

Un brindis por un coctel neuropatológico de virus, toxinas y medio ambiente

Fidias E. León-S¹
Marta Carpintero²
Nhora de Merino³
Jaime Bayona⁴
Leonidas Ocampo⁵
Martha E. León-S⁶
Vladimir Zaninovic⁷

RESUMEN

Con el fin de conocer posibles cofactores relacionados con la paraparesia espástica tropical/HTLV-I asociados a mielopatía, investigamos la presencia de micotoxinas en 4 pacientes con esta enfermedad neurológica, quienes vivían en el suroccidente Colombiano. En un paciente con PET/HAM, quien vivía en la localidad de Guapi, se detectó la micotoxina conocida como deoxinivalenol, la cual y hasta donde conocemos, ésta es la primera ocasión en el mundo que se describe este hallazgo. Este hecho podría explicar no sólo el papel de los cofactores en este proceso de neurodegeneración, sino que además, nos permitiría entender los cuadros clínicamente similares descritos en las mismas áreas endémicas de la PET/HAM, pero en quienes no se ha encontrado clase alguna de gérmenes que puedan explicar dichas patologías. Con el fin de corroborar estos hallazgos y descartar una asociación fortuita, se hace necesario realizar una investigación similar, en una población más grande y a la mayor brevedad posible.

PALABRAS CLAVES: Paraparesia espástica tropical, HAM/PET, micotoxinas, HTLV-I, VIH, deoxinivalenol.

ABSTRACT

We investigated the presence of mycotoxins in patients with tropical spastic paraparesis/ HTLV-I associated myelopathy. Deoxinivalenol was detected in a patient with HAM/TSP living in Guapi and in none of the subjects from the control group. So far we are aware, this is the first time that a mycotoxin is found in patients with such pathology. This feature could be helpful to explain not only the cofactors role in diseases related with retroviral infections but might also explain the large amount of similar seronegative cases described in those places where these diseases are considered endemics.

KEY WORDS: Tropical spastic paraparesis, HAM/PET, mycotoxin, HTLV-I, HIV, deoxinivalenol.

INTRODUCCIÓN

Desde hace aproximadamente 100 años⁽¹⁾, un tipo de mieloneuropatía fue descrito en Jamaica y desde entonces

cuadros similares han sido descritos en diferentes áreas del mundo, entre ellos la región suroccidental de la costa pacífica colombiana⁽²⁾. La gran mayoría de estudios realizados con el fin de aclarar su etiología han estado encaminados a la identificación de un posible agente infeccioso. Inicialmente, este cuadro se consideró como una complicación malárica y más tarde una infección por *Treponema pallidum*⁽¹⁾. En 1985 Gessain y col encontraron que 10 de 17 pacientes con paraparesia espástica tropical (PET/HAM), en Martinica, poseían anticuerpos contra el retrovirus HTLV-I⁽³⁾; luego en Japón, Colombia y otros lugares se reportaron asociaciones similares⁽⁴⁾. Sin embargo, luego de 15 años de haberse descubierto los retrovirus humanos y de la intensa investigación que se ha realizado en este campo se ha llegado a la conclusión de que estos retrovirus no son necesarios ni suficientes para producir las diferentes enfermedades a las cuales se han asociado estos gérmenes. Esto se debe a que no todos los pacientes portadores desarrollan tales enfermedades y no

1. MD, PhD, Department of Neurology, The University of Alabama at Birmingham, UAB Station, Birmingham.

2. MSc. Laboratorio Químico, Bogotá, Colombia.

3. MD, Departamento de Patología, Fundación Santa Fe, Bogotá, Colombia.

4. PhT(e). Universidad Manuela Beltrán, Bucaramanga, Colombia.

5. MD. Clínica Chicamocha, Bucaramanga, Colombia.

6. DEscí, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

7. MD, Departamento de Medicina Interna, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Correspondencia: Dr. F. E. León-S. FAX: (97)6524958

todos los pacientes con dichos trastornos poseen anticuerpos contra este retrovirus⁽⁶⁻⁸⁾. Además, este mismo virus puede llegar a producir desde calvicie hasta diarrea, pasando por los bien conocidos cuadros de leucemias y linfomas de células T del adulto^(6,7).

