

ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE AFLATOXINA B 1 Y CÁNCER DE PULMÓN

Omar C. Georggi (1) Juan C. Muño (2) Hilda Montrull (3)
Nilda Brizuela (3) Sebastián Avalos (4) Rene M. Gómez (5)

(1) Prof. Adj. Cátedra de Cirugía II - UA Cirugía H. Misericordia Fac. Cs. Médicas U.N.C.

(2) Jefe Serv. de Clín. Médica y Secc. de Alergia e Inmunología H. Misericordia.

(3) Cátedra de Farmacología Facultad de Cs. Médicas U.N.C.

(4) Jefe Serv. de Endoscopia del H. Tránsito Cáseres de Allende.

(5) Médico de la Sección Alergia e Inmunología - H. Misericordia

Resumen

La relación entre el cáncer de hígado y las aflatoxinas está bien demostrada. Los productos químicos genotóxicos reaccionan con el ADN tanto en forma directa o después de la activación metabólica para formar uniones; este es un paso esencial con respecto a la carcinogénesis química. La presencia y el número de uniones específicas al ADN provee una buena indicación de la exposición química y del daño genético resultante del contacto a carcinógenos y la proporción de los mismos que afectan la susceptibilidad para padecer cáncer. Un análisis de las uniones al ADN requiere metodología altamente sensible para detectar por lo menos una unión cada 109 nucleótidos normales. El método más confiable está basado en técnicas físico químicas como la cromatografía líquida de alta presión. (HPLC). Por otra parte la exposición por inhalación del carcinógeno AFB1 debe ser considerada como potencial inductora/productora de cáncer de pulmón. Así es que existen evidencias epidemiológicas circunstanciales que dicho compuesto produciría cáncer de pulmón. El propósito de esta investigación fue determinar la presencia de AFB1 en diferentes tipos de tabaco, a) Virginia de Jujuy, b) Brasileño y c) negro de Salta; así como en tejidos pulmonares obtenidos por biopsias de pacientes con cáncer de pulmón y bronquitis crónica.

Los pacientes se dividieron por sus manifestaciones clínicas en: pacientes afectados con cáncer de pulmón (n:25) y aquellos que presentaban bronquitis crónica (n:14). En el grupo con cáncer de pulmón la estirpe epidermoide se presentó en 23 de 25 cánceres

estudiados, todos ellos fumadores. Los otros 2 casos fueron adenocarcinoma, no fumadores. En los pacientes con bronquitis crónica se registraba el hábito de fumar en 12 de 14 casos.

La determinación de AFB1 fue positiva en los tres tipos de tabaco y negativa en diluyente de PBS. Las biopsias de los carcinomas de estirpe epidermoide fueron positivas en los 23 casos, con un nivel de 0.68 ± 0.82 mg/l. En los pacientes con adenocarcinoma (n:2) el resultado para AFB1 fue negativo, similar a los pacientes con bronquitis crónica (n:2) que no eran fumadores. Los 12 pacientes con bronquitis crónica, todos ellos fumadores, presentaron AFB1 en menor nivel que en el grupo cáncer epidermoide, 0.21 ± 0.109 mg/l, $p < .025$.

Conclusiones:

1° La AFB1 fue encontrada en las fuentes de tabaco, así como en el epitelio bronquial de los cánceres de estirpe epidermoide y en menor nivel en los pacientes con bronquitis crónica. Todos estos pacientes eran fumadores por largos períodos de tiempo.

2° La AFB1 es probable un factor importante que contribuye a la carcinogénesis del cáncer de pulmón epidermoide tras un prolongado hábito de fumar.

Palabras claves: Aflatoxinas, Cáncer epidermoide de pulmón, Bronquitis crónica, Hábito de fumar, HPLC (Cromatografía líquida de alta presión)

Abstract

The relationship between aflatoxins and liver cancer is well established. In addition the inhalation exposure to carcinogen aflatoxin B1 (AFB1) is considerable. Genotoxic chemical is known to react with DNA either directly or after metabolic activation to form adducts, a step thought to be relevant with respect to chemical carcinogenesis. The presence and the amount of specific DNA adducts provide a good indication of chemical exposure and genetic damage resulting the exposure to carcinogens and account for some of factors affecting individual susceptibility to cancer. Analysis of DNA adducts requires that the sensitivity of the methods to be sufficient high to allow detection of about 1 adduct / 10⁹ normal nucleotides. Most suitable method is based in physicochemical technique such as HPLC. Because circumstantial epidemiological evidence suggests that AFB1 inhalation may cause primary lung cancer. We investigate AFB1 by HPLC in three different tobacco sources, and in 39 patients with compatible lung cancer or chronic bronchitis. The patients were divided by clinical manifestations in lung cancer (n: 25) and chronic bronchitis (n: 14). Twenty-three of 25 patients presented epidermoid lung cancer within smoking habit, and 2 of 25 presented adenocarcinoma without smoking habit. In chronic bronchitis group 12 of 14 cases presented smoking habit. The control PBS liquid was negative to AFB1; the different tobacco sources, a) Virginia of Jujuy, b) Brasilerio and c) black of Salta presented AFB1 positive determinations respectively. The bronchial tissues obtained by lung biopsies presented positive AFB1 in lung epidermoid cancer at 0.68 ± 0.82 mg /L. The adenocarcinoma presented AFB1 negative determinations. In chronic bronchitis patients with smoking habit (n:12) presented AFB1 positive with a level less than the epidermoid lung cancer group, 0.21 ± 0.109 mg/L, $p < .025$.

Conclusions:

1° The AFB1 fungus metabolite was found in tobacco sources as well as in bronchial epithelial tissues of the lung epidermoid cancer and in less level in the chronic bronchitis group.

All patients presented smoking habit for a long time.

2° The AFB1 is probably an important factor in the carcinogenesis of the lung epidermoid cancer in patients with prolonged smoking habit.

Key words: Aflatoxins, Epidermoid lung cancer, Chronic bronchitis, Smoking habit, HPLC (high performance liquid chromatography).

Introducción

La relación entre aflatoxinas y cáncer está claramente establecida, así es que las aves que ingieren alimentos contaminados con hongos padecen carcinomas del hígado y de la vía biliar (1). Los hongos involucrados en estas patologías son de la especie *Aspergillus* variedades *flavus*, *parasiticus*, *fumigatus* y *niger*, al igual que otras especies como *penicillium* y *fusarium*. Todas ellas producen aflatoxinas B1, B2, G1, y G2 (1,2,3).

