo de aflatoxinas se ha identificado como un factor de riesgo para ictericia neonatal, especialmente en los casos de ictericia de causa desconocida. Como se ha mencionado anteriormente, existen estudios epidemiológicos que correlacionan la exposición a AFs con retraso en el crecimiento, en especial en niños menores de 5 años, en los cuales se observa relación dosis respuesta entre la dosis de AFs y el grado de retraso en el crecimiento y bajo peso. También existe una correlación negativa ($p < 0.0001$) entre marcadores biológicos como la concentración de AF-alb (aflatoxina unida a la albúmina en sangre) y el incremento ponderal tras 8 meses de seguimiento (Gong et al., 2004).

La enfermedad de Kwashiorkor se ha asociado con la presencia de AFs en la dieta según algunos estudios observacionales. Esto es debido a que la toxina interfiere en la síntesis de proteínas. Cuando se evalúan indicadores nutricionales en referencia a micronutrientes, se ha observado que las AFs modulan la vitamina A, produciendo deficiencia y en consecuencia mayor inmunosupresión, ya que la vitamina A está

implicada en el mantenimiento de la competencia del sistema inmune. Así mismo las concentraciones de Zink y selenio también se ven afectadas por estas toxinas.

La OMS priorizó unos problemas que impactan de forma negativa en la salud y en la carga de enfermedad en años de vida ajustados en función de la discapacidad (AVAD). Estos factores contribuyen con la carga de enfermedad en países en vías de desarrollo. Debido a los efectos inmunológicos y nutricionales de las aflatoxinas, 6 de estos 10 primeros problemas reconocidos por la OMS están influenciados por el consumo de aflatoxinas, lo que contribuiría con aproximadamente el 43.6% de los AVAD en estos países y evidencia la importancia de controlar estas toxinas (Williams et al., 2004).

Las aflatoxinas pueden inducir en el hígado lesiones idénticas a las observadas en los casos de cirrosis. En algunos niños la ingesta excesiva de cobre y el consumo de AFs actúan de forma sinérgica para producir enfermedad hepática. La encefalopatía hepática en pacientes con síndrome de Reye que fallecieron, también se ha asociado con concentraciones de AFs en muestras de hígado (Sherif et al., 2009).

En toxicología es cada vez más importante el concepto de epigenética, conocida como la nueva ciencia genética y que en consenso se define como los cambios colectivos heredables del fenotipo debido a un proceso que se sucede de forma independiente de la secuencia de ADN primaria, pero que varía la expresión de los genes (Tollefsbol, 2011). La información epigenética puede ser transmitida en organismos de una generación a otra ya que estos cambios permanecen estables durante la mitosis y en algunos casos meiosis. Cada vez hay más evidencia que demuestra que las alteraciones epigenéticas pueden alterar de forma importante la salud y que los mecanismos epigenéticos son particularmente relevantes en la respuesta a sustancias tóxicas cuando la exposición ocurre de forma temprana en la vida, como es el caso de la exposición a AFs en útero o mediante su consumo en la leche materna. Esto se debe a que el epigenoma (conjunto de marcas epigenéticas) a diferencia del genoma es más dinámico y desempeña un papel vital en el desarrollo embrionario, la diferenciación tisular y la aparición y desarrollo de enfermedad mediante el control de la expresión génica, es decir, la exposición temprana a sustancias tóxicas produce cambios epigenéticos irreversibles que causan enfermedad de forma posterior en la vida, ya sea durante la infancia o la adultez (Nye et al., 2014).

Los mecanismos epigenéticos más importantes de regulación de genes son tres: metilación del ADN, modificaciones de las histonas y silenciado de genes asociado al ARN. La metilación del ADN es uno de los mecanismos más estudiados por su importancia en carcinogénesis y hace referencia a la adición de un grupo metilo en la posición 5' de citosinas que preceden a guaninas en los dinucleótidos llamados CpG (citosina-fosfato-guanina), esta reacción es catalizada por las enzimas ADN-metiltransferasas (DNMTs) y depende de la concentración de S-adenosil-metionina (SAM), co-sustrato donador de grupos metilo en la célula. Este mecanismo de metilación hace parte de la función celular normal y tiene implicación en la regulación de la expresión génica. Existen regiones enriquecidas en CpGs que se denominan islas CpG en los promotores genéticos y pueden ser silenciadas por metilación aberrante del ADN. La consecuencia de esta metilación es la represión transcripcional y la detención de la expresión génica mediante la inhibición de unión de factores de transcripción y elementos accesorios, lo que lleva a la condensación de la cromatina. Estos patrones de metilación aberrante se han observado durante el desarrollo y la progresión del CHC en pacientes expuestos a AFB1. La metilación altera la expresión de genes en las células durante la diferenciación embrionaria de células pluripotenciales a células diferenciadas (Joh et al., 2014).

El otro mecanismo epigenético de regulación génica consiste en modificación de las histonas. Las modificaciones más comunes ocurren en el extremo N-terminal en aminoácidos específicos de las histonas e incluye reacciones de fosforilación, acetilación, metilación y ubiquitinación (adición de una o varias moléculas de ubiquitina, una proteína pequeña, de manera covalente a proteínas blanco en residuos de lisina). Algunas modificaciones postraduccionales están asociadas a la remodelación de la cromatina y otras están asociadas con la metilación del ADN en las islas CpG determinando la actividad/inactividad de la cromatina lo que lleva a inducción o represión genética. Este grupo de modificaciones se denomina código de histona y determina el nivel de expresión del gen silenciándolo o aumentando la expresión. Adicionalmente aumenta el potencial de la información genética y es un proceso de regulación importante en la remodelación de la cromatina, por lo que juega un papel importante en el destino celular. Sin embargo, este mecanismo dinámico de actividad de la cromatina puede ser alterado por estímulos externos como la exposición a AFB1 mediante la regulación de la

maquinaria epigenética para producir la expresión de genes y fenotipos patológicos que contribuyen con los proceso de carcinogénesis.

Finalmente, el silenciamiento génico mediado por el ARN. Es un mecanismo epigenético que de forma aislada o en conjunto con los otros mecanismos interviene en la propagación estable de los estados de actividad génica. Diferentes moléculas con función de silenciar genes han sido identificadas, especialmente en el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). Entre estas se encuentra un nucleótido pequeño (20-30 nucleótidos) denominado micro ARN de interferencia (miARNs), que regulan la expresión del gen blanco mediante unión al ARNm o por inhibición de la traslación. Se sabe que estas moléculas están involucradas en la regulación post-transcripcional de genes y contribuyen con varias funciones celulares como la proliferación, crecimiento, diferenciación, señalización celular y la respuesta inmune. Pueden intervenir en diferentes procesos patológicos y fisiológicos importantes y cambios en su expresión se han asociado con la aparición de enfermedad, más específicamente de cáncer y con alteraciones en la respuesta a medicamentos (Farazi et al., 2013). Dependiendo de sus genes blancos, los miARNs pueden funcionar como oncogenes o supresores tumorales. La AFB1 juega un papel significativo en el desarrollo de oncogenes. En el CHC varios miARNs causan expresión génica aberrante. Se ha reportado que el microRNA-17~92 cluster es un oncogen que promueve la formación de tumores, la angiogénesis, la invasión tumoral y metástasis en células tumorales específicas de CHC. Otro ejemplo es el miR-34 que regula la actividad y función del gen p53 actuando directamente sobre el gen o modulando la respuesta en las células. El punto caliente o "hot spot" de esta mutación se encuentra localizado en el codón 249 exón 7 del gen p53 y se considera la firma molecular de la exposición a aflatoxinas (Shen, 2012). En conclusión, la AFB1 y el AFBO causan muchos cambios genéticos y epigenéticos involucrados en la patogénesis molecular del CHC.

En el campo de la toxicología ambiental y de alimentos existe un creciente interés en entender como xenobióticos que se encuentran en el ambiente y en la dieta pueden interactuar con el genoma, modificando la expresión genética y alterando la composición de las proteínas y metabolitos en las células. Desde este punto de vista se ha demostrado que la alimentación materna durante la gestación y la lactancia puede

afectar el fenotipo del feto y el recién nacido por mecanismos epigenéticos, debido a que la dieta tiene una gran influencia en la reprogramación epigenética extensiva durante las etapas tempranas de desarrollo.

La exposición en pacientes pediátricos puede presentarse durante la gestación, a través de la leche materna o por el consumo de alimentación complementaria. Esta exposición es un proceso silente y persistente que sucede sin que pueda ser reconocido y que lleva consigo todos los riesgos y problemas de salud anteriormente mencionados, que en estas etapas de desarrollo tienen una importancia mucho mayor, ya que van a tener repercusiones a lo largo de la vida. En este sentido, las estrategias para prevenir la exposición a estas sustancias tóxicas en la población deben enfocarse también en la alimentación infantil y en la dieta de las mujeres en gestación y durante el periodo de lactancia. Adicionalmente, debido a los efectos adversos que causan estas toxinas en la salud se deriva la necesidad de hacer estudios de experimentación en animales y estudios observacionales y epidemiológicos en humanos.

2.3 Reglamentación

La seguridad alimentaria y la protección de la salud de enfermedades que pueden ser producidas por el consumo de alimentos, se ha convertido en un área de interés creciente para diferentes ramas de la ciencia y especialidades, debido a los retos que implica asegurar alimentos inocuos y de alta calidad para el consumo humano. Mientras en los países industrializados se ha desarrollado la infraestructura necesaria para monitorear estándares de calidad en los alimentos, las personas que viven en países en vías de desarrollo no se encuentran protegidas por este tipo de medidas ni por el cumplimiento de las medidas de seguridad alimentaria en su país. Esto implica además que los alimentos de alta calidad que se producen sean exportados a países con altos estándares en seguridad alimentaria, dejando para consumo local los alimentos que no cumplen con las exigencias del comercio internacional (Stoev, 2013)

Debido a la importancia de estas micotoxinas en salud pública, se han hechos esfuerzos para controlar la contaminación de alimentos y la exposición en seres humanos. Es por eso que en casi todos los países de mundo están reguladas y se han establecido niveles máximos permisibles en alimentos. A continuación se presentan los valores establecidos

en la reglamentación en Colombia (Tabla 2-1) y que se encuentran consignados en las normas técnicas colombianas (NTC).

Tabla 2-1. Tabla de niveles máximos permitidos de Aflatoxinas en alimento para consumo humano. Tomado (NTC 3581)

NORMA TECNICA COLOMBANA QUE TRATA DE ARMONIZAR VALORES FIJADOS				
NTC	Industrias alimentarias. Nivel máximo de aflatoxinas permitido en alimentos	El contenido máximo de aflatoxinas totales <i>(Total de aflatoxinas B1 +B2+ G1 + G2) en alimentos para consumo humano directo</i>	10 µg/kg (10 ppb)	} De acuerdo a la AOAC oficial method 977.16 sampling of aflatoxins
		El contenido máximo de aflatoxinas totales <i>(Total de aflatoxinas B1 +B2 + G1 + G2) en alimentos a granel NO destinados a consumo humano</i>	20 µg/kg (20 ppb)	
		El contenido máximo de <i>(Aflatoxina M1) en leche para consumo humano</i>	0.5 µg/kg (500 ppt)	

Adicionalmente, el 30 de octubre de 2013 el Ministerio de Salud y Protección Social aprobó la resolución 4506 en la que se establecen niveles máximos de contaminantes en los alimentos. En esta reglamentación se incluyen nitratos, micotoxinas y metales pesados entre otros. Dicha resolución también establece que la inspección, vigilancia y control de dichas medidas le corresponderá tanto al Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA- como a las Direcciones Territoriales de Salud.

3. Metodología

3.1 Tipo de Estudio

Estudio observacional descriptivo de corte transversal

3.2 Área de Conocimiento

Este estudio está enmarcado en el área de la toxicología de alimentos y en el área de salud pública.

3.3 Estructura General del Estudio

El objetivo del estudio fue cuantificar mediante cromatografía líquida de alta eficiencia los niveles de AFM1 en muestras de leche materna como biomarcador de exposición a AFB1 en madres lactantes y exposición a AFM1 en recién nacidos y lactantes. El estudio se desarrolló en dos fases, durante la primera se realizó la validación de la técnica analítica en el Laboratorio de Toxicología del edificio de postgrados de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia y durante la segunda fase se realizó la recolección y análisis de las muestras. Cuando se estaba realizando la validación de la técnica analítica se evidenció que el método podía detectar tanto AFM1 como AFM2, de tal forma que se realizó la validación para la detección de las dos toxinas en leche materna y se determinaron los niveles en las muestras recolectadas.

Las muestras fueron obtenidas del lactario del Hospital de la Misericordia de la ciudad de Bogotá, hospital que tenía convenio asistencial con la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Se seleccionaron las mujeres que cumplían los criterios de inclusión al momento de tomar la muestra de leche materna según los protocolos adoptados. Se aplicó un cuestionario que incluía preguntas sobre la ingesta diaria de alimentos potencialmente contaminados con aflatoxinas según la revisión de la literatura y otras preguntas de identificación y antecedentes médicos de las madres y de los recién nacidos y lactantes. No se realizó seguimiento posterior de los individuos.

Las muestras de leche fueron llevadas al laboratorio de toxicología para análisis y cuantificación de los niveles de AFM1, y posteriormente se realizó la estadística descriptiva de los datos.

3.3.1 Población

Mujeres que asistían a los lactarios de las instituciones de salud participantes en el estudio, que en el momento se encontraban lactando y que cumplían con los criterios de inclusión.

3.3.2 Criterios de Inclusión

- Manifestar expresamente el deseo de participar voluntariamente en el estudio, mediante la firma del consentimiento informado.
- Mujeres que se encuentren en las instituciones de salud parte del estudio, que estén lactando y estén en condiciones de proporcionar una muestra de 100 cc de leche materna.

3.3.3 Criterios de Exclusión

- Presentar condiciones que le impidan comprender, hacerse comprender o sostener adecuadamente una comunicación verbal con otros individuos.
- Presentar algún tipo de enfermedad en la glándula mamaria que pueda contaminar la muestra recolectada.
- Madres con diagnóstico clínico de hepatitis o infección por VIH.

3.3.4 Fuentes de Información de los Individuos

La información fue obtenida de manera directa por el investigador mediante la realización de una entrevista a la madre antes de la toma de la muestra. La información obtenida fue consignada en un cuestionario diseñado para tal fin (ANEXO A).

El investigador debía estar familiarizado con los beneficios de la lactancia materna (ANEXO B) como política de los lactarios del hospital y conocer a profundidad los objetivos y procedimientos del estudio.

3.3.5 Estrategias de Muestreo y Manejo de las Muestras

A las participantes en el estudio se les brindó una explicación completa y pertinente sobre la investigación y les fueron explicados los procedimientos del estudio, en especial el derecho a retirarse sin perjuicio alguno. Posteriormente se les solicitó que otorgaran por escrito su aprobación para ser parte del estudio, mediante la firma del consentimiento informado (ANEXO C). Hecho esto, se procedió a tomar la muestra (100 ml). Se recolectaron las muestras de las mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión y que aceptaron participar en el estudio hasta completar el número requerido de muestras a través de un muestreo consecutivo por conveniencia.

La técnica utilizada para la toma de muestra se realizó según el protocolo establecido por la OMS (ANEXO D). La extracción fue preferiblemente manual o con la ayuda de un saca leche después de una toma, para aprovechar el reflejo de salida de la leche de la madre. La muestra fue recolectada en una bolsa recolectora estéril destinada para tal fin. En la etiqueta de la bolsa se escribió el código único de identificación.

Las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio en una nevera portátil que contenía hielo seco, esta estaba debidamente marcada y en la etiqueta estaba especificado el contenido "Leche Materna". Las muestras fueron almacenadas en el refrigerador, a aproximadamente 4°C, durante 72 horas como máximo, o en el congelador, a -20 °C, si se requería por periodos más prolongados hasta el análisis. Una vez procesadas, las muestras fueron almacenadas por un periodo indefinido a -70°C (Lovelady et al., 2002).

3.3.6 Tamaño de la Muestra

Según el protocolo establecido por la OMS para el análisis de compuestos orgánicos persistentes COPs en leche materna, se considera y establece como muestra significativa para un país con una población igual o menor a 50 millones de habitantes un $n=50$ (OMS, 2007)

3.3.7 Recolección de Datos

Se realizó mediante un modelo de cuestionario para recoger la información relevante para el estudio tanto de la madre como del lactante. En cuanto a la madre se interrogaron algunos datos demográficos y socioeconómicos como lugar de residencia, edad, estrato y nivel educativo, información sobre la historia clínica prenatal, antecedentes ginecológicos que se consideraron relevantes, historia de lactancia y finalmente una anamnesis alimentaria. Sobre el bebe se indagó el estado general de salud, género, edad y peso (ANEXO D).

Antes de iniciar la recolección de las muestras se realizó una prueba piloto para evaluar la efectividad del cuestionario, para esto el investigador principal realizó una entrevista a 30 madres asistentes al lactario que aceptaron responder las preguntas y posteriormente se realizaron los ajustes y modificaciones necesarias. Una vez terminada esta prueba se inició la recolección de datos para el estudio.

3.3.8 Definición Operacional de las Variables

Variables de Persona Madre:

- Niveles de Aflatoxina M1 en leche materna variable cuantitativa continua.
- Edad. Variable cuantitativa medida en años cumplidos.
- Estrato. Variable cualitativa ordinal.
- Nivel de escolaridad. Variable cualitativa ordinal.
- Paridad. Variable cuantitativa discreta.
- Ingesta diaria de alimentos posiblemente contaminados con AFs. Variable cuantitativa discreta numérica medida como raciones consumidas por día.

Variables de Persona Recién Nacido:

- Edad. Variable cuantitativa, medida días de nacido.
- Peso. Variable cuantitativa medida en gramos.
- Género. Variable cualitativa dicotómica.

Variables de Tiempo:

- El estudio se realizará en un periodo de 12 meses.

VARIABLES DE LUGAR:

- Lactario del Hospital de la Misericordia de Bogotá, institución que aceptó participar en el estudio.
- Localidad. Variable cualitativa nominal.
- Área de procedencia. Variable cualitativa dicotómica (rural-urbana).

3.3.9 Técnicas de Investigación y Criterios de Análisis

3.3.9.1 Aplicación del Cuestionario

Se realizó un interrogatorio directo a las mujeres participantes en el estudio, sobre los hábitos alimenticios con especial énfasis en el consumo de alimentos susceptibles de sufrir contaminación por aflatoxinas como maíz y sus derivados, productos derivados del trigo, frutos oleaginosos, arroz y otros cereales, legumbres y frutas secas. Se indagó por el consumo de alimentos en los tres días antes a la recolección de la muestra teniendo en consideración el tiempo de eliminación de la AFM1 en leche.

Se les preguntó a las madres por el consumo de alimentos de interés, estos fueron expresados en raciones por día.

3.3.9.2 Determinación de AFM1 y AFM2 por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

Para la determinación de la AFM1 y la AFM2 se utilizaron los siguientes reactivos:

Estándar de AFM1 y AFM2 de 2000 ng/ml en acetonitrilo de Micotox Ltda. (Bogotá, Colombia).

Columnas de inmunoafinidad que contienen anticuerpos que reaccionan con la AFM1 y la AFM2 de Neogen Europe Ltda. (Ayr, Scotland).

Acetonitrilo y metanol grado HPLC de Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Agua tipo 1 obtenida de un sistema Millipore Milli-Q system (EMD Millipore, Billerica, MA, USA).



Imagen 3-1. Columnas de Inmunoafinidad. Fuente: el autor.

El método utilizado para la determinación de AFM1 y AFM2 en el presente estudio está basado en un método estandarizado internacionalmente para leche de vaca y por consiguiente se realizó una validación intralaboratorio para leche materna (ISO 14501, 1998).

Una vez las muestras fueron llevadas al laboratorio, se analizaron para determinar la presencia de AFM1 y AFM2 mediante lavado en columna de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a un detector de fluorescencia de la siguiente manera:

La muestra de leche materna (100ml) se calienta hasta lograr una temperatura de 37°C y se homogeniza suavemente con un agitador magnético para dispersar los glóbulos de grasa.

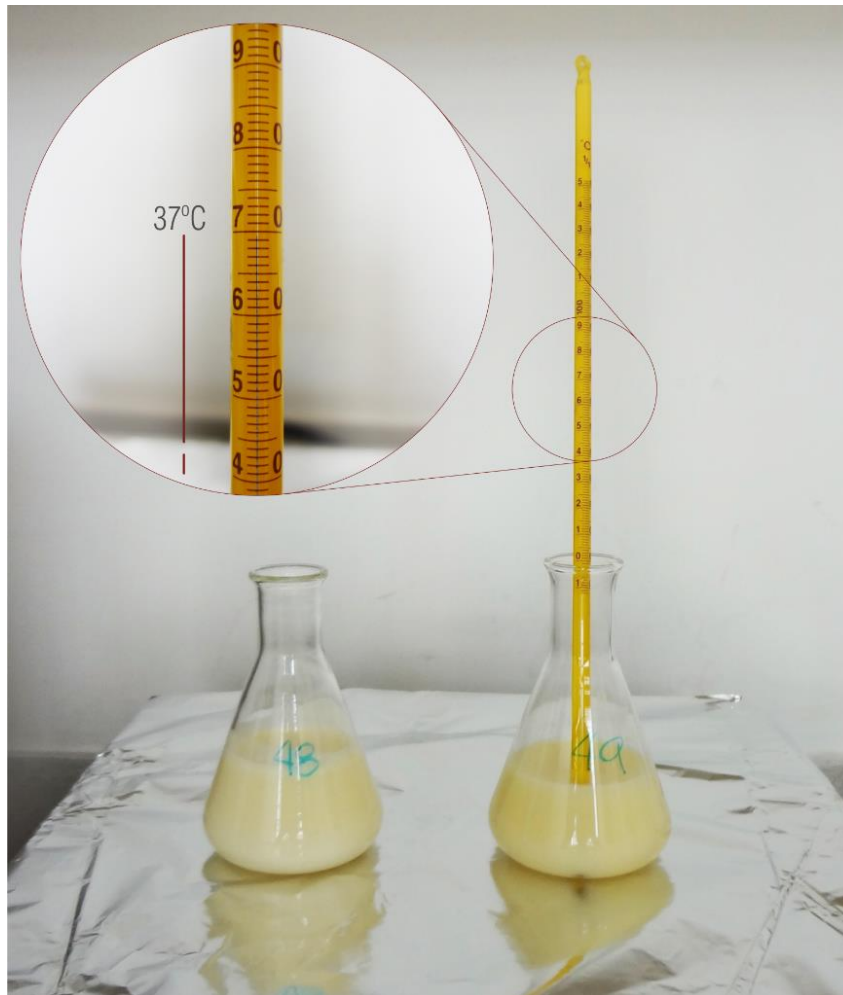


Imagen 3-2. Calentamiento de las muestras. Fuente autor.

Las muestras se pasan a tubos fálcon midiendo 45 ml en cada tubo y se procede a centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos para separar la grasa. Se elimina la capa superior delgada de grasa y luego se filtra la muestra a través de un papel de filtro cualitativo utilizando un embudo. Debe recolectarse una alícuota de 50 ml de filtrado por cada muestra.



Imagen 3-3. Procedimiento de filtrado

Ahora se procede a la preparación de la columna de inmunoafinidad que contiene anticuerpos monoclonales contra la AFM1 y AFM2. Es necesario que la columna esté a temperatura ambiente antes de usarse, ya que estas se almacenan refrigeradas. Se verifica que la columna no se haya secado y que se observa la solución tampón por encima del gel, luego se remueve el extremo inferior de la columna y se acopla al equipo de vacío, se verifica que la llave de paso esté cerrada para evitar pérdida de la solución tampón. Se remueve el extremo superior de la columna y se inserta firmemente una jeringa de plástico de 50 ml que va a servir como reservorio para la muestra.



Imagen 3-4. Preparación de la columna de inmunoafinidad

Se procede a pasar la muestra por la columna de inmunoafinidad a una velocidad constante de 2 a 3 ml/min hasta que finalice toda la muestra. Posteriormente viene la fase de lavado, cuyo objetivo es eliminar cualquier residuo que pueda estar presente en la columna antes de la fase de elusión de la toxina. Para esto se realiza un lavado con dos volúmenes de 10 ml de agua destilada, que deben ser pasados a través de la columna a una velocidad constante de 5 ml/min. Finalmente, antes de la fase de elusión debe dejarse secar el gel y se deben retirar los residuos de agua de las paredes de la columna de inmunoafinidad, para esto puede utilizarse una corriente de aire suave.

Para realizar la elusión y lograr de separación de las toxinas de los anticuerpos en la columna se utilizan 1,25 ml de metanol-acetonitrilo (2:3; v/v) a razón de una gota cada 2 a 3 segundos, seguido de 1,25 ml de agua tipo 1 que se recuperan en un vial de 4 ml. Para asegurar una elusión completa de la toxina, la solución orgánica debe estar en contacto con el gel de la columna de inmunoafinidad por al menos 30 segundos, esto se puede lograr reversando la dirección del flujo con ayuda de una jeringa, siempre y cuando se evite la formación de burbujas.

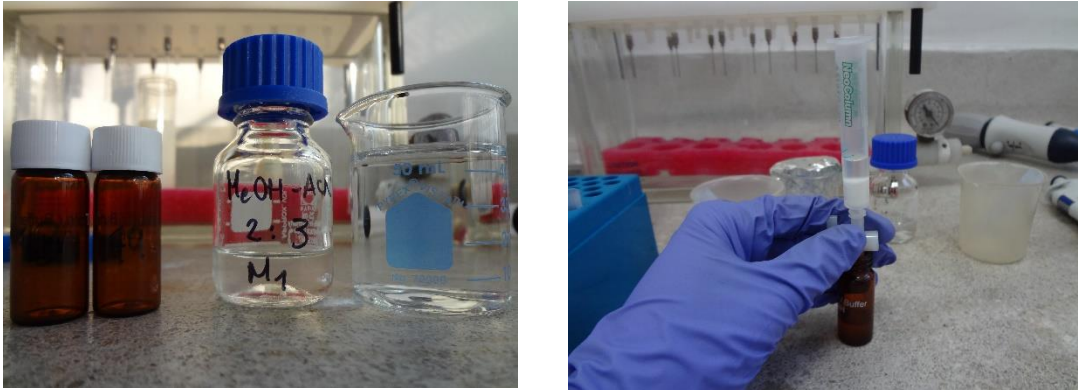


Imagen 3-5. Elusión de la AFM1 y AFM2

La solución obtenida se agita en vortex y se pasa 1 ml a través de un filtro millipore en un vial ámbar silanizado de 1,5 ml para evitar pérdida del analito, ya que la aflatoxina puede adherirse al vidrio del vial. Se procede a la determinación de las AFs por cromatografía líquida de alta eficiencia (Figura 3-1).