Debido a estas incongruencias, se acepta actualmente que deben existir otros factores, diferentes a los retrovirus, que parecen jugar un papel fundamental en el establecimiento de estas enfermedades supuestamente retrovirales. Dentro de éstos están los antígenos de histocompatibilidad leucocitaria los cuales se creyó que explicarían la selección de pacientes susceptibles que llegaban a padecer esta enfermedad pero este "factor" no se ha hallado consistentemente en las poblaciones estudiadas^(9,10). De tal forma que, dentro de la cadena epidemiológica del agente, del huésped y del medio ambiente, ampliamente conocida, queda aún el medio ambiente por investigar.

Diferentes grupos han insistido que los "factores" ambientales juegan un papel fundamental en el desarrollo de las enfermedades asociadas con el HTLV-I principalmente de la PET/HAM^(6,7); pero cuál o cuáles factores no han sido aún claramente identificados. Sin embargo, hace algunos años, cuando uno de nosotros (FELS) estaba investigando y estudiando estos cuadros clínicos en la zona endémica del Japón notó que había ciertos factores climáticos que parecían ir paralelos con la presencia de esta enfermedad, allí en Japón; y curiosamente, este patrón climático se observaba también en Colombia, principalmente hacia el suroccidente del País^(11,12).

Posteriormente vimos asimismo que había una estrecha correlación entre la distribución del PET/HAM, los fenómenos ambientales (EL NIÑO) y las áreas de humedad que acompañan dichos fenómenos climáticos en el mundo⁽¹¹⁻¹³⁾. Estas coincidencias nos resultaron muy interesantes porque actualmente se sabe que la humedad puede llegar a afectar los productos alimenticios, al permitir el crecimiento de hongos toxigénicos, los cuales tienen la capacidad de producir cuadros muy similares a los descritos en las entidades asociadas a los retrovirus⁽¹⁴⁾. Estos hechos nos llevaron a sugerir que estos cuadros clínicos de PET/HAM, descritos en áreas con altos niveles de humedad, bien podrían corresponder a una neuromicotoxicosis humana^(15,16). Por este motivo decidimos analizar estas substancias en pacientes con cuadros clínicos compatibles con esta entidad y las cuales han sido halladas con mayor frecuencia en los diferentes estudios epidemiológicos realizados en algunos de los sectores donde los factores meteorológicos antes mencionados son prevalentes. Los resultados preliminares de dicha investigación son el objeto de esta presentación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Investigaciones realizadas previamente en Colombia demostraron que el suroccidente colombiano es un área endémica para la PET/HAM⁽⁴⁾ y por esto decidimos regresar allí e iniciar la búsqueda de pacientes en Guapi, uno de los principales sitios endémicos para esta entidad.

Debido a las dificultades geográficas y a la falta de un registro y un censo organizado de la población, fue necesario acudir a la comunidad, los médicos y paramédicos de la región, quienes nos colaboraron en la ubicación de los pacientes, según la descripción del cuadro clínico que les ofrecíamos⁽⁴⁾. Algunos de los posibles pacientes contactados vivían en el casco «urbano», pero en otros casos fue necesario realizar travesías por los caños y ríos aledaños a la región con el fin de reubicar dichos pacientes. Uno de ellos había fallecido⁽¹¹⁾. Finalmente, 11 casas fueron ubicadas con pacientes sospechosos de poseer la enfermedad, habiendo podido obtener muestras de orina en 4 de ellos; 2 hombres (42 y 47 años) tenían PET/HAM, un hombre (52 años) tenía neuropatía alcohólica y una mujer (48 años) tenía secuelas de enfermedad cerebrovascular. A cada uno de estos pacientes se les dió instrucciones de recoger mínimo 100 cc de orina en un frasco vacío que había contenido suero fisiológico y la cual una vez recolectada se refrigeró en nevera eléctrica y luego se transportó de manera refrigerada, en una nevera portátil vía aérea a Bogotá, para la realización de dichas pruebas de laboratorio.

