MAURICIO DE ROSA TROTTA

Correlação entre ingestão de aflatoxina B₁,
concentração sérica e urinária de AFB₁–adutos e
expressão hepática de marcadores moleculares
relacionados à hepatocarcinogênese em ratos

Ribeirão Preto

2016

MAURICIO DE ROSA TROTTA

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Correlação entre ingestão de aflatoxina B₁,
concentração sérica e urinária de AFB₁–adutos e
expressão hepática de marcadores moleculares
relacionados à hepatocarcinogênese em ratos

Tese apresentada ao Departamento
de Patologia e Medicina Legal da
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor
em Ciências

Área de concentração: Patologia

Opção: Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Fernando Silva
Ramalho

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Trotta, Mauricio de Rosa

Correlação entre ingestão de aflatoxina B₁, concentração sérica e urinária de AFB₁-adutos e expressão hepática de marcadores moleculares relacionados à hepatocarcinogênese em ratos. Ribeirão Preto, 2016.

101 p. : il.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia. Opção: Patologia Experimental.

Nome: TROTTA, Mauricio de Rosa

Título: Correlação entre ingestão de aflatoxina B₁, concentração sérica e urinária de AFB₁–adutos e expressão hepática de marcadores moleculares relacionados à hepatocarcinogênese em ratos

Tese apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, na Área de concentração: Patologia, Opção: Patologia Experimental

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof.Dr: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha esposa Luciana e meu filho Pedro, já que sem vocês ao meu lado, nada disso valeria à pena. Obrigado pela paciência e pelo amor;

Dedico também este trabalho ao meu pai Fernando, minha mãe Iara (*in memoriam*), e meus irmãos Mariana, André e Marcelo, que sempre me apoiaram e, de diversas maneiras, tornaram a realização deste projeto possível.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho que, mesmo com todas as adversidades no percurso, teve paciência e confiança necessárias para a finalização do projeto;

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP e toda a sua equipe do Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia dos Alimentos pela idealização e parceria no projeto;

À equipe do Laboratório de Patologia Celular e Molecular, Profa. Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho, Dra. Marlei Josieli Augusto e Deisy Mara Silva pelo apoio técnico necessário para a viabilização do projeto;

Aos colegas de pesquisa, Letícia, Maraíza, Livia e Sérgio que sempre acompanharam e ajudaram em todas as etapas do projeto;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro através dos processos nº 2013/04627-8 e 2010/20895-4;

A todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho,

Muito obrigado.

RESUMO

Trotta MR. Correlação entre ingestão de aflatoxina B₁, concentração sérica e urinária de AFB₁-adutos e expressão hepática de marcadores moleculares relacionados à hepatocarcinogênese em ratos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2016. 101 f.

A aflatoxina B₁ (AFB₁) é um metabólito de fungos do gênero *Aspergillus* que crescem naturalmente em alimentos. Devido às condições climáticas e às práticas agrícolas inadequadas, países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, possuem alta possibilidade de exposição à AFB₁ através de alimentos contaminados. A exposição crônica a essa micotoxina pode acarretar no surgimento de carcinoma hepatocelular e explicar a incidência desse tumor na ausência de fatores como hepatites virais e cirrose. Após a ingestão oral, a AFB₁ é biotransformada para a sua forma genotóxica que se liga ao DNA das células hepáticas. Isso gera mutações que podem ser consideradas promotoras da hepatocarcinogênese. Na sequência desse processo, ocorre a formação de novos adutos de aflatoxina que podem se ligar à proteína plasmática ou serem excretados pela urina, respectivamente, AFB₁-lisina e AFB₁-N⁷-guanina. Esses compostos podem ser detectados e funcionar como biomarcadores da exposição e da toxicidade da AFB₁. A AFB₁ foi administrada enteralmente em ratos Wistar, via gavagem, durante 90 dias, sendo essa forma de exposição a mais próxima daquela pela qual os seres humanos estão susceptíveis. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: Grupo Controle (sem AFB₁), AFB₅₀ (50 ppb), AFB₁₀₀ (100 ppb) e AFB₂₀₀ (200 ppb), sendo a concentração de AFB₁ em parte por bilhão (ppb) por quilograma de dieta consumida. Foram realizadas avaliações de bioquímica plasmática de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT); alterações na expressão hepática de genes e proteínas relacionadas ao processo de hepatocarcinogênese (Ciclina D1, p53, β -catenina, Proibitina, p27^{Kip1} e Glutathione-S-Transferase-p1-GST-P) por meios das técnicas de imuno-histoquímica e PCR em tempo real. Foram realizadas determinações dos níveis dos adutos da AFB₁ no soro, na urina. Os resultados mostraram que houve aumento na expressão de AST e ALT em todos os grupos que receberam AFB₁. No grupo AFB₂₀₀ e, em menor proporção no AFB₁₀₀, surgiram diversos focos de hepatócitos alterados marcados positivamente com GST-P, que são lesões pré-neoplásicas bem determinadas e consideradas *endpoints* em ensaios de hepatocarcinogênese experimental. A análise das proteínas hepáticas indicou que as lesões decorrentes da AFB₁ nos grupos AFB₂₀₀ e AFB₁₀₀ apresentaram superexpressão de ciclina D1, p53, β -catenina, proibitina, indicando a participação delas em vias que favorecem a hepatocarcinogênese. Adicionalmente, ocorreu uma redução na expressão gênica do gene p27, o que também indica uma condição favorável para a progressão neoplásica para a formação de carcinoma hepatocelular. A quantificação dos níveis de adutos no soro e na urina apontou que a formação desses compostos foi dose-dependente com as diferentes concentrações de AFB₁ empregadas. Além disso, houve correlação entre a formação dos adutos com a expressão das proteínas Ciclina D, p53, β -catenina e Rb. Sendo assim, foi possível, experimentalmente, apontar as principais proteínas envolvidas na hepatocarcinogênese e indicar que os adutos de aflatoxina no soro e na urina podem ser biomarcadores úteis para mensurar a exposição e o dano causado pela ingestão subcrônica de AFB₁.

Palavras-Chave: Aflatoxina. Carcinogênese. Fígado. Biomarcadores tumorais.

ABSTRACT

Trotta MR. Correlation between aflatoxin B₁ intake and serum and urinary concentrations of AFB₁-adducts and hepatic expression of molecular markers related to hepatocarcinogenesis in rats [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2016. 101 f.

Aflatoxin B₁ (AFB₁) is metabolite produced by fungi of genus *Aspergillus* that grows naturally in food. Due to weather conditions and inadequate agricultural practices, developing countries, including Brazil, have high possibility of exposure to AFB₁-contaminated food. Chronic exposure to this mycotoxin may result in the emergence of hepatocellular carcinoma and explain the incidence of this tumor in the absence of factors such viral hepatitis and cirrhosis. After oral ingestion, AFB₁ is biotransformed to its genotoxic form that binds to DNA in liver cells. This leads mutations that may be considered promoters of hepatocarcinogenesis. Following this process, there is the formation of new adducts of aflatoxins that can bind to plasma proteins or are excreted in the urine, respectively, AFB₁-lysine and AFB₁-N⁷-guanine. These compounds can be detected and work as biomarkers of exposure and toxicity of AFB₁. AFB₁ was administered in Wistar rats enterally, via gavage, for 90 days, and this form of exposure is closest which humans are susceptible. The animals were separated into four groups: control group (without AFB₁), AFB₅₀ (50 ppb), AFB₁₀₀ (100 ppb) and AFB₂₀₀ (200 ppb), in which concentration of AFB₁ in part per billion (ppb) per kilogram of diet consumed by animals. It were performed liver biochemistry plasma aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) assessments; changes in hepatic expression of genes and proteins related to hepatocarcinogenesis (Cyclin D1, p53, β -catenin, Prohibitin, p27^{Kip1} e Glutathione-S-Transferase-p1-GST-P) by immunohistochemical and real-time PCR techniques. The levels of AFB₁ adducts of serum and urine were performed. The results showed increase in AST and ALT levels in all groups receiving AFB₁. In group AFB₂₀₀ and, lesser extent in AFB₁₀₀, emerged several altered hepatocyte foci positively marked with GST-P, which are well determined preneoplastic lesions and deemed endpoints in experimental hepatocarcinogenesis assays. Analysis of liver proteins indicated that damage from AFB₁ in groups AFB₂₀₀ and AFB₁₀₀ showed overexpression of cyclin D1, p53, β -catenin, prohibitin, indicating their participation in ways that favor the hepatocarcinogenesis. Additionally, there was a decrease in gene expression of the p27 gene, which also indicates a favorable condition for neoplastic progression to hepatocellular carcinoma. Quantification of adducts levels in serum and urine showed that the formation of these compounds was dose-dependent with different concentrations of AFB₁ employed. In addition, there was a correlation between the formation of adducts with the protein expression of Cyclin D, p53, β -catenin and Rb. Thus, it was possible experimentally to point out the key proteins involved in hepatocarcinogenesis and indicate that aflatoxin adducts in serum and urine can be useful biomarkers to measure exposure and damage caused by subchronic ingestion of AFB₁.

Keywords: Aflatoxins. Carcinogenesis. Liver. Biomarkers, Tumors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB1	Aflatoxina B1
AFM1	Aflatoxina M1
AFP1	Aflatoxina P1
AFQ1	Aflatoxina Q1
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CDK	Quinase dependente de ciclina
CHC	Carcinoma hepatocelular
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência – Espectômetro de massa
DMSO	Dimetilsulfóxido
FHA	Foco de hepatócito alterado
GSH	Glutathiona reduzida
GST-P	Glutathiona-S-transferase placentária
IAC	Coluna de imunoafinidade
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
MS	Espectômetro de massa
PBT	Proibitina
ppb	Parte por bilhão
Rb	Retinoblastoma
UPLC	Cromatografia líquida de ultraeficiência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Aflatoxina	11
1.2. Epidemiologia do carcinoma hepatocelular (CHC)	15
1.3. Papel da Aflatoxina no carcinoma hepatocelular (CHC)	17
1.4. Biotransformação da AFB ₁	19
1.5. Biomarcadores de Exposição às Aflatoxinas	21
1.6. Aspectos moleculares do carcinoma hepatocelular	24
1.7. Focos de Hepatócitos Alterados / Lesões Pré Neoplásicas	30
2. OBJETIVOS	33
2.1. Gerais	33
2.2. Específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Animais	35
3.2. Administração de AFB ₁	35
3.3. Coleta de Amostras de Urina	37
3.4. Eutanásia e Coleta de Amostras de Sangue e Fígado	37
3.5. Avaliação Imuno-Histoquímica	38
3.6. Expressão gênica das proteínas p53, p27, Rb, Ciclina D1 e PBT	38
3.7. Determinação de Resíduos de Aflatoxinas e Metabólitos em fluidos biológicos	39
3.7.1. <i>Determinação de Aflatoxina M1, Aflatoxina P1, Aflatoxina Q1 e AFB1-N7-guanina em Urina</i>	39
3.7.2. <i>Determinação de AFB1-lisina em Amostras de Plasma</i>	43
3.8. Análise estatística	45
4. RESULTADOS	47
4.1. Consumo diário de ração e ganho de peso dos animais	47
4.2. Análise Bioquímica	48
4.3. Avaliação Histopatológica	49
4.4. Avaliação Imuno-Histoquímica	52
4.5. Estudo da expressão gênica por PCR em tempo real	62
4.6. Determinação das concentrações de AFB1-adutos no soro e na	64

urina	
4.6.1. <i>Produtos de biotransformação de AFB₁ e AFB₁-N⁷-guanina na urina de ratos</i>	64
4.7. Correlação entre as concentrações de AFB₁-adutos no soro e na urina e a expressão hepática de proteínas relacionadas à hepatocarcinogênese	66
5. DISCUSSÃO	70
5.1. Bioquímica e histopatologia	70
5.2. Consumo diário de ração e ganho de peso dos animais	71
5.3. Determinação das concentrações de AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina na urina e AFB₁-lisina no soro	72
5.4. Marcadores moleculares relacionados à hepatocarcinogênese	73
5.4.1. <i>GST-P</i>	73
5.4.2. <i>Ciclina D1</i>	74
5.4.3. <i>p53</i>	76
5.4.4. <i>β-Catenina</i>	77
5.4.5. <i>Retinoblastoma (Rb)</i>	78
5.4.6. <i>Proibitina (PBT)</i>	78
5.4.7. <i>p27</i>	79
6. CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	83
ANEXO	101

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aflatoxina

As micotoxinas são metabolitos secundários de fungos que crescem naturalmente em alimentos (Turner et al., 2013) e são capazes de gerar uma grande variedade de efeitos tóxicos nos vertebrados, incluindo o homem (Coulombe et al., 1991, Yang et al., 2014). Os fungos toxicogênicos podem contaminar um grande número de alimentos em vários estágios de sua produção e processamento, desde o cultivo até o transporte e armazenamento. Estima-se que as suas toxinas contaminem 25% das culturas de cereais no mundo e, dessa maneira, torne frequente a exposição em diversas populações (Turner et al., 2013). Fatores como umidade elevada, altas temperaturas e outras condições ambientais podem favorecer a contaminação desses alimentos (Kumar et al., 2011). Outra característica importante das micotoxinas é que elas apresentam alta estabilidade química (Miller et al., 1995, Turner et al., 2013), o que permite a sua persistência nos alimentos mesmo após a remoção do fungo pelos processos usuais de industrialização (Chu et al., 1991).