Estas aflatoxinas están ampliamente distribuidas por todo el mundo, se desarrollan especialmente en lugares donde se almacenan alimentos en condiciones inadecuadas, tales como elevada humedad y altas temperaturas, las cuales favorecen el desarrollo del hongo (2). Por todo ello la contaminación con aflatoxinas es un problema grave y preocupante de salud pública.

La aflatoxina B1 (AFB1) es la más estudiada y se ha probado que es el más importante agente causal de hepatotoxicidad y cáncer (1,2,3,4,5). Sus efectos tóxicos están unidos a su bio - transformación. Para ejercer su acción carcinogénica la AFB1 requiere la oxidación microsomal monitorizada por el citocromo P 450, que transforma AFB1 en un derivado epóxido (8,9 epoxi-AFB1). Para obtener dicho metabolito existen dos vías de epoxidación a saber : la primer vía es la de la prostaglandin sintetasa y la segunda vía es la de la lipo-oxigenasa, a través de la catalización que inducen los radicales peróxidos derivados de la cascada del **ácido araquidónico** (6,7). A esto último subsigue una posterior unión al

DNA celular mediante enlaces co - valentes (1,2,3,8,9).

Debido a las altas concentraciones de prostaglandin sintetasa y lipo-oxigenasa en los tejidos pulmonares, estas enzimas representan una importante alternativa del metabolismo de la AFB1 en dicho órgano (4,7,10).

Por otro lado el derivado epóxido de la AFB1 es detoxificado del organismo por conjugación con el glutatión. La concentración de la enzima glutatión transferasa es inversamente proporcional a la capacidad de la AFB1 para producir cáncer (1, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 12).

Los citocromos P1A2 y P3A4, dos iso -enzimas del citocromo P 450 hallados en el pulmón pueden ser modulados por productos químicos tales como hidrocarburos policíclicos presentes en el humo de cigarrillo que potencian la activación de AFB1 a su derivado epóxido por inducción enzimática. Ello implicaría un riesgo similar al de la hepato - carcinogénesis que induce la AFB1 cuyo efecto final podría ser el cáncer de pulmón (1, 2, 3, 4, 6, 11, 13).

El cáncer de pulmón está claramente unido al hábito de fumar tabaco, ya que entre el 80 % y el 85 % de las personas que presentan esta patología son fumadores, mientras que en la población no fumadora se considera esta enfermedad como una excepción (14, 15, 16, 17, 18).

Hasta la actualidad no se ha demostrado la relación entre aflatoxinas y cáncer epidermoide de pulmón, a pesar de que el tabaco se encuentra en muchas oportunidades contaminado con hongos, lo cual disminuye su calidad (19). En la literatura mundial se reporta un caso de posible relación entre la inhalación de polvo de maní contaminado por *aspergillus flavus* y la aparición de un adenocarcinoma pulmonar detectado a los tres meses de exposición. Este paciente falleció a los once meses de evolución del proceso (18).

Otro aspecto a destacar es que las aflatoxinas tienen las características de ser termo estables y no se degradan con la combustión del tabaco(19). Ellas son similares a otros compuestos tóxicos potencialmente cancerígenos del tabaco (18).

Por todo lo expuesto el **OBJETIVO de este trabajo fue: realizar un estudio de la presencia de aflatoxinas en el tabaco, y en la lesiones tumorales de pacientes que padecen lesiones compatibles con cáncer de pulmón y/o bronquitis crónica por biopsia endo - bronquial o pieza de resección quirúrgica.**

Material y Métodos

I: Estudio para demostrar la presencia aflatoxina B1 (AFB1) en tabaco:

a) Preparación del extracto de tabaco en PBS (solución salina fosfato balanceada).

Se tomaron muestras de 3 tipos diferentes de hojas de tabaco a saber :

1) tabaco Virginia de Jujuy , 2) tabaco de origen brasileño, 3) tabaco negro de Salta.

El procedimiento extractivo fue realizado siguiendo a Fink, parcialmente modificado, con un cambio de solución salina isotónica por PBS, y en peso / volumen, 1/10 (21). Brevemente 10 gramos de cada hoja de tabaco fue picado, macerado y homogeneizado en 90 ml de solución fosfato balanceada (PBS) y colocada en frasco estéril por 72 horas a 4 ° C, con agitación cuidadosa periódica. Luego este material fue filtrado y utilizado como sustrato para la determinación de AFB1.

b) Solución estándar de Aflatoxina B 1 (AFB1) adquirida en SIGMA Chemical Con.. Fue usada como testigo externo para comparar con lo obtenido en el macerado de hojas de tabaco por la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

c) Cuantificación de AFB1:

La detección y cuantificación de aflatoxina se realizó por HPLC (High performance liquid chromatography): Cromatografía líquida de alta performance, empleando un instrumento Konik KNK 500 serie A (22, 23, 24, 25, 26, 27), provisto de columna de sílica en fase reversa (C-18) (27). La fase móvil fue una

mezcla isocrática de Agua: 72 %, Acetato Nitrilo: 14 %, Metanol : 14 %, con un flujo constante de 1,50 ml/minuto. Para evitar la formación de burbujas parásitas de aire en la columna, antes y durante cada determinación se conectó una fuente de Helio que proveía una corriente homogénea a baja presión (28, 29). Se usó detector absorción visible UV a una longitud de 254 nm. Para cada determinación se inyectaron 20 µl de solución homogeneizada de tabaco en PBS y similar volumen de testigo positivo AF B1 y negativo de PBS estéril. Se compararon los tiempos de retención.

II: Sujetos y Métodos usados

Se realizó el presente estudio con materiales obtenidos en los Servicios de Endoscopia del Hospital Tránsito Cáceres de Allende y Hospital Nuestra Señora de la Misericordia, Córdoba, Argentina entre Abril de 1993 y Abril de 1997.

Los pacientes fueron seleccionados para este estudio por padecer patología pulmonar compatible con cáncer de pulmón o bronquitis crónica (18,30,31). Ellos fueron sometidos a exploración endoscópica para confirmar o desechar el diagnóstico de cáncer de pulmón. A estos pacientes se controló: sexo, edad, sintomatología clínica, radiografía de tórax, y hábito de fumar.