De otro lado, debido a que no conocían los valores normales de la micotoxinas en la población colombiana fue necesario estandarizar las pruebas a desarrollar en una población control; y la cual debía ser idealmente sin alteración médica o neurológica aparente. Cuatro sujetos (2 hombres y 2 Mujeres), con edades entre 25 y 35 años, sirvieron como controles. Se recogieron 100 cc de orina de cada uno de ellos, la cual fue examinada antes y después de ser contaminada intencionalmente con cada una de las toxinas a investigar. Para validar la recuperación de los métodos empleados, fue necesario realizar la estandarización de dichos valores: se evaluó la misma en tres ocasiones diferentes y con tres diferentes volúmenes de orina de 5, 25 y 100 mililitros de orina recolectados de cada uno de los controles.

La extracción de aflatoxinas se realizó de acuerdo con el método descrito en 1983⁽²⁰⁾, al cual se le adicionó la limpieza de la muestra con una columna en fase sólida de Romer específica para aflatoxinas. Las determinaciones se realizaron por cromatografía de capa fina de alta presión (HPTLC) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC)⁽²¹⁾.

En dos ocasiones se realizó la extracción de la toxina de cada volumen de orina con éter de petróleo en una relación orina: solvente de 1: 10, con el fin de eliminar los lípidos y los contribuyentes solubles en grasa. Luego, la porción acuosa se extrajo con 100 mililitros de cloroformo y posteriormente se realizó otra extracción con 100 mililitros de cloroformo y acetona en relación 1:1, v/v. Posteriormente se combinaron las fases orgánicas, se deshidrataron sobre sulfato de sodio y anhidro y se filtraron. El volumen del solvente se evaporó a sequedad para redisolver el extracto y pasarlo por la columna de purificación en la fase sólida de Romer.

El extracto se volvió a disolver totalmente, en 5 mililitros de acetonitrilo/agua en una proporción de 84/16 y se pasó por una columna de mycosep de purificación de Romer, la cual permite el paso de las micotoxinas de interés; y que de acuerdo con su similitud en la polaridad es retenida en la fase sólida según las interferencias preestablecidas por los fabricantes para dichas toxinas.

El volumen, una vez purificado, se llevó de nuevo a sequedad y se redisolvió en un volumen de 1 mililitro de acetonitrilo, se pasó luego en un filtro de millipore de 0,45 μ m, estando el vial limpio para realizar posteriormente el análisis por HTPCL y por HPLC.

El análisis por HPTLC se realizó sobre placas de sílica gel de 10x 10, se aplicaron luego volúmenes de 5 y 7 microlitros y se desarrollaron en cloroformo/acetona en una dilución v/v de 96:4 como la fase móvil. Simultáneamente se colocaron en esta misma placa 3 y 5 microlitros de las diferentes clases de aflatoxinas a investigar como la aflatoxina B1, B2, G1, G2, y M1. Las aflatoxinas se visualizaron bajo luz ultravioleta de onda larga por comparación de los Rf y de la fluorescencia de cada uno de los estándares y muestras antes comentados.

El análisis de HPCL se realizó sobre cromatógrafo Shimadzu con detector ultravioleta, utilizando una columna Shim-pack CLC-SIL y como mezcla de elución se utilizó tolueno/acetato de etilo/metanol/ácido fórmico en volúmenes de 89: 7: 2:2 respectivamente.

La extracción de nivalenol (NIV) y deoxinivalenol (DON) se realizó con solventes similares a los utilizados para la extracción de aflatoxinas y de acuerdo con el método de Romer y Truck en 1987⁽²²⁾ en lo que respecta a los solventes de extracción y a la purificación, el cual se realizó sobre la columna mycosep. Los extractos de estas micotoxinas se llevaron a sequedad y se redisolviaron en 1 ml de cloroformo/metanol en volúmenes de 8: 2 para determinación por HPTLC. Se aplicaron volúmenes de 5 y 7 microlitros sobre

una placa y de 3,5 y 7 de los estándares de 20 microgramos/microlitro de NIV y de DON. La placa se desarrolló luego en cloroformo/acetona/propanol en volúmenes de 8:1:1; luego se secó la placa al aire, se sometió a tratamiento con cloruro de aluminio mediante inmersión en el reactivo, se secó de nuevo al aire y se calentó a 120°C por 7 minutos.

