

## CONTENIDO Y CONSUMO HUMANO DE AFLATOXINAS Y CANCER HEPATOCELULAR EN DOS CANTONES DE COSTA RICA\*

\*\*Victoria Chan

\*\*\*\*Ana Sittenfeld

\*\*\*\*Fernando Brenes

\*\*\*Jorge Fonseca

\*\*\*\*Carlos Mora

\*\*\*\*Ignacio Salom

\*\*\*\*Alfredo Martén

### INTRODUCCION

En Costa Rica hubo 182 casos de Cáncer Hepatoce-  
lular (CHC) en el quinquenio 1979-1983 con una Tasa  
de Incidencia por 100.000 habitantes (Ti) promedio, de  
1,21. Los cantones de San Ramón (Ti= 6,81) y Palmares  
(Ti= 3,41) que son territorios adyacentes, ocuparon por  
orden decreciente de magnitud de la Ti para CHC, los  
puestos 2 y 6 de los 81 cantones del país. Juntos presen-  
taron el 8,24% de los 182 casos del quinquenio 1979-  
1983, suman el 2,01% del área total del país y tuvieron  
el 2,44% de la población costarricense a la mitad del pe-  
riodo mencionado (1). El maíz en grano, en harina indus-  
trial y en tortillas constituye uno de los productos bási-  
cos de la dieta de los individuos en esa zona. Por todo  
ello se decidió realizar un estudio de Casos y Controles  
con el fin de valorar la relación existente entre el consu-  
mo elevado y el contenido en la dieta de las aflatoxinas  
producidas por el hongo *Aspergillus flavus* (2) y el  
CHC en esta zona del territorio.

### MATERIAL Y METODOS

#### ASPETO EPIDEMIOLOGICO

Se realizó un estudio de Casos y Controles en el que  
se denominaron Casos a los 15 núcleos familiares que  
tuvieron algún individuo con CHC en San Ramón y Pal-  
mares (SR-P) diagnosticado entre enero de 1979 y di-  
ciembre de 1983. Todos esos individuos habían tenido la  
zona como residencia habitual, al menos desde 1969. Se  
utilizaron dos grupos diferentes como controles: de ve-  
cindario (C1) e institucionales (C2). Se definieron los C1

como aquellos 15 núcleos familiares que tuvieron un in-  
dividuo con las siguientes características con relación al  
Caso correspondiente:

- mismo sexo;
- de edad no mayor ni menor en 5 años;
- vivir en la casa número tres contando hacia la izquier-  
da a partir del Caso. Este criterio fue escogido al azar.  
En caso de no encontrar en dicha casa al individuo con  
las características requeridas, se continuaría buscándo-  
lo en las casas subsecuentes hasta dar con él. Tal indi-  
viduo debería haber vivido en ese núcleo en algún mo-  
mento del periodo comprendido entre 1969 y 1983.

Los C2 fueron los 15 núcleos familiares que tuvie-  
ron un individuo con las siguientes características con re-  
lación al Caso correspondiente:

- mismo sexo;
- edad no mayor ni menor en 5 años;
- tercer paciente de un día martes (criterios escogidos al  
azar) de la misma consulta y del mismo hospital al que  
asistió al menos una vez o llegó a morir el Caso.

Luego se efectuó una "Encuesta sobre el consumo  
del maíz", con énfasis en el periodo 1974-1983 (desde 5  
años antes del primer diagnóstico de los individuos con  
CHC de la zona del estudio), a los 45 núcleos familiares,  
sin mencionar directamente la palabra cáncer con el fin  
de evitar sesgo por prejuicio de los entrevistados (3). De  
todas estas viviendas se recolectaron muestras de maíz  
entre 300 g y 1,2 Kg. A cada familia se le reintegró una  
bolsa de 1,5 kg de maíz traída por el encuestador. Todas  
las muestras se empacaron en bolsas de polietileno codi-  
ficadas y se almacenaron a 22C hasta por un máximo de  
4 días antes de realizar su análisis, desconociendo el có-  
digo de ellas.