Biopsia por fibroscopía óptica

El procedimiento fue realizado con un Fibroscopio flexible, Olympus, previa anestesia local de la faringe, laringe y traquea, con xylocaina tópica al 4 %. Se introduce el Fibroscopio luego de un tiempo prudencial entre 5 y 10 minutos de realizada la anestesia local, se explora el árbol bronquial tomándose muestras biopsia del epitelio bronquial con neoplasias o inflamación; además se realizó cepillado y lavado bronquial para demostrar por citología la presencia de células neoplásicas. El material de biopsia se divide en dos cuotas de similar tamaño. La primera es enviada al Servicio de Anatomía Patológica, para estudio histológico, siendo fijado la toma biopsia en

formol neutro al 10 %, y embebida en parafina, seccionada en cortes de 5 a 7 mm y coloreadas con hematoxilina eosina. El cepillado / lavado es suspendido en solución fisiológica estéril enviado al servicio de Patología y procesada como extendido sobre porta - objeto.

A. Dosaje de Aflatoxina B1 en tejido de biopsia bronquial

La segunda muestra de la biopsia de epitelio bronquial es suspendida en PBS y llevada de inmediato a temperatura de - 40 ° C. (Freezer)

Luego cuando se realiza el estudio para detectar AFB1, el tejido de biopsia es macerado y procesado como se describe previamente para detectar la presencia de AFB1. En forma breve: el tejido macerado es suspendido en PBS y puesto en contacto con pronasa al 0,05 % (p/v) y colagenasa al 0,15 % en 100 ml de PBS a 4 ° C por 30 minutos, posteriormente inyectado en el aparato de cromatografía de fase reversa, como lo describimos más arriba para detección de AFB1, en las hojas de tabaco y comparado con la AFB1 testigo (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29).

Metodología estadística:

Se utilizo para el análisis de significación: los métodos de Varianza de ANOVA y prueba de Chi², Test de correlación, según el soft Microstat de Ecosoft INC. Se consideró valor significativo P < .05.

RESULTADOS.

Tabaco:

La determinación de las tres muestras de tabaco procesadas, arrojaron resultado positivo para la presencia de AFB1, y el testigo de PBS fue negativa para AFB1, según lo demuestran las respectivos figuras, 1, 2, 3, 4 de las corridas en HPLC.

Sujetos:

Fueron estudiados en forma consecutiva 39 pacientes con patología pulmonar compatible con Cáncer de Pulmón.

De acuerdo con el diagnóstico clínico - patológico el grupo se dividió en pacientes que padecían Cáncer de pulmón (n:25), y Bronquitis crónica (n:14), Tabla I.

El sexo masculino fue el predominante en ambos sub- grupos, tanto en el cáncer de pulmón 24 sobre 25 casos, así como la bronquitis crónica 11 sobre 14 casos, $p < .0005$, Tabla I.

La edad de todo el grupo estudiado (n:39) fue de 63 ± 13 años, con un rango de 84 a 20 años. La edad del grupo Cáncer (n:25) fue 64 ± 9.5 años, los pacientes con bronquitis crónica fue 58 ± 12.75 años, sin diferencia significativa entre estos dos grupos, Tabla I.

El hábito de fumar estaba presente en 35 de los 39 casos estudiados, $p < .0005$. En los pacientes afectados con de Cáncer de pulmón 23 sobre 25 eran fumadores activos y 2 eran no fumadores. Los pacientes con bronquitis crónica en 12 sobre 14 casos eran fumadores, los otros dos no fumadores trabajaban en lugares con alta polución ambiental, $p < .0005$, Tabla I. El tiempo promedio del hábito de fumar fue para los pacientes afectados con carcinoma epidermoide de 49 ± 9.3 años y para el grupo bronquitis crónica fumadores de 37 ± 14 años $p < .0005$, Tabla I.

Según la estirpe celular los pacientes afectados de cáncer de pulmón se dividían en 23 casos con carcinoma epidermoide, todos los pacientes fumadores y dos casos adenocarcinoma, ambos no fumadores, $p < .0005$, fig.6

La presencia de aflatoxina B1 en los tejidos pulmonares obtenidos por biopsia fue positiva en 23 sobre 25 casos de pacientes afectados con cáncer de pulmón (92 %), y en 12 sobre 14 casos de pacientes con bronquitis crónica, $P < .0005$, fig. 6.

Es de hacer notar que los 23 casos de cáncer pulmonar que presentaron AFB1 positiva eran de la estirpe epidermoide y que en los dos casos de adenocarcinoma eran AFB1 negativa, $p < .0005$, fig. 5. Similares hallazgos se encontraron en bronquitis crónica ya que en los 12 pacientes positivos para AFB1 eran fumadores y los dos con resultado negativo para AFB1 eran no fumadores y expuestos a intensa polución ambiental en su lugar de trabajo, fig.6.

Los niveles de AFB1 por HPLC fueron significativamente más altos en pacientes con cáncer epidermoide si lo comparamos con los afectados con bronquitis crónica. El subgrupo cáncer epidermoide presentaba 0.68 ± 0.82 mg/

l y en el grupo bronquitis 0.21 ± 0.109 mg/l, $p < .025$, fig.6.

Discusión

En nuestro estudio hemos encontrado predominio significativo del sexo masculino. Este hallazgo coincide con los tipos de patologías estudiadas, cáncer epidermoide de pulmón y bronquitis crónica, las que están unidas al hábito de fumar. Esta actitud está de acuerdo con las características sociales y culturales imperantes en nuestro país hasta mediados de la década del 70, en la cual el hombre era el fumador consuetudinario. Así es que estas enfermedades pulmonares aparecen entre la quinta y octava década de la vida luego de muchos años de exposición al humo del cigarrillo, alrededor de 40 años, hecho en el que coincidimos con diversos autores (14, 15, 16, 17, 18, 32). También en nuestro estudio el sexo masculino es el predominante y similar a las series de Europa, USA y Japón (14, 15, 16, 17, 18, 32). Por otra parte el cáncer de pulmón tiene el triste privilegio de ser la primer causa de muerte en el mundo occidental (33).