La visualización de las toxinas se realizó con luz ultravioleta de onda larga. El NIV y el DON aparecen como manchas fluorescentes azules, con un Rf de 0,5 y 0,4 respectivamente. La cuantificación de las toxinas se realizó inicialmente por comparación visual de los estándares y las muestras y por medio de la lectura densitométrica. Las placas fueron corridas en solventes de diferente polaridad; se obtuvieron en todos los casos realizados, respuestas similares de las diferentes muestras al ser comparadas con los estándares.

La determinación de fumonisinas se realizó siguiendo el método descrito por Shephard y col 1992⁽²³⁾. La muestra de orina se desproteinizó con 100 mililitros de metanol. La proteína precipitada se separó luego por filtración, se tomó una alícuota de 5 mililitros del filtrado y se aplicó sobre la columna de Romer para fumonisinas. Se lavó la columna con 8 mililitros de metanol/agua en proporción de 3/1 seguida por 3 mililitros de metanol. Los solventes de lavado se descartaron. La fumonisina se diluyó con 10 mililitros de metanol/ácido acético en una relación de 99/1. El extracto se llevó a sequedad en un baño de agua a 60°C y se redisolvió en 1 mililitro de metanol. La muestra se llevó a determinación sobre una placa de sílica gel de HPTLC. El solvente de desarrollo para HPTLC fue de acetonitrilo/agua, en una proporción 85/15.

Después de dicho desarrollo las placas se asperjaron (lo cual se hace con el objeto de lograr reacciones específicas de los compuestos con base en su estructura química), con p-anisaldehído al 0,5% en metanol/ácido sulfúrico/ácido acético en volúmenes de 85/10/5 respectivamente y se calentó en estufa a 110°C por 5 minutos.

Los estándares y muestras positivas aparecen con un color púrpura rojizo a un Rf de 0,21. Para el análisis y confirmación por HPCL se realizó una derivatización con 1 ml de buffer borato 0,05 M, y 40 miligramos de ortoftaldialdehído en metanol y 50 microlitros de 3mercaptanol; la derivatización se realizó inmediatamente antes de la inyección al cromatógrafo. La columna que se utilizó fue una columna de fase reversa de 15 cm x 4 mm de d.i., similar a la empleada para la extracción de aflatoxinas. El solvente de elución fue metanol y se empleó un buffer de fosfato de sodio 0,1M. El flujo del solvente que se utilizó para separar los compuestos sobre la columna de cromatografía fue de 1 ml/min.

RESULTADOS

La recuperación de las toxinas con los diferentes métodos empleados en las orinas de las personas normales fueron del 81% para las aflatoxinas y del 75% para el NIV, el DON y el 75% para las fumonisinas. De las micotoxinas investigadas en las orinas de los pacientes de Guapi, se encontró la presencia de DON en la orina de uno de los pacientes con PET/HAM (12 ug/ml). Esta toxina fue consistentemente hallada, en las diferentes ocasiones en las que estas micotoxinas fueron analizadas.

DISCUSIÓN

Durante muchos años los diferentes estudios clínicos y epidemiológicos persistentemente han señalado que los factores ambientales son fundamentales para el desarrollo de estas entidades relacionadas con retrovirus^(9,11-13,24). Dentro de éstos están la humedad, la falta de refrigeración de los alimentos y las costumbres culturales propias de cada región con respecto a la preparación de los alimentos, todo lo cual tiene como común denominador la fermentación, con la subsecuente producción de micotoxinas, las cuales hemos comprobado en este trabajo. El haber encontrado de manera clara y consistente la micotoxina conocida como DON en un paciente con un cuadro clínico típico de PET/HAM es muy interesante y hasta donde sabemos este hallazgo no había sido descrito en ninguna parte del mundo en esta entidad. Más aún, el hecho de que estas micotoxinas y más específicamente el DON sea la micotoxina más prevalente en el sur de Japón, donde esta enfermedad es endémica, es más coincidental y hace que nuestros hallazgos adquieran una mayor importancia clínica y epidemiológica y plantea unas bases muy interesantes para futuros estudios sobre esta entidad⁽²⁵⁾. El hecho de que este retrovirus del HTLV-I haya sido considerado como uno de los cofactores importantes para ayudar al desarrollo clínico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida⁽²⁶⁾ obliga a continuar estos estudios, los cuales podrían ser muy útiles para entender los diferentes fracasos obtenidos hasta la fecha en la elaboración de vacunas eficaces para controlar y erradicar enfermedades retrovirales.