#### ANALISIS DE AFLATOXINAS POR EL ME- TODO DE VELASCO

La determinación de aflatoxinas en las muestras co-  
dificadas se efectuó por triplicado y empleando el méto-  
do de minicolumnas de Velasco (4).

\* Una ponencia acerca de este trabajo ganó el I Premio del III Con-  
greso Centroamericano de Gastroenterología y III Congreso Na-  
cional de Hepatología, San José, 1988.  
\*\* Departamento de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica  
(ITCR).  
\*\*\* Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular  
(CIBCM), Universidad de Costa Rica (UCR).  
\*\*\*\* Unidad de Hepatología, Hospital México, Caja Costarricense de  
Seguro Social (CCSS) y Escuela de Medicina, UCR.

## ANALISIS DE RESULTADOS

A Partir de los resultados obtenidos se realizaron análisis de chi cuadrado ( $X^2$ ) para valorar la relación entre contenido (igual o mayor a 20 partes por billón (ppb) de aflatoxinas (5) y consumo elevado de aflatoxinas (igual o mayor al promedio de consumo diario de aflatoxinas [2,4 ppb] de todos los encuestados) en la dieta y CHC. Se efectuaron análisis de correlación entre los Casos, C1 y C2, utilizando el paquete de procesos estadísticos SPSS (6).

## RESULTADOS

Según el estudio previsto se visitaron los núcleos familiares de los 15 grupos. Cada uno constituido por un Caso y sus respectivos C1 y C2. Los datos estuvieron completos y fueron confiables en 13 grupos, ya que se desechó un Caso por información no confiable y un C1 por no consumir maíz en la dieta. Cada una de las tres series (Casos, C1 y C2 estuvo constituido por 8 hombres y 5 mujeres. Diez de los Casos tuvieron a San Ramón como residencia habitual, y tres a Palmares. En el Cuadro 1 se aprecia cómo el contenido promedio de aflatoxinas en las muestras de los Casos (22,5 ppb) y de los C1 (23,7 ppb) fue semejante, en tanto el de los C2 (44,2

CUADRO 1

## CONTENIDO PROMEDIO DE AFLATOXINAS EN LAS MUESTRAS DE LOS CASOS CON CHC Y DE LOS CONTROLES EN PARTES POR BILLON

Grupo número	Casos	Controles	
		de vecindario	Institucionales
1	14,0	15,0	49,0
2	16,7	16,7	31,7
3	31,3	29,0	31,3
4	18,7	20,0	31,7
5	18,7	18,3	28,3
6	9,0	12,7	21,7
7	17,7	19,0	71,7
8	31,3	41,0	21,7
9	14,3	17,3	25,7
10	18,3	15,3	19,3
11	38,7	32,0	32,7
12	31,0	42,0	116,7
13	32,3	29,3	93,3
n	13	13	13
Promedio	22,5	23,7	44,2
Desviación estándar	9,2	9,9	30,7

CUADRO 2

## DISTRIBUCION TOTAL Y PORCENTUAL DE LAS MUESTRAS SEGUN SU TIPO Y CONTENIDO DE AFLATOXINAS PARA LOS CASOS Y LOS CONTROLES

Tipo de muestra (total recolectado)	Distribución porcentual por niveles de aflatoxinas	
	Caso o Control	<20 ppb <sup>a</sup> ≥ 20 ppb
Maíz en grano (26 m) <sup>b</sup>	46,2	53,8
Casos (10 m)	60,0	40,0
C1 (10 m)	50,0	50,0
C2 (10 m)	20,0	80,0
Tortilla (8 m)	50,0	50,0
Casos (3 m)	66,7	33,3
C1 (2 m)	100,0	-----
C2 (3 m)	-----	100,0
Harina de maíz (5 m)	-----	100,0
Casos (0 m)	-----	-----
C1 (1 m)	-----	100,0
C2 (4 m)	-----	100,0

<sup>a</sup>= 20 ppb es el límite máximo permitido de aflatoxinas en el alimento de consumo humano según la FDA (5).