Treinta y cinco de nuestros pacientes estudiados eran fumadores 32 masculinos y 3 femeninos. Los cuatro casos que no fumaban eran : 2 adenocarcinoma, 1 masculino y 1 femenino y en el grupo bronquitis crónica los 2 casos no eran fumadores, ambos masculinos, pero expuestos a intensa polución en su lugar de trabajo, fundición de metales, todo lo antes mencionado es coincidente con otros autores (30, 31, 33, 34).

Por otra parte las 25 neoplasias pulmonares tenían un claro predominio de carcinoma epidermoide, 23 sobre 25 casos (92 %) y en clara relación con el cigarrillo. Según diversas series entre el 80 % y 85 % de los cánceres de pulmón que presentan los fumadores tienen como tipo histológico predominante a la estirpe epidermoide, hecho con lo cual coincidimos (15, 16, 17, 18). Los restantes dos casos fueron adenocarcinoma que son probablemente independientes del hábito de fumar (18, 30, 31, 32, 33, 34).

Todos los casos con cáncer de pulmón tipo epidermoide eran positivos para AFB1 en concentraciones superiores a los afectados de bronquitis crónica, siendo fumadores ambos

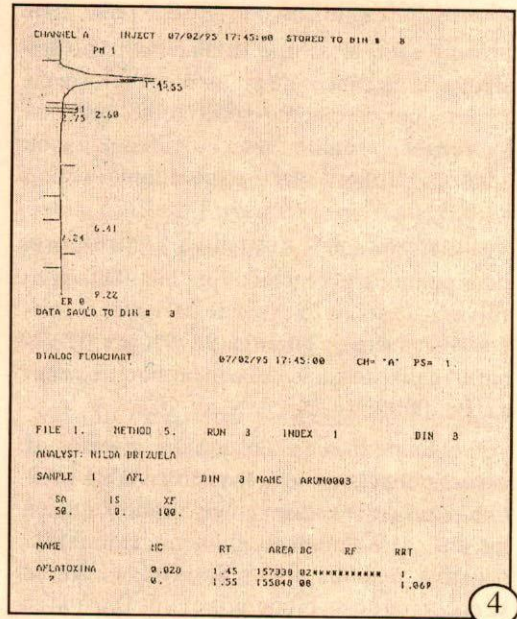
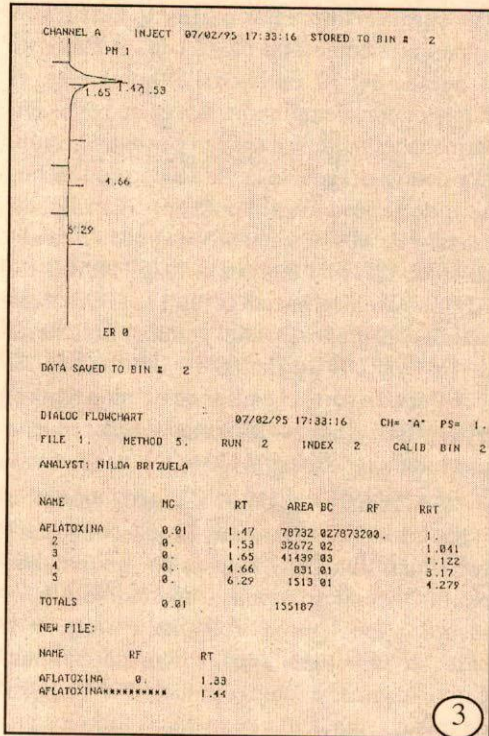
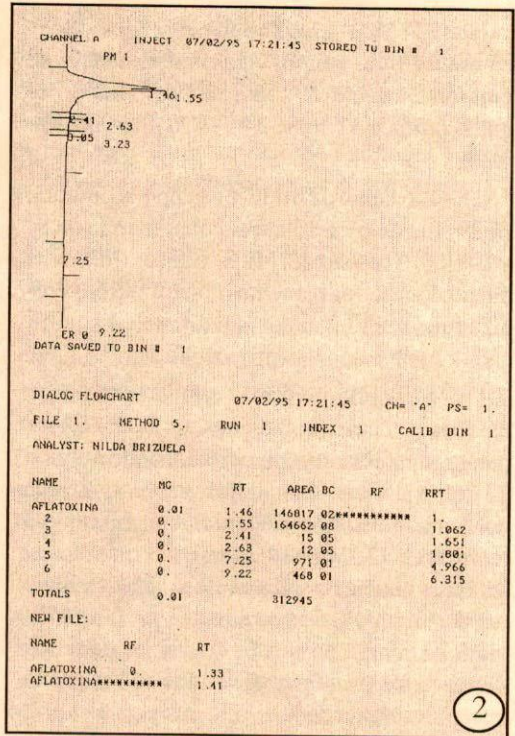
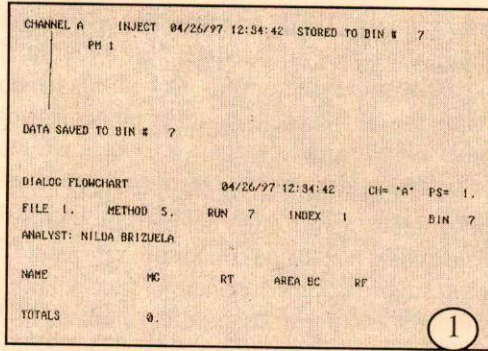


Fig.1:Nivel negativo de AFB1 en solución de PBS , por cromatografía de alta presión(HPLC).

Fig. 2: Niveles de AFB1 por HPLC en Tabaco Virginia de Jujuy.

Fig.3 : Niveles de AFB1 por HPLC en Tabaco de origen Brasileño.