Dentre as diferentes micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. tamari nomius* (Moss et al., 1998), e foram descobertas no final da década de 1950 (Moss et al., 1998, Kensler et al., 2011, Kew et al., 2013, Doi; Uetsuka, 2014). Já o risco para a saúde humana e animal foi estabelecido no início da década de 1960 na Inglaterra, quando se atribuiu à aflatoxina ser o agente causador de uma doença conhecida como Doença X dos Perus (*Turkey X Disease*), cujas principais características eram a presença de hepatotoxicidade aguda e morte dos animais. Ela foi isolada a partir de amostras dos alimentos fornecidos aos animais e foi possível estabelecer suas características químicas e biológicas (Roze et al., 2013).

Atualmente, são conhecidos 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina. Porém, os principais tipos de interesses médicos e de saúde são identificados como B1, B2, G1 e G2 (Coulombe et al., 1991, Kensler et al., 2011, Kew et al., 2013, Abrar et al., 2014). Dentre essas, a aflatoxina B1 (AFB1), além de ser encontrada com maior frequência em produtos vegetais, é a mais abundante e a que

possui maior toxicidade (Busby; Wogan, 1984, Doi; Uetsuka, 2014), enquanto que a toxicidade da aflatoxina B2 (AFB2), G1 (AFG1) e G2 (AFG2) são de cerca de 50, 20 e 10% da toxicidade da AFB1, respectivamente (Leeson et al., 1995). A AFB1 tem sido frequentemente identificada como contaminante em alimentos armazenados bastante comuns na dieta humana, como amendoim, milho, soja, arroz, pimentas, trigo, frutas secas, nozes e castanhas (Leeson et al., 1995, Abrar et al., 2013, Qian et al., 2013).

Além de genotóxica, a AFB1 é considerada um dos agentes mutagênicos naturais mais potentes. Foi classificada pela Organização Mundial de Saúde como um agente cancerígeno do "Grupo A" devido a sua contribuição na patogênese do carcinoma hepatocelular (CHC) em seres humanos (Tseng et al., 1994, Lopez et al., 2002, Castells et al., 2008, Rubert et al., 2010, Santos et al., 2010, Abrar et al., 2013, Magnussem; Parsi, 2013). A carcinogênese hepática representa o mais importante efeito de toxicidade crônica das aflatoxinas também em muitas espécies animais, incluindo peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas (Newberne; Butler, 1969, Busby; Wogan, 1984). Já em 1967, demonstrou-se sua toxicidade aguda e carcinogenicidade em ratos (Wogan et al., 1967). A AFB1 apresenta atividade carcinogênica hepática em ratos mesmo com baixos níveis de concentração dietária, a partir de 1ppb, atingindo 100% de surgimento de CHC em animais submetidos a 100ppb (Wogan et al., 1974). Em 1987, com base em vários estudos disponíveis, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) concluiu que havia evidências suficientes para classificar a AFB1 como agente classe 1, ou seja, aqueles com potencial cancerígeno para o homem (IARC, 1987; Rothschild et al., 1992, Ventura et al., 2004, Huang et al., 2010, Shyamal et al., 2010, Yang et al., 2014).

As aflatoxinas correspondem ao grupo de micotoxinas mais pesquisado devido aos seus efeitos cancerígenos e tóxicos demonstrado na pecuária, animais de laboratório, e também os seus efeitos hepatocarcinogênico e toxicológico crônicos agudos em seres humanos (Abrar et al., 2013).

Embora estes fungos tenham distribuição mundial, a contaminação de culturas e a produção das toxinas ocorrem com maior frequência na agricultura de subexistência nas regiões tropicais e subtropicais já que nesses locais estão presentes as condições ideais para o seu desenvolvimento, com alta temperatura, ao redor dos 30°C, e alta umidade relativa, entre 80 a 85% (Coulombe et al., 1991, Kumar et al., 2011). Assim, nessas regiões, o risco de exposição é elevado para

humanos e animais, pois ocorre uma significativa produção de aflatoxina tanto na pré quanto na pós-colheita (Cotty; Jaime-Garcia, 2007, Khlangwiset; Wu, 2010, Abdel-Hadiet al., 2012, Kew et al., 2013, Astoreca;et al., 2014, Venegas et al., 2014). Uma elevada exposição tem sido observada em populações em países da África Subsaariana devido à alta ingestão de alimentos contaminados (Wild; Gong, 2010).

Um dos aspectos mais importantes de avaliação de riscos para compostos químicos é estabelecer o grau de exposição ao qual o ser humano está submetido (*World Health Organization*, 2002). Estima-se que 4,5 a 5,5 bilhões de pessoas em todo o mundo estão em risco de exposição a estas toxinas (Williams et al, 2004, Strosnider et al, 2006, Kew et al., 2013). São reconhecidas duas formas de exposição à aflatoxina, a intoxicação aguda grave e a exposição crônica assintomática (Williams et al, 2004, Kew et al., 2013). A intoxicação aguda está associada com sintomas tais como vômito, dor abdominal, edema pulmonar e morte (Cotty; Jaime-Garcia, 2007, Wu et al., 2014) decorrentes principalmente da lesão hepática induzida por estresse oxidativo (Shen; Ong, 1996, Ingawale et al., 2014). Já a intoxicação crônica está altamente associada com o surgimento de câncer hepático (Ranchal, 2009).

Além dos impactos na saúde humana, outras espécies de animais também têm doenças relacionadas com a contaminação por micotoxinas, e isso gera impactos importantes na sua produção (Hussein, Brasel, 2001). A aflatoxina gera uma grande perda econômica e alimentar (produtos de origem vegetal e animal), eleva os gastos na saúde humana e animal e requerem gastos em pesquisas e medidas para minimizar estas perdas (Hussein, Brasel, 2001).

O Brasil, devido à prevalência de clima tropical, apresenta condições ideais para o desenvolvimento desses fungos. Além disso, observa-se ainda no país a utilização de práticas agrícolas inadequadas de plantio, colheita, secagem, transporte e armazenagem de cereais e grãos, que favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos de modo geral, particularmente os toxigênicos (Sabino et al., 1988). De fato, observa-se no país um alto nível de contaminação por aflatoxinas em diversos produtos, sendo o amendoim o de maior incidência. Porém, a aflatoxina também é encontrada no milho, grãos e cereais, leite e derivados lácteos (Maziero; Bersot, 2010). Uma pesquisa feita em Pirassununga, cidade do interior do estado de São Paulo, analisou a contaminação por aflatoxina em diversos alimentos e os resultados mostraram que os mais vulneráveis foram: em primeiro lugar o

amendoim, seguido pelo milho, feijão, leite e produtos lácteos (Jager et al., 2013). Outra pesquisa avaliou a presença de fungos e micotoxinas em castanhas do Pará de quatro estados da Amazônia brasileira e concluiu que esse produto é um bom substrato para o crescimento do fungo (Reis, Oliveira, Baquião, Gonçalves, Zorzete, Corrêa, 2014). O cacau colhido e processado no Brasil também pode apresentar contaminação por aflatoxina, o que pode elevar a exposição a altas concentrações de micotoxinas no chocolate (Copetti et al., 2014). O alto índice de contaminação no amendoim e na Castanhá-do-Pará no Brasil gera impactos negativos na exportação desses produtos para países como Estados Unidos e União Europeia (Arrusa et al., 2005, Barros et al., 2005).

Por estas razões foi instituído no Brasil os Limite Máximos Tolerados (LMT) de aflatoxina em alimentos (Tabela 1) de 10µg/kg para a somatória de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 na Castanha do Pará, 20µg/kg para o amendoim, manteiga de amendoim e milho, 0,5ng/ml de AFM1 no leite fluido e 5 ng/g de AFM1 de leite em pó (BRASIL, 2011, Álvares et al., 2012).

Em países nos quais a ingestão de AFB1 é elevada, a avaliação da exposição à ela é essencial (Turner et al., 2013). Assim, além de medidas para reduzir outros fatores concomitantes que levam à doença hepática crônica, como a adoção da vacinação contra a hepatite B, esforços devem ser direcionados para reduzir a produção de AFB1 em todas as fases da produção de alimentos, especialmente nos países em desenvolvimento. Estes países têm um clima adequado para o crescimento de fungos, são consumidores de alimentos suscetíveis à contaminação (cereais, grãos, nozes) e possuem baixo controle da cadeia alimentar. Essas ações devem envolver os departamentos de saúde pública e agricultura (Gong et al., 2012). Contudo é bastante difícil de eliminar a exposição à AFB1. É possível minimizá-la através de quimioproteção e adsorção, e há muitos trabalhos experimentais estudando estes compostos (Willians et al., 2004). Intervenções agrícolas visando reduzir e prevenir a toxicidade às aflatoxinas em animais e seres humanos podem ser realizadas (IARC, 2002, Khlangwiset, Wu, 2010).

Tabela 1. Limites Máximos Tolerados (LMT) para Micotoxinas no Brasil

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
Aflatoxina M1	Leite fluído	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5
	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Frutas desidratadas e secas	10
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	1
	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada), <i>Zingiber officinale</i> (gengibre) <i>Curcuma longa</i> (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	20
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20

1.2. Epidemiologia do carcinoma hepatocelular (CHC)

O câncer de fígado ocupa uma posição de destaque no *ranking* mundial de incidência e mortalidade dentre as neoplasias malignas mais comuns. Em 2012, foi o quinto mais comum entre os homens (7,5% do total) e o nono entre as mulheres (3,4% do total) (Fig. 1). Entretanto, foi a segunda maior causa de mortalidade (9,1% do total de mortes por câncer no mundo), incluindo ambos os sexos, perdendo apenas para o câncer de pulmão, indicando o prognóstico ruim da doença (IARC, 2012).

Figura. 1. Incidência mundial estimada de câncer hepático em 2012 (Ferlay et al., 2012)

Dentre os diferentes tipos de câncer que podem ocorrer no fígado, o Hepatocarcinoma ou Carcinoma Hepatocelular (CHC) apresenta a maior incidência (Ferlay et al., 2012).

A maior ocorrência de CHC está associada à presença de algum grau de hepatopatia crônica, traduzindo-se em importante causa de óbito em pacientes cirróticos (Yang; Roberts, 2010). De fato, o CHC tem incidência elevada em regiões menos desenvolvidas do globo, com destaque para o leste asiático e África subsaariana (região centro-leste), locais que registram também altas taxas de incidência de fatores de risco como as hepatites virais e o etilismo, além da exposição à aflatoxina (Bressac et al., 1991, Wild; Gong, 2010).

No Brasil, o CHC pode ser considerado uma neoplasia com baixa incidência, sendo estimada uma taxa média nacional de 1:100.000 habitantes/ano, apresentando os maiores valores nos estados da Amazonas, Espírito Santo e Bahia (Pimenta; Massabki, 2010, Gomes et al., 2013). A taxa de incidência do CHC no país apresenta associação com cirrose hepática avançada em cerca de 70% dos casos. Todavia, embora haja discrepâncias nacionais, 42% dos casos no Brasil não apresentam sorologias positivas para hepatites virais (Gonçalves et al., 1997). Esses autores mencionaram a possibilidade de que os casos de CHC em pacientes não cirróticos possam corresponder a situações de exposição à micotoxinas, sobretudo à aflatoxina.

1.3. Papel da Aflatoxina no carcinoma hepatocelular (CHC)

Os principais fatores de risco para o surgimento do CHC são as hepatites crônicas virais B e C, a doença hepática induzida pelo álcool e a esteato-hepatite não alcoólica (Ej-Serag et al., 2007, Blonski et al., 2010). A ocorrência espontânea de CHC em seres humanos é bastante baixa na ausência desses principais fatores de risco (Köhle, 2008; Chittmittrapap, 2013). O efeito sinérgico entre as hepatites virais e ingestão de aflatoxina tem sido bem demonstrada (Wild et al., 1996, Qi et al., 2013, Qureshi et al., 2014). Entretanto, há inúmeros casos de surgimento de CHC em pacientes não cirróticos e isso pode estar relacionada com a exposição à micotoxinas, especialmente aflatoxina (Gonçalves et al., 1997, Kew, 2013).

De fato, já no final da década de 1960, foi demonstrado experimentalmente em ratos que, após a exposição crônica à AFB1 isoladamente, ocorria o surgimento de CHC em ausência de cirrose e com padrão lobular hepático normal (Newberne; Butter, 1969). Essa hipótese de que a exposição à aflatoxina através de dieta poderia contribuir significativamente para a alta incidência de CHC, aliada aos trabalhos experimentais em animais, corroboraram com dados epidemiológicos obtidos na Ásia e na África Subsaariana (Bressac et al. 1991).

A relação entre a exposição à aflatoxina e desenvolvimento de CHC foi ainda reforçada por estudos de biologia molecular do gene p53, o gene mais frequentemente mutado em muitas neoplasias humanas. Este gene possui características de supressor de tumor e pode agir como um oncogene dominante quando mutado, resultando na replicação desregulada de DNA defeituoso, instabilidade genômica e progressão do tumor (Harris et al., 1993, Greenblatt et al 1994, Nita et al., 2002, Olivier et al 2002, Jing et al., 2005, Zhang et al., 2009, Wogan et al., 2011). A imunomarcagem do p53 tem sido utilizada para avaliar o seu papel na hepatocarcinogênese (Bretones et al., 2014), aparecendo baixa em tecidos de fígado não neoplásicos e elevada no carcinoma hepatocelular (Aguillar et al., 1993). Esta mutação tem um efeito importante sobre o aumento da expressão da proteína p53 e pode desempenhar um papel na hepatocarcinogênese (Azechi et al., 2001), bem como a sua progressão e agressividade (Álvares et al., 2012).