<sup>b</sup>= muestras

ppb) fue bastante mayor. Tal y como se presenta en el cuadro 2 se ve que los Casos, los cuales no consumieron harina de maíz, fueron los que presentaron por centualmente niveles menores de aflatoxinas en el maíz en grano (40%) y en las tortillas (33,3%). Los C1 que junto con los Casos constituyen los núcleos residentes en la zona, no consumieron tortillas con contaminación igual o mayor a 20 ppb de aflatoxinas, y todas sus muestras de harina de maíz estuvieron contaminadas por encima de ese valor. Los C2 que estuvieron constituidos por núcleos residentes en la zona (8) y no residentes en la zona (5), presentaron los mayores porcentajes de contaminación con 80,0% de las muestras de maíz en grano igual o mayor a 20 ppb de aflatoxinas, y con 100% de contaminación según los parámetros descritos, en el caso de las tortillas y de la harina de maíz. El contenido promedio de aflatoxinas en las 26 muestras de maíz en grano fue de 24,5 ppb; en las 8 muestras de tortilla fue de 30,0 ppb, y en las 5 muestras de maíz fue de 59,7 ppb. Los cuadros 3 y 4 son dos tablas de contingencia en las que se comparan los Casos: primero con los C1 (cuadro 3) según la exposición (contenido de aflatoxinas igual o mayor a 20 ppb en las muestras), y luego con los C2 (cuadro 4) también según la exposición descrita. Los valores de  $X^2$  fueron 0,16 y 8,32 respectivamente. No existió relación es-

tadísticamente significativa (p,05) entre el contenido de aflatoxinas en la dieta y el CHC, de acuerdo a los tipos de controles usados. Incluso en los C2 fue significativa la relación (p,05) entre el contenido elevado de aflatoxinas y la no existencia de CHC. El cuadro 5 muestra la similitud en relación con el consumo promedio diario de aflatoxinas en microgramos por día (ug/día), que se encontró en los Casos (2,07 ug/día), en los C1 (2,7 ug/día), y en los C2, que tuvieron un consumo promedio mayor (3,01 ug/día). Al analizar las tablas de contingencia que se presentan en los cuadros 6 y 7, notamos que al comparar los Casos, primero con los C1 (cuadro 6) según la exposición (consumo diario de aflatoxinas igual o mayor a 2,4 ppb), y luego con los C2 (cuadro 7), también según la exposición descrita. Los valores X<sup>2</sup> fueron 0,16 y 1,38 respectivamente. Tampoco existió estadísticamente significativa (p,05) entre el consumo diario promedio de aflatoxinas en la dieta y el CHC, de acuerdo a los dos tipos de controles usados.

**CUADRO 3**

**DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS SEGUN EL CONTENIDO DE AFLATOXINAS DE LOS CASOS Y DE LOS CONTROLES DE VECINDARIO**

Contenido de aflatoxinas	Casos de CHC	Control de vecindario	Totales
>=20 ppb	5	6	11
<20 ppb	8	7	15
Totales	13	13	26

**CUADRO 4**

**DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS SEGUN EL CONTENIDO DE AFLATOXINAS DE LOS CASOS Y DE LOS CONTROLES INSTITUCIONALES**

Contenido de aflatoxinas	Casos de CHC	Controles Institucionales	Totales
>=20 ppb	5	12	17
<20 ppb	8	1	9
Totales	13	13	26