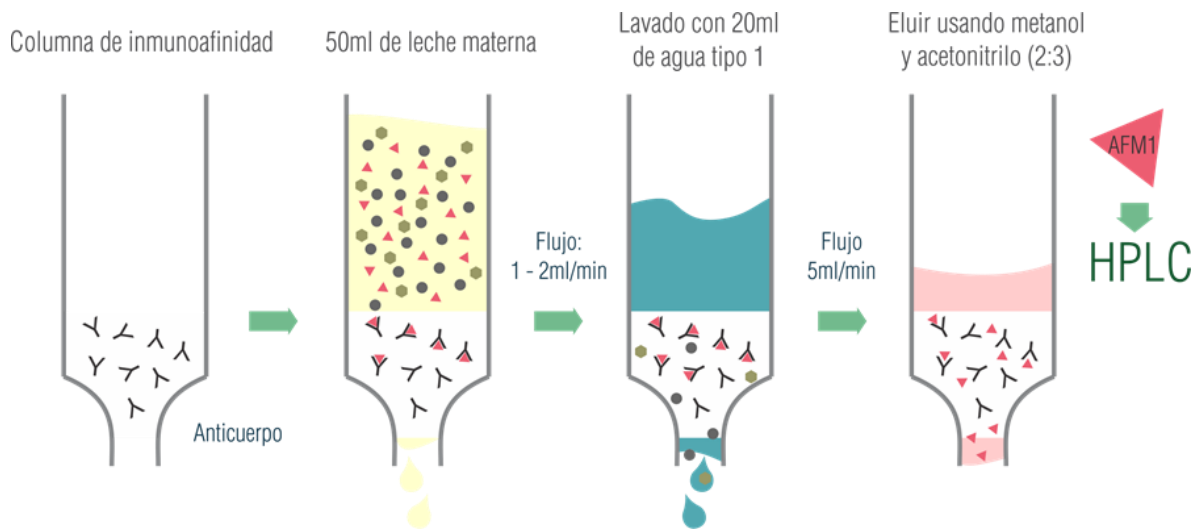


Figura 3-1. Determinación de AFM1 y AFM2 utilizando una columna de inmunoadinidad. Fuente autor.

La cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, se llevó a cabo en un cromatógrafo Shimadzu Prominence sistema HPLC que consta de una unidad de desgasificación DGU-20A3, una bomba dual LC-20AB, un dispositivo de inyección SIL-20AHT, un

detector de fluorescencia RF-20Axs, una columna CTO-20A y un módulo “bus” de comunicaciones CBM-20A, todos controlados por el software Lab Solution.



Imagen 3-6. Cromatógrafo Shimadzu Prominence sistema HPLC

La fase móvil empleada es una mezcla socrática de agua:acetonitrilo:metanol (50:30:20; v:v:v) previamente desgasificada a un flujo de 0,6 ml/min. Se utilizó una columna Phenomenex Prodigy ODS3 of 250 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 μ m (Phenomenex Inc. Torrance, CA, USA) que se mantenía a una temperatura de 30°C.

El detector de fluorescencia se programó a una longitud de onda de excitación de 346 nm y a una longitud de onda de emisión de 430 nm que fueron determinadas después de realizar tres espectros (ANEXO G). Los metabolitos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención y co-inyección de estándares, se utilizó un estándar AFM1-AFM2 a una concentración de 200 ng/l.

A continuación se presenta una tabla en la que se resumen los pasos del método analítico empleado en la determinación de las concentraciones de aflatoxina en las muestras:

Tabla 3-1. Resumen del método analítico para determinación de AFM1 y AFM2 en muestras de leche materna

	PASO EN LA MARCHA ANALÍTICA	OBJETIVO
1	Calentar 100 ml de leche a 37°C	Disolver los glóbulos grasos
2	Agitar suavemente mediante agitación magnética	Dispersar los glóbulos grasos
3	Centrifugar a 4,000 g durante 15 minutos	Separar la grasa de la fase acuosa
4	Filtrar a través de papel cualitativo y coleccionar exactamente 50 ml de filtrado	Separar la grasa de la fase acuosa
5	Pasar los 50 ml de filtrado a través de una columna de inmunoafinidad NeoColumn Aflatoxin®	Concentrar el analito
6	Lavar la columna con dos volúmenes sucesivos de 10 ml de agua destilada	Remover impurezas
7	Eluir la columna con 1.25 ml de acetonitrilo: metanol (3:2), seguidos de 1.25 de agua destilada en un vial ámbar salinizado de 4 ml	Recuperar el analito concentrado
8	Inyectar 10 µl en el cromatógrafo de líquidos	Identificar y cuantificar el analito

3.3.9.1 Análisis Estadístico

La variable respuesta consistió en el nivel de AFM1 (ng/l) en leche materna, para cada madre lactante, y esta variable se considera continua.

Los factores sociodemográficos correspondieron a la edad de la madre (años), el peso del recién nacido o lactante (gramos) y la edad (días) al momento de la toma de muestra de leche materna.

Los factores categóricos sociodemográficos para cada madre lactante fueron: el estrato socioeconómico, el número de hijos, el nivel de escolaridad, el área de residencia, la relación de la madre con el Distrito Capital de Bogotá, el número de controles prenatales,

los antecedentes patológicos de la madre, si el embarazo fue normal, las patologías presentadas durante el embarazo, el tipo de parto, y el género de los hijos de las madres lactantes.

Los factores categóricos de alimentación, en los tres días anteriores a la toma de muestra de leche materna fueron, el número de raciones consumidas de: almendras, arepa de maíz, arepa de trigo, arroz, avena, cebada, centeno, cereales al desayuno, maíz, maní, nueces, pan, pasta y tortilla de maíz.

Se elaboró la estadística descriptiva univariada (promedio, mediana, desviación estándar, error estándar, mínimo, máximo, rango) para los factores sociodemográficos, y tablas de frecuencias absolutas y relativas para los factores categóricos sociodemográficos y de alimentación.

Los análisis se elaboraron utilizando el software R, versión 3.0.2 (R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [URL http://www.R-project.org/](http://www.R-project.org/)).

3.4 Consideraciones Éticas

De acuerdo con lo establecido en la Resolución N°008430 del 4 de Octubre de 1993 emitida por el Ministerio de Salud, se considera que el presente proyecto de investigación contribuye a la generación de conocimiento útil para la prevención y control de los efectos adversos sobre la salud, ya que se está investigando un problema de salud pública como es la exposición a aflatoxinas, que son sustancias altamente tóxicas.

Se espera que los resultados de este estudio fortalezcan la base empírica para la evaluación del riesgo sanitario de las personas, y promuevan medidas de protección ambiental y otras destinadas a reducir las concentraciones de estas sustancias en la leche materna.

El investigador encargado de la recolección de información y de la toma de muestras fue un profesional entrenado y capacitado, con conocimiento y experiencia en el ámbito médico. Este proporcionó información sobre las características y los objetivos del estudio a las donantes.

Se protegió la privacidad de todos los individuos que hagan parte del estudio y la información personal recolectada fue considerada como confidencial.

Esta fue una investigación con riesgo mínimo y los individuos participantes en el estudio no sufrieron daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio.

Todos los participantes en la investigación firmaron el consentimiento informado (elaborado de acuerdo a lo establecido en la Resolución 008430 de 1993), que fue explicado claramente antes de proceder a su firma. Mediante este, autorizan su participación en el estudio (ANEXO C). En el caso de los individuos menores de edad, se obtuvo el consentimiento informado de quien ejercía la patria potestad o la representación legal del menor.

La presente investigación no representó riesgos para las mujeres lactantes, así como tampoco para el lactante. En ningún momento la recolección de muestras constituyó una carga excesiva para la madre ni puso en riesgo el estado nutricional del lactante.

La toma, transporte y manipulación de las muestras se realizó de acuerdo a lo establecido en los protocolos internacionales existentes para el caso (Lovelady et al., 2002). En todo momento se acogieron las normas de buenas prácticas de laboratorio y se siguieron las medidas de bioseguridad que fueron pertinentes para este tipo de investigación.

Todas las personas que participaron en el estudio, y especialmente las que estuvieron en contacto directo con posibles donantes, estuvieron bien informadas sobre los beneficios de la lactancia materna para la salud del lactante y también de la madre. El Anexo B contiene información general sobre por qué es importante la lactancia materna, y fue leído por todas las personas que intervinieron en el estudio.

El presente proyecto fue sometido a evaluación por parte del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, así como el de la Institución de Salud en la que se realizó la investigación (ANEXO E).

3.5 Propiedad Intelectual

El presente trabajo de investigación respeta el derecho de reserva de propiedad intelectual de la investigación y se acoge a todas las normas consagradas en el Reglamento sobre Propiedad Intelectual de la Universidad Nacional de Colombia, contenido en el acuerdo 035 del 2003 (Acta 8 del 3 de diciembre) del Consejo Académico.

Yo, Marlib Paloma Sánchez Torres, como autor de la Tesis de Maestría titulada, Determinación de niveles de aflatoxina M1 en leche materna: estudio observacional descriptivo en muestras recolectas en un hospital pediátrico de referencia de la ciudad de Bogotá, durante el año 2013 y contenida en este documento, reconozco que recibí apoyo económico de la Vicedecanatura de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional sede Bogotá por ocho millones de pesos moneda corriente (\$8.000.000), en convocatoria para estímulo a la investigación a través de proyectos y trabajos de investigación en los posgrados de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, 2012.

Conté con la dirección del Dr. Gonzalo Diaz, profesor titular de la Universidad de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de sede de la Universidad Nacional, quien me asesoró durante mi trabajo en el Laboratorio de Toxicología, especialmente con el uso de los equipos para la realización de la determinación de AFM1 en las muestras de leche, dirigió la validación del método analítico y me aportó su conocimientos y experiencia durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

Conté con la codirección de la Dra. Myriam del Carmen Gutiérrez egresada de la Maestría en toxicología de la Universidad Nacional y docente pensionada de la Facultad de Medicina, quien me brindo apoyo intelectual para el desarrollo del presente proyecto. La mayoría del trabajo es información sobre los resultados del estudio, la cual debe ser compartida con la comunidad académica y científica.

Este manifiesto está basado en la ley 23 de 1982 de derecho de autor de la República de Colombia, la declaración 351 de la comunidad Andina de Naciones y el reglamento de propiedad intelectual de la Universidad Nacional de Colombia, acuerdo 035 de 2003.

4. Validación del Método Analítico

Para la determinación de la AFM1 y la AFM2 se empleó el método estandarizado internacionalmente ISO 14501 para determinación de AFM1 por limpieza con columna de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta eficiencia en leche y polvo de leche; sin embargo, este método utiliza como matriz leche de vaca, por lo que fue necesario realizar una validación intralaboratorio de la metodología analítica para leche materna.

El primer paso fue la elaboración de un plan de validación (ANEXO F) que contiene los parámetros de la validación requeridos y el diseño experimental. La validación fue realizada utilizando muestras de leche materna de donantes, las cuales no tenían niveles detectables de AM1 o AFM2.

4.1 Principio

La aflatoxina es extraída a través del paso de la muestra por una columna de inmunoafinidad, la columna contiene anticuerpos específicos que se encuentran unidos a un material de soporte sólido. A medida que la muestra pasa a través de la columna, los anticuerpos se unen selectivamente con toda la aflatoxina (antígeno) presente en la muestra formando un complejo antígeno-anticuerpo. Todos los otros componentes de la matriz de la muestra se lavan de la columna con agua. La cantidad aflatoxina presente en el eluato se determina por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a detección fluorimétrica.

4.2 Columna de Inmunoafinidad

La columna debe contener anticuerpos contra la AFM1 y la AFM2. La columna debe tener una capacidad máxima de no menos de 100 ng de aflatoxina M1 (lo que corresponde a 2µg/l cuando se aplica un volumen de muestra de 50 ml) y dará una recuperación de no menos del 80% para la AFM1 y la AFM2 cuando se utiliza una solución estándar que contiene 4 ng de la aflatoxina (lo que corresponde a 80 ng/l cuando se aplica un volumen de muestra de 50 ml). Cualquier columna de inmunoafinidad que cumpla las especificaciones de rendimiento mencionados

anteriormente se puede utilizar. El rendimiento de las columnas será verificada periódicamente, y al menos una vez por cada lote de columnas.

4.3 Parámetros de la Validación

Debido a los requerimientos del método analítico, antes de iniciar la validación fue necesario establecer el porcentaje de grasa en la leche materna, ya que es muy importante eliminar en la mayor medida posible la grasa de la leche antes de pasar la muestra por la columna de inmovilización, para esto se empleó el método Gerber o método ISO 2446.

El método Gerber consiste en separar la grasa de la leche mediante la aplicación de ácido sulfúrico y alcohol amílico. Los glóbulos de grasa se encuentran en un estado emulsionado permanente con el líquido lácteo, esto sucede gracias a la membrana fosfolipídica del glóbulo de grasa, el ácido sulfúrico a una concentración alta oxida e hidroliza los componentes orgánicos de la membrana, que en conjunto con el alcohol amílico (2-metilbutanol) facilitan la separación de la grasa de la solución ácida. Posteriormente, mediante centrifugación la grasa se separa dentro de un butirómetro de dimensiones estandarizadas en el cual se lee directamente el contenido de grasa expresado en g/100g de muestra.

El procedimiento consiste en agregar 10 ml de ácido sulfúrico con una densidad de $1,816 \pm 0,003$ g/ml al 90-91% en el butirómetro, luego se añaden 10,75 ml de leche y finalmente 1 ml de alcohol amílico con una densidad de $0,811 \pm 0,002$ g/ml. Hay que hacer énfasis en que el cuello del butirómetro no se humedezca y que la leche y el ácido no se mezclen. Se cierra el butirómetro y se centrifuga por 15 min a 65°C .

Después de realizar este procedimiento se obtuvo que en promedio la leche materna tiene un porcentaje de grasa de 3,4% por lo que se considera una matriz apta para determinación mediante columna de inmovilización y cromatografía líquida.

4.3.1 Especificidad y Selectividad

La selectividad y la especificidad son las medidas de la confiabilidad del resultado en presencia de interferencias. La especificidad es la habilidad de un método de responder de manera exclusiva al analito de interés y no responder a impurezas, productos de degradación y otros componentes de la matriz, en el caso de la leche materna esto es muy importante debido a que se trata de una matriz compleja con gran cantidad de elementos esenciales en la nutrición infantil como proteínas, inmunoglobulinas, carbohidratos y lípidos. La selectividad del método demuestra que este puede ser usado para cuantificar el analito sin interferencias. Es indispensable demostrar que la señal producida durante el proceso de medición del analito corresponde solamente al analito y no se debe a la presencia de algún compuesto física o químicamente similar o simplemente a una coincidencia. Esto se denomina confirmación de la identidad. La presencia o no de compuestos interferentes depende de la efectividad del proceso de purificación. En este caso para determinar la selectividad se utilizaron extractos de leche materna libres del analito y se verificó que no existía señal en el tiempo de retención del analito de interés ni en un tiempo cercano. A continuación se muestra la imagen de un cromatograma en el cual no hay señal en el tiempo de retención de los analitos de interés.

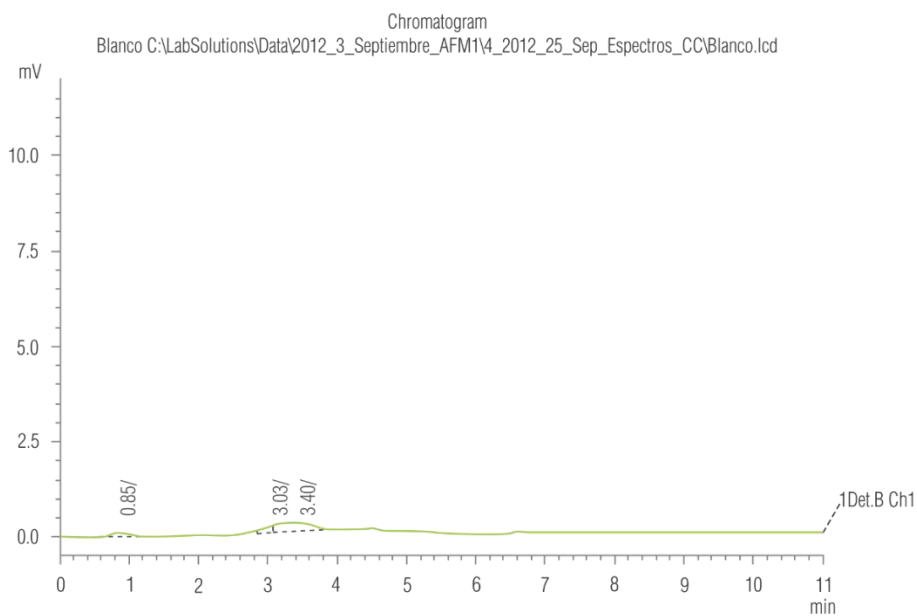


Figura 4-1. Muestra de leche materna sin valores detectables de aflatoxina

A continuación se realizó el enriquecimiento de la muestra con AFM1 a una concentración 200 ng/l, esto se comparó un estándar de AFM1 para verificar que no hay interferencias que eluyan en los tiempos de retención de interés. De esta manera se considera que el método es selectivo.

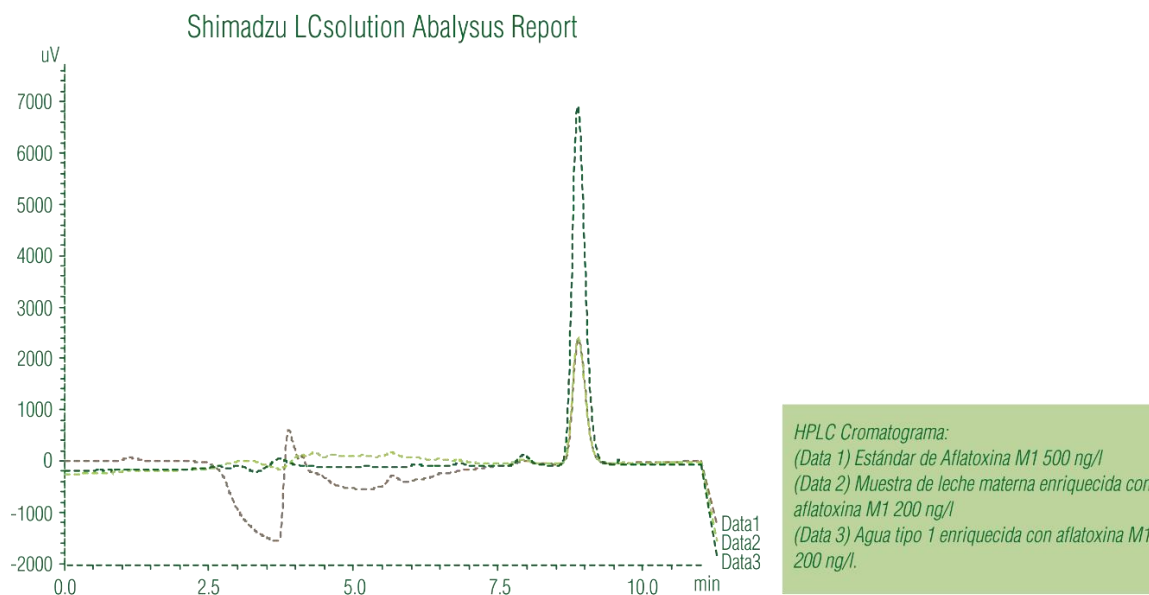


Figura 4-2. Selectividad del método analítico

4.3.2 Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Quando se realizan mediciones del analito a niveles muy bajos como en el caso de análisis de residuos, es importante conocer la concentración mínima o propiedad del analito que puede detectarse de manera confiable. El LOD corresponde a la menor cantidad de analito cuya señal puede demostrarse que es significativamente mayor a la medición del error aleatorio del blanco a un nivel determinado de confianza (generalmente 95-99%). Usualmente se asume el LOD como el valor blanco (o del ruido) más tres veces la desviación estándar ($LOD = \text{señal blanco} + 3\sigma$). Cuando se utiliza este parámetro como LOD el riesgo de un error tipo I (falso positivo) es del 0,13% mientras que el riesgo de un error tipo II (falso negativo) es del 50%. Es por esta razón que en la

determinación del LOD se realizó según el método establecido por la EPA 40 CFR part 136, apéndice B.

En este documento el límite de detección del método se define como la concentración mínima de una sustancia que puede ser medida y que permite reportar con un nivel de confianza del 99% ($\alpha=0,01$) que la concentración del analito es mayor a cero. Se determina mediante el análisis de una muestra en una matriz determinada que contiene el analito. El procedimiento empleado para calcular el LOD empleado en esta validación fue el siguiente:

- Se obtuvieron varias réplicas de datos de la muestra empleando el método a evaluar (8 mediciones con una concentración de 2 a 5 veces el ruido) para estimar la variabilidad de la medición a niveles bajos del analito y se calcula la desviación estándar, s .

- Se usó la distribución de t de Student y los valores críticos de t para el nivel de confianza específico y el número apropiado de grados de libertad:

$$\text{LOD} = t(n-1, 1-\alpha) \times s$$

- Al determinarse $n=8$ réplicas, los grados de libertad $df=7$ ($n-1$ grados de libertad) El nivel de confianza estipulado en la definición de la EPA es del 99%. Si $\alpha=0,01$, entonces $1-0,99=0,01$, es decir, existe un 1% de probabilidad de cometer un error de decisión tipo I (falso positivo)
- El valor crítico de t para 7 grados de libertad a un nivel de confianza del 99% (“one tailed test”) es de 2,998 (aproximadamente 3), por lo tanto se requiere una respuesta promedio del analito de 3 veces el valor de la desviación estándar sobre el valor de la señal del blanco antes de poder afirmar que el analito fue detectado. Se obtuvo que el LOD para la AFM1 fue de 0,62 ng/l y de 0,42 ng/l para la AFM2.
- El LOQ es la menor cantidad de analito en una muestra analítica que puede determinarse cuantitativamente con adecuada exactitud y precisión bajo condiciones experimentales predeterminadas. Generalmente se asume el LOQ

como el valor del blanco (o del ruido) mas 10 veces la desviación estándar (LOQ= señal blanco + 10σ). En este caso el LOQ fue de 2 ng/l para la AFM1 y de 1,4 ng/l para la AFM2.

Tabla 4-1. Determinación de LOD AFM1 y AFM2

Observación	AFLATOXINA M1		AFLATOXINA M2	
	Área	Concentración (ng/l)	Área	Concentración (ng/l)
1	215	0,83	237	1,06
2	352	1,36	259	1,16
3	227	0,88	228	1,02
4	301	1,17	239	1,07
5	247	0,96	220	0,99
6	296	1,15	205	0,92
7	227	0,88	238	1,07
8	198	0,77	157	0,70
	S.D. (s)	0,21		0,14
	MDL	0,62		0,42

4.3.3 Rango de trabajo y rango lineal

Para cualquier método cuantitativo es indispensable determinar el rango de concentración del analito para el cual el método puede ser aplicado. Este rango hace referencia a las concentraciones o propiedades del analito que son medidas, no a las concentraciones en la muestra original. En el nivel inferior del rango de concentración los factores limitantes corresponden a los límites de detección/cuantificación. El extremo superior dependerá de factores asociados al sistema de respuesta del instrumento.

Dentro del rango de trabajo debe existir un rango lineal de respuesta. En este rango la respuesta tiene una relación lineal con respecto a la concentración del analito. La magnitud de este rango lineal puede establecerse durante la evaluación del rango de

trabajo. Es importante aclarar que el cálculo de la regresión lineal no es suficiente para establecer linealidad. La determinación y evaluación de residuales o el análisis de los factores de respuesta pueden usarse como parámetros objetivos de linealidad.

Para determinar el rango de trabajo deben medirse la respuesta (eje y) versus la concentración del analito (eje x) de diferentes concentraciones (blancos fortificados) y examinar visualmente la curva para identificar aproximadamente el rango lineal y los límites inferior y superior del rango de trabajo. El rango lineal se establece utilizando mínimo 6 concentraciones diferentes (blancos fortificados) y evaluando posteriormente los residuales o los factores de respuesta. La manera de establecer linealidad utilizando los factores de respuesta se describe a continuación. El factor de respuesta (FR) corresponde a la siguiente relación:

$$\text{FR} = \text{respuesta (señal)} / \text{concentración}$$

Una vez determinada la respuesta a diferentes concentraciones se calcula la pendiente, intercepto y R² de la curva, los factores de respuesta promedio y su correspondiente desviación estándar y coeficiente de variación. Si el sistema es lineal, el C.V debe ser cercano a 0%. El criterio de aceptación de linealidad de la curva de calibración corresponde a un C.V (RSD) <10%.

Las curvas de calibración para la AFM1 y la AFM2 se realizaron utilizando 5 niveles de concentración equivalentes a 12,5 25, 50, 100 y 200 ng/l, se prepararon tres réplicas independientes para cada nivel. La curva de calibración para la AFM1 presentó una ecuación lineal de $y = 242,95x + 168,67$ y un coeficiente de correlación de 1, la curva de calibración de la AFM2 evidenció también una ecuación lineal de $y = 243,55x + 39,75$ y un coeficiente de correlación de 1. El método fue lineal en los 5 puntos evaluados.