A capacidade da AFB1 de alterar a função do gene p53 decorre de sua biotransformação. No fígado, a AFB1 é metabolizada pelo sistema CYP 450 em AFB1-exo-8,9-epóxido, um metabólito altamente reativo que se liga às guaninas do

DNA para formar adutos, sendo esse o principal mecanismo de sua hepatotoxicidade (Theumer et al., 2010) devido ao acúmulo de danos ao DNA nas células hepáticas (Ranchal, 2013). Assim, muitos estudos em CHC em humanos de populações expostas a altos níveis de aflatoxina dietética encontraram altas frequências de mutações do gene p53, especialmente a substituição de guanina por timina no terceiro par de bases do códon 249 do éxon 7 do gene p53 (AGG por AGT, arginina por serina, R249S) (Bressac et al., 1991, Hsu et al., 1991, Wogan et al., 2011). Essas mutações em R249S induzidas por AFB1 têm sido associadas com o desenvolvimento de CHC na ausência de cirrose (Villar, 2012). Há diversos trabalhos relatando que em 50% dos casos de carcinoma hepatocelular, a mutação *hot point* ocorre no gene p53, sendo mais prevalente em áreas de alta exposição à AFB1. Por outro lado, as áreas com baixa exposição à AFB1 apresentaram um pequeno número casos de CHC relacionados com mutação R249S. Em países ocidentais, onde a exposição à AFB1 é pouco relevante, mutações do gene p53 são encontradas em aproximadamente 20% dos CHCs (Kirk et al., 2000, Laurent-Puig et al., 2001, Moudgil et al., 2013). Estes resultados sugerem que a mutação de p53 (R249S) no carcinoma hepatocelular humano foi especificamente correlacionada com exposição à AFB1, sendo rara em outros tipos de câncer (Chittmittrapap et al., 2013, Moudgil et al., 2013). Neste caso, estes indivíduos com a mutação no p53 podem ter o CHC em um fígado não cirrótico (Nita et al., 2002). Um estudo em 124 pacientes com CHC que foram submetidos à ressecção hepática na Tailândia demonstrou que a taxa de mutação R249S entre pacientes positivos e negativos para HBsAg não estava estatisticamente relacionada (Chittmittrapap et al., 2013). Além disso, não existe qualquer diferença na expressão desta proteína em pacientes com VHB, VHC ou álcool, estando atribuído o aumento da sua expressão com a exposição a AFB1 (Alves et al., 2004, Nogueira et al., 2009, Hamid et al., 2013). Embora alguns países possuam um maior controle das hepatites virais, principalmente através da vacinação contra hepatite B (Chen et al., 1996), a exposição à aflatoxinas pode ter uma contribuição significativa para hepatocarcinogênese elevada (Chittmittrapap et al., 2013). Um estudo quantitativo do risco de câncer hepático decorrente da exposição à AFB1 estimou que ela pudesse ser a causa de 4,6 a 28,2% dos casos mundiais de CHC (Chen et al., 1996).

No Brasil, um estudo mostrou que existe uma alta frequência na imunoeexpressão de p53 em casos de CHC na população, sendo esse valor próximo daqueles observados na China ou em países da África, e isso pode ser decorrente da alta exposição à aflatoxina (Alves et al., 2004).

1.4. Biotransformação da AFB₁

A biotransformação é o processo pelo qual o corpo transforma as substâncias estranhas (xenobióticos) em novos compostos (metabólitos), ou seja, é um processo em que o composto original é modificado para ser eliminado a partir do sistema biológico (Guengerich et al., 1999). A aflatoxina é uma dessas substâncias que requer uma ativação metabólica para assumir a sua forma carcinogênica (Kensler et al., 2011). Após ingestão oral, a AFB₁ é eficientemente absorvida pelo sistema portal e biotransformada antes de sua excreção pelas vias urinária e fecal (Wilson et al., 1985, Groopman et al., 1993). A AFB₁ absorvida e os seus metabolitos são excretados na urina, enquanto que as fezes são uma via de eliminação para AFB₁ não absorvida. A excreção pode ocorrer também através do leite materno após o consumo de alimentos contaminados (Turner et al., 2013). A AFB₁ é concentrada no fígado e, em menor grau, no rim, sendo também encontrada no sangue venoso mesentérico como AFB₁ livre ou na forma de metabólitos solúveis em água (Wogan et al., 1967).

As enzimas da família do citocromo P450 (CYP), CYP1A2, CYP3A4 e CYP2A6 são responsáveis pela biotransformação das aflatoxinas absorvidas (Essigmann et al, 1982, Turner et al., 2013, Yang et al, 2013.), convertendo a AFB₁ em sua forma carcinógena, a AFB-8,9-epóxido, que é covalentemente ligada ao DNA e à albumina do soro, formando, respectivamente, a aflatoxina AFB₁-N⁷-guanina e os adutos da lisina (Essigmann et al. 1977, Essigmann et al.,1982, Sabbioni et al. 1987, Qian et al, 2013, Kew et al., 2013). A ligação de AFB₁ com o com a guanina do DNA modifica sua estrutura e, portanto, sua atividade biológica, criando assim os mecanismos mutagênicos e carcinogênicos básicos da AFB₁ (Bressac et al., 1991, Hsu et al., 1991, Turner et al., 2013). O aduto AFB₁-N⁷-guanina é instável e rapidamente passa por uma depurinação, sendo excretada na urina (Bennett et al., 1981). Com isso, os sítios apurínicos vagos na molécula de

DNA tendem a ser preenchidos com adenina e resultam em uma transverso de guanina para timina. Essa mutação causada pela aflatoxina é uma alteração genética permanente na célula afetada, o que possibilita a iniciação da hepatocarcinogênese (Hsieh; Atkinson, 1991; Aguillar et al., 1993, Guengerich et al., 1998, McKillop et al., 2006). A transverso no DNA acarreta em uma mutação significativa no gene supressor de tumor p53 no códon 249 (Aguillar et al., 1993, Smela et al., 2001, McKillop et al., 2006, Hussam et al., 2007, Kew et al., 2013).

Figura. 2. Biotransformação das aflatoxinas B1 e M1, extraído e adaptado de Mykkanen et al., 2005

As enzimas também oxidam a AFB₁ a vários outros derivados além dos epóxidos, sendo os principais os metabólitos hidroxilados, a aflatoxina M₁ (AFM₁), aflatoxina Q₁ (AFQ₁), o metabólito demetilado, a aflatoxina P₁ (AFP₁) e uma espécie

reduzida, o aflatoxicol. A AFM₁ pode ser ativada para formar AFM₁-8,9-epóxido que se liga ao DNA e é excretado na urina na forma de AFM₁-N⁷-guanina (Egner et al., 2003). AFQ₁ e AFP₁ não são consideravelmente oxidados pelos microsossomos humanos e não são considerados genotóxicos (Raney et al., 1992). Os metabólitos AFM₁, AFQ₁ e AFP₁ não são bons substratos para a epoxidação e possuem genotoxicidade reduzida comparada à AFB₁, e conseqüentemente são considerados produtos de detoxificação. Entretanto, no caso da AFM₁, a alta citotoxicidade reportada para o composto demonstra que é necessária precaução em designar a formação da AFM₁ como um produto de detoxificação, também sendo considerada pela IARC um agente carcinogênico classe 1 (Neal et al., 1998, IARC, 2002). Um esquema das principais vias de biotransformação da aflatoxina está apresentado na Figura 2.

1.5. Biomarcadores de Exposição às Aflatoxinas

Biomarcadores são usados como indicadores de exposição, efeito ou suscetibilidade sendo muito úteis para relacionar a exposição a agentes ambientais e o desenvolvimento de doenças clínicas, e assim poder identificar indivíduos com alto risco de doença. Neste contexto, os biomarcadores de Aflatoxina têm sido utilizados para estabelecer o seu papel etiológico no surgimento de CHC em humanos (Kensler et al., 2011). O desenvolvimento dos biomarcadores para mensurar os metabólitos de AFB₁ e os adutos de AFB₁-DNA e de albumina é considerado um meio acurado e confiável de quantificar a exposição por aflatoxina na dieta em populações humanas (Wu; Santella, 2012). A correlação entre os níveis AFB₁-N⁷-guanina e a incidência do tumor de fígado foi primeiramente estabelecida em experimentos com animais (Groopman et al., 1992b, Wild et al., 1996) e posteriormente validados em estudos epidemiológicos, tornando o seu uso viável em amplos estudos populacionais (Groopman et al., 1992a, Groopman et al., 1992c).

A AFB₁-N⁷-guanina na urina serve como um biomarcador não invasivo de dose biologicamente efetiva já que a formação desse aduto é a via causal do CHC induzido por aflatoxina (Kensler et al., 2011). Porém, sua limitação reside no fato de que a sua excreção é rápida e reflete a exposição de apenas as últimas 24 a 48 horas. Já o aduto de AFB₁-lisina tem meia-vida similar a da albumina, sendo uma

medida que pode contemplar a exposição relacionada entre 2 a 3 semanas (Wild et al., 1996).

Embora a formação de adutos seja apenas uma das etapas críticas da hepatocarcinogênese (Wild et al., 1996), uma análise de diferentes estudos prospectivos apontou que existe uma forte correlação entre os biomarcadores de exposição à AFB₁ no soro e na urina como risco de surgimento de CHC (Wu; Santella, 2012).

Um projeto com mais de 18000 pessoas estudou associação entre os biomarcadores de aflatoxina com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC), e mostrou uma enorme elevação no risco de desenvolvimento de CHC quando os biomarcadores de aflatoxinas foram detectados na urina, principalmente em pacientes portadores do vírus da Hepatite B (HBV). Adicionalmente, a presença na urina de AFB₁-N⁷-guanina, aduto da aflatoxina, sempre resultou em um maior risco em desenvolver o CHC (Ross et al., 1992, Qian et al., 1994). Esses resultados foram corroborados em uma pesquisa posterior com 15000 voluntários, a qual também investigou a relação entre HBV, exposição à AFB₁ e incidência de CHC (Yu et al., 1997).

Diversos estudos relataram a presença das aflatoxinas e seus metabólitos em urina nas últimas décadas. Zhu et al., (1987) reportaram que cerca de 1,2 e 2,2 % da AFB₁ ingerida diariamente estava presente na urina como AFM₁. Em estudo posterior, as mesmas amostras de urina foram novamente avaliadas e aproximadamente 0,2% da AFB₁ ingerida estavam presentes na forma do aduto AFB₁-N⁷-guanina (Groopman et al., 1992c).

Em outro estudo, a quantidade do aduto AFB₁-lisina foi determinada em amostras de soro de 42 indivíduos e correlacionada positivamente com a ingestão de AFB₁ e excreção de AFM₁ na urina. Estimou-se que de 1,4 a 2,3 % da AFB₁ ingerida é covalentemente ligada à albumina (Gan et al., 1988).

Na avaliação de Qian et al. (1994), na urina de 50 pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC) foi detectado, em maior concentração, a AFP₁, seguido da AFM₁ e por último o aduto AFB₁-N⁷-guanina.

Wild et al. (1992) analisaram os mesmos participantes de um estudo de Groopman et al. (1992a) e demonstraram a correlação entre os níveis de AFB₁-lisina no soro e os níveis urinários de AFB₁-N⁷-guanina, validando a AFB₁-lisina como biomarcador. Porém, a AFG₁ foi o metabólito determinado em maior concentração

na urina, já que esta aflatoxina foi encontrada nos alimentos consumidos pelos indivíduos avaliados, em contraste aos outros estudos, onde a dieta analisada não continha AFG₁. Adicionalmente, a AFM₁ também foi observada em algumas amostras.

A excreção urinária de AFQ₁, AFM₁ e da AFB₁-N⁷-guanina foi avaliada em 83 universitários na China (Mykkanen et al., 2005), cujas concentrações médias determinadas foram de 10,4 ng/mL, 0,04 ng/mL e 0,38 ng/mL, respectivamente, e essas diferenças podem ser atribuídas a vieses na faixa etária e dieta dos indivíduos avaliados. Os participantes deste estudo são jovens adultos e na faixa etária entre 18-24 anos, enquanto na maioria das pesquisas anteriores a idade dos indivíduos variava entre 25 e 65 anos. A expressão das enzimas CYP3A que produzem AFQ₁ decresce com a idade, aproximadamente 25-40% em animais e humanos, e o consumo de alimentos ricos em flavonoides e chá verde, por exemplo, pode aumentar a formação de AFQ₁ através da ativação destas enzimas.

No Brasil, os estudos relacionados à determinação de aflatoxinas e metabólitos em fluidos biológicos são escassos. Scussel et al. (2006) avaliaram a presença do aduto AFB₁-lisina em 62% de amostras de sangue de 50 indivíduos coletadas em 1999 na cidade de São Paulo. Sessenta e cinco amostras de urina de moradores da cidade de Piracicaba foram analisadas para determinar os níveis de AFM₁ e 65 % apresentaram concentração detectável (Romero et al., 2010). Porém, a análise de correlação entre a ingestão provável de aflatoxinas, estimada através de questionários de frequência de consumo, e os níveis de AFM₁ determinados na urina, não apresentou valor de *r* significativo. Já o estudo de Jager et al (2016) encontrou uma correlação positiva (*r*=0,45; *p*=0,03) entre as concentrações urinárias de AFM₁ com a ingestão diária estimada total de aflatoxinas.