**CUADRO 5**

**CONSUMO PROMEDIO DIARIO DE AFLATOXINAS DE LOS CASOS CON CHC Y DE LOS CONTROLES (ug/día)<sup>a</sup>**

Grupo número	Casos con CHC	Controles	
		de vecindario	Institucionales
1	1,4	2,2	4,8
2	1,1	0,5	3,2
3	6,1	3,8	1,0
4	1,2	1,9	3,1
5	5,5	1,5	2,3
6	0,4	0,8	1,8
7	0,9	1,9	2,3
8	1,5	4,0	2,8
9	0,5	0,6	0,8
10	0,7	1,3	1,3
11	2,5	4,2	0,5
12	2,5	4,1	7,6
13	2,0	1,4	7,6
Promedio	2,07	2,70	3,01
Desviación estándar	1,82	1,38	2,35

a: ug: microgramo

**CUADRO 6**

**DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS SEGUN EL CONSUMO DIARIO DE AFLATOXINAS DE LOS CASOS Y DE LOS CONTROLES DE VECINDARIO**

Contenido de aflatoxinas (ppb)	Casos de CHC	Controles de vecindario	Totales
>= 2,4	5	4	9
< 2,4	8	9	17
Totales	13	13	26

## CUADRO 7

## DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS SEGUN EL CONSUMO DIARIO DE AFLATOXINAS DE LOS CASOS Y DE LOS CONTROLES INSTITUCIONALES

Contenido de aflatoxinas (ppb)	Casos de CHC	Controles Institucionales	Totales
≥2.4	5	6	11
< 2.4	8	7	15
Totales	13	13	26

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

En el presente estudio, tanto los Casos como todos los Controles (C1 y C2) consumieron el maíz o sus derivados en forma constante, lo que desde este punto de vista los hace tres grupos equivalentes. Además los controles y los C1, son también muy semejantes en cuanto aspectos geográficos, socioeconómicos, culturales y condiciones de vida. Los únicos grupos familiares no residentes en la zona SR-P, se encontraron en los C2, lo que los conviene en un grupo más heterogéneo que los otros dos. Estos hechos probablemente explican el que el contenido de aflatoxinas en las muestras provenientes de los Casos y de los C1 tengan valores promedio y desviaciones estándar muy semejantes, a diferencia de las muestras de los C2 en las que esos valores fueron muy diferentes a los de los otros dos grupos. Las 26 muestras de maíz en grano (contenido promedio de aflatoxinas de 24,5 ppb) son bastante representativas, tanto de las similitudes como de las diferencias apuntadas. No así las 8 muestras de tortilla (contenido promedio de aflatoxinas de 30 ppb), ya que en los C1 las 2 muestras estuvieron por sobre 20 ppb. Aún menos representativas resultaron las 5 muestras de harina de maíz (contenido promedio de aflatoxinas de 59,7 ppb), que en los C1 (1 muestra) y en los C2 (4 muestras), el valor de aflatoxinas estuvo sobre 20 ppb. De ninguno de los Casos se obtuvo harina de maíz. Por los valores obtenidos en las dos tablas de contingencia (cuadros 3 y 4), se muestra que no existe relación estadísticamente significativa entre el contenido elevado de aflatoxinas y el CHC (para C1,  $p,05$  y para C2,  $p,05$ ). Incluso las muestras recolectadas de C2 presentan un contenido promedio de aflatoxinas 1,96 veces más que el de los Casos (Cuadro 1), en cuyos núcleos familiares, por definición ningún individuo tuvo CHC, al menos durante los 15 años previos. Esta relación entre el