Estas micotoxinas tienen como característica fundamental la capacidad de producir inmunosupresión y permiten la acción oportunista de diferentes clases de gérmenes⁽¹⁷⁻¹⁹⁾, lo cual explicaría por qué no todos los individuos infectados con estos retrovirus desarrollan la enfermedad manifiesta a menos de que posean dicho estado de inmunosupresión previa, conformando así un verdadero coctel neuropatológico⁽²⁷⁾. Sin embargo, debido a que estas toxinas pueden actuar también independientemente de los

retrovirus, explicaría la presencia de los cuadros clínicos similares a los descritos en pacientes con enfermedades retrovirales como el PET/HAM y el SIDA, en las zonas consideradas endémicas para estos gérmenes, pero cuyos pacientes han resultado persistentemente seronegativos⁽²⁸⁾. Estos cuadros clínicos, relacionados con los retrovirus y con estos agentes tóxicos como las micotoxinas, parecen ser muy semejantes fisiopatológicamente a los diferentes cuadros clínicos de hepatocarcinoma, descritos principalmente en el Continente Asiático y en los cuales se ha encontrado una clara asociación entre los portadores de los diferentes tipos de virus de la hepatitis y el grado intoxicación micotoxicológica⁽²⁹⁾. Así entonces estas toxinas podrían ser el eslabón perdido en esta cadena epidemiológica no sólo de los retrovirus, sino que además, llenarían el vacío que se ha encontrado hasta ahora para explicar adecuadamente la gran cantidad de pasos observados en el camino de la neurodegeneración y carcinogénesis relacionados con éstos y otros gérmenes de comportamiento biológico muy similar^(30,31).

Finalmente si descontamos las dificultades epidemiológicas para lograr detectar los pacientes evaluados aquí debido a las condiciones de la zona geográfica descrita, se podría considerar que el número de pacientes es pequeño. Pero, si tenemos en cuenta que teóricamente nunca se deben hallar micotoxinas en los humanos, que los primeros casos reportados de SIDA en humanos fueron 5 pacientes, y que también la asociación entre PET/HAM y el HTLV-I fue inicialmente encontrada en 2 casos⁽³⁾ y hoy son miles los de pacientes diagnosticados en el mundo: los presentes resultados nos permiten sugerir que por la presencia de micotoxinas son dignos de ser tenidos muy en cuenta en próximas investigaciones sobre enfermedades retrovirales no sólo en Colombia sino en el mundo. Ellas parecen dirigirnos a una nueva era dentro del campo de las micotoxicosis asociadas a la neurología. Un trabajo en que se investiga la presencia de micotoxinas en una mayor cantidad de sujetos está en proceso y éste será objeto de una futura publicación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roman GC. Tropical myeloneuropathies: The hidden endemics. *Neurology* 35: 1158-1170; 1985
2. Zaminovic V, Biojo R, Barreto P. Paraparesia espástica del Pacífico. *Col Med* 12: 111-117; 1981
3. Gassain A, Barin F, Vernant JC, Gopt O, Maurs L, Calender A. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* ii: 407-408; 1985.
4. Zaminovic V, Arango C, Biojó R, Mora C. Tropical spastic paraparesis in Colombia. *Ann Neurol* 23: 127-132; 1988.
5. Gallo R. Human retroviruses: a personal perspective. *Nat Med*: en prensa.