A determinação quantitativa dos diversos metabólitos em matrizes complexas, como soro e urina, citada nos estudos epidemiológicos apresentados, requer métodos específicos e sensíveis, possíveis de serem empregados em um grande número de amostras. Em particular para o aduto AFB₁-lisina em soro, os métodos utilizados incluem radioimunoensaio (RIA) (Gan et al., 1988), imunoensaio de absorção por acoplamento enzimático (ELISA) (Wild et al., 1992) ou purificação com colunas de imunoafinidade seguida da separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e detecção por fluorescência (Wild et al., 1992, Wang et al., 1996). Devido ao fato de todos esses métodos requererem anticorpos para detecção

e/ou purificação, os resultados necessariamente refletirão a capacidade, especificidade e/ou sensibilidade do anticorpo empregado (Wang et al., 2001). Valores significativamente diferentes entre os resultados dos métodos ELISA, RIA e fluorescência foram obtidos (Wild et al., 1990, Sheabar et al., 1993). O método ELISA fornece alta sensibilidade, porém apresenta os resultados menos específicos e com valores de concentração maiores para AFB₁-lisina, devido à detecção conjunta de adutos oriundos da reação com outros aminoácidos ou da ingestão de aflatoxina estruturalmente semelhantes, como a AFG₁. O método de CLAE-fluorescência fornece especificidade para a AFB₁-lisina, mas não apresenta sensibilidade adequada para uso em estudos epidemiológicos.

Um método recentemente desenvolvido, que combina extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CLAE-EM/EM), possui alto grau de especificidade e sensibilidade (McCoy et al., 2005). Ele utiliza um isótopo estável como padrão interno para corrigir a recuperação e variabilidade de resposta do instrumento, e mostrou ser adequado para quantificação rotineira dos níveis do aduto em soro humano (Scholl et al., 2006b. Jager et al., 2016).

Os métodos utilizados na determinação do aduto AFB₁-N⁷-guanina incluem imunoensaios (Groopman et al., 1992a), CLAE acoplada a detector UV-Visível (Groopman et al., 1992c), ou fluorescência (Wang et al., 1999, Mykkanen et al., 2005). A descrição de um método empregando CLAE-EM/EM para a análise AFB₁-N⁷-guanina em urina com precisão e exatidão expressivamente superiores aos procedimentos anteriores foi apresentada por Egner et al. (2006).

A determinação de aflatoxinas residuais e metabólitos AFM₁, AFP₁ e AFQ₁ em urina, tem sido executada por CLAE-fluorescência (Polychronaki et al., 2008, Tang et al., 2008, Romero et al., 2010). Entretanto, a técnica CLAE-EM/EM foi recentemente empregada com sucesso na determinação de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁ e AFP₁ em urina (Everley et al., 2007).

1.6. Aspectos moleculares do carcinoma hepatocelular

O surgimento do CHC ocorre principalmente associado às doenças crônicas do fígado, estando presente entre 70 a 90% dos casos, e cujas principais causas incluem as hepatites B e C, doença hepática alcoólica e esteato-hepatite não

alcoólica. Outros riscos de CHC decorrem da exposição à aflatoxina, obesidade, diabetes mellitus, cigarro, contraceptivos orais e hemocromatose (Ej-Serag et al., 2007, Blonski et al., 2010). De fato, atribui-se que em algumas regiões da África e Ásia, a alta incidência de CHC ocorra pela elevada exposição a fatores de risco como as hepatites virais e o etilismo, além da exposição à aflatoxina (Bressac et al., 1991).

Aparentemente, a origem do CHC geralmente não é um evento casual. Ela resulta de uma combinação específica de diversas alterações quantitativas, qualitativas ou epigenéticas capazes de modificar as vias oncogênicas (Zucman-Rossi et al., 2010). É um processo multifatorial no qual estímulos extrínsecos acarretam em alterações genéticas em hepatócitos maduros, os quais sofrem proliferações sucessivas e morte celular que resultam na produção de populações celulares monoclonais (Thomas et al., 2014). Existem evidências que sugerem que a hepatocarcinogênese pode se iniciar através de lesões pré-neoplásicas, como acontece nos casos dos macronódulos regenerativos e nos nódulos hepáticos com displasia de baixo ou alto grau (McKillop et al., 2006, Tu et al., 2014.). O acúmulo de alterações genéticas e o surgimento de novas mutações nas lesões pré-neoplásicas provavelmente originam o CHC (Theise et al., 2002, Goodman et al., 2007).

Os tumores hepatocelulares malignos estão intimamente relacionados às mutações em oncogenes e genes supressores de tumor (Zucman-Rossi et al., 2010). Diversos desarranjos moleculares encontrados nos CHC podem estar atribuídos à presença de cirrose e atividades inflamatórias, enquanto outros são inerentes aos nódulos displásicos, e ao CHC por si só (Bosch et al., 1999, Koniaris et al., 2003, Zhu et al., 2003, Bosch et al., 2005). Em estágios iniciais da hepatite crônica, alterações significantes foram detectadas na expressão de fatores de crescimento, proteases e metaloproteases, além de alterações somáticas, redução na apoptose e aumento na expressão de oncogenes e fatores de transcrição (Lok et al., 2000, Okuda et al., 2000, Moudgil et al., 2013). Em geral, estas alterações se tornam mais proeminentes e complexas à medida que a lesão hepática progride para a fibrose, cirrose, nódulos displásicos e, finalmente, CHC (Coleman et al., 2003, Tu et al., 2014). Os repetidos ciclos de agressão e regeneração contribuem diretamente para a hepatocarcinogênese (Fausto; Weber, 1993, Loguerccio et al., 2003). Nesse processo, outro evento comum é a aneuploidia. O CHC é caracterizado por um considerável grau de heterozigocidade em diferentes

cromossomos, como 1p, 4q, 6q, 8p, 8q, 9p, 13q, 16p, 16q, e 17p (Jain et al., 2010). Numerosas mutações em genes críticos também foram observadas, assim como no p73, p53, Rb, APC, DLC-1 (deleted in liver cancer), p16, GSTP1, PTEN, IGF-2, BRCA2, SOCS-1, Smad2 and Smad4, β - catenina, c-myc e Ciclina D1 (Fujimori et al., 1991, Tsuda et al., 1992, Mckillop et al., 2006).

Em termos de frequência, as alterações moleculares mais comuns no CHC são: p53 (20-70%), Ciclina D (11%), p16Ink4 (0-50%), Rb (15%) e β -catenina (16-26%) (Alves et al., 2004), sendo que apenas o aumento na expressão do p53 foi reportado em associação com a interação gênica do vírus da hepatite B e da exposição à aflatoxina (Ozturk et al., 1999).

O desajuste de mecanismos que controlam o ciclo celular também é um importante evento para a carcinogênese. Alterações na atividade das Ciclinas em células transformadas contribuem para acelerar a progressão do ciclo celular. Sucintamente, o ciclo celular é controlado pelas holoenzimas Quinases dependentes de ciclina (CDKs), as quais, quando ativadas pelas Ciclinas, promovem a progressão da célula através do ciclo celular. Já os inibidores de CDKs se ligam a elas e restringem a evolução do ciclo celular (Sherr et al., 1996, Pestell et al., 2000). A expressão aberrante, tanto de CDKs quanto dos inibidores de CDKs, tem um importante papel no desenvolvimento do CHC. A expressão elevada de Ciclina D1 no CHC é variável, atingindo taxas de 6 a 76% entre os diversos estudos (Weinberg et al., 1995, Ito et al., 1999).

As Ciclinas são uma família de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular (Malumbres et al., 2005). As subunidades reguladoras do complexo da Ciclina são do tipo holoenzima de quinase dependente de Ciclina (CDK), que controlam a progressão dos pontos críticos do ciclo celular através da fosforilação e inativação das substâncias alvo (Bretones et al., 2014). A atividade das CDKs é controlada pelo aumento da produção de Ciclinas e pela atividade dos inibidores CDKs (Deshpande et al., 2005, Sanches et al., 2005). Muitos hormônios e fatores de crescimento influenciam a proliferação celular por meio das vias de transdução de sinal, e podem modificar a atividade da Ciclina. As alterações na atividade das Ciclinas em células modificadas contribuem para acelerar a progressão do ciclo celular, o que pode ser decorrente de falhas em vias que regulam a síntese de Ciclinas ou mutações que causam a perda de função de proteínas inibidoras (Choi et al., 2014). Em resumo, o ciclo celular é controlado por CDKs que, quando ativadas,

promovem a progressão das células através do ciclo celular (Sherr et al., 1996, Choi et al., 2014). Por exemplo, os complexos de Ciclinas D com CDK-6 e CDK-4 são necessários para a progressão através da fase G1 do ciclo celular (Xiong et al., 1991, Mishra et al., 2013). A passagem através da fase-S requer a Ciclina A, que forma um complexo com CDK-2. A atividade de CDKs reduzir devido a vários inibidores tais como *p16^{INK4A}*, *p27^{KIP1}* e *p21^{WAF1}* (Pestell et al., 2000, Chen et al., 2013). O desarranjo nos mecanismos que controlam o ciclo celular é um evento importante para haver a carcinogênese (Merle et al., 2009, Huang et al., 2014).

As vias da p16 / Ciclina D1 / RB (retinoblastoma) podem ser consideradas como as maiores reguladoras do ciclo celular (Chen et al., 2013, Kitagawa et al., 2013). Os genes RB e p16 agem como genes supressores de tumor (Zang et al., 2011) e Ciclina D1 como um oncogene (Weinberg et al., 1995, Hui et al., 1998, Ito et al., 1999, Hu et al., 2014). Dentre os reguladores positivos do ciclo celular, alterações na expressão de Ciclina D1 têm sido associadas ao aumento da proliferação celular e o desenvolvimento de neoplasias (Ito et al., 1999, Huang et al., 2014). No caso do CHC, a expressão aberrante desses reguladores de CDKs desempenha um papel importante no desenvolvimento dessa neoplasia (Moghaddan et al., 2007, Matsuda et al., 2013). A superexpressão de Ciclina D1 pode ser um evento precoce durante hepatocarcinogênese e desempenhar um papel na diferenciação tumoral (Joo et al., 2001). Experimentalmente, a exposição à AFB1 acarreta em uma superexpressão de Ciclina D1 no tecido hepático, e isso está relacionado com o surgimento de focos de hepatócitos alterados, que são considerados como fases iniciais da hepatocarcinogênese (Yang et al., 2000, Jia et al., 2002, Kumar et al., 2011).

Há ainda outros três inibidores importantes da progressão do ciclo celular pertencentes à família Cip/Kip: *p27^{KIP1}* (p27), *p21^{WAF1}* (p21) e *p57^{KIP2}* (p57) (Romanov et al., 2012). O *p27^{KIP1}* é o membro da família Kip mais extensivamente estudado no que diz respeito ao seu significado clínico na evolução do câncer em humanos (Matsuda et al., 2013). Ele é fortemente expresso em células não proliferativas e desempenha um papel importante na regulação tanto da quiescência como da progressão através da fase G1, agindo por inibição da expressão da Ciclina/CDKs através da ligação da proteína aos complexos Ciclina/CDK ativos no núcleo (Nam et al., 2004, Wang et al., 2014). A perda de *p27^{KIP1}* atua em conjunto com a mutação dos vários oncogenes e genes supressores, facilitando, assim, o

crescimento do tumor (Yang et al., 2014). A redução na proteína sintetizada pelo $p27^{KIP1}$ está significativamente relacionada com a fase e o volume dos tumores primários (Azechi et al., 2001). Assim, o $p27^{KIP1}$ tem sido descrito como um dos principais reguladores negativos da progressão do carcinoma hepatocelular, e o aumento na sua expressão é considerado um bom prognóstico em CHC (Fiorentino et al., 2000, Ito et al., 2001, Chen et al., 2010, Xiaodong et al., 2010). Em relação ao $p21^{WAF1}$, a redução de sua expressão está relacionada principalmente à mutação do gene p53 no CHC, e também contribui para hepatocarcinogênese (Qu et al., 2012). No entanto, a perda de $p21^{WAF1}$ não foi identificada como um fator independente de mau prognóstico em CHC (Ito et al., 2001, Buitrago-Molina et al., 2013). As alterações nos genes reguladores de ciclo celular $p21^{waf1/cip1}$ e $p27^{Kip1}$ estão mais envolvidos nos casos de CHC não relacionados à cirrose, os quais poderiam ser ao menos em parte, atribuídos à exposição à aflatoxina (Tretiakova et al., 2010). Foi descrito que danos no DNA hepático induzidos por AFB1 foram relacionados com redução na expressão de p21 e p27 (Ranchal et al., 2009). A genotoxicidade por AFB1 também foi relacionada com a redução da expressão de p27 no tecido hepático, já que a superexpressão de p27 reduziu a proliferação celular, a apoptose e a mutagênese de DNA induzidas por AFB1 nos hepatócitos, além de bloquear o ciclo celular. Um menor dano hepatocelular está relacionado com um aumento na expressão p27 mRNA e aumento da expressão da proteína em hepatócitos tratados com AFB1. Em contraste, um maior acúmulo de danos no DNA decorrente de alta concentração de AFB1 foi relacionado com uma redução da expressão de p27. Foi observado o mesmo efeito da AFB1 sobre a expressão de mRNA de p21. A expressão de p27 foi significativamente reduzida em CHC (Nam et al., 2004, Jing et al., 2005, Ranchal et al., 2013). Uma redução significativa na expressão de $p57^{KIP2}$ é observada em CHC, comparando-se com o tecido hepático normal (Hu et al., 2013), e foi associada a uma maior agressividade, caracterizada por pouca diferenciação, maiores volumes tumorais, invasão portal, intensa proliferação celular e baixa taxa de sobrevida (Ito et al., 2000).