contenido elevado de aflatoxinas en los C2 y la no existencia de CHC fue significativa ( $p 0,05$ ) y fue precisamente en estos núcleos familiares que se obtuvieron la mayoría de las muestras de harina de maíz (4 de 5) (cuadro 2), las cuales fueron las que presentaron el mayor contenido promedio de aflatoxinas (1,99 veces más que el del maíz en grano) a diferencia de las muestras de maíz en grano (promedio de aflatoxinas: 24,5 ppb), que fue el tipo de muestra mayormente recolectado en los Casos (10 de las muestras) (cuadro 2). Aunque para valorar el consumo promedio diario de aflatoxinas en la dieta no existen parámetros claros de seguridad que sean aceptados a nivel internacional, de todas maneras en el presente estudio tampoco se encontró relación estadísticamente significativa entre dicho parámetro y el CHC al nivel de significancia del 5% (cuadros 6 y 7). Dada entonces la falta de correlación entre el CHC, tanto con el consumo promedio diario como con el grado de contaminación de aflatoxinas del maíz de la dieta, se sugiere entonces que el virus de la hepatitis B (VHB) juegue un papel más determinante en cuanto a la etiología del CHC. Esto último sustentado en el hecho de que en SR-P la prevalencia del VHB es de 10,5% (7), a diferencia de 0,53 a 0,66% (8) y de 0,8% (7) de la población general, que se reportan en la literatura nacional. O sea, entre 13,13 y 19,8 veces mayor prevalencia en los cantones de nuestro estudio, que en el resto de la población costarricense. también en el hecho de que en dos series de individuos con CHC en Costa Rica, se encontró lo siguiente: en una de 35 individuos, 22 de ellos (68,86%), tuvieron positivo algún marcador del VHB (9) y en la otra de 69 individuos, 9 de ellos (13,04%) resultaron positivos por las técnicas de tinción en tejidos para evidenciar a los antígenos del VHB (8). Sabemos que se ha propuesto que las aflatoxinas juegan un papel sinérgico con el VHB, al alterar las primeras la respuesta celular del huésped humano, favoreciendo las propiedades oncogénicas del segundo (10). Por los hallazgos obtenidos en nuestro estudio, ésta también parece ser la conclusión más adecuada para explicar los Casos de CHC en San Ramón y Palmares. Se recomienda tomar medidas preventivas, tendientes a reducir la contaminación por aflatoxinas en los productos o alimentos susceptibles a ella, tanto en la etapa de recolección como durante el almacenamiento, con el propósito de disminuir la ingestión de aflatoxinas a través de alimentos (en especial en aquellas zonas del país donde la prevalencia del VHB sea alta), que eventualmente puedan presentar una elevada contaminación por aflatoxinas. Además resulta urgente conocer, a través de estudios adecuadamente diseñados y realizados, la relación que existe entre el VHB y el CHC en Costa Rica.

## RESUMEN

Se analizó la relación entre el contenido y el consumo de aflatoxinas del maíz de la dieta y el Cáncer Hepatocelular (CHC), con un estudio de Casos y Controles,

tomando 13 de los 15 individuos con CHC de San Ramón y Palmares de 1979 a 1983. Ambos cantones suman un 2,01% del área total del país, 2,44% de su población media, y 8,24% de los 182 casos de CHC del país en el período 79-83. En esos cantones la Tasa de Incidencia de CHC/100.000 habitantes (Ti) quinquenal fue 5,11; 4,22 veces más que la del país ( $Ti = 1,21$ ). Los 39 núcleos familiares formados por 13 Casos, 13 Controles de vecindario (C1) y 13 Controles institucionales (C2), consumían regularmente maíz o sus derivados. Los 26 núcleos de la zona San Ramón-Palmares (constituidos por 13 Casos y 13 C1) consumieron más maíz en grano que corresponden a las muestras menos contaminadas por aflatoxinas ( $x=24,5$  partes por billón [ppb] según el método de Velasco), En los 13 C2 estuvieron los núcleos no residentes en la zona y consumieron más harina de maíz industrial siendo éstas las muestras con la mayor contaminación ( $x= 59,7$  ppb). El consumo promedio diario de aflatoxinas fue  $x= 2,07$  ug/día para los Casos,  $x = 2,7$  ug/día para los C1 y  $x = 3,01$  ug/día para los C2. No hubo relación estadísticamente significativa entre CHC, el consumo diario de aflatoxinas (p,05) o el contenido mayor a 20 ppb de aflatoxinas en el maíz de la dieta (p,05), por lo que se sugiere que otros agentes etiológicos, incluyendo al virus de la hepatitis B, podrían estar relacionados con la etiología del CHC en los casos de San Ramón y Palmares.