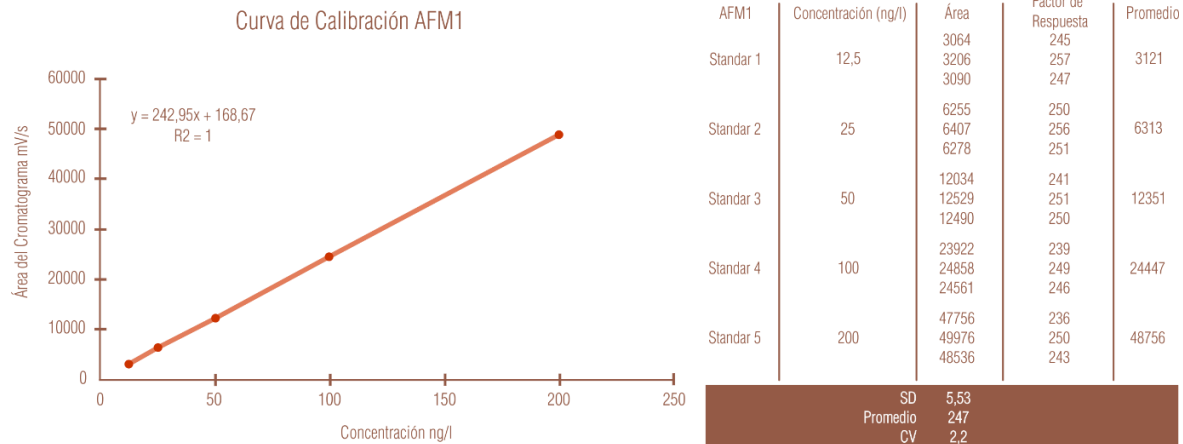


Figura 4-3. Curva de calibración AFM1

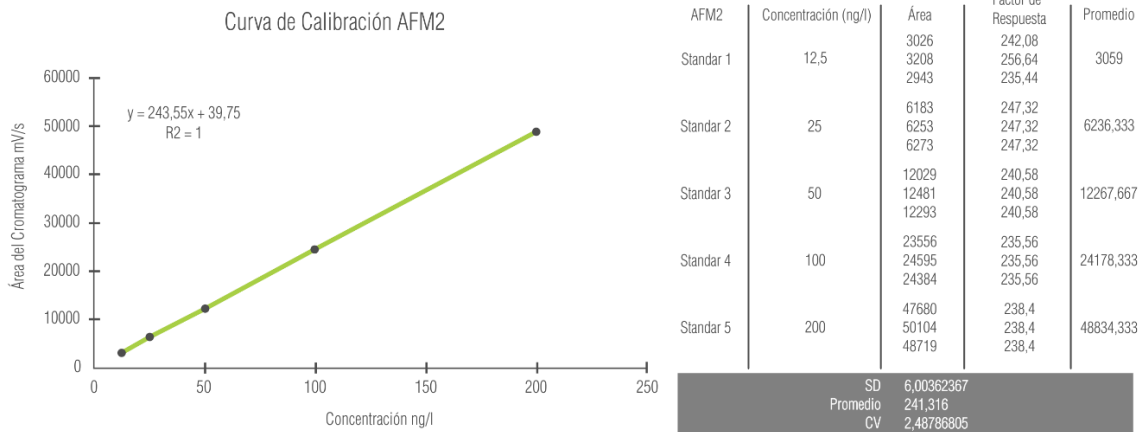


Figura 4-4. Curva de calibración AFM2

4.3.4 Sensibilidad

La sensibilidad del método corresponde a la pendiente de la curva de calibración (gradiente de la curva de respuesta), es decir, al cambio en la respuesta del instrumento correspondiente a un cambio en la concentración del analito. De acuerdo con la IUPAC la sensibilidad es igual a la pendiente de la curva de concentración de interés (o sea igual al factor de respuesta; factor de respuesta = respuesta/concentración)

4.3.5 Exactitud

La Exactitud expresa el grado de aproximación de un resultado al valor real (ISO 3534-1). La exactitud generalmente se evalúa por sus dos componentes: fidelidad y precisión. La fidelidad indica que tan cercano está el valor promedio de un grupo de datos obtenidos con el método al valor real. La fidelidad normalmente se expresa en términos de desviación o sesgo con respecto al valor esperado. La precisión es una medida del grado de proximidad de un resultado con respecto al otro y usualmente se expresa por parámetros como la desviación estándar, el cual describe el grado de dispersión de los resultados.

La exactitud fue evaluada enriqueciendo tres muestras con una concentración de 25, 50 y 100 ng/l por triplicado. El porcentaje de recuperación fue de 92,3% para la AFM1 y de 90,2% para la AFM2.

Tabla 4-2. Exactitud de la AFM1 y la AFM2

Concentración ng/L	M2	M1	CONCENTRACIÓN A PARTIR DE LA CURVA		AFM2		AFM1	
	Área AFM2	Área AFM1	AFM2	AFM1	Exactitud	%R	Exactitud	%R
25	5626	5989	23,3	24,2	23,5	93,9	25,3	101,1
	5572	6300	23,1	25,5				
	5769	6432	23,9	26,0				
50	12099	11687	50,2	47,3	46,3	92,6	43,3	86,5
	10991	10459	45,6	42,3				
	10384	9912	43,1	40,1				
100	22195	20780	92,1	84,1	90,4	90,4	83,0	83,0
	21732	20739	90,2	84,0				
	21425	19992	88,9	80,9				

Finalmente puede decirse que el método cumple con los propósitos para determinar niveles de AFM1 y AFM2 en muestras de leche materna por columna de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detección fluorimétrica.

5. Resultados

La AFM1 fue detectada en el 90% de la muestras con una media de 5.2 ng/l, una mediana de 3.2 ng/l y un rango de 0.9 a 18.5 ng/l. No se encontraron niveles positivos para AFM2. La Figura 5-1 muestra un cromatograma de una muestra positiva.

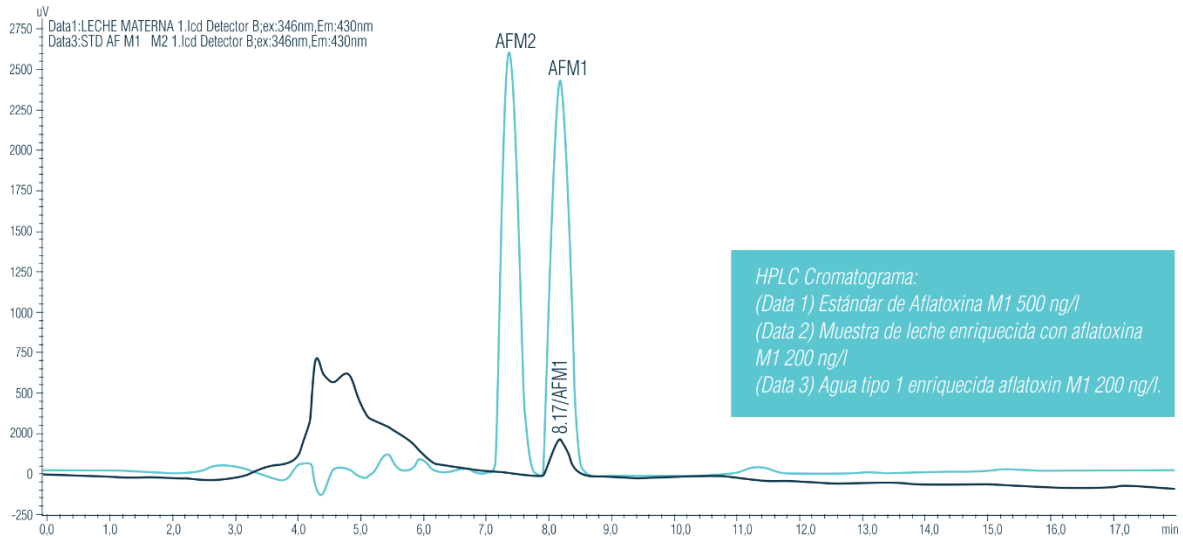


Figura 5-1. Cromatograma de una muestra con niveles de AFM1

Los niveles de AFM1 encontrados no corresponden con una distribución normal (gaussiana). Los percentiles 25, 50 y 75 fueron 1.70 ng/l, 2.95 ng/l y 6.02 ng/l respectivamente, a continuación se presenta un histograma de frecuencias elaborado con las muestras positivas, para apreciar la distribución de frecuencia de las concentraciones de AFM1 (Figura 5-2).

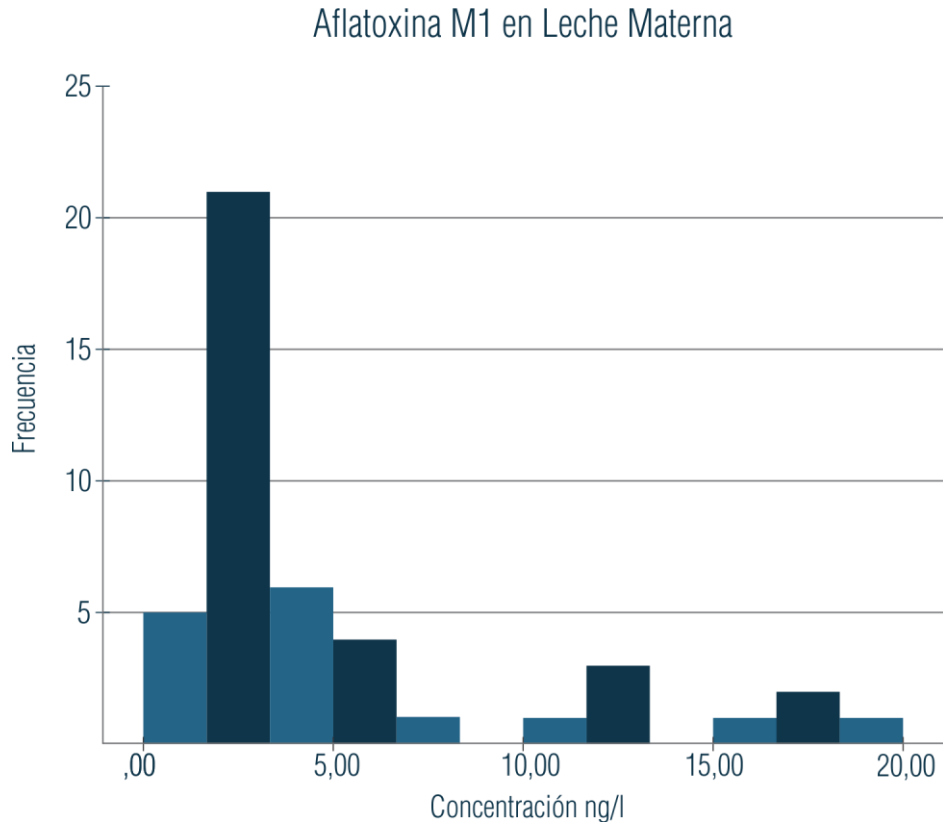


Figura 5-2. Histograma de frecuencias muestras positivas AFM1

5.1 Resultados Univariados

La muestra para este estudio estuvo conformada por 50 madres lactantes que acudían al lactario del centro de atención médica durante el tiempo en el cual se desarrolló la investigación. Todas las mujeres accedieron voluntariamente a participar en el estudio.

Se encontró que el promedio de edad de las madres lactantes fue de 25.9 años, y que el 50% de estas estaban en el intervalo de 21 a 31 años (tabla 5-1). El peso promedio de los recién nacidos y lactantes fue de 2982.5 g, y el 50% tenía un peso de 2770 a 3295 g. La edad y el tiempo de lactancia fue en promedio de 68.4 días, con un rango entre 3 y 660 días. La concentración de AFM1 tuvo un promedio de 4.69 ng/l, una mediana de 2.95 ng/l, un máximo de 18.5 ng/l y el 50% de los valores de AFM1 estuvieron entre 1.70 y 5.02 ng/l.

Tabla 5-1: Estadística descriptiva de las variables continuas registradas al momento de la toma de muestra

Estadístico		Edad de la Madre (años)	Peso del bebe (gramos)	Edad de los bebes (días)	AFM1
N		50	49	50	50
Media		25.94	2982.47	68.42	4.32
E.E.		.890	77.897	16.201	.6918
Mediana		25.00	3030.00	23.00	2.850
Moda		21	3080	30	0
D.E.		6.297	545.282	114.558	4.64
Mínimo		15	800	3	.0
Máximo		41	4200	660	18.5
Percentiles	25	21.00	2770.00	12.00	1.700
	50	25.00	3030.00	23.00	2.850
	75	31.00	3295.00	60.00	5.025

Las variables edad de las madres, peso y edad de los recién nacidos y lactantes son continuas, sin embargo, para tener una visión alterna estos valores han sido categorizados (tablas 5-2, 5-3, 5-4). El 58% de las madres lactantes presentaban edades inferiores a 27 años, y el 52% de estas, tenían entre 19 y 26 años. El peso de los recién nacidos y lactantes en forma de categorías muestra que el 75.5% de los bebes participantes en el estudio tenía un peso inferior 3300 gramos. El 70% de los bebes, presentó un peso entre 2800 y 3799 gramos y el 80% presentaron una edad inferior a 99 días.

Tabla 5-2. Distribución absoluta y relativa de la edad (años) de las madres lactantes del estudio.

Edad madre (años)	n	%	% Acum.
15 – 18	3	6.0	6.0
19 – 22	16	32.0	38.0
23 – 26	10	20.0	58.0
27 – 30	8	16.0	74.0
31 – 34	7	14.0	88.0
35 – 38	4	8.0	96.0
39 – 42	2	4.0	100.0
Total	50	100.0	

Tabla 5-3. Distribución absoluta y relativa del peso de los bebés (gramos) registrado el día de la toma de muestra.

Peso bebe (gramos)	n	%	% Acum.
800 – 1299	1	2.0	2.0
1300 – 1799	1	2.0	4.1
1800 – 2299	2	4.0	8.2
2300 – 2799	8	16.0	24.5
2800 - 3299	25	50.0	75.5
3300 - 3799	10	20.0	95.9
3800 - 4299	2	4.0	100.0
Total	49	98.0	

Tabla 5-4. Distribución absoluta y relativa de la edad de los bebés (días), registrado el día de la toma de muestra.

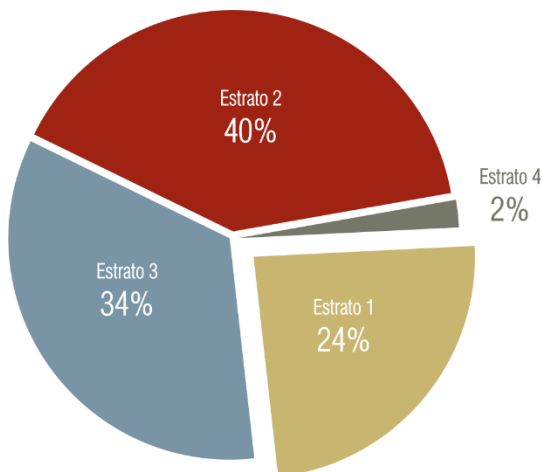
Edad bebe (días)	n	%	% Acum.
0 - 99	40	80.0	80.0
100 - 199	5	10.0	90.0
200 - 299	2	4.0	94.0
300 - 399	2	4.0	98.0
600 - 699	1	2.0	100.0
Total	50	100.0	

En cuanto a la distribución absoluta y relativa del estrato socio-económico, el número de hijos y área de residencia (tabla 5-5) se observa que el 64% de las madres lactantes provenían de un estrato socioeconómico igual o inferior al estrato 2. Los estratos 2 y 3 comprendieron el 74% del total de las madres lactantes. Solamente el 2% de las madres afirmó pertenecer a estrato 4. El 56% de las madres reportó un solo hijo, seguido por un 26% con dos hijos. En lo referente a la escolaridad el 14% de las madres lactantes tenía estudios universitarios completos, y el 48% niveles de educación de bachillerato o técnico. Predominó el área de residencia urbana (84%) sobre el área rural (16%).

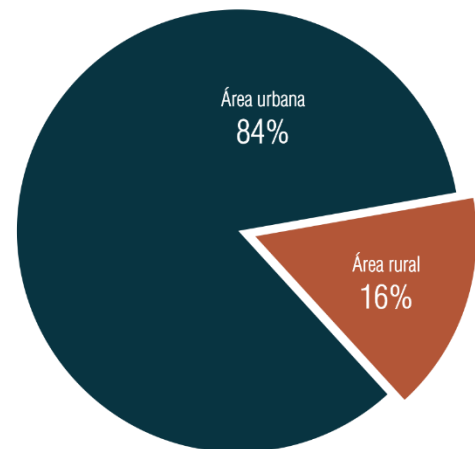
Tabla 5-5. Distribución absoluta y relativa del estrato socio-económico, el número de hijos y área de residencia

Estrato socio-económico			
	n	%	% Acum.
1	12	24	24
2	20	40	64
3	17	34	98
4	1	2	100
Número de hijos			
Categoría	n	%	% Acum.
1	28	56	56
2	13	26	82
3	5	10	92
4	3	6	98
5	1	2	100

Nivel de escolaridad			
Categoría	n	%	% Acum.
Desconocido	1	2	2
Primaria	4	8	10
Bachillerato incompleto	6	12	22
Bachillerato	12	24	46
Técnico	12	24	70
Universitario Incompleto	6	12	82
Universitario	7	14	96
Postgrado	2	4	100
Área			
	n	%	% Acum.
Rural	8	16	16
Urbana	42	84	100



Estrato de las madres



Área de procedencia

Figura 5-3. Distribución del estrato socioeconómico y el área de procedencia

Con respecto a la relación de la madre con el Distrito Capital de Bogotá, el 88% de las madres habitan en alguna localidad de la ciudad de Bogotá, 12% provenían de otros departamentos (Boyacá, Casanare, Huila, Cesar y Cundinamarca). Con respecto a las

madres lactantes provenientes del D.C., la localidad con mayor porcentaje de madres fue Ciudad Kennedy 20.5), seguido por Suba y Ciudad Bolívar.

Tabla 5-6. Distribución absoluta y relativa del origen de las madres lactantes participantes en el estudio.

Origen de la madre lactante			
	n	%	% Acum.
Distrito Capital	44	88	88
Provincia	6	12	100
Distribución de las madres que residen fuera del Distrito Capital			
Departamento	n	%	% Acum.
Boyacá	2	33.3	33.3
Casanare	1	16.7	50
Huila (Pitalito)	1	16.7	66.7
Cesar (Valledupar)	1	16.7	83.3
Cundinamarca (Zipaquirá)	1	16.7	100
Total	6	100	

Distribución de las madres que residen en el Distrito Capital			
Localidad	n	%	% Acum.
Antonio Nariño	2	4.5	4.5
Calera	1	2.3	6.8
Ciudad Bolívar	6	13.6	20.5
Ciudad Kennedy	9	20.5	40.9
Engativá	2	4.5	45.5
Fontibón	1	2.3	47.7
Madrid	1	2.3	50
Puente Aranda	2	4.5	54.5
Rafael Uribe Uribe	3	6.8	61.4
San Cristóbal	2	4.5	65.9
Santa Fe	1	2.3	68.2
Soacha	4	9.1	77.3
Suba	6	13.6	90.9
Teusaquillo	1	2.3	93.2
Tunjuelito	2	4.5	97.7
Usaquén	1	2.3	100
Total	44	100	

En general, el 60% de las madres reportaron entre 6 y 9 controles prenatales durante el embarazo. El 20% presentaron complicaciones durante el embarazo, caracterizados principalmente trastorno hipertensivo. El 72% de las madres tuvo parto vaginal.

Tabla 5-7. Distribución absoluta y relativa de los antecedentes patológicos y ginecológicos de las madres

Número de controles prenatales				Embarazo normal			
	N	%	% Acum.		N	%	% Acum.
0	2	4	4	No	10	20	20
1	1	2	6	Sí	40	80	100
2	1	2	8	Complicaciones durante el embarazo			
3	1	2	10		N	%	% Acum.
4	1	2	12	Amenaza de aborto	1	10	10
5	3	6	18	Amenaza de parto pre -término	1	10	20
6	6	12	30	Bajo peso	1	10	30
7	9	18	48	Embarazo múltiple	1	10	40
8	6	12	60	Enfermedad congénita	1	10	50
9	9	18	78	Hidronefrosis	1	10	60
10	6	12	90	Poli-hidramnios	1	10	70
11	1	2	92	Pre-eclampsia	2	20	90
12	2	4	96	Sobrepeso	1	10	100
13	1	2	98	Total	10	100	
14	1	2	100	Vía del parto			
Antecedentes médicos de la madre					n	%	% Acum.
	N	%	% Acum.	Cesárea	14	28	28
HTA	1	2	2	Vaginal	36	72	100
Migraña	1	2	4				
Ninguno	48	96	100				

Con relación al número de raciones en los tres días previos al momento de la toma de muestra de leche materna (Tabla 5 8), no se reportó consumo de centeno, nueces o tortillas. El arroz fue el alimento consumido al menos en una ración por el 94% de madres, con 54% de estas reportando el consumo de tres raciones. El pan fue el segundo alimento con un reporte de al menos una ración por el 76% de las madres, con 42% de las madres consumiendo 3 raciones. La pasta fue el tercer alimento más consumido en al menos en una ración (62%), con 50% de las madres consumiendo máximo una ración en los últimos tres días. La avena y la arepa de trigo (con 58%) fueron los alimentos consumidos en cuarto lugar, con al menos una ración. La avena tuvo un 16% de madres consumiendo tres raciones, mientras que la arepa de trigo fue consumida en una ración por un 22% de las participantes en el estudio.

Tabla 5-8. Distribución absoluta y relativa del número de raciones tomadas por las madres lactantes en los tres días anteriores a la toma de muestra de leche materna.

Almendras				Cereales al desayuno			
Raciones	n	%	% Acum.	Raciones	n	%	% Acum.
0	48	96	96	0	37	74	74
1	1	2	98	1	2	4	78
2	1	2	100	2	6	12	90
Arepa de maíz				3	3	6	96
Raciones	n	%	% Acum.	4	1	2	98
0	37	74	74	6	1	2	100
1	8	16	90	Maíz			
2	3	6	96	Raciones	n	%	% Acum.
3	2	4	100	0	33	66	66
Arepa de trigo				1	12	24	90
Raciones	n	%	% Acum.	2	2	4	94
0	29	58	58	3	2	4	98
1	11	22	80	4	1	2	100
2	6	12	92	Maní			
3	4	8	100	Raciones	n	%	% Acum.
Arroz				0	36	72	72
Raciones	n	%	% Acum.	1	10	20	92
0	3	6	6	2	1	2	94
1	4	8	14	3	1	2	96
2	1	2	16	4	2	4	100
3	27	54	70	Nueces			
4	3	6	76	Raciones	n	%	% Acum.
5	1	2	78	0	50	100	100
6	11	22	100	Pan			
Avena				Raciones	n	%	% Acum.
Raciones	n	%	% Acum.	0	12	24	24
0	29	58	58	1	8	16	40
1	5	10	68	2	4	8	48
2	6	12	80	3	21	42	90
3	8	16	96	4	3	6	96
5	1	2	98	6	2	4	100
9	1	2	100	Pasta			
Cebada				Raciones	n	%	% Acum.
Raciones	n	%	% Acum.	0	19	38	38
0	38	76	76	1	25	50	88
1	9	18	94	2	4	8	96
2	2	4	98	3	2	4	100
3	1	2	100	Tortillas			
Centeno				Raciones	n	%	% Acum.
Raciones	n	%	% Acum.	0	50	100	100
0	50	100	100				

5.2 Resultados de Estadística Bivariada

Las medianas de la concentración de AFM1 (ng/l) fueron altas en las categorías de edad de las madres lactantes de 19 a 22 y de 27 a 30 años, y en este último grupo, la desviación estándar fue la más alta de todas la categorías.

Tabla 5-9. Estadística descriptiva de la concentración de AFM1 (ng/l) en las categorías de edad de la madre.

Edad madre (años)	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
15 – 18	3	2.23	2.30	1.33	2.10	0.00	4.60	4.60
19 – 22	16	5.36	5.41	1.35	3.15	1.10	18.50	17.40
23 – 26	10	4.03	4.53	1.43	2.85	0.00	15.40	15.40
27 – 30	8	5.89	6.67	2.36	4.15	0.00	18.20	18.20
31 – 34	7	2.44	1.31	0.50	2.60	0.00	4.20	4.20
35 – 38	4	3.23	2.32	1.16	2.60	1.20	6.50	5.30
39 – 42	2	3.15	0.21	0.15	3.15	3.00	3.30	0.30
Total	50	4.32	4.64	0.66	2.85	0.00	18.50	18.50

Las medianas de la concentración de AFM1 (ng/l) fueron las más altas en las categorías de peso del lactante de 1300 a 1799, de 2300 a 2799 y de 3300 a 3799 gramos, aunque en la categoría de 1300 a 1799 gramos solo se reportó un lactante, mientras que la categoría 2800 a 3299 gramos hay 25 con una mediana de 2.6 ng/ml. La máxima variabilidad se expresó en los lactantes de 2300 a 2799 kilogramos de peso

Tabla 5-10. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) en las categorías de peso del recién nacido

Peso bebe (gramos)	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
800 – 1299	1	.00			.00	.00	.00	.00
1300 – 1799	1	6.00			6.00	6.00	6.00	.00
1800 – 2299	2	2.50	1.13	.80	2.50	1.70	3.30	1.60
2300 – 2799	8	5.81	6.58	2.33	3.60	.00	18.50	18.50
2800 – 3299	25	3.77	4.12	.82	2.60	.00	17.10	17.10
3300 – 3799	10	5.65	5.17	1.64	3.25	.90	18.20	17.30
3800 – 4299	2	.70	.71	.50	.70	.20	1.20	1.00
Total	49	4.28	4.68	.67	2.80	.00	18.50	18.50

El mayor número de recién nacidos y lactantes (40) presentó una edad entre los 0 a 99 días, con una mediana de AFM1 de 2.75 ng/l y desviación estándar de 3.62 ng/l en las muestras provenientes de las madres lactantes de este grupo. Los recién nacidos y lactantes con edad superior a 200 días presentaron medianas elevadas de AFM1 (por encima de 7.70 ng/l).