Por outro lado, demonstrou-se que a proteína p53 encontra-se superexpressada em casos de carcinoma hepatocelular com a exposição à aflatoxina (Ozturk et al., 1999, Zhang et al., 2009, Kew et al., 2013, Amadeo et al., 2014). Assim, esta mutação específica da aflatoxina em um gene chave relacionado

com o desenvolvimento do CHC tem o potencial de servir como um biomarcador de efeito biológico pela exposição à aflatoxina (Wogan, 2011).

Nesse caso, as mutações no DNA associadas à exposição à AFB1 podem alterar a característica de supressor de tumor do p53 para um oncogene (Harris et al., 1993, Greenblatt et al 1994, Nita et al., 2002, Olivier et al 2002, Jing et al., 2005, Zhang et al., 2009, Wogan et al., 2011) A inativação de pRB e p16 é um acontecimento importante e desempenha um papel crítico na hepatocarcinogênese humana (Azechi et al., 2001).

A p53 também está relacionada com outro gene supressor de tumor, a proibitina (PBT) (Nuell et al., 1991, Chowdhury et al., 2013). O gene humano da PBT, como o próprio nome sugere, possui basicamente atividades antiproliferativas (Nuell et al., 1991, Zhou et al., 2013). A PBT possui um domínio do tipo SPFH (*Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C*), na sua porção aminoterminal, e um domínio na membrana celular (Theiss; Sitaraman, 2011). Na verdade, a PBT pode ser encontrada no citoplasma ou no núcleo, de acordo com as suas características celulares (Fusaro et al., 2003). Em nível nuclear, a PBT parece ser essencial para a regulação dos processos celulares como a apoptose, proliferação e transcrição de gene (Theiss; Sitaraman, 2011). A PBT foi também detectada no núcleo associada ao retinoblastoma (Rb) e às proteínas oriundas do p53, induzindo alterações nos fatores de transcrição, resultando na inibição do ciclo celular e na indução de apoptose (Sánchez-Quiles et al., 2010). A ação de supressora tumoral da PBT foi associada à expressão nuclear nas células neoplásicas de diversos tumores (Wang et al., 2002, FUSARO et al., 2003). Além disso, a PBT reduz a translocação nuclear do NF- κ B, que é mediado por TNF- α , quando exibe a função de supressora tumoral (Theiss et al., 2009). Por outro lado, foi observada a PBT ligada na membrana mitocondrial interna, onde está envolvida na estabilização de proteínas mitocondriais, com a função de redutora do estresse oxidativo (Nijtmans et al., 2009). Além da regulação de várias funções celulares, a localização da PBT mitocondrial está principalmente envolvida na redução dos danos causados pelo estresse oxidativo na fase crônica de diversas doenças (Theiss et al., 2009). De fato, o bloqueio na interação da PBT com o citocromo C oxidase, uma enzima mitocondrial, foi associada com o aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a infecção pelo vírus C na hepatite (Tsutsumi et al., 2009). Quanto ao CHC, a deficiência da PBT foi acompanhada pelo bloqueio da proliferação e da indução de

apoptose, fatores estes antineoplásicos, bem como os níveis da PBT estão aumentados nas células de CHC em humanos (Sánchez-Quiles et al., 2010).

Assim, o envolvimento de alterações na expressão nuclear da PBT, relacionadas ou não à via do p53, em vigência da exposição à aflatoxina no CHC humano permanece desconhecido. E ainda, permanece a dúvida se haveria hiperexpressão citoplasmática da PBT no fígado normal exposto à aflatoxina, imputando na aflatoxina implicação com estresse oxidativo.

Uma alteração importante relacionada com o CHC é a expressão diferenciada da via Wnt, que regula a expressão de diversos genes associados com proliferação, metabolismo e remodelação da matriz extracelular (Edamoto et al., 2003, Calvisi et al., 2007, Lee et al., 2007). A β -catenin é o oncogene frequentemente mais ativado em CHC por mutação, e essa alteração ocorre principalmente na ausência de riscos CHC habituais, ou seja, sem infecção por HBV e em fígados não cirróticos (Zucman-Rossi et al., 2010). Em casos de exposição à AFB1, foi demonstrado que o efeito regulador da β -catenina na via Wnt / β -catenina pode também estar envolvido na patogenicidade e carcinogenicidade do AFB1 (Fang et al., 2013).

Outra via que interfere na progressão do CHC é a do supressor de tumor Retinoblastoma (Rb), que possui um papel crítico na avaliação dos *checkpoints* do ciclo celular em tecido do fígado para manter a integridade do genoma e na supressão da tumorigênese. Foi demonstrado que a supressão de Rb no fígado resultou em uma marcante resposta proliferativa após a exposição crônica à AFB1. A toxina age causando aberrações na morfologia nuclear do hepatócito e ploidia que resultam na perda de Rb (Reed et al., 2009).

1.7. Focos de Hepatócitos Alterados / Lesões Pré Neoplásicas

Para a avaliação da exposição a compostos tóxicos na hepatocarcinogênese, o *endpoint* aceito era definido pela presença de tumor definido histologicamente. Entretanto, essa abordagem apresenta a desvantagem de demandar longos períodos até o surgimento do tumor propriamente dito (Bannasch, 1986). De fato, após uma exposição crônica de 100 ppb de AFB1 na dieta o surgimento de CHC o tempo mínimo que foi necessário para o surgimento do primeiro CHC foi de 54 semanas (Woogan et al., 1974). Porém, um estudo experimental em ratos expostos

à AFB1 mostrou que todas as neoplasias malignas obtidas ao final do trabalho foram precedidas por focos de hepatócitos alterados (FHA), um forma de lesão pré-neoplásica (Pritchard; Butler, 1987).

Uma lesão pré-neoplásica pode ser definida como uma população celular alterada histologicamente, porém que não apresenta características neoplásicas, mas possuem alta probabilidade de progredir para uma neoplasia (Bannasch, 1986). No fígado, essas lesões precoces podem ser caracterizadas como focos de proliferação, também chamados de focos atípicos, focos de hepatócitos alterados, focos acidofílicos, basofílicos ou de células claras, e não são consideradas lesões reparativas, mas sim um estágio precoce da carcinogênese (Soffritti; McConnell, 1988). Esses FHAs são compostos por hepatócitos diferenciados que apresentam alterações metabólicas e moleculares e gradualmente progridem para um fenótipo neoplásico pouco diferenciado, e esse processo inclui o aumento na quantidade da forma placentária de Glutathione S Transferase (Bannasch et al., 2003).

As Glutathione S transferases (GST) são um grupo de enzimas metabólicas que têm um papel importante na modulação da ligação da AFB1 com o DNA já que ocorre a inativação a reatividade do AFB1-epoxide pela conjugação com glutathione reduzida GSH (Hiruma et al., 1996). A principal função das GSTs é a de catalisar a conjugação de glutathione reduzida (GSH) a um sítio eletrofílico de uma ampla gama de compostos potencialmente tóxicos e cancerígenos, tornando tais compostos menos perigosos e permitindo a sua pronta excreção (Hayes et al., 1995). A classe placentária dessa enzima (GST-P) é abundante no fígado de ratos e é induzida por toxinas exógenas (Ito et al., 2012). A presença de focos GST-P positivos (GST-P+) no fígado de ratos é considerada um marcador pré-neoplásico específico e confiável em diversos modelos de hepatocarcinogênese (Tatematsu et al., 1985, Bannasch, 1986), incluindo o de exposição à AFB1 e pode ser considerado um *endpoint* para avaliar agentes hepatocarcinogênicos sem a necessidade de obter neoplasias propriamente ditas, reduzindo substancialmente a duração desses estudos (Gradelet et al., 1998; Ha et al., 1999; Jia et al., 2002; Ferk et al., 2013; Qian et al., 2013).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

- Correlacionar o nível de metabólitos (adutos) da AFB1 em fluidos biológicos com a ingestão subcrônica de diferentes concentrações de aflatoxina;
- Correlacionar alterações na expressão hepática de genes e proteínas relacionadas à hepatocarcinogênese com a ingestão subcrônica de diferentes concentrações de aflatoxina;

2.2. Específicos

- Verificar as alterações bioquímicas séricas e histopatológicas hepáticas de ratos submetidos à ingestão subcrônica experimental de diferentes concentrações de aflatoxina;
- Investigar a expressão hepática de genes e proteínas envolvidas no processo de carcinogênese por meio das técnicas de imuno-histoquímica e PCR em tempo real no fígado de ratos submetidos à ingestão subcrônica de diferentes concentrações de aflatoxina;
- Determinar os níveis de metabólitos (adutos) da AFB1 em fluídos biológicos (soro e urina) após ingestão subcrônica experimental de diferentes concentrações de aflatoxina.
- Correlacionar os níveis de metabólitos (adutos) da AFB1 em fluídos biológicos (soro e urina) após ingestão subcrônica experimental de diferentes concentrações de aflatoxina com as alterações na expressão hepática de genes e proteínas envolvidos no processo de carcinogênese;

Materiais e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

De acordo com o projeto submetido a e aprovado na Comissão de Ética da FMRP/USP (protocolo nº 032/2013, ver Certificado de Aprovação em ANEXO), utilizamos 55 ratos *Wistar*, obtidos e mantidos durante todo o período experimental no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP. Os animais, provenientes do Serviço de Biotério do Campus de Ribeirão Preto da USP, foram trazidos com 21 dias de vida e, após uma semana de aclimação, começaram a ser intoxicados com a aflatoxina.

Os animais foram mantidos em caixas plásticas forradas com maravalha de madeira autoclavada, em grupos de cinco. As trocas de caixas eram realizadas três vezes por semana, e os animais recebiam alimentação (ração peletizada específica para roedores) e água filtrada *ad libitum*.

No biotério, as condições macroambientais propiciam uma temperatura média de 22° C e umidade relativa em torno de 55%. Os animais ficaram submetidos a um fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

3.2. Administração de AFB₁

Os ratos foram distribuídos ao acaso em quatro grupos experimentais correspondentes a quatro diferentes graus de exposição à aflatoxina, sendo um grupo controle e três grupos que receberam diferentes doses de AFB₁ por via enteral (gavagem), diariamente, durante período de 90 dias, caracterizando um estudo subcrônico de teste de toxicidade oral (OECD, 1998). Para cada nível de exposição, as concentrações de AFB₁ administradas aos animais, correspondentes ao consumo estimado (para cada quilograma de ração), foram as seguintes:

- Tratamento A (n=10): 0 μg AFB₁ (controle – Grupo **Controle**);
- Tratamento B (n=15): 50 μg de AFB₁ / kg (50 ppb) de ração consumida (Grupo **AFB50**);
- Tratamento C (n=15): 100 μg de AFB₁ / kg (100 ppb) de ração consumida (Grupo **AFB100**);
- Tratamento D (n=15): 200 μg de AFB₁/ kg (200 ppb) de ração consumida (Grupo **AFB200**).

As concentrações utilizadas foram baseadas em estudos que mostraram o surgimento de neoplasias hepáticas ao final da exposição crônica à AFB₁ (Woogan et al., 1974, Cullen et al., 1987). Utilizamos os mesmos valores para observar se estas concentrações validadas para CHC também poderiam ser utilizadas para um estudo de exposição subcrônica, no qual o objetivo é o surgimento de FHA. A AFB₁ purificada (Sigma-Aldrich®) foi diluída em solução de DMSO 5%. O grupo controle recebeu a solução de DMSO 5% isenta da micotoxina.

Para a estimativa do consumo médio dos animais de cada caixa plástica, realizava-se diariamente a pesagem da sobra de ração, a qual era subtraída da quantidade administrada no dia anterior e, a seguir, dividida pelo número de animais da caixa. Esse valor médio de consumo de ração foi utilizado para calcular a dose de AFB₁ que cada animal deveria receber.

Para monitorar o estado de saúde dos animais, realizamos semanalmente a pesagem de cada rato, sendo que todos os animais apresentavam identificação individual. Os pesos foram ajustados de modo a corrigir as variações iniciais. Isso foi feito dividindo-se o peso em determinado momento pelo peso inicial.

Considerando o peso médio dos animais, estima-se que o Grupo AFB200 recebeu uma dose de 23 μg AFB₁/ kg peso corporal/ dia, ou uma dose total durante todo o período do experimento (90 dias) de 2 mg AFB₁/kg de peso corporal. Similarmente, o Grupo AFB100 recebeu uma dose total de 1 mg AFB₁/kg de peso corporal.

3.3. Coleta de Amostras de Urina

Durante os 7 dias que antecederam a eutanásia, foram realizados os procedimentos para a coleta de amostras de urina de cada animal. Para isso, diariamente durante um período de 4 horas pela manhã, os animais foram transferidos para uma caixa individual que continha piso gradeado, sendo mantidos em restrição alimentar e hídrica durante esse período. Desta forma, a urina eliminada permanecia no fundo da caixa e podia ser coletada com uma seringa. Para evitar contaminação da urina com fezes, a grade foi revestida com tela de *nylon*. As amostras foram armazenadas em -20°C até a análise.