Fig. 4 : Niveles de AFB1 por HPLC en Tabaco negro de Salta

Tabla I : Características Clínicas de los pacientes afectados po Cácer de Pulmón y Bronquitis Crónica

Caso N°	Sexo	Edad en años	Habito de fumar en años	Rx tórax Ca Pulmón	Histopatologlogía
Carcinoma Pulmonar					
1	Mas.	64	(+) 57	(+)	Carcinoma Epidermoide
2	Mas	61	(+) 45	(+)	Carcinoma Epidermoide
3	Mas	67	(+) 45	(+)	Carcinoma Epidermoide
4	Mas	69	(+) 30	(+)	Carcinoma Epidermoide
5	Mas	67	(+) 50	(+)	Carcinoma Epidermoide
6	Mas	78	(+) 65	(+)	Carcinoma Epidermoide
7	Mas	78	(+) 66	(+)	Carcinoma Epidermoide
8	Mas	73	(+) 58	(+)	Carcinoma Epidermoide
9	Mas	58	(+) 47	(+)	Carcinoma Epidermoide
10	Mas	65	(+) 52	(+)	Carcinoma Epidermoide
11	Mas	69	(+) 56	(+)	Carcinoma Epidermoide
12	Mas	55	(+) 45	(+)	Carcinoma Epidermoide
13	Mas	66	(+) 50	(+)	Carcinoma Epidermoide
14	Mas	62	(+) 40	(+)	Carcinoma Epidermoide
15	Mas	47	(+) 30	(+)	Carcinoma Epidermoide
16	Mas	58	(+) 48	(+)	Carcinoma Epidermoide
17	Mas	77	(+) 57	(+)	Carcinoma Epidermoide
18	Mas	57	(+) 47	(+)	Carcinoma Epidermoide
19	Mas	69	(+) 50	(+)	Carcinoma Epidermoide
20	Mas	58	(+) 49	(+)	Carcinoma Epidermoide
21	Mas	58	(+) 40	(+)	Carcinoma Epidermoide
22	Mas	79	(+) 60	(+)	Carcinoma Epidermoide
23	Mas	59	(+) 44	(+)	Carcinoma Epidermoide
24	Mas	44	(-)	(+)	Adenocarcinoma
25	Fem.	78	(-)	(+)	Adenocarcinoma
Bronquitis Crónica					
26	Mas.	44	(+) 20	(-)	BC No maligno
27	Mas	68	(+) 55	(-)	BC No maligno
28	Fem.	73	(+) 50	(-)	BC No maligno
29	Fem.	64	(+) 22	(-)	BC No maligno
30	Mas	56	(+) 41	(-)	BC No maligno
31	Mas	65	(+) 40	(-)	BC No maligno
32	Mas	55	(+) 40	(-)	BC No maligno
33	Mas	51	(+) 30	(-)	BC No maligno
34	Fem.	49	(+) 35	(-)	BC No maligno
35	Mas	51	(+) 30	(-)	BC No maligno
36	Mas	84	(+) 65	(-)	BC No maligno
37	Mas	40	(+) 20	(-)	BC No maligno
38	Mas	69	(-) 45 polución	(-)	BC No maligno
39	Mas	44	(-) 20 polución	(-)	BC No maligno

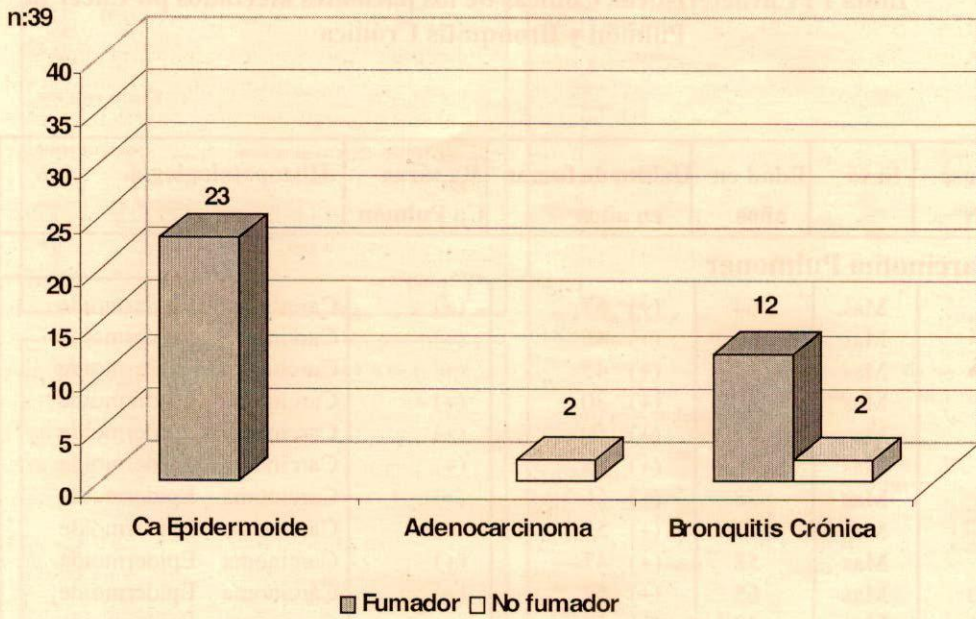


Fig.5 : Relación entre el hábito de fumar, estirpe celular de los cánceres de pulmón y bronquitis crónica.

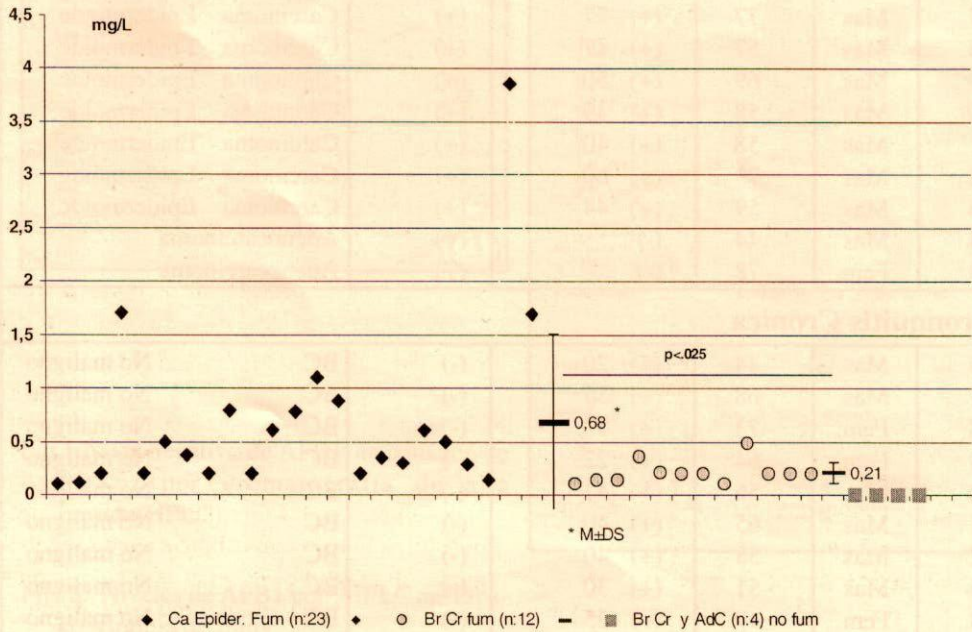


Fig. 6: Estudio de los niveles de Aflatoxina B 1 en tejidos bronquiales de pacientes fumadores y no fumadores afectados con carcinoma epidermoide, adenocarcinoma y bronquitis crónica .

grupos de pacientes. Los cuatro casos restantes, no fumadores, fueron negativos para AFB1, dos casos con adenocarcinoma y dos con bronquitis crónica por contaminación ambiental en su trabajo, fundición de metales. En nuestro estudio el grupo con cáncer de pulmón estuvo expuesto en forma más prolongada al hábito de fumar que los que padecían bronquitis crónica.