Tabla 5-11. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) en las categorías de edad del recién nacido

Edad bebe (días)	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
0 – 99	40	3.75	3.62	.57	2.75	.00	18.20	18.20
100 – 199	5	2.68	1.24	.56	3.10	1.30	4.20	2.90
200 – 299	2	9.55	10.68	7.55	9.55	2.00	17.10	15.10
300 – 399	2	7.70	10.89	7.70	7.70	.00	15.40	15.40
600 – 699	1	18.50	.	.	18.50	18.50	18.50	.00
Total	50	4.32	4.64	.66	2.85	.00	18.50	18.50

Las muestras provenientes de madres lactantes del estrato 1 mostraron una mediana alta comparadas con las madres de los otros estratos. Las madres del estrato 3 reportaron la mediana más baja de AFM1 de todos los estratos (2.40 ng/l). La única madre del estrato 4 reportó una concentración de AFM1 en leche materna de 6.20 ng/l.

Tabla 5-12. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) en las categorías de estrato socioeconómico de la madre lactante.

Estrato	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
1	12	6.73	6.99	2.02	3.45	.00	18.50	18.50
2	20	3.07	2.50	.56	2.60	.00	10.40	10.40
3	17	3.99	4.28	1.04	2.40	.00	15.40	15.40
4	1	6.20	.	.	6.20	6.20	6.20	.00
Total	50	4.32	4.64	.66	2.85	.00	18.50	18.50

En cuanto a la procedencia de las madres, las muestras de mujeres que habitan en área rural presentaron una mediana de concentración de AFM1 mayor que las muestras de leche provenientes de mujeres de área urbana.

Tabla 5-13. Estadística descriptiva de AFM1 (ng/l) en las categorías del área de procedencia de la madre lactante

Área	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
Rural	8	5.20	5.30	1.87	3.25	.00	15.40	15.40
Urbana	42	4.16	4.56	.70	2.75	.00	18.50	18.50
Total	50	4.32	4.64	.66	2.85	.00	18.50	18.50

Tabla 5-14. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) en las categorías de lugar de residencia de la madre lactante

Ubicación	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
Distrito Capital	44	4.60	4.82	.73	2.95	.00	18.50	18.50
Provincia	6	2.33	2.45	1.00	2.15	.00	6.50	6.50
Total	50	4.32	4.64	.66	2.85	.00	18.50	18.50

Las medianas de la concentración de AFM1 fueron más altas en madres con un nivel de escolaridad de bachillerato incompleto (8.75 ng/l). Las medianas más bajas se presentaron en las madres con estudios universitarios y técnicos. La muestra de la única madre que no reportó información sobre su nivel de estudios tiene una mediana de 8 ng/l.

Tabla 5-15. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) de acuerdo al nivel de escolaridad de la madre lactante

Escolaridad	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
Desconocido	1	8.00	.	.	8.00	8.00	8.00	.00
Bachillerato	12	4.38	5.68	1.64	2.90	.00	18.50	18.50
Bachillerato incompleto	6	9.15	8.57	3.50	8.75	.00	18.20	18.20
Postgrado	2	5.20	1.41	1.00	5.20	4.20	6.20	2.00
Primaria	4	3.73	1.87	.94	2.90	2.60	6.50	3.90
Técnico	12	2.56	1.67	.48	2.45	.20	6.00	5.80
Universitario	7	2.06	1.08	.41	2.10	.00	3.10	3.10
Universitario Incompleto	6	5.07	3.16	1.29	4.70	2.00	10.40	8.40
Total	50	4.32	4.64	.66	2.85	.00	18.50	18.50

A continuación se presentan las tablas con la estadística descriptiva que fueron realizadas para las variables relacionadas con los antecedentes ginecológicos de la madre

Tabla 5-16. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) de acuerdo al número de hijos de la madre lactante

Número de hijos	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
1	28	3.86	3.55	.67	2.80	.00	17.10	17.10
2	13	4.34	5.34	1.48	2.80	.00	18.50	18.50
3	5	7.90	8.28	3.70	3.30	.00	18.20	18.20
4	3	3.03	3.27	1.89	2.60	.00	6.50	6.50
5	1	3.10	.	.	3.10	3.10	3.10	.00
Total	50	4.32	4.64	.66	2.85	.00	18.50	18.50

Tabla 5-17. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) de acuerdo al embarazo normal de la madre lactante al momento de la toma de muestra de leche materna.

Embarazo normal	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
No	10	3.78	4.46	1.41	2.50	.00	15.40	15.40
Sí	40	4.46	4.73	.75	2.95	.00	18.50	18.50
Total	50	4.32	4.64	.66	2.85	.00	18.50	18.50

Tabla 5-18. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) de acuerdo al tipo de parto de la madre lactante al momento de la toma de muestra de leche materna.

Parto	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
Cesárea	14	3.12	3.39	.90	2.35	.00	13.30	13.30
Natural	36	4.79	5.01	.83	3.10	.00	18.50	18.50
Total	50	4.32	4.64	.66	2.85	.00	18.50	18.50

Tabla 5-19. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) de acuerdo al género del bebe de la madre lactante al momento de la toma de muestra de leche materna.

Género	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
No reporta	1	3.60	.	.	3.60	3.60	3.60	.00
Femenino	20	3.90	4.87	1.09	2.25	.00	18.20	18.20
Masculino	29	4.64	4.62	.86	3.10	.00	18.50	18.50
Total	50	4.32	4.64	.66	2.85	.00	18.50	18.50

Al realizar la estadística bivariada en relación a la información obtenida del cuestionario de alimentación se observó que los valores de las medianas de la concentración de AFM1 fueron más elevados en las madres que consumieron al menos tres raciones de

arepa de maíz (10.50 ng/l), así como en la mujeres que consumieron al menos 3 raciones de arroz (3 ng/l) y al menos 3 raciones de pasta (10.25 ng/l).

Tabla 5-20. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) en relación al número de raciones de almendras, arepa de maíz, arepa de trigo, arroz, avena y cebada, consumidas por las madres lactantes.

Almendras								
Raciones	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
0	48	4.40	4.72	.68	2.85	.00	18.50	18.50
1	1	2.00			2.00	2.00	2.00	.00
2	1	3.10			3.10	3.10	3.10	.00
Arepa de maíz								
Raciones	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
0	37	4.08	4.19	.69	3.00	.00	18.50	18.50
1	8	4.86	5.39	1.91	2.70	.20	17.10	16.90
2	3	1.77	.49	.28	2.00	1.20	2.10	.90
3	2	10.50	10.89	7.70	10.50	2.80	18.20	15.40
Arepa de trigo								
Raciones	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
0	29	4.82	4.95	.92	2.80	.20	18.50	18.30
1	11	4.21	4.63	1.40	3.10	.00	17.10	17.10
2	6	3.77	4.81	1.96	2.50	.00	13.30	13.30
3	4	1.85	1.37	.68	2.05	.00	3.30	3.30
Arroz								
Raciones	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
0	3	2.93	3.11	1.80	2.60	.00	6.20	6.20
1	4	2.88	.51	.26	2.90	2.30	3.40	1.10
2	1	1.50	.	.	1.50	1.50	1.50	.00
3	27	3.89	3.74	.72	3.00	.00	18.20	18.20
4	3	1.80	1.31	.75	1.20	.90	3.30	2.40
5	1	6.00			6.00	6.00	6.00	.00
6	11	7.10	7.31	2.20	2.70	.00	18.50	18.50
Avena								
Raciones	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
0	29	5.34	5.67	1.05	2.90	.00	18.50	18.50
1	5	3.70	2.57	1.15	3.30	1.10	8.00	6.90
2	6	2.73	2.11	.86	1.85	.80	6.00	5.20
3	8	3.31	1.37	.48	3.05	2.00	6.00	4.00
5	1	.00			.00	.00	.00	.00
9	1	.00			.00	.00	.00	.00
Cebada								
Raciones	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
0	38	4.07	4.17	.68	2.95	.00	18.50	18.50
1	9	6.19	6.65	2.22	2.60	1.70	18.20	16.50
2	2	1.35	1.91	1.35	1.35	.00	2.70	2.70
3	1	3.10			3.10	3.10	3.10	.00

Tabla 5-21. Estadística descriptiva del AFM1 (ng/l) en relación al número de raciones de cereales al desayuno, maíz, maní, pan y pasta, consumidas por las madres lactantes

Cereales al desayuno								
Raciones	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
0	37	4.92	5.21	.86	2.90	.00	18.50	18.50
1	2	1.70	.57	.40	1.70	1.30	2.10	.80
2	6	3.52	1.46	.60	3.35	2.10	6.00	3.90
3	3	2.17	.76	.44	2.00	1.50	3.00	1.50
4	1	3.10			3.10	3.10	3.10	.00
6	1	.00			.00	.00	.00	.00
Maíz								
Raciones	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
0	33	5.26	5.37	.94	2.80	.00	18.50	18.50
1	12	2.68	1.87	.54	2.95	.00	6.20	6.20
2	2	1.65	2.33	1.65	1.65	.00	3.30	3.30
3	2	2.05	.07	.05	2.05	2.00	2.10	.10
4	1	3.10			3.10	3.10	3.10	.00
Maní								
Raciones	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
0	36	4.36	4.87	.81	2.85	.00	18.50	18.50
1	10	4.49	4.88	1.54	2.25	.00	15.40	15.40
2	1	6.00			6.00	6.00	6.00	.00
3	1	3.30			3.30	3.30	3.30	.00
4	2	2.55	.78	.55	2.55	2.00	3.10	1.10
Pan								
Raciones	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
0	12	5.82	6.54	1.89	2.50	.00	18.20	18.20
1	8	7.96	5.89	2.08	6.20	2.60	18.50	15.90
2	4	2.90	.29	.15	2.85	2.60	3.30	.70
3	21	2.90	2.45	.53	2.10	.00	10.40	10.40
4	3	3.10	1.10	.64	3.10	2.00	4.20	2.20
6	2	.40	.57	.40	.40	.00	.80	.80
Pasta								
Raciones	n	Media	D.E.	E.E.	Mediana	Min.	Max.	Rango
0	19	4.84	5.23	1.20	2.80	.00	18.20	18.20
1	25	3.89	3.61	.72	3.10	.00	17.10	17.10
2	4	1.63	1.20	.60	1.65	.20	3.00	2.80
3	2	10.25	11.67	8.25	10.25	2.00	18.50	16.50

5.3 Características sociodemográficas de las mujeres con muestras positivas por encima del percentil 75

A continuación se presentan las principales características de las muestras cuya concentración de AFM1 se encontró por encima del percentil 75 (5.025 ng/l). Al realizarse la discriminación de las muestras con niveles de AFM1 por encima de 5.025 ng/l se encontraron 12 muestras con concentraciones entre 6.2 ng/l y 18.5 ng/l. El promedio de edad de las mujeres fue de 25.6 con un rango de 20 a 38 años.

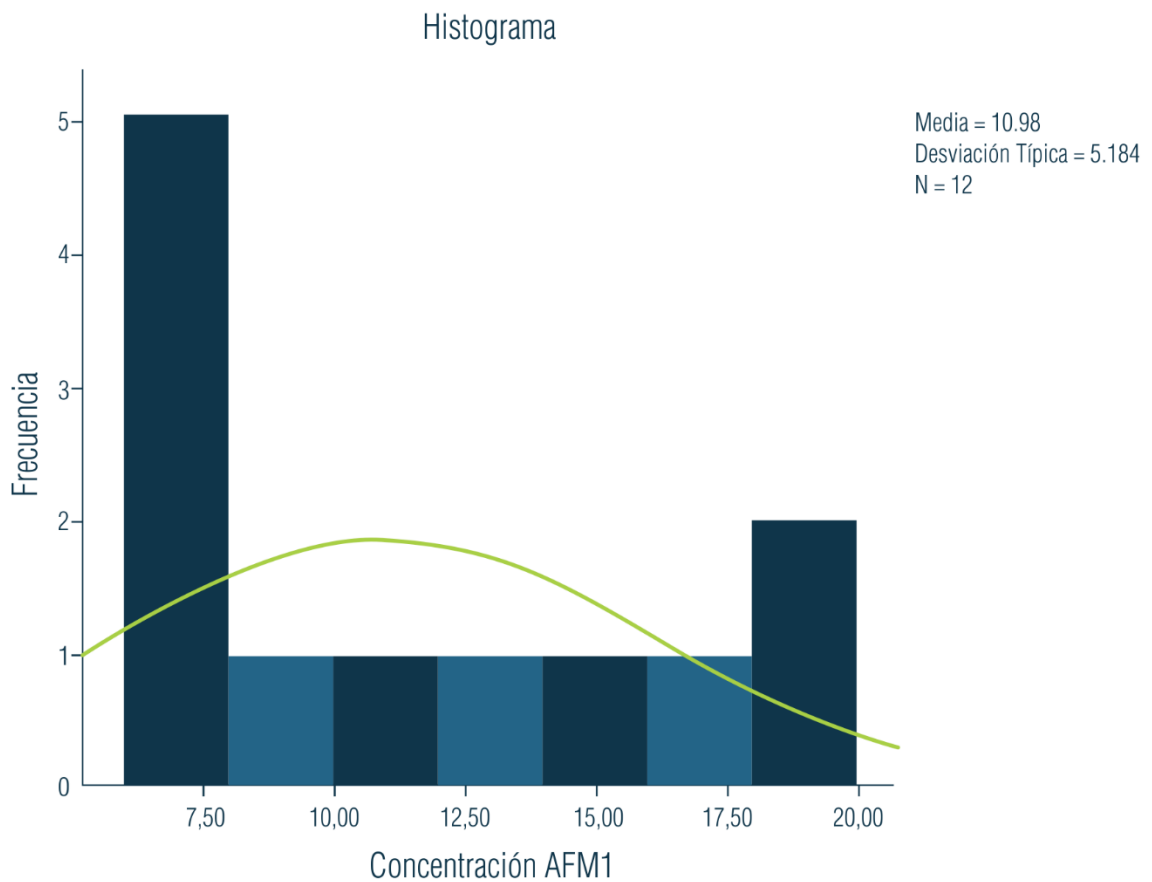


Figura 5-4. Histograma de frecuencias muestras positivas por encima del percentil 75

Tabla 5-22. Concentraciones de AFM1 (ng/l) por encima del percentil 75

Concentración AFM1				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
6,00	2	16,7	16,7	16,7
6,20	2	16,7	16,7	33,3
6,50	1	8,3	8,3	41,7
8,00	1	8,3	8,3	50,0
10,40	1	8,3	8,3	58,3
13,30	1	8,3	8,3	66,7
15,40	1	8,3	8,3	75,0
17,10	1	8,3	8,3	83,3
18,20	1	8,3	8,3	91,7
18,50	1	8,3	8,3	100,0
Total	12	100,0	100,0	

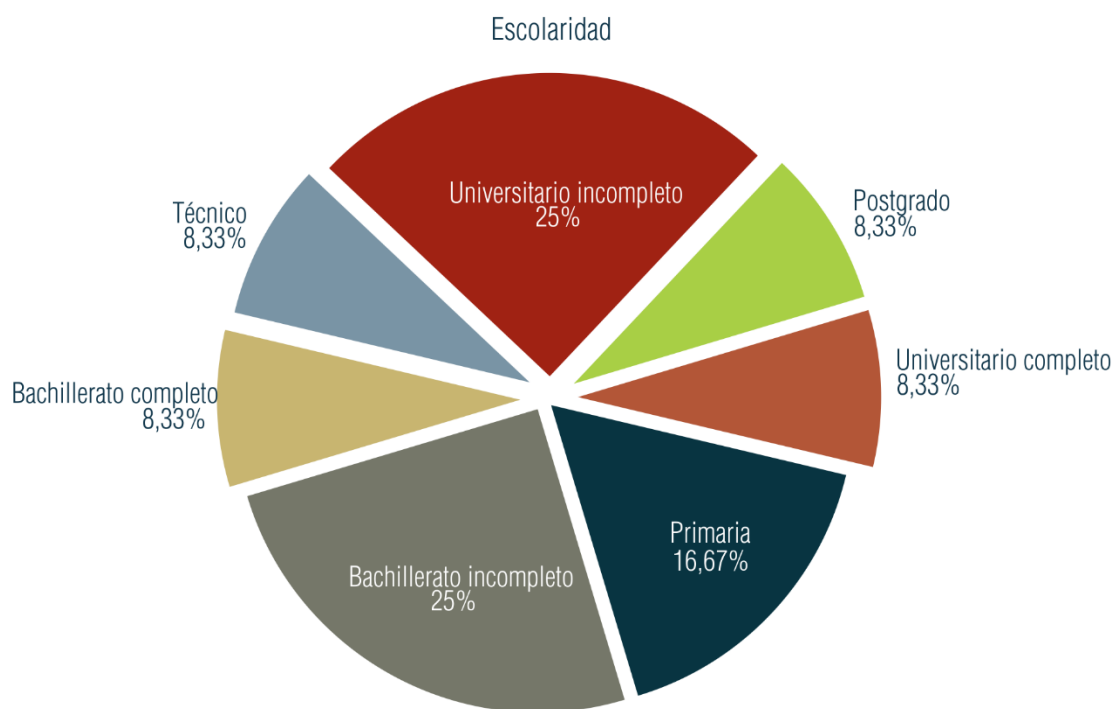


Figura 5-5. Distribución de la escolaridad en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.

Se evidencia que el mayor número de mujeres tenían estudios de primaria y de bachillerato con un porcentaje del 41.67%, seguido de la madres con estudios universitarios incompletos con un 25%. En cuanto al estrato socioeconómico la mayoría de las mujeres pertenecía al estrato 1 y 2 con un porcentaje del 66.66%, seguido del estrato tres con un 25%, solamente 1 mujer reportó pertenecer al estrato 4.

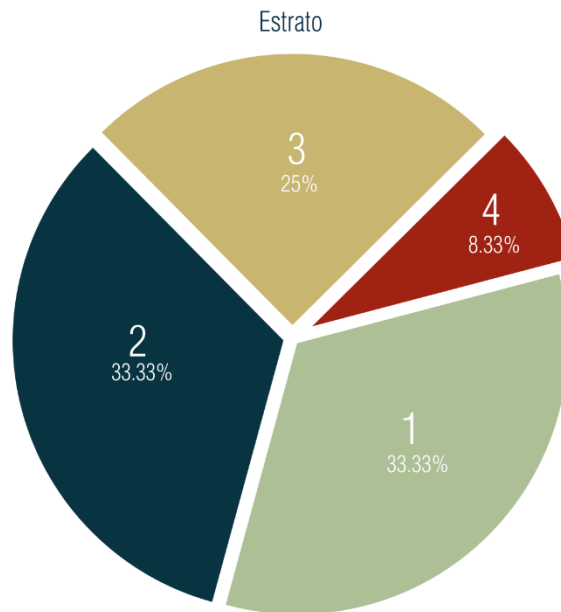


Figura 5-6. Distribución del estrato en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.

A continuación se presenta una tabla que contiene el lugar de residencia reportado por las mujeres con concentraciones por encima del percentil 75. Se encontró que 11 de las mujeres residía en Bogotá y 1 reportó residir zona rural del departamento de Casanare.

Tabla 5-23. Lugar de procedencia de las mujeres con concentraciones de AFM1 por encima del percentil 75

Lugar de Procedencia			
1	Puente Aranda	7	Santa Fe
2	Teusaquillo	8	Ciudad Bolívar
3	Casanare	9	Ciudad Bolívar
4	Fontibón	10	Rafael Uribe Uribe
5	Calera	11	San Cristóbal
6	Kennedy	12	Soacha

La mayoría de mujeres provenía del área urbana con un porcentaje del 75% y reportó tener 1 hijo (58.33%) cuyo género en su mayoría fue masculino con un porcentaje del 58.33%.

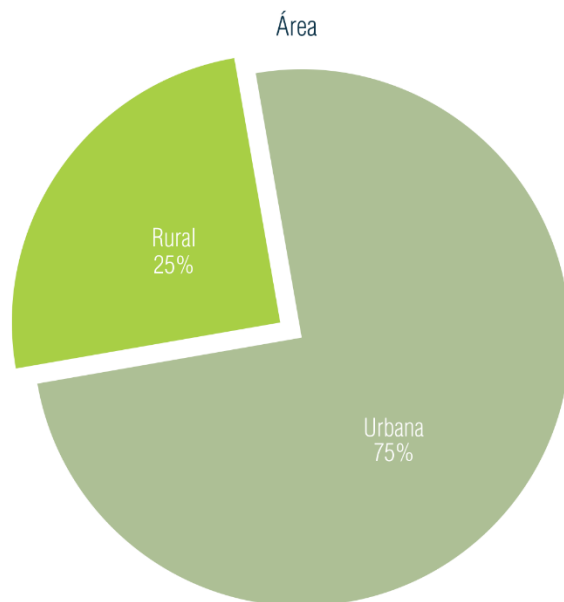


Figura 5-7. Distribución del área en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.

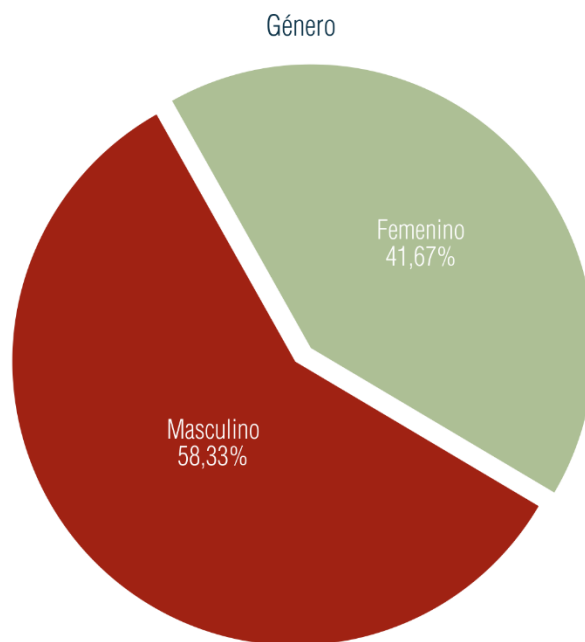


Figura 5-8. Distribución del género en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.

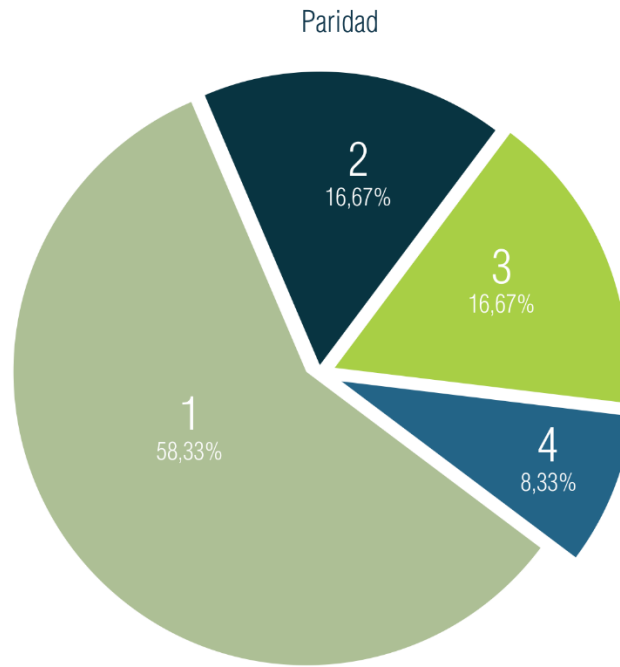


Figura 5-9. Distribución de la paridad en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.

A continuación se presenta una aproximación a los patrones de consumo de los 7 alimentos y grupos de alimentos potencialmente contaminados por parte de los 12 casos que tuvieron unos niveles de aflatoxina por encima del percentil 75. Siendo las categorías de alimentos las siguientes: Maíz, derivados del maíz en los que se incluyen la arepa de maíz y las tortillas, alimentos derivados de la harina de trigo en los que se incluyen el pan, la arepa de harina de trigo y la pasta, arroz, cereales como la avena, la cebada y el centeno, cereales para el desayuno y frutos oleaginosos como el maní, almendras y nueces. Inicialmente se presentan frecuencias de consumo de los alimentos y grupos alimentos de forma individual y posteriormente se describen las frecuencias de consumo de combinaciones de alimentos.

En cuanto al maíz se evidencia que el 8.33% de las mujeres reportó haber consumido al menos una ración de maíz, mientras que el 91.68% dijo no haber consumido este alimento. Cuando se les preguntó acerca del consumo de derivados del maíz el 33.33% refirió haber consumido al menos una ración de estos alimentos y en todos los casos el alimento consumido fue la arepa de maíz.

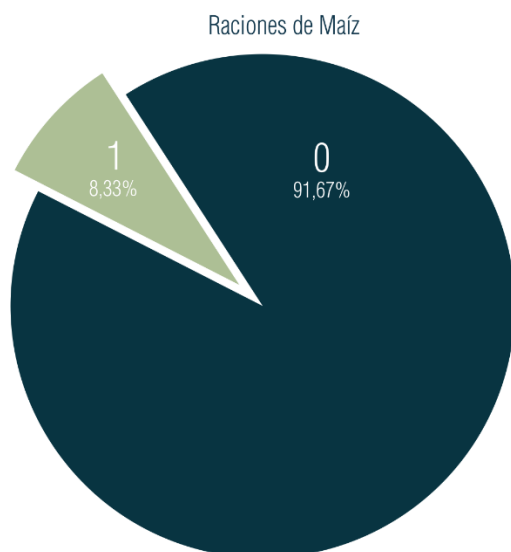
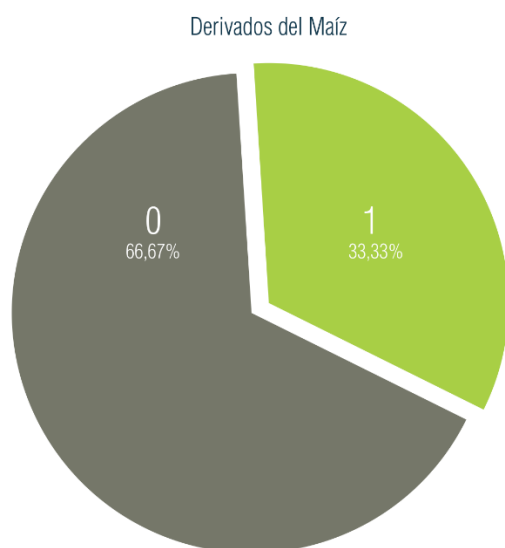


Figura 5-10. Distribución del consumo de maíz en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.