## SUMMARY

Diet aflatoxin amount and consumption, and hepatocellular cancer in two costarrican counties. With a Case Control study, relationship between diet aflatoxin amount and consumption, and Hepatocellular Cancer (HCC) was tested with 14 of all 15 individuals with HCC in San Ramón and Palmares counties (SR-P) from 1979 to 1983. Both counties together represent 2,01% of total Costa Rica (CR) area, 2,44% of its mean population and 8,24% of its total 182 cases of HCC from 1979 to 1983. Mean Incidente Rate/100.000 (IR) for this period in SR-P was 5,11 which is 4,22 times higher than that of CR ( $IR=1,21$ ). All 39 family groups formed by 13 Cases, 13 Neighborhood Controls (C1) and 13 Hospital Controls (C2) ate corn and derivates regularly. The 26 family groups of SR-P (13 Cases and 13 C1) mainly ate corn grain which were those samples with less aflatoxin contamination ( $x= 24,5$  parts/billion or ppb as measured by Velasco method). Industrial flour samples had the highest aflatoxin contamination ( $x = 59,7$  ppb), which was mainly consumed by family groups not living in SR-P (13 C2). Mean aflatoxin daily consumption for Cases was  $x=2,07$  ug/day, for C1 was  $x= 2,7$  ug/day and for C2 was  $x = 3,01$ , ug/day. Relationship between HCC and daily aflatoxin consumption (p,05), and diet aflatoxin content more than 20 ppb (p,05) were not statistically significant. It suggests that other aetiologic agents, including Hepatitis B Virus (HBV) could have been related to HCC in Cases of SR-P.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alán, M., Chan, V., Sittenfeld, A., Mora, C., Brenes, F., Fonseca, J., Salom, I. y Martén, A. Descripción epidemiológica del cáncer hepatocelular (CHC) en Costa Rica entre 1979 y 1983. Acta Méd. Cost., en prensa.
2. Bulatao-Jayme, J., Almero, E.M., Castro, Ma. C.A., Salamat, L.A., Velandria, F.V. Dietary aflatoxin and hepatocellular carcinoma in the Philippines. Phil J Int Med, 1981, 19:95-101.
3. Sackett, D.L., Haynes, R.B. y Tugwell, P. Clinical epidemiology. A basic science for clinical medicine. Toronto, Little Brown and Co., 1985.
4. Velasco, J. Detection of aflatoxin using small columns of florisit. J Am Oil Chem Soc, 1972, 49:141-142.
5. Food and Drug Administration. Brazil nuts, pistachio nuts, and other foods and feeds. Availability of guidelines. Fed Reg, 1978, 42(11): 2444-2445.
6. Nie, N.H., Hull, C.H., Jenkins, J.G., Steinbrenner, K y Bent, D.H. Statistical package for the social sciences. New York, McGraw Hill, 1975.
7. Armijo, J., Herra, S.A., Hevia, F.J., Visona, K., Zamora, E. y Villarejos, V.M. Marcadores serológicos de hepatitis viral B y No-A No-B en personal del Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica, Acta Méd Cost, 1987, 30 (1): 40-44.
8. Salom, I., Román, S., Macaya, G., Fonseca, J., Brenes, F., Mora, C. y Martén, A. Revisión retrospectiva de la prevalencia del virus de la hepatitis B (VHB) en varios grupos de población. Rev. Biol Trop, en prensa.
9. Sittenfeld, A., Zamora, E. y Serra, J. Determination of alpha fetoprotein in patients with acute and chronic hepatitis B, in HBsAg positive donors and in patients with primary hepatocarcinoma in Costa Rica In: Proceedings of the International Symposium on Viral Hepatitis and AIDS. San José, 1986.
10. Lutwick, L.I. Relation between aflatoxin, hepatitis B virus, and hepatocellular carcinoma. Lancet, 1979, i: 755-757.