También conocemos que la aflatoxina B1 se encuentra contaminando el tabaco desde el almacigo hasta la hoja procesada en el cigarrillo, cigarro, y tabaco molido para pipa (19). Este hecho es corroborado por nuestra investigación que encuentra aflatoxina B1 en la hoja de tabaco. Una característica a destacar de AFB1 es la termo-estabilidad, ya que se destruye recién luego de los 600 °C, por lo tanto resistente a la combustión habitual del tabaco. (19) Este hecho tornaría al mismo como más peligroso.

La Aflatoxina B1 necesariamente ejerce su actividad carcinogénica a través del citocromo P 450 y es sinérgica con el benzopireno y β -naftilamina así como nitrosamina y nitrosopirrolidina que también tienen esta vía común de detoxificación en diversos órganos de la economía tales como: el hígado, riñón, y pulmones. En este último órgano involucran a células epiteliales y macrófagos. Estas células tienen como estructura para la oxidación a los microsomas, y la misma es dirigida por el citocromo P 450 y sus iso-enzimas P1A2 y P3A4 las cuales modulan la transformación de la AFB1 en un derivado epóxido (8,9 epoxi-AFB1). Luego sigue una unión al DNA celular mediante uniones covalentes (1, 2, 4, 6, 8, 35, 36, 37, 38, 39). Otra vía de epoxidación de la AFB1 es la de la prostaglandin-sintetasa como los demostraron Battista y Marnett (2). así como la vía metabólica de la lipo-oxigenasa la cual es catalizada por radicales peróxidos producto de la cascada del ácido araquidónico (1,3, 6). En la actualidad se reconocen más de 200 genes para el citocromo P 450 en la biología tanto animal como vegetal. En la especie humana se han identificado 19 genes del citocromo P 450, de los cuales cuatro de ellos son extra-hepáticos, ocupando lugares de la inter-fase entre el medio ambiente y los tejidos, cuyo ejemplo representa el epitelio del sistema respiratorio (1, 6, 8, 37,38).

La unión al DNA se realiza por fallas en la detoxificación de los compuestos hidrófobos a través de los sistemas enzimáticos de conjugación, sulfo-transferasas, glucoronil-transferasas y glutation-transferasa. La concentración de estas enzimas son inversamente proporcionales a la capacidad de AFB1 para producir cáncer (1, 6, 7, 8, 9). Las aflatoxinas y en especial la AFB1 tienen fuerte efecto mutagénico, ellas actúan sobre oncogenes y genes supresores de los tumores. Por ello la AFB1 ha sido capaz de activar en forma experimental en hepatomas de ratas los oncogenes c-ras, así como los oncogenes c-myc (1). También la AFB1 induce una sobre-expresión de la fosfocreatincinasa lo cual facilita la transformación de los oncogenes Ha-ras (1).

Otro aspecto llamativo es la inducción de mutaciones en el gen p53 supresor de tumores por acción de AFB1 (1, 13, 40, 41, 42, 43, 44, 45). Estudios realizados demuestran que el 65 % de los pacientes con cáncer bronquial tienen mutaciones en dicho gen (1, 11, 41, 42, 43, 44). Esta afirmación está avalada por estudios de epidemiología y genética molecular en diversas partes del mundo (11). Así es que entre los caucásicos estaría relacionada con diversos compuestos cancerígenos del humo del cigarrillo, tales como benzopirenos, β -naftilamina, nitrosamina, nitrosopirrolidina (1, 6, 8, 11, 15, 18, 45, 46), y como demostramos en este trabajo probablemente con AFB1.

Por otra parte se ha descrito en la rata dimorfismo sexual, por el cual las ratas machos presentan mayor prevalencia de tumores frente a AFB1 que las ratas hembras, esto se debe a una mayor actividad del citocromo P 450 en las hembras. Este hecho antes mencionado es uno de nuestros hallazgos en la clínica del cáncer de pulmón, con predominio manifiesto del sexo masculino. Esto nos sugiere fuertemente la posibilidad de que este mecanismo este implicado en la expresión clínica, aunque actualmente no existan evidencias en otros trabajos que permitan traspasar los estudios experimentales a los seres humanos afectados por cáncer de pulmón (8).

Por todo ello podemos concluir que este metabolito fúngico AFB1 que contamina el tabaco, contribuye a aumentar la capacidad carcinogénica del mismo al sumarse a otros ele-

mentos ya demostrados como cancerígenos, tales como el benzopireno, nitrosaminas, β naftilamina, nitrosopirrolidina, polonio radiactivo, y cadmio(1,8, 13, 14,18, 30,31,32, 33,34, 45). Todos ellos se encuentran en el humo del cigarrillo, y actúan en forma sinérgica potenciando las capacidades carcinogénicas individuales a través del citocromo P 450 , y de su falla en la detoxificación y posterior unión a al DNA nuclear de la AFB1, lo cual produce cambios o mutaciones, cuyo producto final es la célula cancerosa(1,4, 8, 14,15, 29, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 49, 50, 51). Este hecho es similar al efecto AFB1 y la hepatitis B en países asiáticos, donde la exposición por separado de cada uno de dichos agentes no produce hepatoma, pero la sinergia de ambos condiciona las circunstancias para padecer la enfermedad (1, 2, 29, 51, 52, 53, 54, 55) .