Derivados del Maíz

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos Arepa de Maíz	4	100,0	100,0	100,0

Figura 5-11. Distribución del consumo de derivados del maíz en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.

Para los cereales se evidenció que todas las mujeres consumieron arroz y se observó diferencia en el número de raciones consumidas, el 50% consumió tres raciones, seguido del 33.3% que consumió tres raciones en las últimas 72 horas.

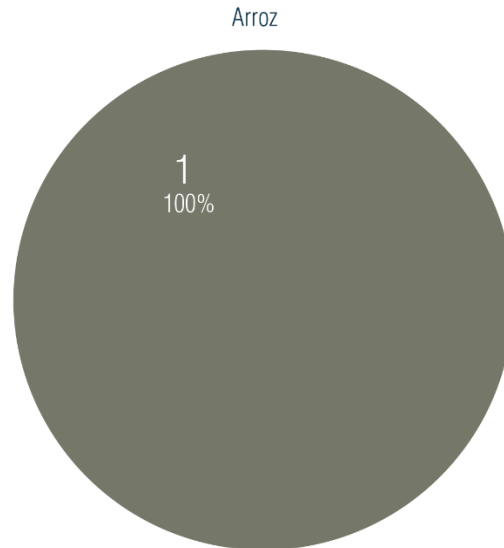


Figura 5-12. Distribución del consumo de arroz en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.

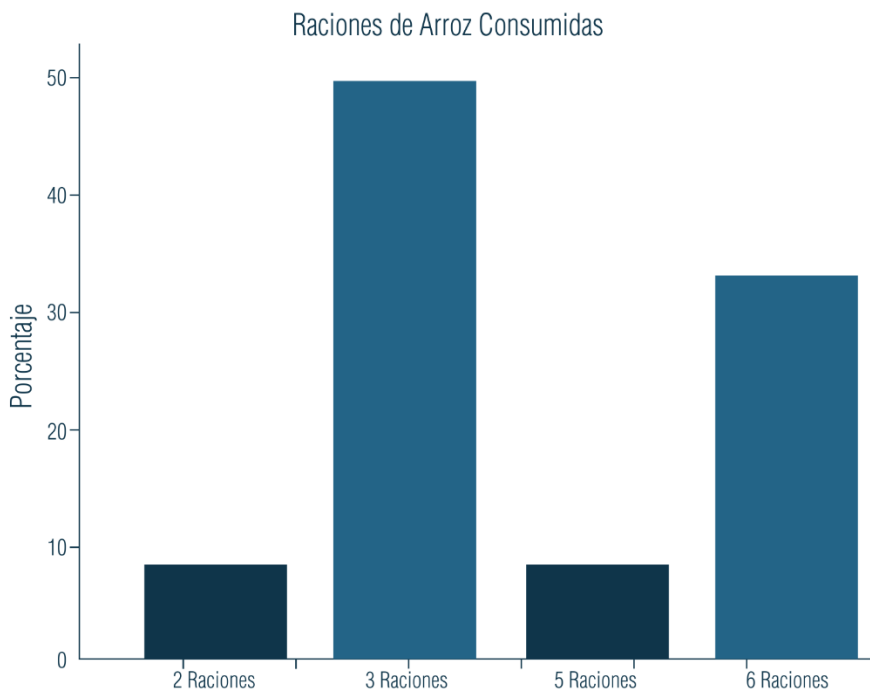


Figura 5-13. Raciones consumidas de arroz por las mujeres con concentraciones por encima del percentil 75

Tabla 5-24. Raciones consumidas de arroz por las mujeres con concentraciones de AFM1 por encima del percentil 75

Raciones de Arroz Consumidas				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
2 Raciones	1	8,3	8,3	8,3
3 Raciones	6	50,0	50,0	58,3
Válidos 5 Raciones	1	8,3	8,3	66,7
6 Raciones	4	33,3	33,3	100,0
Total	12	100,0	100,0	

Para el caso de otros cereales el 41.67% reportó consumo de al menos una ración de algún cereal en las últimas 72 horas, de los cuales el 51.1% consumió avena y el 42.9% cebada.

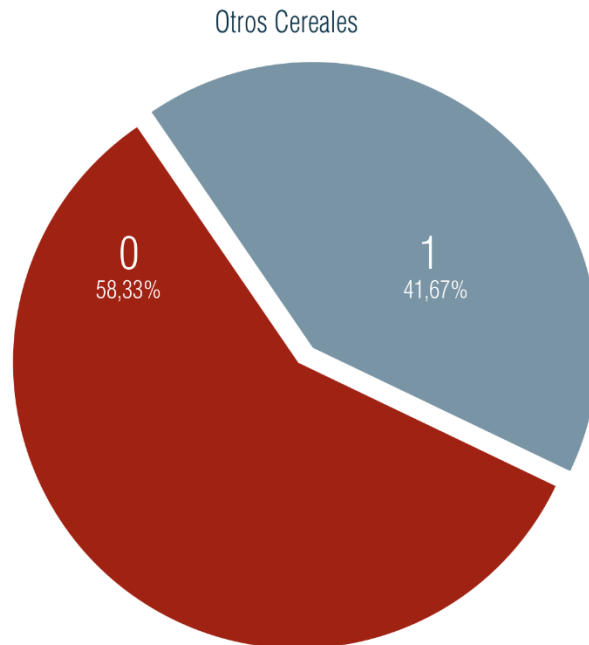


Figura 5-14. Distribución del consumo de otros cereales en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.

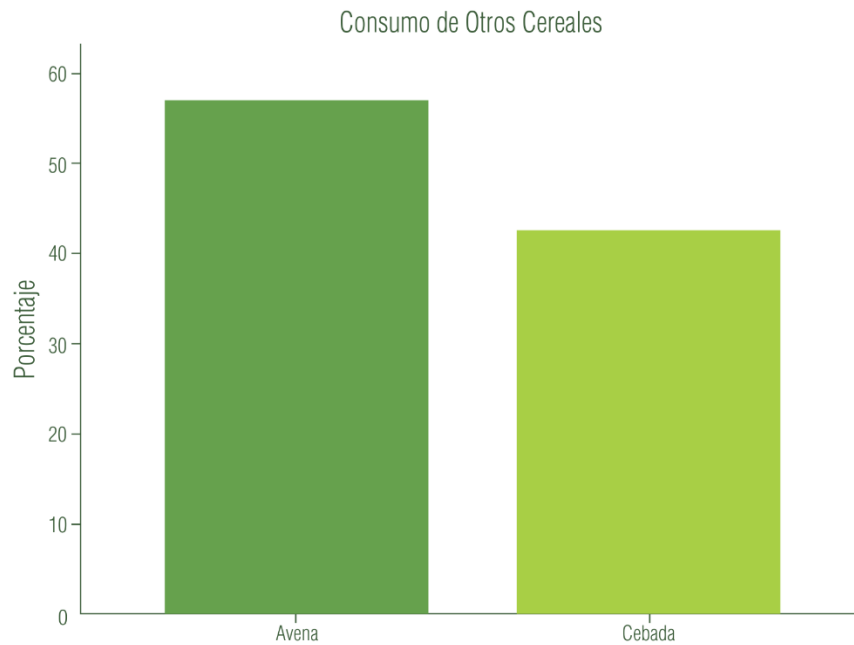


Figura 5-15. Consumo de otros cereales en mujeres con concentración de AFM1 por encima del percentil 75.

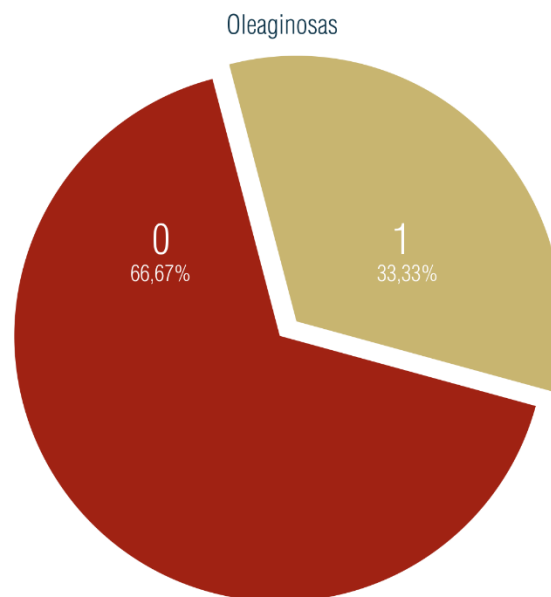


Figura 5-16. Distribución del consumo de oleaginosas en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.

Los frutos oleaginosos fueron consumidos por el 33.33% de las mujeres y todas refirieron consumo de maní. En el caso de los derivados de la harina de trigo la gran mayoría (83.33%) reportó el consumo de al menos una ración de este tipo de alimentos. El mayormente consumido fue el pan con un porcentaje de 50%, seguido por la pasta y la arepa con porcentajes de 37.5% y 12.5% respectivamente.

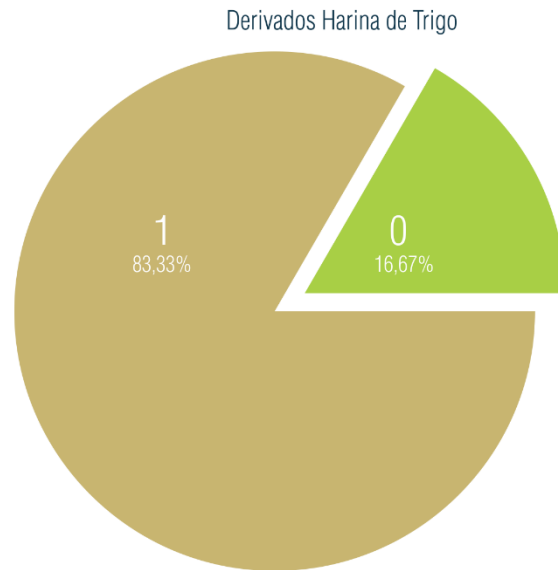


Figura 5-17. Distribución del consumo de derivados de la harina de trigo en muestras positivas con concentraciones por encima del percentil 75.

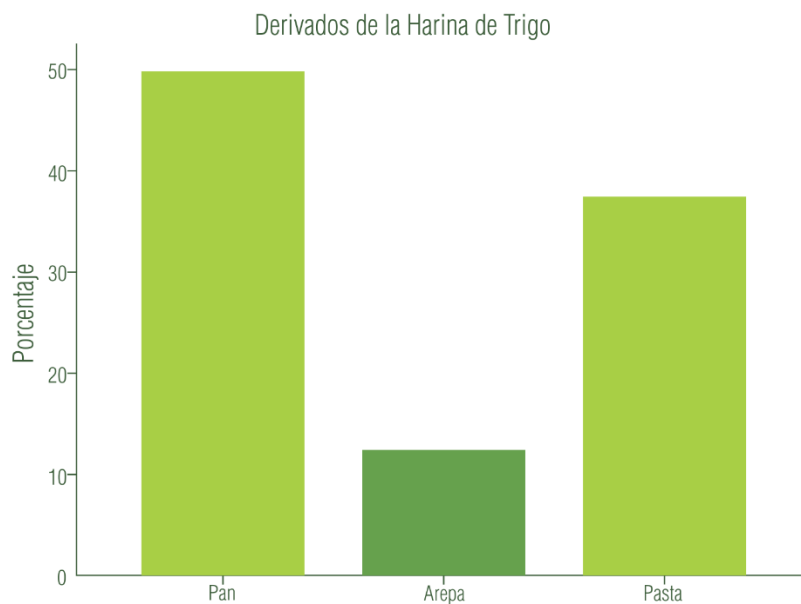


Figura 5-18. Consumo de derivados de la harina de trigo

A continuación se presentan los resultados de las frecuencias de consumo de combinaciones de alimentos, para esto se discriminaron los alimentos de forma individual y se tuvieron en cuenta los datos obtenidos de la estadística descriptiva de la frecuencia de consumo de las madres cuyos niveles de AFM1 se encontraron por encima del percentil 25, por tal motivo no se tuvieron en cuenta las tortillas, el centeno, las nueces y las almendras debido a que no se reportó su consumo.

Tabla 5-25. Tabla consumo de combinación de alimentos

Consumo de Combinación de Alimentos				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
2	2	16,7	16,7	16,7
3	5	41,7	41,7	58,3
4	2	16,7	16,7	75,0
5	1	8,3	8,3	83,3
6	2	16,7	16,7	100,0
Total	12	100,0	100,0	

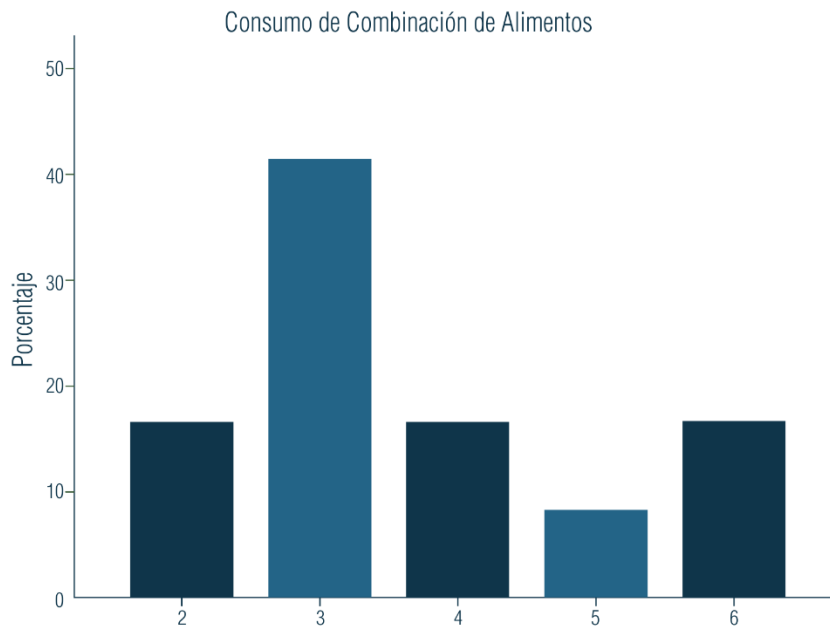


Figura 5-19. Frecuencia de consumo por combinación de alimentos

El 41.7% consumió 3 alimentos, un porcentaje de 16.7% consumió 2, 4 y 6 alimentos respectivamente. En el grupo de mujeres que consumieron tres alimentos, la combinación más frecuente fue pan, pasta y arroz y en las demás categorías fue evidente que la dupla arroz y pan fue la de mayor presentación.

6. Discusión

6.1 Discusión de Resultados

La contaminación con micotoxinas y principalmente con aflatoxinas en alimentos consumidos frecuentemente en la dieta como cereales, semillas, legumbres y frutos secos entre otros, que ocurre en cualquier parte del proceso de producción o distribución, su persistencia en tejidos y productos derivados de animales para consumo humano y su comprobada resistencia a procesos de esterilización, llevan a una exposición deletérea que genera procesos de enfermedad relacionados con carcinogénesis y genotoxicidad, lo que se refleja en el aumento de la incidencia de cáncer hepático, así como en alteraciones de la inmunidad y trastornos del aparato reproductor (Mehrzhad et al., 2014; Shouman et al., 2012; Wogan et al., 2012; Shuaib et al., 2010).

Debido a su alta toxicidad y efectos nocivos sobre la salud, se han realizado esfuerzos provenientes de instituciones principalmente internacionales, bajo el marco de la seguridad alimentaria, para regular los niveles máximos permitidos de AFs en los alimentos; sin embargo hasta hace muy poco en Colombia no existía legislación de obligatorio cumplimiento en lo referente al control de micotoxinas en los alimentos para consumo humano, la resolución 4506 de 2013 ha sido aprobada recientemente (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013). Este estudio fue llevado a cabo antes de que se implementaran las medidas de control en cumplimiento con la resolución, por lo tanto se considera que los datos generados por esta investigación pueden servir como información de base a ser comparada con resultados de estudios elaborados posteriormente al establecimiento de los niveles máximos de contaminantes como las micotoxinas en alimentos destinados para el consumo humano.

Teniendo en cuenta que el metabolito de la AFB1 denominado AFM1 puede ser objetivizado en leche materna, se convierte en un biomarcador excepcional para medir la exposición a estas sustancias en un momento clave del desarrollo humano como lo es el periodo de lactancia. Se planteó un estudio observacional descriptivo que permitiera

determinar si existían niveles detectables y cuantificables de AFM1 en muestras de leche materna obtenidas en el lactario del Hospital de la Misericordia de la ciudad de Bogotá, a través de la aplicación de una metodología analítica validada y disponible como la cromatografía líquida de alta eficiencia y adicionalmente, realizar la descripción de patrones de consumo de alimentos potencialmente contaminados con AFB1 en las mujeres participantes en el estudio.

Con este estudio se validó una técnica analítica para la cuantificación de AFM1 y AFM2, se utilizó la cromatografía líquida de alta eficiencia, método que ha mostrado ser más eficiente por presentar una mayor sensibilidad en comparación con ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) (Cigić y Prosen, 2009). Esto fue corroborado al realizar la validación del método analítico, ya que se encontró que la cromatografía líquida HPLC con detección de fluorescencia es altamente sensible para la determinación de AFM1 y AFM2 en leche materna.

Se generaron datos en lo referente a la exposición a AFB1 en mujeres lactantes en la ciudad de Bogotá, que pueden ser utilizados en evaluaciones de riesgo en seguridad e inocuidad alimentaria para determinar el riesgo entre el consumo de alimentos contaminados con AFB1 y desenlaces en la salud. Estas evaluaciones ayudarían a fundamentar programas de prevención y vigilancia nacionales que estén acordes con las recomendaciones internacionales para la regularización de micotoxinas y principalmente de la AFB1 (Khlanguiset y Wu, 2010; Doull et al., 2007; Fryer et al., 2006).

La exposición a AFs está en íntima relación con los procesos de calidad por los cuales pasan los alimentos, desde el cultivo hasta su distribución (Wu y Khlanguiset, 2010). De esta forma la población de países en desarrollo y principalmente aquella perteneciente a estratos socioeconómicos más bajos tendrá pocas posibilidades de beneficiarse de procesos de cultivo, cosecha, almacenamiento, empaquetamiento y distribución acordes con las regulaciones internacionales si no hay compromisos institucionales y gubernamentales desde el ámbito nacional claros en torno a la regulación de los niveles permitidos de AFs (Groopman et al., 2008). Es por eso que la muestra a la que hace referencia el estudio permite una primera aproximación al grado de exposición a AFs por consumo de alimentos contaminados en Bogotá.

El análisis de la muestra poblacional indica que se trata principalmente de madres jóvenes, provenientes en su gran mayoría del área urbana de Bogotá. Al tener en cuenta el estrato socioeconómico se reporta que el 98% de las participantes pertenece a los estratos 1, 2 y 3 de la ciudad, condensándose la población en tres localidades principales: Ciudad Bolívar, Kennedy y Suba. Estos datos son representativos de la población que asiste al hospital pediátrico para recibir atención médica, la cual es una población vulnerable, en términos económicos y sanitarios y por ende de seguridad alimentaria. La exposición a AFs está en íntima relación con los procesos de calidad por los cuales pasan los alimentos, desde el cultivo hasta su distribución, antes del consumo humano, de esta forma la población perteneciente a países en vías de desarrollo y principalmente aquella perteneciente a estratos socioeconómicos más bajos tendrá pocas posibilidades de beneficiarse de técnicas de cultivo, cosecha, almacenamiento empaquetamiento y distribución acordes con las regulaciones internacionales si no hay compromisos institucionales y gubernamentales desde el ámbito nacional claros en torno a la regulación de los niveles permitidos de AFs. Es por eso que la muestra poblacional a la que hace referencia el estudio nos permite una primera aproximación al grado de exposición de una población de muy alto riesgo para contaminación con AFs.

El análisis univariado de categorías de edad y peso de los bebés es demostrativa de la ubicación hospitalaria de la cual se tomaron las muestras: pacientes recién nacidos y lactantes tempranos, hospitalizados en la Unidad de Recién Nacidos, que al ser una unidad de intervenciones complejas, propicia tiempos de estancia prolongados de los bebés, asociados a intervenciones médicas adicionales para el mantenimiento de condiciones estándares, como uso de sucedáneos de la lactancia materna, por lo cual la variable de peso puede estar influenciada por factores de confusión.

La pregunta central de la cual se deriva esta investigación indagaba la presencia del metabolito AFM1 en la leche materna de una muestra tomada de un lactario de la ciudad de Bogotá, encontrándose una mediana de 2.9 ng/l, sin embargo al organizar los datos el valor central se encuentra en 2.9 ng/l, y una D.E valorada en 4.89 ng/l mostrándonos una dispersión considerable de los datos con un dato mínimo de 0.0 ng/l y el valor máximo encontrado de 18.5 ng/l, lo que puede estar en relación con el tamaño de la muestra.

La determinación de la prevalencia de niveles de AFM1 en leche materna encontró que el 90% de las muestras tenía niveles cuantificables de AFM1, el 75% de las muestras de leche materna tiene niveles superiores a 1.7 ng/l y el 50% de estas muestras tiene concentraciones mayores a 2.9 ng/l. Esto evidencia presencia de AFM1 en la mayoría de las muestras, por lo cual es claro que existe contaminación con AFs en los alimentos y además establece la utilidad de la cromatografía líquida de alta eficiencia para determinación de AFM1 y AFM2 en leche materna.

Cuando se realiza la comparación con estudios similares realizados en el mundo, se encuentra que la prevalencia de AFM1 en leche obtenida en este estudio (90%) es menor comparada con los resultados obtenidos en Emiratos Árabes, estudio en el que se hizo la determinación de AFM1 en leche materna por HPLC y se encontró una prevalencia de 92% (Abdulrazzaq et al. 2003), con la prevalencia de 98.1% de un estudio realizado en Iran, en el cual se recolectaron muestras de leche materna en 4 hospitales de la ciudad de Tehran durante mayo a septiembre de 2006 (Sadeghi et al. 2009) y con un estudio realizado en Turquía y que tuvo una prevalencia del 100% (Gürbay et al., 2009). La prevalencia fue mayor en comparación con estudios realizados en Turquía en madres lactantes voluntarias en el periodo comprendido entre diciembre de 2008 y abril de 2009, en el que el 24.6 % de las muestras fueron positivas con un rango entre 1.3 y 6.0 ng/l (Atasever et al., 2014), en Egipto en donde se detectaron niveles positivos de AFM1 en el 35.5% de las muestras (Polychronaki et al., 2006) y que en otro estudio realizado en Iran en el que se encontró una prevalencia de 22% en las muestras de leche materna provenientes de madres de zona rural (Mahdavi et al., 2010). Esto evidencia que la prevalencia obtenida en este estudio es alta y en algunos casos supera la prevalencia obtenida en investigaciones realizadas principalmente en países árabes no industrializados como Turquía, lo que indica que es importante evaluar la magnitud de la exposición a AFs en Colombia y el impacto que esta puede tener en salud pública.

Aunque las concentraciones de AFM1 no son tan altas, debe tenerse en cuenta que la leche materna es el alimento recomendado por la Organización Mundial de la Salud para la alimentación de los recién nacidos hasta los 2 años y la presencia de AFs podría generar alteraciones celulares acumulativas que deriven en aumento de hepatocarcinoma y de otras enfermedades en la vida adulta, dado que los lactantes no han desarrollado completamente el complejo enzimático citocromo P450 y por tanto los

procesos de detoxificación no han sido completados, permitiendo mayores daños comparativamente con los adultos (Bbosa et al., 2010; Portha et al., 2014). Y dado que la AFB1 y la AFM1 están identificadas como agentes carcinogénicos, mutagénicos y genotóxicos, no es posible establecer un valor de referencia toxicológica en leche materna por debajo del cual no se induzca efectos adversos.

En esta investigación se exploraron los patrones de consumo de alimentos que pudieran estar potencialmente contaminados con AFB1 en las mujeres participantes en el estudio. Al aplicar el instrumento que exploraba el consumo de alimentos potencialmente contaminados con AFs en los tres días anteriores a la toma de la muestra se encontró que esta muestra poblacional tenía una baja ingesta de semillas y frutos secos como el maní, nueces y almendras, probablemente relacionado con el costo que presentan estos productos y en algunos casos con su accesibilidad. En cuanto al consumo de cereales y sus derivados, se puede ver como el arroz es un elemento esencial de la dieta de la muestra seleccionada, encontrando que el 94% había consumido alguna ración de arroz, seguido del consumo de trigo representado en productos como el pan, la pasta y las arepas que habla sobre la importancia del control de los niveles de AFs en productos de consumo usual.

En el caso del centeno y las arepas de maíz, estos alimentos fueron incluidos debido a que está documentado en la literatura que son susceptibles de sufrir contaminación con AFs, sin embargo ninguna mujer reportó consumo de centeno y tortillas de maíz. En el caso del centeno esto puede deberse a que no hace parte de la dieta base de los colombiano y también a la forma como se planteó la pregunta durante la entrevista, ya que se indagó de forma exclusiva por este cereal y en la mayoría de los casos el centeno se consume como parte de otros alimentos, por ejemplo alimentos integrales. En cuanto a la arepa de maíz se considera que en la población objeto de estudio este alimento no es de consumo usual. Esto puede ser debido a la procedencia de las mujeres, ya que en Colombia este tipo de arepas es mayormente consumido en la zona cafetera (maíz amarillo dulce), en Boyacá (maíz amarillo) y en Santander (maíz amarillo descascarado con cenizas).

El análisis bivariado permite realizar hipótesis sobre la relación entre factores independientes y dependientes y los niveles de AFM1 hallados, es así como se observa

que la mediana de los niveles de AFM1 es mayor en las muestras de leche materna recolectada en pacientes que se encuentran en el rango de edad entre 19 a 22 años, adicionalmente en este rango de edad fue donde se encontró el nivel más alto de AFM1 reportado dentro de todas las muestras. Se considera que esto puede ser consecuencia del muestreo y no necesariamente significa que la concentración de AFM1 sea mayor en esta categoría etárea.