3.4. Eutanásia e Coleta de Amostras de Sangue e Fígado

Ao final dos 90 dias de administração de AFB1, os ratos foram eutanasiados para a coleta de amostras de sangue e fígado. Para tanto, cada animal foi previamente anestesiado por meio de um sistema de anestesia inalatória, empregando-se Isoflurano (Cristália®) vaporizado em oxigênio a 100%. Após certificação da profundidade anestésica adequada, realizava-se uma incisão longitudinal mediana da parede abdominal. A coleta de sangue foi efetuada por punção da veia cava caudal com seringa e agulha heparinizadas. Na sequência, procedeu-se à hepatectomia total por meio da secção dos vasos e ligamentos de sustentação do fígado. O óbito dos animais ocorria por dessangramento decorrente do procedimento de hepatectomia. Finalmente, os fígados foram avaliados macroscopicamente, sendo padronizada a coleta de fragmentos do lobo lateral esquerdo para as análises histopatológicas e por imuno-histoquímica, e o restante do fígado encaminhado para as demais avaliações programadas no projeto. As amostras de sangue foram centrifugadas para a obtenção do plasma, e armazenadas a -80°C. Amostras de plasma foram obtidas para a dosagem do aduto plasmático de AFB1 e da atividade plasmática das aminotransferases da alanina (ALT) e do aspartato (AST).

3.5. Avaliação Imuno-Histoquímica

Amostras hepáticas fixadas em formol tamponado 10% e embebidas em parafina foram submetidas a estudo imuno-histoquímico para identificação dos seguintes marcadores: **Ciclina D1** (DSC-6, 1:100; Santa Cruz Biotechnology), **p53** (DO-2, 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), **β -catenina** (E5, 1:100; Santa Cruz Biotechnology), **Rb** (Rb1, 1:50; Santa Cruz Biotechnology), **PBT** (Clone II-14-10, 1:100 – Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, EUA), **p27^{Kip1}** (SX53G8, 1:100; DAKO) e **glutathione-S-transferase-p1** (GSTP1) (3F2C2, 1:50; Santa Cruz Biotechnology), utilizando o método da avidina-biotina-peroxidase (Vectastain Elite ABC Kit Universal, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA). Diaminobenzidina foi empregada como substrato cromógeno. As lâminas foram contracoradas em Hematoxilina de Harris e montadas com Permount. Como controle negativo, todos os espécimes foram submetidos ao mesmo protocolo, porém omitindo-se o anticorpo primário sob as mesmas condições. A expressão hepática de cada proteína foi estimada por morfometria por meio da contagem da positividade para o marcador (nuclear ou citoplasmático) utilizando-se aumento de 200x (objetiva de 20x), considerando 25 campos microscópicos aleatórios ou cerca de 6 mm² de área avaliada por amostra. A contagem de focos GST-P+ foi realizada de acordo com Qian et al. (2013).

3.6. Expressão gênica das proteínas p53, p27, Rb, Ciclina D1 e PBT

O RNA total foi extraído de amostras hepáticas congeladas utilizando-se o Mini Kit RNeasy (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. Na sequência, o DNA complementar foi obtido por transcrição reversa a partir de 500 ng de RNA total utilizando kit de retrotranscrição (Omniscript Reverse Transcriptase kit, QIAGEN). Após incubação a 37°C por 60min, a mistura foi tratada com RNase antes da reação de amplificação. A amplificação gênica com simultânea quantificação foi realizada por meio de Sistema PCR “real time” Step One Plus (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA) utilizando-se volume final de 20 μ L contendo *primers* específicos para os genes **Ciclina D1**, **p53**, **Rb**, **PBT**, **p27** e **GAPDH** (Assays-on-Demand Gene Expression Products, Applied Biosystems Inc.) e enzima Taq

Polimerase (TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG - 2X, Applied Biosystems). As reações foram realizadas em triplicata. Todos os dados foram normalizados com a fração GAPDH, e relatados em relação à expressão do grupo controle.

3.7. Determinação de Resíduos de Aflatoxinas e Metabólitos em fluidos biológicos

Para a quantificação dos resíduos de AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina na urina, e AFB₁-lisina no soro foram realizados os procedimentos descritos a seguir:

3.7.1. Determinação de Aflatoxina M₁, Aflatoxina P₁, Aflatoxina Q₁ e AFB₁-N⁷-guanina em Urina

Instrumentação

Todos os experimentos foram realizados em um sistema de Cromatografia líquida de ultraeficiência (Ultra Performance Liquid Chromatography – UPLC) equipado com bomba de alta pressão Acquity I-Class, amostrador Acquity FTN e coluna C₁₈ BEH (2,1 x 50 mm, 1,7 µm), acoplado a um espectrômetro de massas Xevo TQS (Waters). A coluna foi mantida a 40 °C e as amostras a 15 °C durante as análises. A coleta e o processamento de dados foram realizados utilizando o software *MassLynx*, versão 4.1.

Reagentes e Soluções

Os reagentes empregados são de grau analítico e a água purificada por deionização (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, EUA). Acetonitrila e metanol grau cromatográfico (JT Baker, Xalostoc, Mexico) foram utilizados para as análises no sistema UPLC. O padrão de aflatoxina M₁ foi adquirido da Sigma (Sigma, St

Louis, MO, USA) e os padrões de aflatoxina P₁, aflatoxina Q₁ e AFB₁-N⁷-guanina foram comprados da Toronto Research Canada (TRC, Toronto, Ontário, Canadá).

Soluções estoques individuais de AFM₁, AFP₁ e AFQ₁ foram preparadas em acetonitrila e a concentração determinada espectrofotometricamente empregando os valores de absorvidade molar (ϵ) disponíveis na literatura (Buchi et al. 1973; Dalezios et al. 1971; Masri et al. 1974). A AFB₁-N⁷-guanina foi pesada em balança analítica e dissolvida em solução metanol:1%ácido acético em água (50:50).

Preparo de Amostra

As amostras de urina foram mantidas congeladas a - 20 °C até o momento da análise. O Fluxograma 1 apresenta as principais etapas de preparo de amostra para a determinação do biomarcador AFB₁-N⁷-guanina em urina. A determinação dos biomarcadores AFM₁, AFP₁ e AFQ₁ foi realizada diluindo as amostras previamente centrifugadas na proporção 1:9 (urina:água).

Para a determinação de AFB₁-N⁷-guanina nas urinas de ratos, 5 mL de urina foram diluídos com 5 mL de solução tampão fosfato salina e extraídas conforme descrito no Fluxograma 1.

Otimização dos Parâmetros do Espectrômetro de Massas

A Tabela 2 apresenta as transições empregadas para a determinação de AFM₁, AFP₁ e AFQ₁, AFB₁, Aflatoxicol e AFB₁-N⁷-guanina em urina de ratos.

Fluxograma 1. Procedimento de Extração para Determinação de AFB₁ –N⁷-guanina em amostras de urina de ratos

Tabela 2. Transições MRM empregadas para a quantificação e confirmação das aflatoxinas por espectrometria de massas.

Analito	Íon Precursor (<i>m/z</i>)	Íons fragmentos (<i>m/z</i>)	Voltagem do cone (V)	Energia de Colisão(V)
AFM ₁	329	273 ^a	52	24
		229 ^b	52	38
AFP ₁	299	271 ^a	56	22
		215 ^b	56	30
AFQ ₁	329	206 ^a	60	24
		177 ^b	60	35
AFB ₁	313	285 ^a	94	36
		241 ^b	94	22
AFL	297	269 ^a	40	20
		115 ^b	40	58
AFB ₁ -N ⁷ -guanina	480	152 ^a	28	18
		135 ^b	28	62

^a transição de quantificação

^b transição de confirmação

m/z, relação massa/carga do íon precursor e dos respectivos fragmentos.

Validação do Método Analítico para Determinação de Aflatoxina M₁, Aflatoxina P₁, Aflatoxina Q₁, Aflatoxina B₁, Aflatoxicol e AFB₁-N⁷-guanina em Urina de Ratos

Os limites de detecção, quantificação e linearidade foram avaliados e todas as curvas de calibração foram preparadas empregando como solvente amostras de urina dos animais controle diluídas 1:9 (urina:água), para compensar o efeito de matriz.

A recuperação e a precisão foram avaliadas através da fortificação de uma amostra com concentração dos analitos em estudo abaixo do limite de detecção, fortificada no limite de quantificação, 50,0 e 100,0 ng.mL⁻¹ de AFM₁, AFP₁, AFQ₁, AFB₁ e Aflatoxicol. Cada nível de fortificação foi preparado (diluído 1:9 com água) em seis réplicas independentes e a concentração final calculada a partir da injeção em duplicata de cada extrato. O procedimento foi repetido em três dias distintos para a determinação da precisão intermediária. Para a determinação de AFB₁-N⁷-guanina uma amostra de urina foi fortificada com 10, 100 e 200 pg mL⁻¹ e extraída conforme procedimento descrito anteriormente.

3.7.2. Determinação de AFB1-lisina em Amostras de Plasma

A determinação de AFB1-lisina em amostras de soro foi realizada seguindo o procedimento descrito por McCoy et al. (2005). A análise baseia-se na hidrólise da albumina e liberação do aduto AFB1-lisina, que é extraído da mistura empregando coluna de extração em fase sólida e o extrato resultante posteriormente injetado no sistema UPLC-MS.

Reagentes e Soluções

Os reagentes empregados são de grau analítico e a água purificada por deionização (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, EUA). Acetonitrila e metanol grau cromatográfico (JT Baker, Xalostoc, Mexico) foram utilizados para as análises no sistema UPLC. A enzima Pronase foi adquirida da Calbiochem (San Diego, CA, EUA). O padrão de AFB1-lisina foi sintetizado e purificado resultando em uma solução 6,60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7.0. Esta solução foi diluída a concentração apropriada em solução de metanol:água (25:75) e empregada em todos os estudos descritos a seguir.

Preparo de Amostra

As amostras de soro foram mantidas congeladas a - 80 °C até o momento da análise. O Fluxograma 2 apresenta as principais etapas de preparo de amostra para a determinação do biomarcador AFB1-lisina.

Otimização dos Parâmetros do Espectrômetro de Massas

O espectrômetro de massas foi operado no modo de aquisição MRM utilizando ionização no modo positivo, com uma voltagem de capilar de 0,75 kV, temperatura da fonte de 150 °C e temperatura de dessolvatação de 500 °C. Os fluxos do gás de dessolvatação e do gás do cone foram mantidos em 800 L.h⁻¹ e 150L.h⁻¹, respectivamente. Durante os experimentos de caracterização do padrão sintetizado no modo de aquisição MS Daughter Scan, foram observadas quatro

transições mais intensas para o analito e possíveis de serem empregadas para a quantificação e confirmação. A Tabela 3 apresenta as transições empregadas para a determinação AFB₁-lisina.

Fluxograma 2. Procedimento de Extração para Determinação de AFB₁-lisina em Amostras de Soro

Tabela 3. Transições MRM empregadas para a determinação da AFB₁-lisina por espectrometria de massas.

Analito	Íon Precursor (<i>m/z</i>)	Íons fragmentos (<i>m/z</i>)	Voltagem do cone (V)	Energia de Colisão (V)
AFB ₁ -lisina	457	394	30	38
		376	30	38
		348	30	38
		328	30	38

m/z, relação massa/carga do íon precursor e dos respectivos fragmentos.

Parâmetros da Análise Cromatográfica

Dez microlitros de amostras e padrões foram injetados no sistema cromatográfico. A eluição foi realizada em modo gradiente empregando água e acetonitrila ambos contendo 0,1 % de ácido fórmico e mantendo o fluxo da fase móvel em 0,5 mL.min⁻¹. A Tabela 4 apresenta o gradiente utilizado.

Tabela 4. Eluição em gradiente empregada na análise cromatográfica de AFB₁-lisina.

Tempo (minutos)	% A	% B
0,0	95	5
0,5	95	5
5,0	75	25
5,5	10	90
6,0	95	5
6,5	95	5

A, água deionizada contendo 0,1 % de ácido fórmico.

B, acetonitrila contendo 0,1 % de ácido fórmico.

3.8. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média e erro padrão da média. As comparações estatísticas entre os grupos foram feitas pelo teste não paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido pelo teste de Dunn ou Mann Whitney, ou pelo coeficiente de correlação de Pearson. Valores de probabilidade (p) inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Os dados foram analisados utilizando o *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, San Diego, CA).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Consumo diário de ração e ganho de peso dos animais

Os resultados do consumo médio semanal de ração em cada grupo mostraram que não houve variações significativas nesse parâmetro entre os grupos com diferentes quantidades de AFB1, indicando um consumo homogêneo entre eles e, conseqüentemente, uma ingestão proporcional de AFB1 (Fig. 3).