El mecanismo antes mencionado sería condicionante y podría explicar en forma razonable los hallazgos de metástasis en diversos órganos al momento del diagnóstico inicial del cáncer de pulmón, hecho encontrado entre el 60 y 75 % de los pacientes (14, 15, 18, 29, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 51).

También se debe analizar que individuos aparentemente asintomáticos pero con niveles elevados de AFB1 unidos a albúmina en sangre periférica, como lo demostró Sabbioni (29) , tendrían predisposición para padecer cáncer de pulmón, sobre todo si el individuo es fumador. Esto es corroborado por el estudio de Cusumano sobre pacientes con cáncer de pulmón, no fumadores, que presentaron en suero niveles de AFB1 iguales a la población de controles normales(56) . Por otra parte nuestro estudio, con otra metodología demuestra que la AFB1 aparece en tejido pulmonar de cánceres de estirpe epidermoide y en pacientes con bronquitis crónica, todos ellos fumadores. En los no fumadores, un grupo pequeño de pacientes con adenocarcinoma y bronquitis por polución en su trabajo, los tejidos pulmonares fueron negativos para AFB1. Este hallazgo es coincidente con ambos estudios pero con diferentes substratos (29, 56) , aunque el exiguo número de casos en los no fumadores impiden una correcta interpretación de su significación .

Conclusiones:

- 1° En fin, creemos que estamos ante un elemento importante en el cáncer de pulmón: la AFB1. Este metabolito fúngico aparece en el tabaco y en los tumores de bronquios de la estirpe epidermoide.
- 2° La AFB1 cumpliría un papel inductor de mutaciones que condicionan al Cáncer de Pulmón.
- 3° Estos conocimientos aportados a la patogenia del cáncer de pulmón señalan y reafirman la idea que en la génesis del carcinoma epidermoide bronquial existen múltiples factores para inducir dichos tumores.

Bibliografía

1. Eaton D, Gallagher EP. Mechanism of Aflatoxins carcinogenesis. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1994; 34 :135-72 .
2. Battista JR, Marnett LJ. Prostaglandin H-synthetase dependent epoxidation of AFB1. *Carcinogenesis.*1985; 6: 1227- 9.
3. Liu L, Massey TE. Bioactivation of AFB1 by lipo-oxygenases , Pg H synthetase and CYP 450 mono-oxygenase in guinea pig tissues. *Carcinogenesis.* 1992; 13: 533-39
4. Hayes JD, Judah DJ, Neal GE. Resistance to aflatoxin B1 is associated with expression of a novel aldo - ketoreductase which has catalytic activity towards a cytotoxic aldehyde - containing metabolite of the toxin. *Cancer Res.*1993;53 : 3887 -94.
5. Full report of the forty - ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (WHO Technical Repor Series in press)1999.
6. Henke D, Danilowics R M, Curtis JF, Boucher RC, Elling TE. Metabolism of arachidonic acid by human nasal and bronchial epithelial cells. *Arch. Biochem Biophys.* 1988 ; 268: 426 - 36.
7. Smith BR, Brian WR. The role of metabolism in chemical- induced pulmonary toxicity. *Toxicol Pathol.* 1991 ; 19: 470-81

8. Tredaniel J, Zalzman G, Douriez E. Gènes et enzymes dans le métabolisme des carcino-gènes. *Bull Cancer*. 1995; 82 (suppl 2): 77 -84.
9. Buelter TM, Eaton DL . Complementary DNA cloning, messenger RNA expression, and induction of alpha class glutathione S transferases in mouse tissues. *Cancer Res*. 1992; 52: 314- 8.
10. Kusmer EJ, Marks RL, Abanony D, Krell R. Inhibition by REV - 5901 of leucotriene release from guinea pig and human lung tissue in vitro. *Biochem. Pharmacol*. 1989; 38 : 4183 - 9.
11. Zalzman G, Tredaniel J, Lepchapt E, Lubin R, Soussi T, Hirsch A . Le gène et la proteïne p53 dans la carcinogenese bronchique: de la biologie a la clinique. *Rev Mal Respir*. 1994;11: 455-72.
12. Yun TK. Usefulness of medium-term bioassay determining formations of pulmonary adenoma in NIH(GP) mice for finding anticarcinogenic agents from natural products. *J. Toxicol Sci*. 1991; 16(Suppl 1) :53-62.
13. Cariello NF, Piegorsch WW, Adams WT, Skopek TR. Computer program for the analysis of mutational spectra : application to p53 mutations. *Carcinogenesis*. 1994; 15: 2281-5.
14. Velila Marco J, Pérez Trulent A, Peña López GM. Carcinoma Bronquial, *Arch. Bron. Neumonol, España*. 1987; 23: 289-97
15. Nasiell M, Carlense F, Aver S. et al Pathogenesis of bronchial carcinoma with special reference to pathogenesis and influence of bronchial mucose of 20 metil cholantrene and cigarette smoking. *Recent results. Cancer Res*. 1982; 82:53-68.
16. Wolpaw DR. Early detection in lung cancer. *Med. Clin. North Am*. 1996; 80: 63-82.
17. Nonomura A, Mizykani Y, Shimizu J, Oda M, et al. Clinicopathological Study of Primay Malignant tumors of the lung: An Analysis of 993 Tumors Resected at the Kanazawa University Hospital Between 1979-1993. *J Surg. Oncology* . 1995 , 58: 5-11.
18. Fraser, Paré, Paré, Fraser Genereux. Enfermedades neoplásicas de los pulmones. En *Diagnóstico de las enfermedades del Tórax* . Panamericana. Bs. As. 1992;pp. 1251 - 1602.
19. Boletín divulgación del INTA. 1976; 5: 45-6.
20. Auerbach O. Historia Natural del carcinoma pulmonar. En *Tratado de Neumonología*. A Fishman, Editor. Doyma-MacGraw - Hill, Madrid. 1983;pp 1318-1431.
21. Fink J. Enfermedades del Pulmón. Rose// Friedman Editores. *El Laboratorio en Inmunología Clínica*, 2^{da} Edición . Buenos Aires, Panamericana. 1984;pp. 921- 4.
22. Margni RA. Cromatografía de Exclusión, en *Inmunología e Inmunoquímica*. R A Margni editor. 4^a Edición. Panamericana Bs. As. 1989;pp 620- 43.
23. Hewards GA, Martin AJP. The Separation of C12,C18 fatty acids by reversed phase partition chromatography. *Biochem J*. 1950; 46:532-8.
24. Abel FW, Pollard FH, Uden PC, Nickless G: A new gas -liquid chromatographic - phase. *Biochem J*. 1950;22: 23-8
25. Stewart HNH, Perry SG . A new approach to liquid partition chromatography . *J Chromatog*. 1968; 37: 97-8
26. Kirkland JJ. High speed liquid partition with chemical bounded stationary phase. *J Chromatog. Saic*. 1971; 9: 206-14
27. Majors RE. High Performance liquid chromatogrophy on small particle silica gel. *Annal Chem*. 1972; 44: 1722- 6.
28. Kingston DGY, Gherhart BB. Preparation of octadecil parasil for reeversed phase liquid chromatography. *J Chromatog*. 1976;116 :182- 3.
29. Sabbioni G, Wild Chr. Identification of an aflatoxin G1 -serum albumin adduct and its relevance to measurement of human exposure to aflatoxins. *Carcinogenesis* .1991; 12: 97-103
30. Postmus PE. Epidemiology of Lung Cancer. In *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*. Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LK, Senior RM. Editors. Mac-Graw-Hill, New York, 1998;pp 1707 -17.