Valorar la relación entre peso del bebe y las concentraciones de AFM1 no provee mayor información dada la cantidad de variables de confusión que puede presentarse por ser un medio controlado asociado a intervenciones médicas. Se destaca que en la categorización de 2300 a 2799 g se presentan niveles de AFM1 mayores a la mediana poblacional, siendo este el tercer grupo en tamaño (n=8). Se puede inferir que en esta muestra la variable de peso no podría relacionarse estrictamente con los niveles de AFM1, por lo cual se debería plantear seguimientos a curvas pondoestaturales de los lactantes, para determinar si aislando las variables de confusión, niveles altos de AFM1 en leche materna, se correlaciona con un impacto en el crecimiento y desarrollo de estos bebes y si este impacto es cuantificable y demostrable.

Anteriormente en la discusión de los resultados, se había planteado como el estrato socio-económico puede ser un factor predisponente para el consumo de alimentos contaminados con AFs. Esto se representa nuevamente en los resultados bivariados que relacionan estas variables, presentándose la mediana más alta de concentración de AFM1 en las muestras de madres que provenían de estrato 1.

Se encontró que el nivel educativo y la concentración de AFM1 no se relacionan, ya que madres con estudios completos de primaria tuvieron niveles de AFM1 menores comparativamente con madres con bachillerato incompleto o completo, sin embargo si se observa que estos niveles fueron inferiores en madres que tenían estudios universitarios y técnicos.

Al observar las relaciones entre AFM1 y el área de procedencia, se encuentra que los mayores niveles se presentaron en el área rural con una mediana de 3.25 ng/l en comparación con la zona urbana con una mediana de 2.75 ng/l. Los resultados están en concordancia con los obtenidos en otros estudios (Mahdavi et al., 2010), dónde se

encuentran concentraciones más altas de aflatoxina en las muestras de madres procedentes de zonas rurales. Esto podría sugerir que por las condiciones socio-económicas de la muestra hay una exposición mayor a factores que aumentan la incidencia de contaminación de los alimentos por AFs, así como menores posibilidades de acceder a alimentos de calidad, por tanto debe indagarse en futuros estudios cuales son las condiciones de cultivo, cosecha, almacenamiento y distribución de los alimentos para identificar los factores que predisponen a este tipo de contaminación.

Debido a que la mayor parte de las madres participantes del estudio son jóvenes, la categorización de madres con uno y dos hijos son las más prevalentes. Sin embargo se encontró que la mediana de las concentraciones de AFM1 fue más elevada en madres con tres hijos.

Para analizar el patrón de consumo de los alimentos, se realizó el estudio individual por alimento, sin embargo se debe tener en cuenta que el consumo de estos alimentos no fue mutuamente excluyente. Se encuentra que el arroz es el alimento que se consumió con mayor frecuencia, 47 mujeres reportaron haber consumido al menos una ración, lo que corresponde a un 94%. En el caso de las muestras positivas con una concentración de AFM1 por encima del percentil 75, el 100% de las mujeres reportó consumo de al menos una ración de este cereal. En lo referente a los alimentos derivados de la harina de trigo, en las mujeres que reportaron el consumo de al menos una ración de pasta se encontró una mediana de 3.1 ng/l y en las que reportaron el consumo de al menos una ración de arepa de trigo la mediana fue de 3.1 ng/l. Dada la frecuencia de consumo es importante realizar controles más estrictos a los niveles de AFs en estos alimentos que generalmente son la base de la alimentación de muchas familias colombianas.

La estadística descriptiva encontrada para las semillas y frutos secos muestra como las almendras a pesar de ser un alimento poco consumido por las participantes del estudio, si presentó concentraciones positivas para AFM1 en aquellas que reportaron un consumo de 1 a 2 raciones, siendo la concentración más alta encontrada 3.1 ng/l en la mujer que reporto consumo de dos raciones. En cuanto al maní, se encontró que 14 mujeres habían consumido alguna ración en los últimos tres días. En las 10 mujeres que reportaron consumo de una ración se encontró una de las concentraciones más altas del estudio con un resultado de 15.4 ng/l y una mediana en este rango de consumo de 2.25

ng/l. Dos mujeres consumieron cuatro raciones con una mediana de 2.55 ng/l. Es importante tener en cuenta que el maní es uno de los productos que usualmente se comercializa de forma informal, sin tener estándares de calidad mínimos ni en su producción, empaquetamiento, ni almacenaje, probablemente estas condiciones se relacionen con la presencia elevada de concentraciones de AFM1 en los resultados; no obstante se considera necesario hacer estudios de contaminación con AFB1 en este tipo de alimento en particular.

En Colombia el maíz se cultiva en diferentes regiones durante todo el año, el maíz amarillo es uno de los alimentos más consumidos por los colombianos con un consumo aparente de 1.580.620 toneladas al año (FENALCE, 2011) y es un alimento que presenta mayor susceptibilidad de ser contaminado con aflatoxinas debido a los rangos de temperatura que requiere para su crecimiento, a los daños mecánicos que puede sufrir durante los procesos de recolección y que alteran la calidad física del grano de recolección y a las condiciones de humedad durante el almacenamiento que aumenta la producción de AFs (Groopman et al., 2008). Es de resaltar que la arepa es el alimento derivado del maíz, con mayor consumo por la población colombiana. La arepa de maíz es un alimento étnico de consumo diario en gran parte del territorio nacional, elaborada a partir de la masa de maíz blanca, amarilla, o mezcla de ambas previamente cocida mezclada con otros ingredientes (ICONTEC, 2007). Según la ENSIN (Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010) estima que el 76.1% de la población consume pan, galleta o pasta diariamente, lo que evidencia que en la población colombiana el consumo de arepa es usual. El presente estudio se encontró que las mujeres que consumieron al menos una ración de maíz presentaron una mediana de 2.95 ng/l y las mujeres que reportaron el consumo de al menos una ración de arepa de maíz presentaron una mediana de 2.7 ng/l. Esto puede ser debido a que exista contaminación en la materia prima con que se elabora la arepa y a que en el país además de la producción industrial, existe elaboración artesanal en la cual no hay procesos de producción estandarizados y en algunas ocasiones no se implementan medidas de control. Debido al alto consumo de este cereal y a las concentraciones de AFM1 encontradas se considera pertinente establecer medidas de control y monitorización de niveles de AFB1 en el maíz y en productos derivados del maíz.

Finalmente, se realizó la estadística descriptiva de las principales características sociales, demográficas y de los patrones de consumo de las mujeres que presentaron concentraciones de AFM1 en leche por encima del percentil 75. El promedio de edad fue de 25.6 ng/l, por lo que se trata de mujeres jóvenes cuya escolaridad principalmente es primaria y bachillerato incompleto, quienes pertenecen a los estratos 1 y 2, viven en su mayoría en zonas urbanas de la ciudad de Bogotá y tienen entre 1 y 2 hijos. En este sentido la caracterización de esta población es similar a la descrita del total de las mujeres.

En Colombia se han realizado estudios en alimentos destinados para el consumo humano y animal que demuestran que existe riesgo de exposición a AFs. Se ha evidenciado presencia de *Aspergillus* spp. en alimentos para consumo animal en el cual 24 de 50 aislamientos correspondieron con *Aspergillus* aflatoxigénico. Esto muestra la presencia de cepas altamente tóxicas en Colombia (Díaz et al., 2009). Otro estudio realizado en alimentos seleccionados destinados a consumo humano para determinar la ocurrencia de AFs encontró que 14 de 109 muestras de maíz y productos derivados del maíz, 4 de 40 muestras de arroz, 2 de 30 muestras de legumbres, y 2 de 11 muestras de cereales para el desayuno se encontraban contaminadas con aflatoxinas y que 12 del total de 22 muestras positivas tenía concentraciones por encima del nivel máximo tolerable de AFB1 en la mayoría de países (5 ng/g). Estos resultados indican que la contaminación con AFB1 en ciertos alimentos en Colombia es un problema de salud pública (Díaz en al. 2001). La presente investigación es el primer reporte de exposición a AFB1 y AFM1 en mujeres y lactantes y demuestra una alta prevaencia de AFM1 en leche materna, lo que a su vez indica que existe exposición a AFB1 por medio del consumo de alimentos contaminados, por lo que se consideró importante realizar una aproximación al consumo de alimentos potencialmente contaminados.

Al realizar la caracterización de los patrones de consumo se evidencia que el arroz fue el alimento más consumido, reportando consumo de al menos 1 ración en el 100% de las muestras y de éstas la mayoría reportó consumo de 3 raciones en las últimas 72 horas. Seguido por los derivados de la haría de trigo entre los que se destacan el pan y la pasta y los derivados del maíz con un consumo preponderante de la arepa de maíz. Otros alimentos consumidos con relativa frecuencia fueron el maní y la avena. Sin embargo hay que tener en cuenta que el consumo de estos alimentos no fue exclusivo, la mayoría de

las mujeres consumió al menos una ración de tres alimentos diferentes en las últimas 72 horas y al identificarse las combinaciones más frecuentes se encontraron el pan, la pasta y el arroz y el arroz y el pan. Esto es una aproximación a los patrones de consumo de alimentos potencialmente contaminados, no son datos exactos debido al tamaño de la muestra y al instrumento diseñado para la recolección de la información. Con base en estos resultados puede ser necesario enfocar próximas investigaciones sobre contaminación con aflatoxinas en alimentos para consumo humano en Colombia en el arroz, los derivados de la haría de trigo (pasta y arepa), el maíz y el maní, así mismo estos alimentos y materias primas deberían ser objeto de estricta regulación y control.

6.2 Limitaciones del Estudio

El estudio que se planteó dentro de una metodología observacional y cuyo objetivo fue determinar la prevalencia y niveles de AFM1 en muestras de leche materna mediante la determinación por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) fue cumplido, sin embargo se encontró una limitación con respecto al tamaño y características de la muestra. El tamaño de muestra fue pequeño, considerando las múltiples variables asociadas que pueden determinar la presencia de AFM1. Del mismo modo la homogenización de los individuos, debido a su procedencia y sus características sociodemográficas no permitió realizar una extrapolación mayor de los resultados, dado que estos solo pueden ser aplicados al contexto específico de los pacientes.

Una limitación relevante que presentó esta investigación se relaciona con los datos obtenidos a través del cuestionario sobre ingesta de alimentos, ya que se trata de un instrumento puramente descriptivo, con alta tendencia a la subjetivación principalmente del tipo de alimento, su composición, ingredientes, preparación y el número de raciones consumidas, no controla las variables de confusión y puede presentarse sesgo de memoria.

Debido principalmente a la disponibilidad de presupuesto se escogió un tipo de estudio que no permitió hacer correlaciones o asociaciones entre los niveles de AFs encontrados y el consumo de alimentos potencialmente contaminados. Así mismo por ser un estudio de corte transversal no se hizo seguimiento a las mujeres o los lactantes lo que hubiera podido arrojar otro tipo de información importante.

6.3 Recomendaciones

Partiendo de las limitaciones de este estudio se sugiere a los investigadores que aborden esta problemática, primero: la necesidad de contar con una muestra de mayor tamaño que permita encontrar y determinar el peso de factores y variables que contribuyen a detectar concentraciones positivas de AFM1 en leche materna. Además un tamaño muestral mayor permitirá que se incluya diferentes características individuales y demográficas que impacten en los resultados, lo cual redundará en la posibilidad de extrapolar los mismos en una población más grande y más diversa. En este mismo sentido los estudios relacionados deberán procurar ser realizados a través de un muestreo poblacional a través de estudios multicentricos analíticos, incluyendo muestras provenientes tanto de centros de alta complejidad, de baja complejidad, ambulatorios y realizar aleatorización de las muestras con el fin obtener diversificación de las características de los participantes.

Se sugiere además que se estandaricen las condiciones de seguimiento de los patrones nutricionales de los participantes, con el fin de poder objetivizar aquellos alimentos implicados directamente con las concentraciones de AFM1, de forma que se limiten los factores que produzcan confusión en los resultados. De esta forma se podrá calcular medidas de asociación y la fuerza de tal asociación entre concentraciones de AFM1 y alimentos contaminados con este tipo de sustancias.

Se propone que en una futura investigación se realice un seguimiento prolongado a la cohorte muestral que presente concentraciones de AFM1 y que adicionalmente se tomen muestras de alimentos consumidos por los individuos y de otras matrices biológicas para realizar una mejor caracterización de la exposición.

En referencia los alimentos potencialmente contaminados con aflatoxinas se recomienda hacer estudios de monitoreo en maíz, teniendo en cuenta las diferentes etapas de producción en las que puede presentarse contaminación como son el almacenamiento, transporte y distribución del grano y las condiciones que pueden favorecer el crecimiento de aflatoxinas: temperatura, humedad relativa, aireación, tiempo y las BPM (buenas prácticas de manufactura). También se recomienda hacer estudios de monitorización de AFB1 y otras micotoxinas en maní, haciendo la comparación entre la producción

artesanal e industrial para determinar si existe un mayor riesgo de contaminación y por ende para la salud en el maní que se produce y comercializa de forma no industrial.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con este estudio, se considera que se requiere realizar estudios de características metodológicas que permitan realizar comparaciones entre poblaciones expuesta y no expuesta para determinar desenlaces relacionados en salud y su impacto en la población.

Por último se sugiere explorar otros biomarcadores de exposición en sangre y orina para poder identificar una población más grande y diversa expuesta a aflatoxinas.

7. Conclusiones

La importancia de este trabajo de investigación radica en la cuantificación de los niveles de AFM1 en muestras de leche materna como biomarcador de exposición a AFB1, uno de los agentes cancerígenos más potentes que se conocen. En Colombia se han realizado previamente estudios de exposición a AFs, sin embargo, estos evaluaron la presencia del contaminante en alimento, es la primera vez que se determinan metabolitos en matrices biológicas en humanos evidenciándose concentraciones positivas de AFM1 en el 90% de las muestras, lo que indica que la mayoría de las mujeres objeto del estudio estuvieron expuestas a AFB1.

El método de determinación de AFM1 y AFM2 en leche materna por columna de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplado a un detector de fluorescencia es apropiado y cumple los propósitos para los que fue empleado. Por esta razón puede ser utilizado en futuros estudios de investigación cuyo propósito sea evaluar la exposición a AFB1 mediante la determinación de AFM1,

El presente estudio demuestra una alta prevalencia de AFM1 en leche materna e indica exposición a AFB1. La exposición a AFB1 tiene efectos adversos en la madre, en el feto y más adelante en el lactante, esta exposición se considera entonces de gran importancia en salud pública debido a que es silenciosa y permanente desde muy temprano en la vida, resultado en procesos de enfermedad con alta mortalidad como el CHC. Adicionalmente, este trabajo fue desarrollo antes de que se aprobara la nueva legislación colombiana para contaminantes en alimentos, por lo cual los datos obtenidos son relevantes para futuras investigaciones y cuando se decida monitorizar el impacto alcanzado por la implementación de la nueva normatividad.

Con el fin de proteger la salud pública, muchos países alrededor del mundo han establecido niveles máximos tolerables de AFs en los alimentos como parte de una política integral de seguridad alimentaria, que incluye la monitorización de estos contaminantes en los alimentos y la realización de estudios para evaluar la exposición en

seres humanos. Según los resultados obtenidos en este estudio, los alimentos susceptibles de sufrir contaminación con AFs mayormente consumidos por la población objeto de estudios son la arepa de maíz, el arroz y los derivados de la harina de trigo, por ende se considera necesario que los diversos actores involucrados en garantizar la inocuidad de los alimentos enfoquen sus esfuerzos en la monitorización de este tipo de productos.

Alimentos como el maní deben ser tenidos en cuenta para futuros estudios de exposición. En esta investigación se encontraron medianas más altas en mujeres que afirmaron haber consumido al menos dos raciones de este alimento y deben tenerse en cuenta las características particulares de elaboración y comercialización que se presentan en nuestro país como por ejemplo la elaboración casera y la distribución y venta en la calle.

Las aflatoxinas son un problema presente y continuarán siéndolo en el futuro debido al incremento global de la población y a la necesidad de maximizar la producción de alimentos, lo que puede ocasionar detrimento de los métodos de cosecha, producción y almacenamiento. Al aplicarse el cuestionario de ingesta de alimentos potencialmente contaminados y al explicar a las mujeres el objeto del estudio, se evidencia que ninguna tenía conocimiento sobre la existencia de las AFs y los efectos de estas en salud, tampoco se tiene una cultura sobre la importancia de la seguridad alimentaria y no se reconoce la inocuidad de alimentos como un derecho que puede ser exigido por los ciudadanos de un país, por lo que se hace necesario sensibilizar a los consumidores sobre la importancia y los efectos adversos de estas toxinas.

Por último se requieren investigaciones posteriores para determinar la presencia de metabolitos de AFB1 en otros fluidos biológicos, así como en poblaciones vulnerables del país, especialmente poblaciones de áreas rurales y de zonas geográficas con humedad relativa elevada que favorece la contaminación como la Amazonía, para generar mucha más información sobre la exposición en un País donde la monitorización de micotoxinas es poco frecuente debido a que la legislación ha sido recientemente aprobada.

A. Anexo: Cuestionario

CUESTIONARIO PARA DONANTES DE LECHE MATERNA

Determinación de niveles de aflatoxina M₁ en muestras leche materna recolectadas en lactarios y Hospitales de Bogotá y su correlación con el consumo de alimentos contaminados.

CONFIDENCIAL

FECHA:

COD:

LUGAR DE LA ENTREVISTA:

Sección 1. Información Personal

Nombre:

Edad:

Estrato:

Escolaridad:

Residencia (especificar si es zona rural o urbana), Localidad:

Sección 2. Antecedentes Médicos

1. Ginecológicos (especifique paridad):
2. Asistió a controles prenatales durante el último embarazo (si la respuesta es positiva, indique a cuántos):
3. El embarazo fue normal:
4. Si la respuesta a la pregunta 3 es negativa explique el porqué:

5. ¿Durante el embarazo le hicieron exámenes para diagnóstica Hepatitis B y VIH?
6. ¿Cuál fue el resultado?
7. ¿Le han diagnosticado paludismo o malaria?
8. ¿Sufre de alguna (otra) enfermedad?
9. ¿En el momento se encuentra consumiendo algún medicamento de forma constante?

Sección 3. Información sobre el Lactante

1. ¿Cuántos meses tiene su hijo?
2. ¿El parto fue en una institución de salud? ¿Fue normal?
3. ¿Le diagnosticaron bajo peso al nacer? (si lo recuerda especificar el peso)
4. ¿Cuál es el género del bebe?
5. ¿Cuánto pesa?
6. ¿En el momento se encuentra en buenas condiciones generales de salud?
7. Si la respuesta a la pregunta 6 es negativa especifique el porqué

Sección 4. Información sobre Lactancia

1. ¿Se encuentra amamantando a más de un bebe?
2. ¿La lactancia materna es exclusiva?
3. Si la respuesta 2 es negativa explique por qué y especifique los alimentos que está consumiendo él bebe
4. ¿Cada cuánto está alimentando al bebe?
5. ¿Cuánto tiempo se demora el bebe succionando cada vez?
6. ¿Lo amamanta de uno o de ambos senos?

Sección 5. Hábitos Alimenticios

Indague sobre el consumo de alimentos potencialmente contaminados con aflatoxinas en las 72 horas anteriores a la toma de la muestra. Para cada alimento se debe hacer una descripción sobre el mismo, e indicar el número de raciones consumidas por día y el total en el periodo estudiado.

INGESTA DE ALIMENTOS EN LAS 72 HORAS ANTERIORES A LA TOMA DE LA MUESTRA			
ALIMENTO	DESCRIPCION	RACIONES DÍA	RACIONES TOTALES
Maíz			
Alimentos derivados de maíz (arepas, tortillas)			
Alimentos derivados de la harina de trigo			

(pan, arepas, pasta)			
Arroz			
Otros cereales solos (avena, cebada, centeno)			
Combinación cereales (granola, cereales para el desayuno)			
Semillas oleaginosas (maní, almendras, nueces)			

B. Anexo: Importancia de la Lactancia Materna

RESUMEN INFORMATIVO SOBRE EL ESTUDIO DE LA LECHE MATERNA DE LA OMS

Se debe recalcar a las madres que de acuerdo con todos los estudios realizados la leche materna es el mejor alimento natural para los lactantes. Este estudio se realiza para determinar si existen niveles de AFM1 en leche materna. Está enmarcado dentro del esfuerzo internacional que se ha venido realizando desde hace varias décadas para combatir la exposición a este tipo de sustancias que son altamente tóxicas, como la aflatoxina B1, agente cancerígeno, cuya asociación con la aparición de carcinoma hepatocelular ha sido demostrada. Parte de estos esfuerzos han sido realizados por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), quienes aseguran que los países deben asumir el compromiso de garantizar una nutrición segura y sana para esta generación y las siguientes, alcanzando así la seguridad alimentaria para todos.

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos secundarios capaces de inducir efectos adversos en animales o humanos que las consumen. Las micotoxinas pueden ser producidas por los hongos en diferentes sustratos pero generalmente son producidas en granos y cereales comúnmente utilizados en nutrición humana y animal. Las aflatoxinas son el grupo de micotoxinas más tóxico que se conoce, siendo la más tóxica de estas la aflatoxina B1 (AFB1). Hembras lactantes que consumen AFB1 eliminan en la leche un metabolito hidroxilado de esta, conocido como aflatoxina M1 (AFM1). El nombre de este metabolito refleja su origen ya que la M proviene de la palabra inglesa "milk". La AFM1 conserva la toxicidad y carcinogenicidad de la AFB1 y es, por lo tanto, estrictamente regulada en diversos países.

Las aflatoxinas son una amenaza para la salud pública, por esto es importante realizar investigaciones que permitan la recolección de datos sobre las concentraciones de aflatoxinas en los alimentos y en la leche materna. Estos datos se han utilizado para evaluar los riesgos para la salud humana derivados de la exposición a este tipo de compuestos. Este estudio también promoverá la lactancia materna como la mejor alimentación para los lactantes, ya que será la base de posibles medidas para controlar la contaminación con aflatoxinas y disminuir las concentraciones en la leche materna. Esta acción coincide con la Estrategia Mundial para la Alimentación del Lactante y el Niño Pequeño, adoptada por la Asamblea Mundial de la Salud y el Consejo Ejecutivo de UNICEF en 2002.

Este tipo de estudio se ha realizado en diferentes regiones del mundo con el fin de apoyar y fortalecer, donde sea posible, la capacidad nacional de vigilancia y gestión racional de

micotoxinas en los alimentos. En el presente estudio participarán por lo menos 50 madres en cuya leche se analizara la presencia de AFM1. Los resultados con los nombres de las donantes, serán confidenciales y no figurarán en los resultados.

Se reitera que en el mundo se han seguido acumulando datos sobre los beneficios para la salud de la lactancia materna. En el conjunto de la población, se recomienda la lactancia materna exclusiva durante seis meses para la gran mayoría de los lactantes, seguida de lactancia materna y alimentos complementarios apropiados hasta los dos años o más.

WHO (2006) The International code of marketing of breast-milk substitutes. Frequently asked questions. Geneva, World Health Organization. ISBN 9241594292

C. Anexo: Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Certificado de consentimiento

He sido invitada a participar en el Estudio Mundial de la OMS sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes en la Leche Materna. Se me ha informado sobre el objetivo y los procedimientos del estudio, en síntesis

Objetivo del estudio

Las aflatoxinas son unas sustancias producidas por algunas clases especiales de hongos. Estas sustancias pueden ser detectadas en los alimentos, esto sucede porque durante el proceso de producción el hongo puede contaminar los alimentos. Muchas veces un alimento que contiene aflatoxinas no presenta cambios en su apariencia, color, olor o sabor, por lo que es necesario realizar pruebas en el laboratorio para determinar si hay contaminación. Cuando se consumen este tipo de alimentos el cuerpo los procesa y elimina. En el caso de una mujer que se encuentre lactando pueden detectarse parte de estas sustancias en la leche materna y eso es lo que queremos evaluar con este estudio. Se evaluará además el perfil de ácidos grasos presentes en la leche

Los datos científicos siguen demostrando los beneficios para la salud de la lactancia materna. Para la población general, se recomienda la lactancia materna exclusiva durante los primeros seis meses para la gran mayoría de los lactantes, y luego leche materna con los alimentos complementarios apropiados hasta los dos años o más.

Procedimientos

Se le solicita que proporcione una muestra de 100 ml de leche. La leche se puede extraer manualmente o con un sacaleche.

Riesgo y molestias

Puede sentir algunas molestias cuando extraiga la leche manualmente o con un sacaleche. Le daremos instrucciones acerca de cómo extraer la leche de ambas maneras. Ninguna de las preguntas que le formulemos será de naturaleza personal.

Confidencialidad

La información que se reúna para este proyecto de investigación será confidencial. La información sobre Ud. que se requiera para el estudio será guardada en un documento en el que no figurará su nombre sino un número. El nombre asociado al número asignado a cada documento será guardado en un lugar seguro y no será divulgado a nadie.

Aun si esta información se divulgara accidentalmente, su divulgación no tendría consecuencias importantes porque en los resultados no figurará su nombre sino un código. Además, sólo se informarán resultados promedio (medias) y no resultados individuales.

Participación voluntaria

Ud. no está obligada a participar en este estudio si no lo desea. La decisión de no participar no afectará en modo alguno la atención que recibe en este centro. Seguirá gozando de todos los beneficios, independientemente de cuál sea su decisión Ud. puede decidir dejar de participar en el estudio en cualquier momento que lo desee, si decide dejar de participar, no perderá ningún derecho como paciente de este centro. Su tratamiento en este centro no se verá afectado en modo alguno por su decisión.

Información de contacto

Si tiene alguna pregunta, puede formularla ahora o más adelante.