Figura 3. Consumo médio diário de ração por ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 13 semanas (90 dias) de experimento. Os valores são expressos como média, n= 10-14 animais/ grupo.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Em relação ao ganho de peso dos animais no decorrer do projeto, observou-se que apenas o grupo AFB100 apresentou um crescimento menor do que os demais grupos, já a partir da quinta semana, e essa redução perdurou até a finalização do projeto. Entretanto, não houve diferença entre o ganho de peso dos grupos Controle, AFB50 e AFB200 durante todo o experimento (Fig. 4)

Figura 4. Ganho de peso médio relativo de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 13 semanas (90 dias) de experimento. Os valores são relativos ao peso médio inicial, n= 10-14 animais/ grupo. (★) Controle e AFB50; (•) p < 0,05 em relação ao grupo Controle e p < 0,01; (O) p < 0,01 em AFB50.

4.2. Análise Bioquímica

A quantificação das aminotransferases indicou que em todos os grupos que receberam AFB1 houve um aumento significativo nos níveis de ambas as enzimas comparando-se com o Grupo Controle. Adicionalmente, na avaliação da AST, o grupo AFB200 apresentou uma elevação ainda maior do que a dos demais grupos que também receberam a AFB1 em dosagens menores (Fig. 5). Os valores das quantificações estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros hepáticos bioquímicos entre os grupos experimentais após a administração de solução salina ou fatores hepatotróficos nutricionais.

	ALT (U/L)	AST (U/L)
Grupo Controle	25,6±4,4	105±8,9
Grupo AFB50	34,1±9,61	126,1±15,2
Grupo AFB100	33,6±7,7	125±15,2
Grupo AFB200	36,4±8,1	143,7±25,3

Os dados estão mostrados como média±DP; ALT=alanina aminotransferase, AST=aspartato aminotransferase,

Figura 5. Dosagem bioquímica dos níveis plasmáticos de **Alanina Aminotransferase** (ALT) e de **Aspartato Aminotransferase** (AST) de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias.

Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., n= 10-14 animais/ grupo.

(*) p < 0,05 em relação ao grupo Controle;

(•) p < 0,01 em relação ao grupo Controle e p < 0,05 em relação aos demais grupos tratados com AFB1.

4.3. Avaliação Histopatológica

O estudo histopatológico das amostras de parênquima hepático dos ratos tratados com diferentes doses de AFB1 revelou que não foram observadas áreas de necrose, infiltrado inflamatório ou atipias celulares sugestivas de focos neoplásicos. Entretanto, foi possível observar a ocorrência de intensas áreas cujo citoplasma do hepatócito encontra-se tumefeito, com intensa vacuolização, de aspecto claro e granular, caracterizando uma degeneração baloniforme hepatocelular distribuída difusamente por todos os lóbulos analisados (Fig. 6).

Porém, no grupo AFB200, e em menor medida no grupo AFB100, foi possível a identificação de diversos FHAs, sem qualquer correspondência nos grupos AFB50 e Controle (Fig. 11). O diagnóstico dos FHAs foi realizado através da observação de alterações celulares evidentes em um grupo bem definido de hepatócitos, tais como: células grandes com citoplasma abundante, aumento da relação núcleo / citoplasma, núcleos pleomórficos ampliadas, cromatina agregada, membranas nucleares grossas e nucléolos proeminentes (Fig. 6) com características de FHA de células claras, sendo que essas áreas coincidiam com áreas marcadas com GST-P (Fig. 7).

Figura 6. Fotomicrografias representativas de amostras do parênquima do lobo lateral esquerdo do fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias. **A,B-** grupo controle; **C,D-** grupo AFB100; **E,F-** grupo AFB200. **Coloração H&E** – A,C,E: 100x; B,D,F: 400x. Há degeneração baloniforme hepatocelular difusa nas células circunjacentes à veia centrolobular (VC), sobretudo nas amostras oriundas do grupo AFB200 (E e F). Não foram observadas alterações histopatológicas adicionais, como infiltrado inflamatório, atipias celulares ou focos de necrose.

FOCOS DE HEPATÓCITOS ALTERADOS

Figura 7. Fotomicrografias representativas de amostras do parênquima do lobo lateral esquerdo do fígado de ratos tratados diariamente com AFB1 durante 90 dias – grupo AFB200. **A,B,E,F** – aumento 100x; **C,D** – aumento 400x. A imunomarcagem nuclear e citoplasmática de hepatócitos para a proteína **GST-P** evidencia a presença de múltiplos Focos de Hepatócitos Alterados (FHA) neste grupo de animais, cuja correspondência nos respectivos cortes corados pela H&E nem sempre é evidente. Ressalta-se que nos FHAs há intensa balonização citoplasmática celular, com intensa imunomarcagem para a proteína GST-P.

4.4. Avaliação Imuno-Histoquímica

A análise imuno-histoquímica mostrou que a intoxicação por via oral dos animais com AFB1 durante 90 dias resultou em significativa transformação dos hepatócitos. Por meio da avaliação da expressão hepática das proteínas p53, Ciclina D1, Rb, β -Catenina, Proibitina e, especialmente, da enzima GST-P, foi possível a identificação inequívoca de focos celulares com evidentes alterações fenotípicas sugestivas de lesões pré-neoplásicas nos grupos AFB100 e AFB200.

As Figuras 8 e 9 mostram os valores médios do número de FHAs/mm² e do número de células GST-P positivas/mm², respectivamente. O grupo AFB200 exibiu maior número de FHAs e células GST-P positivas/mm² em relação aos demais grupos estudados, enquanto o grupo AFB100 apresentou maior marcação para o GST-P (FHAs e células) em comparação aos grupos AFB50 e controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e AFB50 no que diz respeito ao número de FHAs e células GST-P positivas/mm² de fígado.

A quantificação mostrou que, no grupo AFB200, foram encontradas, em média, 40 células GST-P positivas/mm² e 4 FHAs GST-P positivos/cm². Já no grupo AFB100 foram encontrados 5 cm² células GST-P positivas e 1 FHA GST-P positivos/cm². Nos fígados dos animais dos grupos Controle e AFB50 não houve identificação de FHAs, embora houvesse certo grau de marcação no epitélio ductal biliar na região portal (Figs 10, 11 e 12).

Por não ter havido marcação de GST-P no grupo AFB 50, optou-se por realizar as demais análises imuno-histoquímicas, moleculares e de adutos apenas nos grupos AFB100 e AFB200.

Figura 8. Avaliação imuno-histoquímica da frequência de Focos de Hepatócitos Alterados (FHA) por meio da imunomarcagem para a enzima Glutathione-S-Transferase, forma placentária (GST-P) no fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., n= 7-8 animais/grupo.

(*) p < 0,05 em relação aos grupos Controle e AFB50;

(●) p < 0,05 em relação aos grupos Controle, AFB50 e AFB100.

Figura 9. Avaliação imuno-histoquímica do número de hepatócitos imunomarcados para a enzima Glutathione-S-Transferase, forma placentária (GST-P) no fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., n= 7 animais/grupo.

(*) p < 0,05 em relação aos grupos Controle e AFB50;

(●) p < 0,05 em relação aos grupos Controle, AFB50 e AFB100.

Proteína GST-P – GRUPO CONTROLE

Figura 10. Fotomicrografias representativas de amostras do parênquima do lobo lateral esquerdo do fígado de ratos do grupo Controle (aumento 400x). A imunomarcagem nuclear e citoplasmática para a proteína **GST-P** encontra-se restrita ao epitélio ductal biliar. Não foram evidenciados hepatócitos marcados para a GST-P nas amostras oriundas deste grupo de animais.

Proteína GST-P - GRUPO AFB100

Figura 11. Fotomicrografias representativas de amostras do parênquima do lobo lateral esquerdo do fígado de ratos tratados diariamente com AFB1 durante 90 dias – grupo AFB100 (aumento 400x). Há intensa imunomarcção nuclear e citoplasmática de hepatócitos para a proteína GST-P. Observa-se um restrito número de Focos de Hepatócitos Alterados nas amostras deste grupo, verificando-se ainda que os focos são constituídos por pequeno número de células.

Proteína GST-P - GRUPO AFB200

Figura 12. Fotomicrografias representativas de amostras do parênquima do lobo lateral esquerdo do fígado de ratos tratados diariamente com AFB1 durante 90 dias – grupo AFB200 (aumento 400x). Há intensa imunomarcagem nuclear e citoplasmática de hepatócitos para a proteína GST-P. Observa-se grande número de Focos de Hepatócitos Alterados nas amostras deste grupo, sendo os focos constituídos por numerosas células.

Em relação às proteínas p53, Ciclina D1 e β -catenina, todas elas apresentaram uma maior marcação no tecido hepático nos animais dos grupos AFB100 e AFB200 comparando-se com o Controle. No caso do p53 e Ciclina D1, a elevação do grupo AFB200 foi significativamente maior também que do grupo AFB100 (Figuras 13, 14 e 15). As fotomicrografias das lâminas estão apresentadas nas Figuras 18, 19 e 20.

Figura 13. Avaliação imuno-histoquímica dos níveis da proteína p53 no fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., n= 7-8 animais/grupo.

(*) p < 0,01 em relação ao grupo Controle;

(●) p < 0,01 em relação aos grupos Controle e AFB100.

Figura 14. Avaliação imuno-histoquímica dos níveis da proteína **Ciclina D1** no fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., n= 7-8 animais/grupo.

(*) p < 0,01 em relação ao grupo Controle;

(●) p < 0,01 em relação aos grupos Controle e AFB100..

Figura 15. Avaliação imuno-histoquímica dos níveis da proteína β -catenina no fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., n= 5-10 animais/grupo.

(*) $p < 0,01$ em relação ao grupo Controle.

A análise de Rb mostrou que houve intensa redução da imunomarcagem nos grupos AFB100 e AFB 200 comparando-se com o grupo Controle, embora não tenha sido detectada uma diferença entre eles (Fig. 16). Em relação à Proibitina, houve um aumento da imunomarcagem apenas no Grupo AFB100, sendo que entre o Grupo AFB200 e o grupo controle não houve diferença (Fig. 17).

Figura 16. Avaliação imuno-histoquímica dos níveis da proteína **Retinoblastoma (Rb)** no fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias.

Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., n= 5-8 animais/grupo.

(*) $p < 0,01$ em relação ao grupo Controle.

Figura 17. Avaliação imuno-histoquímica dos níveis da proteína **Proibitina** no fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., n= 7-10 animais/grupo.

(*) $p < 0,01$ em relação ao grupo Controle.

Figura 18. Fotomicrografias representativas de amostras do parênquima do lobo lateral esquerdo do fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias (aumento 400x). **A,B-** grupo controle; **C,D-** grupo AFB100; **E,F-** grupo AFB200. Há evidente imunomarcção citoplasmática hepatocelular para as proteínas Ciclina D1 e p53 em todos os grupos avaliados, embora significativamente mais intensa nos animais pertencentes ao grupo AFB200 (E e F).

Figura 19. Fotomicrografias representativas de amostras do parênquima do lobo lateral esquerdo do fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias (aumento 400x). **A,B-** grupo controle; **C,D-** grupo AFB100; **E,F-** grupo AFB200. A imunomarcagem citoplasmática para a proteína **Rb** é restrita aos hepatócitos periportais nas amostras oriundas dos grupos Controle e AFB100, enquanto no grupo AFB200 a imunomarcagem é mais intensa e presente também em hepatócitos intralobulares. A imunomarcagem pela **Proibitina** é discreta nas amostras dos animais do grupo Controle, e mais intensa nas amostras dos animais tratados pela AFB1 (grupos AFB100 e AFB200).

Figura 20. Fotomicrografias representativas de amostras do parênquima do lobo lateral esquerdo do fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias (aumento 400x). A- grupo controle; B- grupo AFB100; C- grupo AFB200. Há moderada imunomarcagem citoplasmática hepatocelular para a proteína β-Catenina nas amostras oriundas dos animais submetidos ao tratamento com AFB1 (grupos AFB100 e AFB200).

4.5. Estudo da expressão gênica por PCR em tempo real

A avaliação da expressão gênica de diversas proteínas no fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 demonstrou que, no momento da coleta das amostras hepáticas, a intoxicação oral dos animais por AFB1 acarretou em alterações significativas nos níveis de mRNA hepático para as proteínas Ciclina D1 e p27 (Figs. 21 e 22). No caso da Ciclina D1, ocorreu aumento nos grupos AFB100 e AFB200 em relação ao grupo Controle, não havendo diferença significativa entre eles. Já no p27, houve uma redução significativa comparando-se os grupos AFB100 e AFB200 com o grupo Controle e, novamente, não houve diferença entre eles. Não foram observadas diferenças nos níveis de mRNA hepático para as proteínas p53, Rb e proibitina (Figs. 24 a 25).

Figura 21. Avaliação da expressão gênica da proteína **Ciclina D1** no fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., $n = 5$ animais/grupo. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle.

Figura 22. Avaliação da expressão gênica da proteína **p27** no fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., $n = 5$ animais por grupo. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle.

Figura 23. Avaliação da expressão gênica da proteína **p53** no fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., $n=5$ animais/grupo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Figura 24 Avaliação da expressão gênica da proteína **Proibitina** no fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., $n=5$ animais/grupo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Figura 25. Avaliação da expressão gênica da proteína **Retinoblastoma (Rb)** no fígado de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB1 durante 90 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., $n=5$ animais/grupo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

4.6. Determinação das concentrações de AFB₁-adutos no soro e na urina

4.6.1. Produtos de biotransformação de AFB₁ e AFB₁-N⁷-guanina na urina de ratos

Validação do Método Analítico

O método desenvolvido apresentou desempenho satisfatório para a determinação dos analitos em estudo, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados de validação do método analítico para determinação de AFM₁, AFP₁, AFQ₁, AFB₁, Aflatoxicol e AFB₁-N⁷-guanina em urina de rato.