31. Utell MJ, Samet JM. Trastornos del aparato respiratorio mediados por el ambiente. *Clin Med Norte Am.* 1990;74: 301- 16.
32. Goldsmith JR. Efecto de la polucción aérea sobre los pulmones. En *Tratado de Neumonología*. A Fishman editor. Doyma, McGraw-Hill. Madrid. 1983, pp 453-8.
33. Cady BA. Surgeon's Views on Tobacco Control. *J.Surg. Oncology.* 1995;59:1-2.
34. Shields PG, Harris CC. Causas ambientales del cáncer. *Clin.Med. Norte Am.* 1990; 74: 273- 87
35. Ayesh R, Idle JR, Ritchie JC, Crothers MJ, Hetzel MR, Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. *Nature.* 1984; 312 : 169- 70.
36. Dvorackova Y. Aflatoxin inhalation and alveolar cell carcinoma. *Brit.Med J.* 1976,1: 691.
37. Donnelly PJ, Stewart RK, Ali SL, Conlan AA, Reid KR, Petsikas D, Massey TE. Biotransformation of aflatoxin B1 in human lung. *Carcinogenesis,* 1996 ;17: 2487 -94.
38. Kelly JD, Eaton DL, Guengerich FP, Coulombe RA. Aflatoxin B1 activation in human lung. *Toxicol. Appl Pharmacol.* 1997; 144: 88 -95.
39. Airoidi L, Pastorelli R, Magagnotti C, Fanelli R. Carcinogen-DNA adducts as tolls in risk assessment. *Adv Exp Med Biol* 1999; 472:231-40.
40. Puisieuz A, Lim S, Groopman J, Ozturk M. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiological defined carcinogens. *Cancer Res.* 1991; 51: 6185-9
41. Semenza JC, Weasel LH. Molecular epidemiology in environmental health: the potential of tumor suppressor gene p53 as a biomarker. *Environ Health Perspect.* 1997; 105: (Suppl 1) 155 -63.
42. Sengstag C, Morbe JL, Weibel B. Codon 249 of human TP53 tumor suppressor gene is no hot spot for aflatoxin B1 in a heterologous background/ *Mutat Res.* 1999;430:131-44.
43. Tam AS, Foley JF, Devereux TR, Marompot RR, Massey TE. High frequency and heterogeneous distribution of p53 mutations in aflatoxin B1 - induced mouse lung tumors. *Cancer Res.* 1999; 59:3634 -40.
44. Stanley LA, Mandel HG, Riley J, Sinha S, Higginson FM, Judah DJ, Neal GE. Mutations associated with in vivo aflatoxin B1 induced carcinogenesis need not be present in the vitro transfection by this toxin. *Cancer Lett.* 1999;137:173 -81.
45. Hussain SP, Harris CC. P53 mutation spectrum and load: the generation of hypotheses Linking the exposure of endogenous or exogenous carcinogens to human cancer. *Nut Res.* 1999 ; 428 : 23 - 32.
46. Vainio H, Wilbourn J, Cancer etiology : agents causally associated with human cancer . *Pharmacol. Toxicol.* 1993; 72 (Suppl 1): 4-11.
47. Mace K, González FJ, McConnell IR, Garner RC, Avanti O, Harris CC, Pfeifer AM. Activation of promutagens in human bronchial epithelial cell line stably expressing human cytochrome P450 1 A2. *Mol. Carcinog.* 1994;11: 65- 73.
48. Akao M, Kuroda K, Gono T, Kishikawa S. Isolation of a metastasizing cancer cell line from a aflatoxin B 1-induced rat liver tumor. *Chem.Pharm. Bull.* 1992;40: 1299-302.
49. Ioannides CG, Grimm EA. Tumor Immunity, in *Clinical Immunology, Principles and Practice*. Rich RR, Fleisher TA, Schwartz B D, Shearer WT, Strober W. Mosby , St Louis, 1996; pp 333 - 349.
50. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunidad frente a tumores, en *Inmunología Celular y Molecular*. 2da Edición. Interamericana- McGraw-Hill, Madrid. 1995; pp 399-422.
51. J Kuby . Cancer and the immune system. *Immunology*, 3rd Ed. W.H. Freeman and Company. New York 1997; pp 555 - 96.
52. Yin SJ, Kao MC, Lee SC. Sequential Biochemical and Histological Changes in Rats Treated with Aflatoxin B1. *Br J Cancer.* 1980; 42 : 319 - 25

53. Garner RC. Carcinogenesis By fungal Products. *British Med Bull.* 1980; 36 :47-52
54. Franco D, Castaing D, Brèchet C, Morin J. L'Aflatoxines B1 est elle un cacinogène hèpatique. *Gastroenterol Clin. Biol.*1982; 6 : 124- 8.
55. Jennigs GS, Oesh F, Steinberg P. In vivo formation of aflatoxin B1 – DNA addudts in parenchymal and non parenchymal cel of rat liver . *Carcinogenesis .* 1992; 13: 831-5.
56. Cusumano V. Aflatoxins in sera from patients with lung cancer . *Oncology* 1991; 48 : 194 – 5.