He leído atentamente la información precedente o me ha sido leída. Se me ha dado la posibilidad de formular preguntas sobre esta información y todas las preguntas que he formulado han sido respondidas de manera satisfactoria. Otorgo mi consentimiento voluntario para participar como sujeto de este estudio y comprendo que tengo derecho a retirarme del estudio hasta que mi muestra haya sido mezclada con otras. Si decido retirarme del estudio, entiendo que puedo hacerlo sin que esto afecte de manera alguna la atención médica que recibo. También otorgo mi consentimiento para que todo resto de muestra de leche no utilizado para el presente estudio pueda ser guardada para estudios similares que se realicen en el futuro.

Nombre de la madre participante (impreso)

Fecha y firma de la participante

_____/_____/____ (día/mes/año)

Si la participante es analfabeta o menor de edad

Nombre de un testigo independiente (impreso), fecha y firma del testigo

Nombre y fecha del representante legal (impreso), fecha y firma

(De ser posible, esta persona debe ser elegida por la participante, y no debe tener relación alguna con el equipo de investigación)

_____/_____/____ (día/mes/año)

Nombre del investigador (impreso)

Fecha y firma del investigador

_____/_____/____ (día/mes/año)

D. Anexo: Protocolo OMS

EXTRACCIÓN MANUAL DE LECHE MATERNA

Enséñele a la madre a hacerlo ella misma. No le extraiga usted la leche. Tóquela solamente para mostrarle lo que debe hacer y sea muy delicado al hacerlo.

Primero se deben lavar cuidadosamente las manos. Luego se lava el seno con jabón suave libre de contaminantes y se enjuaga con agua destilada.

Luego la madre procede a la extracción de la muestra, para esto debe:

-Sentarse o quedarse de pie cómodamente y mantener el recipiente cerca del pecho.

-Colocar el dedo pulgar sobre el pecho por ENCIMA del pezón y la areola, y el índice POR DEBAJO, opuesto al pulgar. Con los otros dedos sostiene el pecho.

-Presionar el pulgar y el índice ligeramente hacia adentro, hacia la pared torácica, evitando presionar demasiado lejos para no ir a bloquear los conductos de leche.

-Presionar el pecho que queda detrás del pezón y la areola entre el pulgar y el índice.

-Debe presionar los senos lactíferos que queden por debajo de la. A veces es posible sentir los senos lactíferos en un pecho lactante. Se siente como maní o como arvejas. Si la madre los puede sentir, debe presionar sobre ellos.

-Hacer presión y soltar, hacer presión y soltar. Esto no debe doler; si es así la técnica está equivocada. Puede que no salga leche al comienzo, pero después de hacer presión unas pocas veces la leche comienza a gotear, a lo cual pueden seguir “chorros” de leche si el reflejo de oxitocina es activo. Hacer presión en la areola de igual forma por los LADOS, para asegurarse que se está extrayendo leche de todos los segmentos del pecho.

-Evitar frotar o deslizar los dedos en la piel. El movimiento de los dedos se parece más al que se hace cuando le toman a uno las huellas digitales.

-Evitar apretar el pezón mismo. La presión o el estiramiento del pezón no pueden extraer la leche materna, como tampoco puede hacerlo el bebé succionando solamente del pezón.

-Extraer leche de un pecho durante por lo menos 3 a 5 minutos hasta cuando el flujo disminuya, luego “ordeñar” el otro lado, y luego repetir en los dos lados. La madre puede usar cualquiera de las manos en cualquiera de los pechos y cambiar cuando se canse.

Explíquese a la madre que la extracción adecuada de su leche toma entre 20 y 30 minutos. Es importante no tratar de extraer la leche en un tiempo más corto.

Durante la extracción el investigador sostiene el recipiente en el cual se va a recolectar la muestra, este debe ser un tubo de vidrio esterilizado con tapa rosca con capacidad para almacenar 100 mL, este debe estar debidamente etiquetado con el código que corresponde a la donante.

Si no se obtiene la cantidad de la muestra en una sola toma, la extracción puede repetirse dentro de un lapso de 24 horas. Se recolecta en el mismo recipiente.

El tiempo que debe pasar entre la lactancia del bebe y la toma de la muestra por el mismo seno es de 2 horas.

Cuando la recolección de los 100 mL se realiza en diferentes extracciones, estas pueden hacerse alternando la glándula mamaria.

WHO. 1993. Breastfeeding counselling: A training course. Participant's Manual

E. Anexo: Aprobación Comité de Ética

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGIA
MAESTRIA EN TOXICOLOGÍA

Bogotá D.C., Junio 27 de 2012
MT-237-12

Estudiante
MARLIB PALOMA SANCHEZ
Maestría en Toxicología
Facultad de Medicina

Apreciada Estudiante

Comendidamente me permito informarle que el Comité de Ética de la Facultad de Medicina en su reunión del día 21 de junio de 2012 acta No 82, dio su concepto aprobatorio del proyecto de tesis titulado, DETERMINACIÓN DE NIVELES DE AFLATOXINA M1 EN MUESTRAS LECHE MATERNA RECOLECTADAS EN LACTARIOS DE HOSPITALES DE BOGOTÁ Y SU CORRELACION CON EL CONSUMO DE ALIMENTOS POTENCIALMENTE CONTAMINADOS." Agradezco su atención a la presente

Se anexa copia de la comunicación CE-011

Cordialmente,

(Firma Ilegible)

Coordinador Académico
Programa Curricular Maestría en Toxicología
Departamento de Toxicología

Copia: Profesor Gonzalo Díaz - Director del proyecto

F. Anexo: Plan de Validación

Plan preparado por: (Nombre/ Cargo/ Dependencia)

Nombre: _____ Fecha: _____

Firma: -

Plan revisado por: (Nombre/ Cargo/ Dependencia)

Nombre: _____ Fecha: _____

Firma: -

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ISO/DIS 14501 IDF 171	PLAN	RESULTADO
<p>1.1. ¿Cuál es el objetivo final del método? <i>Adecuación al propósito: Es el grado en que la aplicabilidad de un método se ajusta a los criterios o requerimientos establecidos por el investigador, que hace uso de los informes o datos generados a través de un método de ensayo. Es la adaptación de un método para un fin previsto.</i></p> <p>¿Existen concentraciones máximas permitidas de aflatoxina M1 en la matriz que se va a utilizar?</p>	<p>Determinar los niveles de AF-M1 en muestras de leche materna, utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia.</p> <p>En la literatura científica no existen reportados niveles aflatoxina M1 en leche materna que se consideren normales.</p> <p>En leche de vaca para consumo humano el límite máximo permisible de</p>	

	AF-M1 es 0.5 ppb (Eaton y Groopman,1994) y 0,05 ppb en Europa	
1.2. ¿Es estable la AF-M1? ¿La AF-M1 sufre algún tipo de degradación en la leche?	<p>Es inestable a la exposición a luz ultravioleta en presencia de oxígeno, a pH extremos (< 3, > 10) y a agentes oxidantes (IARC, 2002). Deben tomarse las precauciones necesarias durante la manipulación de estándares y de las muestras para análisis.</p> <p>En leche materna la AF-M1 es estable por varios meses si se congela a -20°C (Polychronaki., et al, 2007). Se pueden almacenar indefinidamente a -72°C (Needham and Wang, 2002)</p> <p>Los datos que existen son para leche de vaca. Se considera que la concentración de la toxina no varía si se trata la leche con calor o, si se almacena congelada (JECFA, 2001)</p>	
1.3. Selectividad del método <i>La selectividad es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes. Estos interferentes normal o frecuentemente se encuentran en la matriz de interés.</i>	<p>El método debe ser capaz de detectar la aflatoxina M1 y distinguirla de otros compuestos presentes en la leche materna.</p> <p>Analizar por triplicado un mínimo de tres blanco de reactivos, tres blancos de leche materna y tres muestras o estándares de concentración conocida</p>	

	de AF-M1. Las interferencias deben separarse de la AF-M1 con una $R_s \geq 2$. En caso de sobre posición de picos interferentes se deben modificar las condiciones cromatográficas hasta lograr la separación.	
1.4. Rango Analítico	No hay establecidos rangos analíticos para AF-M1 en leche materna.	El target level es de 50 ppt
1.5. Linealidad <i>Es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar unos resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.</i>	<p>Se demuestra directamente mediante diluciones en serie de una solución estándar (Si se preparan las diferentes concentraciones utilizando diferentes pesos del estándar se puede introducir mayor error). Se deben usar como mínimo 5 puntos.</p> <p>La linealidad se evalúa mediante los estimadores de regresión lineal del gráfico: la pendiente (m), el coeficiente de correlación (r) y el punto de corte (intercepto) con el eje de las Y (L_0). Las concentraciones calculadas utilizando el método de regresión lineal deben estar dentro del 20% del valor teórico.</p> <p>Se debe determinar la desviación estándar de los factores de respuesta.</p> <p>Se debe determinar la linealidad de los estándares puros y la de los extractos</p>	Realizar una curva de calibración con 5 puntos

	de leche materna, para posteriormente comparar las ecuaciones de regresión.	
<p>1.6. Sensibilidad</p> <p><i>Es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito.</i></p>	<p>En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración. El valor de sensibilidad obtenido [m] debe permitir una adecuada discriminación del nivel más bajo del rango analítico</p>	
<p>1.7. Límite de detección</p> <p><i>Concentración o cantidad real del analito presente en el material objeto de análisis que llevará, con una probabilidad (1-β), a la conclusión de que la concentración o cantidad del analito es mayor en el material analizado que en el material testigo</i></p>	<p>Se recomienda para su cálculo por lo menos seis mediciones de blanco matriz, testigo reactivo o concentración estimada cercana al blanco.</p> <p>Se realiza según el método de la EPA. Para esto se evalúan 8 estándares a una misma concentración</p>	
<p>1.8. Límite de cuantificación</p> <p><i>Una característica del funcionamiento del método que suele expresarse como señal del valor (verdadero) de la medición que producirá estimaciones con una desviación estándar relativa (RSD) generalmente de 10 %</i></p>	<p>El LOQ se calcula mediante la siguiente fórmula: $LOQ = 10 S_0$ de una señal cercana al LOD</p>	
<p>1.9. Exactitud</p> <p><i>Grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia.</i></p>	<p>Usualmente se reporta como el porcentaje de recuperación alcanzado utilizando el método analítico. Se recomienda evaluar un mínimo de 9 determinaciones a tres niveles de</p>	

	concentración, por triplicado (Chan et al., 2004). Se realiza a concentraciones de 25, 50 y 100 ppb por triplicado en muestras naturalmente contaminadas	
<p>1.10. Precisión</p> <p><i>Expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas obtenidas de ensayos individuales cuando el método se aplica a múltiples alícuotas de una muestra homogénea bajo condiciones establecidas</i></p>	<p>La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar relativa (RSD). Para cada concentración determinada el RSD debe ser $\leq 25\%$ para la repetibilidad (r) y $\leq 40\%$ para la reproducibilidad (R). La precisión debe estudiarse sobre:</p> <ul style="list-style-type: none"> -El sistema (evaluando la dispersión de la menos 6 inyecciones del estándar) -El método (evaluando la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea) (Quattrocchi et al., 1992). 	
1.11. Técnicas Confirmatorias	Se realizará mediante la derivatización de la aflatoxina M1 con ácido trifluoroacético (Stubblefield , 1987)	
<p>1.12. Repetibilidad</p> <p><i>Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el</i></p>	Se refiere a la variación intra-laboratorio (precisión intermedia), realizada en días diferentes por diferente analista u utilizando equipos diferentes	

<i>mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo.</i>		
1.13. Reproducibilidad <i>Es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítem idénticos de análisis en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros.</i>	Se determinará como precisión intermedia. Dos analistas realizarán el ensayo en días diferentes y en equipos distintos Se refiere a la variación inter-laboratorios	
1.14. Robustez <i>Indica el grado de confiabilidad del método ante cambios deliberados de variables y parámetros; indica la fiabilidad del método en su uso normal</i>	Entre las condiciones analíticas que pueden afectar un método se encuentran: Analistas, equipos, solventes, composición de la fase móvil, temperatura, efecto del filtrado, columnas, estabilidad de la muestra, tiempo de extracción, flujo otros. Para esta determinación se aplica el Test de Youden y Steiner. Este procedimiento permite evaluar el efecto de siete variables con sólo ocho análisis de una muestra.	
1.15. Recuperación en Muestras Fortificadas	Ver numeral 1.9.	
1.16. Validación del método de ensayo realizado bajo las mismas condiciones de un ensayo real		
1.17. Criterio para el número de muestras válidas estadísticamente a	Se utilizará una carta de control	

ser analizadas		
1.18. ¿Cuál es el grado de accesibilidad de los datos del archivo de validación?	Los datos generados serán archivados en físico en un archivador destinado para tal fin y en forma digital en los computadores del Laboratorio de Toxicología.	
1.19. ¿Las modificaciones al método de ensayo han sido documentadas y archivadas en el archivo de validación?	Se deben documentar todos los cambios realizados al método e imprimir y guardar en forma digital la información pertinente a los cambios realizados, como cromatogramas, tablas y gráficos para incluirlas en el archivo de validación	
1.20. ¿Registro del procedimiento utilizado?	El plan de validación corresponde al registro del procedimiento utilizado para establecer las características de desempeño del método	
1.21. ¿El método utilizado es apropiado para el uso pretendido?	Se analizarán los datos obtenidos y se determinará si el método analítico es apropiado para determinar la presencia de AF-M1 en leche materna.	
1.22. Estimación de la incertidumbre	Se estimará como 2 veces la desviación estándar del método completo para muestras fortificadas. La incertidumbre debe ser <10%	

REFERENCIAS:

IARC (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 82: 1–556. PMID: 12687954

Polychronaki N, West RM, Turner PC, Amra H, Abdel-Wahhab M, Mykkanen H, El-Nezami H. 2007. A longitudinal assessment of aflatoxin M1 excretion in breast milk of selected Egyptian mothers. *Food and Chemical Toxicology* 45:1210–1215

JECFA (2001) Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food (WHO Food Additives Series No. 47), 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Geneva: International Program on Chemical Safety, World Health Organization

CC Chan, H Lam, YC Lee, XM Zhang. 2004. Analytical method validation and instrument performance verification. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

Quattrocchi O, Abelaira S, Laba R. 1992. Introducción a la HPLC: Aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro, Buenos Aires, Argentina.

Needham L and Wang R. 2002. Analytic Considerations for Measuring Environmental Chemicals in Breast Milk. *Environ Health Perspect*; 110(6):A317-24.

Eaton, D. L., and Groopman, J. D. (1994). In *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. Academic Press, Inc., San Diego, CA.

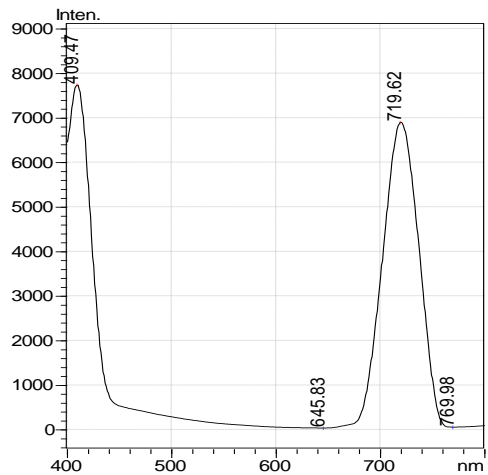
Stubblefield RD. 1987. Optimum conditions for formation of aflatoxin M1 trifluoroacetic acid derivative. J AOAC; 70: 1047-10.

G. Anexo Espectros

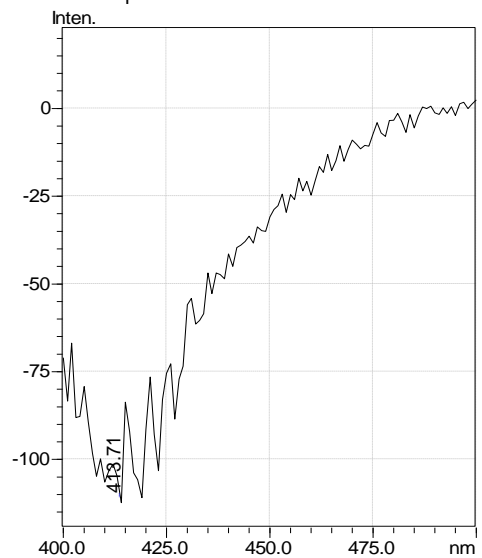
Septiembre 25 de 2012

Se realizaron 3 espectros, uno a la línea base, y otro al analito desconocido presente en las muestras procesadas, midiendo 50 µl de std de 200 ng/ml de AFM₁ llevando a un volumen final de 1000 µl con fase móvil, H₂O:CH₃CN: MeOH 50:30:20(v/v/v). Se inyectaron 10 µl, se mantuvo la longitud de onda de excitación en 360 nm el espectro se realizó en la respuesta de emisión entre 400 a 800 nm.

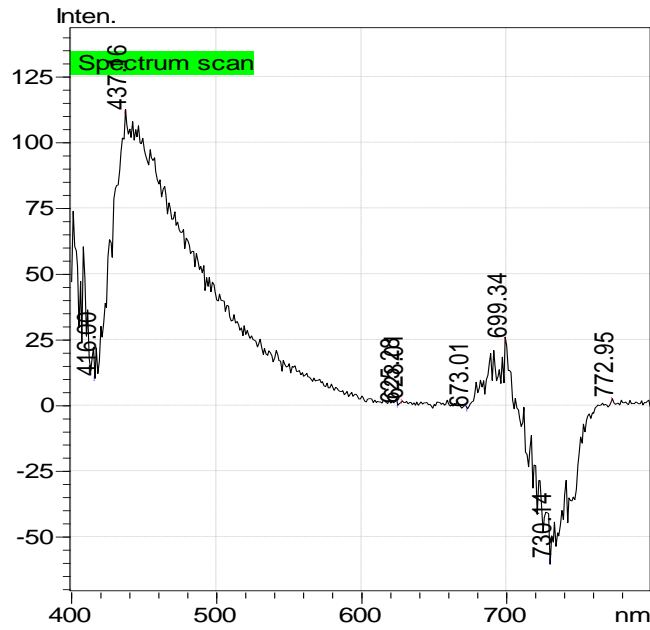
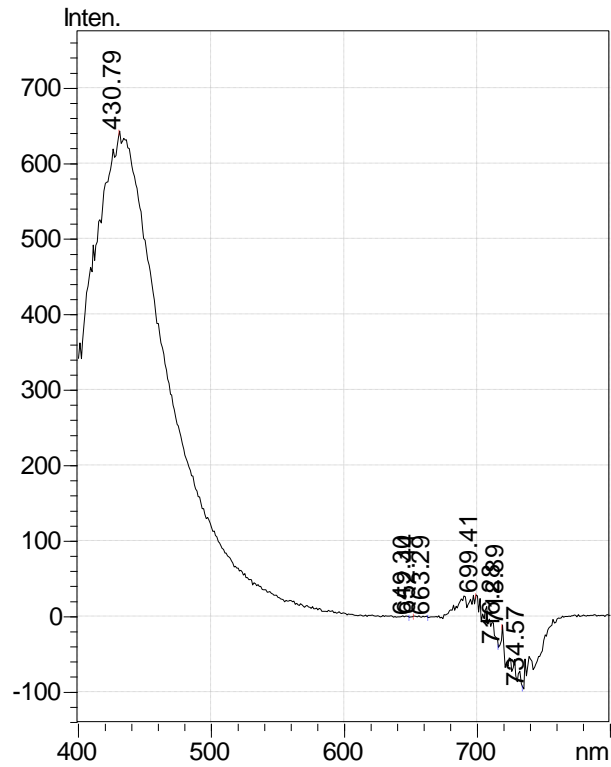
Espectro a línea base
BACKGROUND



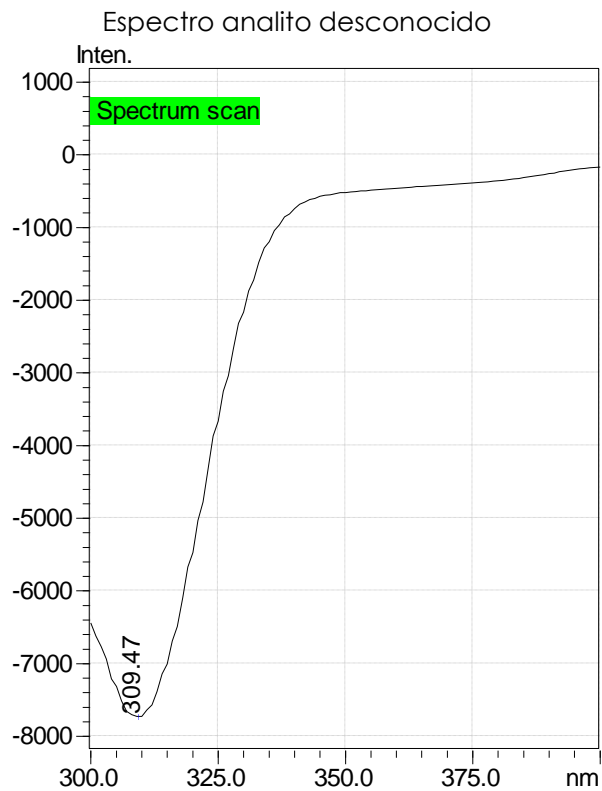
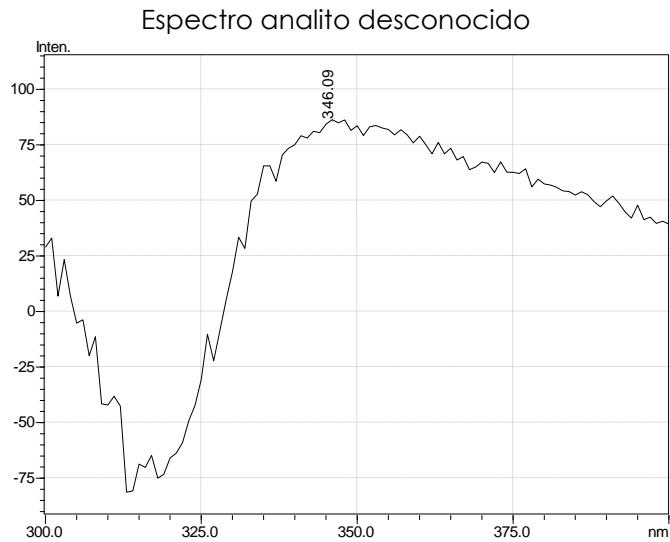
Espectro a fase móvil



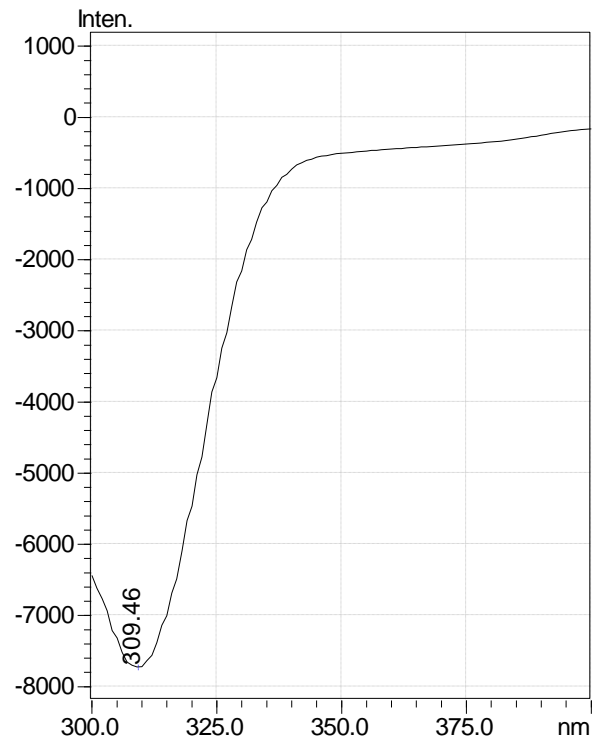
Espectro analito desconocido

Espectro Aflatoxina M₁

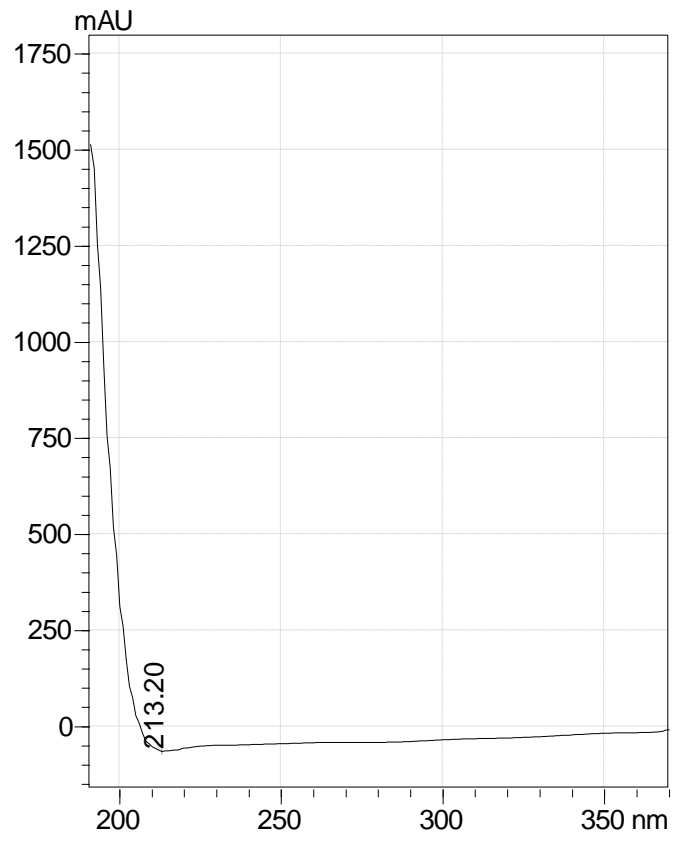
Se realizaron 3 espectros, uno a la línea base, y otro al analito desconocido presente en las muestras procesadas, midiendo 50 µl de std de 200 ng/ml de AFM₁ llevando a un volumen final de 1000 µl con fase móvil, H₂O:CH₃CN:MeOH 50:30:20(v/v/v). se inyectaron 10 µl, se mantuvo la longitud de onda de emisión en 430 nm el espectro se realizó en la respuesta de excitación entre 300 a 400 nm.