6. Zaninovic V, Leon-S FE. Fifteen years of follow-up on HTLV-I positive and HTLV-I negative spastic paraparesis patients in Southwestern Colombian, South América. *J Neurovirol* 2: 357-360; 1996.
7. Zaninovic V. Enfermedades asociadas con el virus HTLV-I. Cali, X,Y,Z; 1992.
8. Leon-S FE, Arimura K, Arimura Y, Sonoda Y, Suwazono S, Osame M. Clinical neurophysiological comparative study on HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Arc Med Res* 26: 397-403; 1995.
9. Leon-S FE, Ariza-DeLeon A, Ariza-C, León-S ME. Mitochondrial DNA and some more in the Japanese-South American linkage. *South Pac Study J* 9: 9-15; 1994.
10. Leon-S FE, Ariza-DeLeon A, Ariza-CA. HLA, Transpacific contacts and retrovirus. *Hum Immunol* 42: 348-350; 1995.
11. Leon-S FE, Zaninovic V. Geographical considerations on HAM/PET in Japan. *Inst Med Trop Sao Paulo* 37(2): 185-186; 1995.
12. Leon-S FE, Zaninovic V. Clima, costumbres y cultura en el HAM/PET en Colombia. *Acta Med Col* 19: 248; 1994.
13. Schoental R. Mycotoxins and the toxicity of plants. *Chem Brit* 20: 1108-1113; 1994.
14. Leon-S FE. Neuromycotoxicosis in the II world war. *Can J Neurol Sci* 20: 185; 1993.
15. Leon-S FE. Bacteria No!, Fungus Yes!. *J Clin Epidemiol* 48: 1183-1184; 1995.
16. Leon-S FE. Kuru, Volcanes y virus lentos no es la canción, es el cantante. *ABC* 11: 81-84; 1995.
17. León-S FE. Human micotoxicosis: ancient lessons from arecent past. Proceedings of the 2nd International Symposium on Environmental Protection. Bucaramanga, Colombia, pp 234-236.
18. Schoental R. A corner of history. Moses and mycotoxins. *Prev Med* 9: 159-161; 1980.
19. Anakarahanonta T, Chudhabuddhi Ch. High-performance liquid chromatography of aflatoxins in human urine. *J Chromat* 275: 387-393; 1983.
20. Yourtee DM, Yourtee CL. Aflatoxin detoxification in humans. Laboratory field and clinical perspectives. *J Toxicol-Toxin Reviews* 8: 3-18; 1989.
21. Truckess MW, Flood MT, Mossoba MM. High performance thin-layer chromatographic determination of deoxynivalenol, fusarenon-x and nivalenol in barley, corns and wheat. *J Agric Food Chem* 35: 1987.
22. Shephard GS, Thiel PG, Sydenham. Determination of fumonisin B1 in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromat* 574: 299-304; 1992.
23. Virus Diseases: Human T lymphotropic virus type I, HTLV-I. *Who wklly Epidem Rec* 49: 382-383; 1989.
24. Leon-S FE, Zaninovic V. Hechos, factores y cofactores en el camino de los retrovirus. *Medicas UIS* 9: 68-72; 1995.
25. Watson RR. Cofactors in HIV-1 infection and AIDS. CRC Boca Raton, Florida, 1989.
26. Ho DM, Cao Y, Zhu T, Farthing Ch, Wang N, Gu G, Schooley RT, Darr ES. Idiopathic CD4+ lymphocytopenia-immunodeficiency without evidence of HIV infection. *N Engl J Med*: 380-385; 1993.
27. Duesberg PH. Is HIV the cause of AIDS?. *Lancet* 346: 1371-1372; 1995.
28. Pradilla G. Las micotoxinas y los retrovirus: ¿Un coctel neuropatológico? *Medicas UIS* 9: 59-60; 1995.
29. Mochizuki S, Fukushima T, Maruyama K. Multistep alterations of human lymphocytopenia infect with HRVI and them exposed to carcinogens. *Det Prev* 18: 335-342; 1994.
30. Okamoto T, Ohno Y, Suganes T, Watanabe S, Shimoyama M, Tajima K, Miwa M, Shimotohno K. Multistep carcinogens model for adult T-Cell leukemia. *Jap J Cancer Res* 80: 191-195; 1989.
31. Galfga N, Carpintero M, León-S FE, Ocampo L, Bayona J. Mycotoxins in myelopathies of man. *Lancet* 348: 1039; 1996.