Espectro Aflatoxina M₁



Espectro Aflatoxina M₁



Bibliografía

Abdulrazzaq YM, Osman N, Yousif ZM, Al-Falahi S. Aflatoxin M1 in breast milk of UAE women. *Ann Trop Paediatr*. 2003; 23(3):173-9.

Alla EAMA, Aly SE, Neamat-Allah AA. Human exposure to mycotoxins in Egypt. *Mycotoxin Research*. 2002; 18:23–30.

Alm T, Elvevåg B. Ergotism in Norway. Part 1: The symptoms and their interpretation from the late Iron Age to the seventeenth century. *Hist Psychiatry*. 2013 Mar; 24(1):15-33.

Atasever M, Yildirim Y, Atasever M, Tastekin A. Assessment of aflatoxin M1 in maternal breast milk in Eastern Turkey. *Food Chem Toxicol*. 2014; 66:147-9.

Azziz-Baumgartner E, Lindblade K, Giesecker K, Schurz Rogers H, Kieszak S, Njapau H, Schleicher R, McCoy LF, Misore A, DeCock K, Rubin C, Slutsker L. Aflatoxin Investigative Group. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Env Health Perspect*. 2005; 113:1779–1783.

Bbosa G, Kitya D, Odda J, Ogwal-Okeng J. Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. *Health*. 2013; 5(10A):14-34

Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, Mathers C, Rivera J. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet*. 2008 Jan 19; 371(9608):243-60.

Blount, WP. Turkey "X" disease. *JBr. Turkey Fed*. 1961; 9: 55–58.

CAST. *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems*. Iowa, USA: Council for Agricultural Science and Technology; 2003. Report No. 139.

Caloni F, Stamatii A, Friggè G, D'Angelis I. Aflatoxin M1 absorption and cytotoxicity on human intestinal in vitro model. *Toxicon*. 2006; 47(4):409-15.

Carrillo L. *Los hongos de los alimentos y forrajes Argentina*. Buenos Aires: Editorial Universidad Nacional de Salta; 2003.

Choy WN. A review of the dose-response induction of DNA adducts by aflatoxin B1 and its implications to quantitative cancer-risk assessment. *Mutat Res*. Mar. 1993; 296(3):181-98.

Cigić IK, Prosen H. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *Int J Mol Sci*. 2009;10(1):62-115.

Creppy E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett*. 2002; 127(1-3):19-28.

Céspedes AE, Diaz GJ. Analysis of aflatoxins in poultry and pig feeds and feedstuffs used in Colombia. *J AOAC Int.* 1997; 80(6):1215-9.

CFS (Comité de seguridad alimentaria mundial). Marco estratégico mundial para la seguridad alimentaria y la nutrición - primera versión. Roma: CFS; 2012. Report No.: CFS 2012/39/5 [citado 2014 Ene 2]. Disponible en: <http://www.fao.org/cfs/cfs-home/global-strategic-framework/es/>

CFS (Comité de seguridad alimentaria mundial) [Internet]. [Roma]: Food and Agriculture Organization of the United Nations; [fecha desconocida]. About CFS; [citado 2014 Ene 12]. Disponible en: <http://www.fao.org/cfs/cfs-home/cfs-about/en/>

Codex Alimentarius: International Food Standards. [Internet]. [Roma]: Food and Agriculture Organization of the United Nations; [fecha desconocida]. About Codex; [actualizado 2 Ene 2014; citado 2014 Ene 18]. Disponible en: <http://www.codexalimentarius.org/about-codex/en/>

Cullen JM, Brown DL, Kissling GE, Foley JF, Rizzo J, Marion PL, Parron VI, French JE. Aflatoxin B1 and/or hepatitis B virus induced tumor spectrum in a genetically engineered hepatitis B virus expression and Trp53 haploinsufficient mouse model system for hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 2009; 37(3):333-42.

Denning DW, Quiapo SC, Altman DG, Makarananda K, Neal GE, Camallere EL, Morgan MRA, and Tupasi TE. Aflatoxin and outcome from acute lower respiratory infection in children in the Philippines. *Ann Trop Paediatr.* 1995; 15, 209 –216.

Dhanasekaran D, Shanmugapriya S, Thajuddin N, Panneerselvam A. Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. En: R. Guevara. *Aflatoxins: biochemistry and molecular biology.* Rijeka, Croacia: InTech; 2010. p. 221-254.

Diaz G, Murcia W. Biotransformation of Aflatoxin B1 and its relationship with the differential toxicological response to aflatoxin in commercial poultry species. En: R. Guevara. *Aflatoxins: biochemistry and molecular biology.* Rijeka, Croacia: InTech; 2010. p. 3-20.

Díaz G y Murcia H. 2011. Biotransformation of Aflatoxin B1 and Its relationship with the differential toxicological response to aflatoxin in commercial poultry species. [Internet] Rijeka, Croacia: InTech; 2011 [cited 2013 Nov 2]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-biochemistry-and-molecular-biology>

Diaz GJ, Lozano MC, Acuña A. Prevalence of *Aspergillus* species on selected Colombian animal feedstuff and ability of *Aspergillus* section *Flavi* to produce aflatoxins. *World Mycotoxin Journal.* 2009; 2 (1):31-34.

Diaz GJ, Espitia E. Occurrence of aflatoxin M1 in retail milk samples from Bogotá, Colombia *Food Addit Contam.* 2006; 23(8):811-5

Diaz GJ, Perilla NS y Espitia E. First Colombian interlaboratory study for the determination of aflatoxin B1 in yellow corn. *Mycotoxin Research.* 2004; 20:11-18

Diaz GJ, Perilla NS, Rojas Y. Occurrence of aflatoxins in selected Colombian foods. *Mycotoxin Res.* 2001; 17(1):15-20.

Diaz GJ, Murcia HW, Cepeda SM. Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of aflatoxin B1 in chickens and quail. *Poult Sci.* 2010; 89(11):2461-9.

Doull J, Borzelleca JF, Becker R, Daston G, DeSesso J, Fan A, Fenner-Crisp P, Holsapple M, Holson J, Craig Llewellyn G, MacGregor J, Seed J, Walls I, Woo YT, Olin S. Framework for use of toxicity screening tools in context-based decision-making. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(5):759-96.

El Nezami, H.S., Nicoletti, G., Neal, G.E., Donohue, D.C., Ahokas, J.T. Aflatoxin M1 in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food Chem. Toxicol.* 1995; 33, 173–179.

FAO. Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas. Roma, Italia. Department of Agriculture; 2003

FAO. [Internet]. [Roma]: Food and Agriculture Organization of the United Nations; [fecha desconocida]. A short history of FAO; [Citado 2014 Ene 12]. Disponible en: <http://www.fao.org/about/en/>

FAO. FAO Cereal Supply and Demand Brief. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013 [citado 2014 Ene 21]. Disponible en: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>

FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2004. Fao food and nutrition paper 81. [citado 2012 Nov 26]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5499e/y5499e00.pdf>

FENALCE. Caracterización del cultivo de maíz en Colombia. Colombia: Departamento de Información Económica y Estadística; 2011. [Citado 2014 Oct 26]. Disponible en: www.fenalce.org.co.

Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, Tuschl T. MicroRNAs in human cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2013;774: 1-20.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide 2012. [Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012. Cancer Bases; [citado 2014 Ene 12]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

Fink-Gremmels, J. Mycotoxins: their implications for human and animal health. *The Veterinary Quarterly.* 1999; 21(4):115-120.

Forgacs J, Carlll WT. Preliminary mycotoxic studies on hemorrhagic disease in poultry. *Vet. Med.* 1955; 50: 72.

Fryer M, Collins C, Ferrier H, Colvile R, Nieuwenhuijsen M. Human exposure modelling for chemical risk assessment: a review of current approaches and research and policy implications. *Environ. Sci. Policy*. 2006; 9: 261-274.

Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Gagliardi, L., Ciotti, S., Luisi, S., Bognanno, M., La Fauci, L., Lacopino, A.M., Nigro, F., Li Volti, G., Vanella, L., Giammanco, G., Tina, G.L., Gazzolo, D. Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. *Mol. Nutr. Food Res*. 2008; 52, 496–501.

Gong Y, Hounsa A, Egal S, Turner PC, Sutcliffe AE, Hall AJ, Cardwell K, Wild CP. Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired childgrowth: a longitudinal study in Benin, WestAfrica. *Environ Health Perspect*. 2004 Sep;112(13):1334-8.

Guengerich FP, Cai H, McMahon M, Hayes JD, Sutter TR, Groopman JD, Deng Z, Harris TM. Reduction of aflatoxin B1 dialdehyde by rat and human aldo-keto reductases. *Chem Res Toxicol*. 2001; 14(6):727-37.

Guengerich FP. Cytochrome P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity. *AAPS J*. 2006 Mar 10;8(1):E101-11.

Groopman JD, Johnson D, Kensler TW. Aflatoxin and hepatitis B virus biomarkers: a paradigm for complex environmental exposures and cancer risk. *Cancer Biomark*.2005; 1(1):5-14.

Groopman JD, Kensler TW, Wild CP. Protective interventions to prevent aflatoxin-induced carcinogenesis in developing countries. *Annu Rev Public Health*. 2008;29:187-203.

Gürbay A, Atasayar Sabuncuođlu S, Girgin G, Sahin G, S. Yig'it S, Yurdakök M, Tekinalp G. Exposure of newborns to aflatoxin M1 and B1 from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48:314–319

Hartley RD, Nesbitt BF y O'Kelly J. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*. 1963; 198: 1056-1058.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2005. 45:51–88

He XY, Tang L, Wang SL, Cai QS, Wang JS, Hong JY. Efficient activation of aflatoxin B1 by cytochrome P450 2A13, an enzyme predominantly expressed in human respiratory tract. *Int J Cancer*. 2006 Jun 1;118(11):2665-71.

Henry, S.H., Bosch, F.X., Troxell, T.C. and Bolger, P.M. Reducing liver cancer – global control of aflatoxin. *Science*. 1999; 286:2453-2454. (Pendiente bajarlo)

Hussein HS y Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on human and animals. *Toxicology*. 2001; 167(2):101-134.

IARC. Aflatoxins. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; 2003

IARC. Some traditional herbal medicines: Some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon, France: IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization; 2002. Volume 82. p.69.

IARC. Chemical agents and related occupations: A review of human carcinogens. Lyon: the International Agency for Research on Cancer; 2012. Volume 100 F

ICONTEC. Industrias alimentarias. Nivel máximo permitido de aflatoxinas en los alimentos. Bogotá D.C.: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC); 2006. I.C.S.: 01.100.30; 67.050.00

ICONTEC. Arepas de maíz refrigeradas. Especificaciones de producto. Bogotá D.C.: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC); 2007. NTC 5372.

INC-ESE Colombia [Internet]. Bogotá: INC; [fecha desconocida]. Cáncer en cifras; [citado 2014 Jul 12]. Disponible en:
<http://75.126.65.106/~incancer/instituto/content/estadisticas>.

ISO. Milk and milk powder- Determination of aflatoxin M1 content- Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography. Suiza: International Organization for Standardization; 1998. ISO 14501:1998(E)

Jaffar S, Grant AD, Whitworth PJ, Smith P, Y H, Whittle H. The natural history of HIV-1 and HIV-2 infections in adults in Africa: a literature review. Bull World Health Organ. 2004 Jun;82(6):462-9.

Jelinek CF, Pohland EA, and Wood GE. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds – An update. Journal of the AOAC International. 1998; 72: 223-230

Jiang Y, Jolly PE, Preko P, Wang JS, Ellis WO, Phillips TD, Williams JH. Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus disease. Clin Dev Immunol. 2008; 2008:790309

Joh RI, Palmieri CM, Hill IT, Motamedi M. Regulation of histone methylation by noncoding RNAs. Biochim Biophys Acta. 2014 Jun 17

Jonsyn FE, Maxwell SM, Hendrickse RG. Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. Mycopathologia. 1995; 131:121–126.

Jubert C, Mata J, Bench G, Dashwood R, Pereira C, Tracewell W, Turteltaub K, Williams D, Bailey G. Effects of chlorophyll and chlorophyllin on low-dose aflatoxin B(1) pharmacokinetics in human volunteers. Cancer Prev Res (Phila). 2009 Dec;2(12):1015-22.

Kensler T, Roebuck B, Wogan G, Groopman J. Aflatoxin: A 50-Year odyssey of mechanistic and translational toxicology. Toxicol Sci. 2010; 120 Suppl 1:S28-48. Epub 2010 Sep 29.

Khlangwiset P, Wu F. Costs and efficacy of public health interventions to reduce aflatoxin-induced human disease. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2010; 27(7):998-1014.

Khlangwiset P, Shephard GS, Wu F. Aflatoxins and growth impairment: A review. *Critical Reviews in Toxicology.* 2011 41(9): 740–755

Khlangwiset P, Wu F. Costs and efficacy of public health interventions to reduce aflatoxin-induced human disease. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2010;27(7):998-1014.

Kirk GD, Bah E, Montesano R. Molecular epidemiology of human liver cancer: insights into etiology, pathogenesis and prevention from The Gambia, West Africa. *Carcinogenesis.* 2006;27(10):2070-82.

Kew MC. Hepatocellular carcinoma in developing countries: Prevention, diagnosis and treatment. *World J Hepatol.* 2012 Mar 27;4(3):99-104.

Lamplugh SM, Hendrickse RG, Apeageyi F, Mwanmut DD. Aflatoxins in breast milk, neonatal cord blood, and serum of pregnant women. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1988 Apr 2; 296(6627):968.

Leeson S, Diaz GJ and Summers JD. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. Guelph, Ontario, Canada: University Books; 1995

Lima CS, Ribeiro LF, Herceg Z. The effects of diet on epigenetic processes. En: Tollefsbol T, editor. *Handbook of epigenetics.* Estados Unidos: Elsevier; 2011.p.449-58.

Liu Y, Wu F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ Health Perspect.* 2010 Jun;118(6):818-24.

Lv J, Yu YQ, Li SQ, Luo L, Wang Q. Aflatoxin B1 promotes cell growth and invasion in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through H19 and E2F1. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(6):2565-70.

Lovelady CA, Dewey KG, Picciano MF, Dermer A; Technical Workshop on Human Milk Surveillance and Research on Environmental Chemicals in the United States. Guidelines for collection of human milk samples for monitoring and research of environmental chemicals. *J Toxicol Environ Health A.* 2002; 65(22):1881-91.

McLean M, Dutton MF. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacol Ther.* 1995; 65(2):163-92.

Mahdavi R, Nikniaz L, Arefhosseini SR, Vahed Jabbari M. Determination of aflatoxin M1 in breast milk samples in Tabriz-Iran. *Matern Child Health J.* 2010; 14(1):141-5. Epub 2008 Dec 18.

Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol.* 2013 Oct; 60:218-37.

Marroquín-Cardona AG, Johnson NM, Phillips TD, Hayes AW. Mycotoxins in a changing global environment - A review. *Food Chem Toxicol.* 2014;69C:220-230

Martín JF, Casqueiro J y Liras P. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. *Curr Opin Microbiol.* 2005; 8: 282–293.

Mehrzaad J, Devriendt B, Baert K, Cox E. Aflatoxin B₁ interferes with the antigen-presenting capacity of porcine dendritic cells. *Toxicol In Vitro.* 2014 Jun;28(4):531-7

Ministerio Comercio Industria y Turismo. Guía práctica codex alimentarius Colombia. Bogotá: Asistencia técnica al comercio en Colombia; 2007. [Citado 2014 Ene 2]. Disponible en: http://www.foodsafety.com.co/pdf/memorias/2013/IA/10.Guia_Practica_Codex_Alimentarius_Colombia.pdf

Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución número 4506 de 2013. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2013. [Citado 2014 Oct 20]. Disponible en: <http://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/Resoluci%C3%B3n%204506%20de%202013.pdf>.

Mohamed E. Zain. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 2011, 15 (2): 129–144

Navas MC, Suarez I, Carreño A, Uribe D, Rios WA, Cortes-Mancera F, Martel G, Vieco B, Lozano D, Jimenez C, Gouas D, Osorio G, Hoyos S, Restrepo JC, Correa G, Jaramillo S, Lopez R, Bravo LE, Arbelaez MP, Scoazec JY, Abedi-Ardekani B, Santella RM, Chemin I, Hainaut P. Hepatitis B and Hepatitis C Infection Biomarkers and TP53 Mutations in Hepatocellular Carcinomas from Colombia. *Hepat Res Treat.* 2011;2011:582945. doi: 10.1155/2011/582945. Epub 2011 Oct 31.

Navas, S.A., Sabino, M., Rodriguez-Amaya, D.B. Aflatoxin M1 and ochratoxin A in a human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. *Food Addit. Contam.* 2005; 22,457–462

Neal GE, Eaton DL, Judah DJ, Verma A. Metabolism and toxicity of aflatoxins M1 and B1 in human-derived in vitro systems. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998; 151(1):152-158

Needham LL, Wang RY. 2002. Analytic considerations for measuring environmental chemicals in breast milk. *Environ Health Perspect.* 2002 Jun;110(6):A317-24.

Norma Técnica Colombiana NTC 3581. Industrias alimentarias: nivel máximo permitido de aflatoxinas en los alimentos. Bogotá, Colombia: ICONTEC Internacional; 2006

Nye MD, Fry RC, Hoyo C, Murphy SK. Investigating Epigenetic Effects of Prenatal Exposure to Toxic Metals in Newborns: Challenges and Benefits. *Med Epigenet.* 2014;2(1):53-59.

Organización Mundial del Comercio. Serie de acuerdos de la OMC: Medidas sanitarias y fitosanitarias. Ginebra: Secretaría de la OMC; 2005. [Citado 2014 Jan 2]. Disponible en: [http://www.aladi.org/nsfaladi/reuniones.nsf/b39ad25b5f3ed8860325792f0063916e/\\$FILE/Acuerdo%20MSF.pdf](http://www.aladi.org/nsfaladi/reuniones.nsf/b39ad25b5f3ed8860325792f0063916e/$FILE/Acuerdo%20MSF.pdf)

OMS. The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva: World Health Organization; 2008. [citado 2014 Ene 21]. Disponible en: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf?ua=1

OMS. WHO Global Strategy for Food Safety: safer food for better health. Food Safety Programme. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2002. [Citado 2012 Nov 26]. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/general/global_strategy/en/

OMS. Fourth WHO-Coordinated Survey of Human Milk for Persistent Organic Pollutants in Cooperation with UNEP: Guidelines for Developing a National Protocol. Geneva, Switzerland: Food Safety, Foodborne Diseases and Zoonoses Department, World Health Organization; 2007

Paterson RM, Lima N (a). Toxicology of mycotoxins. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. 2010; 31-63.

Paterson RM, Lima N (b). Mutagens manufactured in fungal culture may affect DNA/RNA of producing fungi. *J Appl Microbiol*. 2009; 106: 1070–1080

Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007 Jun; 28(6):622-9.

Pittet, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds - an updated review. *Revue Med. Vet*. 1998; 149(6): 479-492.

Pitt JI. Toxigenic fungi and mycotoxins. 2000 *Br Med Bull* 56 (1):184–192.

Polychronaki N1, C Turner P, Mykkänen H, Gong Y, Amra H, Abdel-Wahhab M, El-Nezami H. Determinants of aflatoxin M1 in breast milk in a selected group of Egyptian mothers. *Food Addit Contam*. 2006;23(7):700-8.

Portha B, Fournier A, Kioon MD, Mezger V, Movassat J. Early environmental factors, alteration of epigenetic marks and metabolic disease susceptibility. *Biochimie*. 2014;97:1-15.

Ravinayagam V, Jaganathan R, Panchanadham S, Palanivelu S. Potential Antioxidant Role of Tridham in Managing Oxidative Stress against Aflatoxin-B1-Induced Experimental Hepatocellular Carcinoma. *Int J Hepatol*. 2012; 2012:428373

Rawal S, Coulombe RA Jr. Metabolism of aflatoxin B1 in turkey liver microsomes: the relative roles of cytochromes P450 1A5 and 3A37. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011; 254(3):349-54. Epub 2011 May 18.

Saad AM, Abdelgadir AM, Moss MO. Exposure of infants to aflatoxin M1 from mothers' breast milk in Abu Dhabi, UAE. *Food Additives and Contaminants.* 2005; 12:255–261.

Sadeghi N, Oveisi M, Jannat B, Hajimahmoodi M, Bonyani H, Jannat F. Incidence of aflatoxin M1 in human breast milk in Tehran, Iran. *Food Control.* 2009;20(1):75–78.

Sancar A1, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004; 73:39-85.

Shen J1, Wang S, Zhang YJ, Kappil MA, Chen Wu H, Kibriya MG, Wang Q, Jasmine F, Ahsan H, Lee PH, Yu MW, Chen CJ, Santella RM. Genome-wide aberrant DNA methylation of microRNA host genes in hepatocellular carcinoma. *Epigenetics.* 2012 Nov;7(11):1230-7

Sherif SO, Salama EE, Abdel-Wahhab MA. Mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. *Int J Hyg Environ Health.* 2009; 212(4):347-68

Shirabe K, Toshima T, Taketomi A, Taguchi K, Yoshizumi T, Uchiyama H, Harimoto N, Kajiyama K, Egashira A, Maehara Y. Hepatic aflatoxin B1-DNA adducts and TP53 mutations in patients with hepatocellular carcinoma despite low exposure to aflatoxin B1 in southern Japan. *Liver Int.* 2011; 31(9):1366-72.

Shouman BO1, El Morsi D, Shabaan S, Abdel-Hamid AH, Mehrim A. Aflatoxin B1 level in relation to child's feeding and growth. *Indian J Pediatr.* 2012; 79(1):56-61.

Shuaib FM, Ehiri J, Abdullahi A, Williams JH, Jolly PE. 2010. Reproductive health effects of aflatoxins: a review of the literature. *Reprod Toxicol*; 29(3):262-70. Epub 2010 Jan 5.

Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 2002 ;56:365–379.

Sirot V, Fremy JM, Leblanc JC. Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study. *Food Chem Toxicol.* 2013; 52:1-11.

Stern MC, Umbach DM, Yu MC, London SJ, Zhang ZQ, Taylor JA. Hepatitis B, aflatoxin B1, and p53 codon 249 mutation in hepatocellular carcinomas from Guangxi, People's Republic of China, and a meta-analysis of existing studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10(6):617-25.

Stoev SD. Food safety and increasing hazard of mycotoxin occurrence in foods and feeds. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013; 53(9):887-901

Streit E, Naehrer K, Rodrigues I, Schatzmayr G. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *J Sci Food Agric*. 2013; 93(12):2892-9. doi: 10.1002/jsfa.6225. Epub 2013 Jun 26.

Strosnider H, Azziz-Baumgartner E, Banziger M, Bhat RV, Breiman R, Brune MN, DeCock K, Dilley A, Groopman J, Hell K, Henry SH, Jeffers D, Jolly C, Jolly P, Kibata GN, Lewis L, Liu X, Lubber G, McCoy L, Mensah P, Miraglia M, Misore A, Njapau H, Ong CN, Onsongo MT, Page SW, Park D, Patel M, Phillips T, Pineiro M, Pronczuk J, Rogers HS, Rubin C, Sabino M, Schaafsma A, Shephard G, Stroka J, Wild C, Williams JT, Wilson D. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environ Health Perspect*. 2006; 114 (12):1898–1903

Squire, R.A., 1981. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. *Science* 214 (4523), 877–880.

Sutandyo N. Nutritional Carcinogenesis. *Acta Med Indones*. 2010; 42(1):36-42.

Turconi G, Guarcello M, Livieri C, Comizzoli S, Maccarini L, Castellazzi AM, Pietri A, Piva G, Roggi C. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn. An epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). *European Journal of Nutrition*. 2004; 43:191–197.

Tollefsbol T, editor. Handbook of epigenetics. The new molecular and medical genetics. Estados Unidos: Elsevier; 2011.

Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Anal Chim Acta*. 2009 Jan 26; 632(2):168-80

Turner PC, Moore SE, Hall AJ, Prentice AM, Wild CP. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. *Environ Health Perspect*. 2003; 111(2):217-20.

Urrego J. Establecimiento de niveles reales de prevalencia y distribución por Aflatoxina y Ocratoxina A en cereales para consumo humano en Bogota. [Tesis (M Sc)]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2005.

Vereb H, Dietrich AM, Alfeeli B, and Agah M. The Possibilities Will Take Your Breath Away: Breath Analysis for Assessing Environmental Exposure. *Environ Sci Technol*. 2011; 45:8167–8175

WHO. 2008. The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva:World Health Organization. Available: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html [accessed 27 April 2010].

Wild CP, Turner PC. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*. 2002; 17(6):471-81.

Wild CP, Pionneau FA, Montesano R, Mutiro CF, Chetsanga CJ. Aflatoxin detected in human breast milk by immunoassay. *International Journal of Cancer*. 1987; 40:328–333

Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, et al. (2005) Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 80, 1106–1122

Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr*. 2004 Nov; 80(5):1106-22.

Wilson DM y Abramson D. *Storage of Cereal Grains and Their Products*. Fourth Edition. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists; 1992.

Wogan GN, Kensler TW, Groopman JD. Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma. A review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2012; 29(2):249-57.

Wu F, Khlangwiset P. Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin-reduction strategies in Africa: case studies in biocontrol and post-harvest interventions. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2010; 27(4):496-509. doi: 10.1080/19440040903437865.

Yarru LP, Settivari RS, Antoniou E, Ledoux DR, Rottinghaus GE. Toxicological and gene expression analysis of the impact of aflatoxin B1 on hepatic function of male broiler chicks. *Poult Sci*. 2009 Feb; 88(2):360-71.

Yates IE. Cytotoxicity and mutagenicity of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in *Photobacterium phosphoreum*. *J. Microbiol. Methods* 3 (3–4):181–186

Zavala Rafael. [Internet]. [Bogotá]: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura; [Abr 2013]. Aspectos principales de la cooperación de la FAO en Colombia; [citado 2014 Ene 12]. Disponible en: http://coin.fao.org/coin-static/cms/media/15/13649161521310/mensaje_faorep_abril_20132.pdf