Analito	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	Faixa de Calibração ^a (ng mL ⁻¹)	r ²	Nível de fortificação (ng mL ⁻¹)	Recuperação ^b (%)	Precisão CV ^c (%)
AFM ₁	0,006	0,02	0,02- 10	0,9982	0,2	84	3
					50	82	4
					100	84	1
AFP ₁	0,038	0,125	0,125 - 10	0,9989	0,125	94	4
					50	89	3
					100	91	3
AFQ ₁	0,02	0,07	0,07 - 10	0,9981	0,7	84	10
					50	85	2
					100	86	7
AFB ₁	0,012	0,04	0,04 - 10	0,9978	0,4	88	6
					50	83	2
					100	84	3
Aflatoxicol	0,04	0,1	0,1 - 10	0,9991	1	94	8
					50	86	5
					100	90	6
AFB ₁ -N ⁷ - guanina	0,04	0,1	0,1– 2,0	0,9984	0,01	75	13
					0,1	80	14
					0,2	81	11

LOD: Limite de Detecção.

LOQ: Limite de Quantificação.

^a Faixa de calibração elaborada para compensar a diluição dos analitos AFM₁, AFP₁, AFQ₁, AFB₁ e Aflatoxicol a pré-concentração da AFB₁-N⁷-guanina

^b Recuperação média, n=6 para AFM₁, AFP₁ e AFQ₁, AFB₁ e Aflatoxicol e n=3 para AFB₁-N⁷-guanina

^c Coeficiente de variação

A precisão intermediária estimada através da análise das mesmas amostras fortificadas em dois dias adicionais apresentou valores entre 3 e 10% para os analitos AFM₁, AFP₁, AFQ₁, AFB₁ e Aflatoxicol. A precisão intermediária não foi avaliada para a AFB₁-N⁷-guanina. Deve-ressaltar o efeito de matriz para as amostras de urina de ratos é menos pronunciado e menores limites de quantificação foram obtidos nestas amostras. A Figura 26 apresenta um cromatograma de uma mistura de padrões de AFM₁, AFP₁, AFQ₁, AFB₁ e Aflatoxicol preparada em urina de rato diluída 1:9 (urina:água).

Figura 26. Cromatograma (transições de quantificação, Tabela 6) de uma **mistura de** padrões de AFM₁, AFP₁, AFQ₁, AFB₁ e Aflatoxicol na concentração de 1 ng.mL⁻¹ cada, preparada em urina de rato diluída 1:9 (urina:água).

As Figuras 27 e 28 apresentam cromatogramas de amostras de urina de ratos naturalmente contaminadas com AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina, respectivamente.

Figura 27. Cromatograma (transição m/z 329>273) de uma amostra de urina de rato diluída 1:9 (urina:água).

Figura 28. Cromatograma (transição m/z 480>152) de uma amostra de urina de rato naturalmente contaminada com AFB₁-N⁷-guanina.

4.7. Correlação entre as concentrações de AFB₁-adutos no soro e na urina e a expressão hepática de proteínas relacionadas à hepatocarcinogênese

Os resultados das concentrações de AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina na urina e de AFB₁-lisina no soro em função da quantidade de AFB₁ ingerida são mostrados nas figuras 29, 30 e 31. Há uma intensa correlação entre a formação dos adutos AFM₁, AFB₁-lisina e AFB₁-N⁷-guanina com as diferentes quantidades de AFB₁ fornecidas aos animais ($r=0,87$, $p<0,001$; $r=0,79$, $p<0,001$ e $r=0,81$, $p<0,001$, respectivamente). Nenhuma amostra apresentou concentração de AFP₁, AFQ₁, AFB₁ e aflatoxicol acima dos limites de detecção estabelecidos.

Figura 29. Concentração do metabólito **AFM₁** nas amostras de urina de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB₁ durante 90 dias (n= 9-13 animais/grupo). *r* - coeficiente de correlação de Pearson.

Figura 30. Concentração do metabólito **AFB₁-N⁷-guanina** nas amostras de urina de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB₁ durante 90 dias (n= 9-13 animais/grupo). *r* - coeficiente de correlação de Pearson.

Figura 31. Concentração do metabólito **AFB₁-lisina** nas amostras de soro de ratos tratados diariamente com diferentes doses de AFB₁ durante 90 dias (n= 10-14 animais/grupo). *r* - coeficiente de correlação de Pearson.

Foram efetuadas uma série de correlações entre as concentrações dos metabólitos de AFB₁ na urina (AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina) e no soro (AFB₁-lisina) e a expressão hepática de marcadores proteicos ligados à hepatocarcinogênese. Os resultados estão apresentados na Tabela 7. Houve correlação dos níveis de adutos AFB₁-lisina, AFB₁-N⁷-guanina e AFM₁ com todos os marcadores proteicos

analisados. A única exceção foi a ausência de correlação da AFB1-lisina com a marcação por GST-P.

Tabela 7. Correlação entre as concentrações de AFB1-adutos e os marcadores moleculares de carcinogênese hepática

	AFB1-Lis sérica	AFB1-N7-guanina na urina	AFM1 na urina
Focos GST-P+	r= 0.330 (p= 0.075)	r= 0.6850 (p< 0.0001)	r= 0.6520 (p= 0.0001)
Células GST-P+	r= 0.2329 (p= 0.1921)	r= 0.4850 (p= 0.0042)	r= 0.5382 (p= 0.0012)
Células Ciclina D1+	r= 0.7269 (p= 0.0004)	r= 0.5287 (p= 0.02)	r= 0.6050 (p= 0.0061)
Células p53+	r= 0.7483 (p= 0.0001)	r= 0.6134 (p= 0.0031)	r= 0.6884 (p= 0.0008)
Células β-catenina+	r= 0.4969 (p= 0.0186)	r= 0.5008 (p= 0.0176)	r= 0.4135 (p= 0.049)
Células RB+	r= - 0.7532 (p< 0.0001)	r= - 0.6588 (p= 0.0006)	r= - 0.5358 (p= 0.0084)

r – Coeficiente de correlação de Pearson

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. Bioquímica e histopatologia

A avaliação bioquímica de ambas as aminotransferases revelou significativa lesão hepatocelular em todos os grupos tratados com AFB1 comparando-se com o grupo controle. Não houve diferença significativa nos níveis de aminotransferases entre os grupos AFB50 e AFB100. Entretanto, os animais pertencentes ao grupo AFB200 exibiram maiores níveis séricos de aspartato aminotransferase em relação aos animais do grupo AFB100. Elevação nas aminotransferases é um achado frequente em decorrência da exposição crônica à AFB1 em ratos (Rawi e Waggas, 2013) e esta associada à peroxidação lipídica causada pela micotoxina (Souza et al., 1999, El-Agamy et al., 2010, Nili-Ahmadabadi et al., 2011, Soliman et al., 2012). Quian et al, 2013 encontraram elevações nos valores de ALT e AST em ratos apenas após 5 semanas de exposição à AFB1 e esse fato está associado ao crescimento dos focos GST-P+. As enzimas AST e ALT estão presentes no citosol do hepatócitos. A AST é também localizada nas mitocôndrias. Após danos aos hepatócitos decorrentes da exposição à AFB1, estas enzimas são liberadas (Soliman et al., 2012).

O estudo histopatológico das amostras de parênquima hepático dos ratos tratados com diferentes doses de AFB1 revelou que não foram observadas áreas de necrose, infiltrado inflamatório ou atipias celulares sugestivas de focos neoplásicos. Entretanto, foi possível observar a ocorrência de intensas áreas cujo citoplasma do hepatócito encontra-se tumefeito, com intensa vacuolização, de aspecto claro e granular, caracterizando uma degeneração baloniforme hepatocelular distribuída difusamente por todos os lóbulos analisados, assim como também foi observado após lesões tóxicas decorrentes da exposição a diferentes agentes hepatotóxicos como tetracloreto de carbono, pelo nitrilotriacetato férrico e pela AFB1 (Kaur et al., 2006, Sancho-Bru et al., 2007, Tsai et al. 2009, Soliman et al., 2012).

Dado o período experimental utilizado no presente trabalho, a ausência de lesões neoplásicas era esperada. Já foi bem estabelecido que com doses compatíveis com a utilizada, o surgimento de CHC propriamente dito demanda um período mínimo de aproximadamente 50 semanas (Woogan et al., 1974). Entretanto,

no grupo AFB200, e em menor medida no grupo AFB100, foi possível a identificação de diversos FHAs, sem qualquer correspondência nos demais grupos experimentais e controle. O diagnóstico dos FHAs foi realizado através da observação de alterações celulares evidentes em um grupo bem definido de hepatócitos, tais como: células grandes com citoplasma abundante, aumento da relação núcleo / citoplasma, núcleos pleomórficos ampliadas, cromatina agregada, membranas nucleares grossas e nucléolos proeminentes com características de FHA de células claras, sendo que essas áreas também foram GST-P+. Esse padrão de FHA também foi observado em um estudo de ingestão subcrônica de AFB1 (Qian et al., 2013). Os focos de células claras são considerados focos iniciais e persistentes, mesmo após a interrupção da exposição ao carcinógeno, progredindo para a formação de CHC (Bannasch, 1986). Experimentalmente, focos de células claras que surgiram em curto período de tempo decorrente da exposição crônica à dieta com 150 ppb AFB1, concentração compatível com a do presente trabalho, resultaram em surgimento de CHC ao final de 68 semanas (Newberne; Wogan, 1968).

5.2. Consumo diário de ração e ganho de peso dos animais

Não houve variação significativa entre o consumo da dieta entre os grupos experimentais, indicando que a exposição à AFB1 foi homogênea entre os grupos. Em relação ao ganho de peso, observou-se que apenas o grupo AFB100 teve um crescimento menor comparando-se com o grupo controle e AFB50. Não houve diferença entre os grupos AFB200 e AFB100.

Esses resultados são inconclusivos e podem decorrer da baixa concentração de aflatoxina na dieta, já que reduções significativas no ganho de peso dos animais expostos à aflatoxina na dieta em relação aos seus grupos controles foram observadas após dietas com concentração de AFB1 bastante superior a do presente estudo. (Liao et al., 2002; Soliman et al., 2012, Johnson et al, 2014). Dietas com concentração de até 400 ppb (o dobro da máxima que foi utilizada no presente trabalho) também não mostraram diferenças no ganho de peso dos animais mesmo após 40 semanas. As diferenças nesse parâmetro só foram marcantes no grupo que recebeu 1600 ppb (Hinton et al., 2003).

5.3. Determinação das concentrações de AFM1 e AFB1-N7-guanina na urina e AFB1-lisina no soro

A quantificação dos metabólitos de AFB1 na urina e no soro pela técnica de UPLC-MS/MS demonstrou que o tratamento dos ratos com diferentes doses de AFB1 resultou em concentrações proporcionais dos diferentes metabólitos no soro e na urina dos animais. Observou-se elevada correlação positiva entre as doses de AFB1 e concentrações de AFM1 e AFB1-N7-guanina na urina e AFB1-lisina no soro (coeficientes de correlação de Pearson $> 0,75$; $p < 0,0001$ – Figs. 33 a 35).

Como o presente trabalho utilizou doses pregressivas de aflatoxina B1, foi possível concluir que a formação de adutos de aflatoxina é dose-dependente.

O modelo animal permite um controle dos níveis de exposição, apresentando uma vantagem sobre a grande variação na exposição comumente encontrada em humanos (Kensler et al., 2011).

As enzimas da família P450 CYP1A2, CYP3A4 e CYP2A6 são responsáveis pela biotransformação da AFB1, dando origem ao metabólito AFB-8,9-epóxido, um produto altamente carcinogênico capaz de se interagir ao DNA e à albumina gerando os adutos AFB1-N7-guanina e AFB1-lisina, respectivamente (Essigmann et al., 1982; Sabbioni *et al.*, 1987). Além de sofrer epoxidação, AFB1 pode ser oxidada para produzir os metabólitos aflatoxina M1 (AFM1) e aflatoxina Q1 (AFQ1), reduzida em aflatoxicol, ou sofrer demetilação para a aflatoxina P1 (AFP1). A AFM1 pode ser convertida em AFM1-8,9-epóxido, o qual se liga ao DNA para formar a AFM1-N7-guanine (Jager et al., 2011). Ao interagir com o material genético, a AFB1 induz importantes alterações estruturais e funcionais no DNA, conduzindo aos mecanismos mutagênicos básicos da micotoxina. Groopman et al. (1992) demonstraram associação entre níveis urinários de AFM1 e AFB1-N7-guanina e incidência de hepatocarcinoma. A detecção do metabólito AFB1-N7-guanina na urina está relacionado a aumento de 200-300% no risco relativo de desenvolver hepatocarcinoma. A AFB1-N7-guanina na urina serve como um biomarcador não invasivo de dose biologicamente efetiva já que a formação desse aduto é a via causal do CHC induzido por aflatoxina (Kensler et al., 2011).

Existe também uma correlação positiva entre os níveis séricos de AFB1-lisina e a formação de adutos de AFB1-DNA que efetivamente levam à promoção da hepatocarcinogênese, ou seja, o aduto de lisina pode ser considerado um

biomarcador de desenvolvimento de CHC (Wild et al., 1996), principalmente após a exposição crônica (Qian et al., 2013).

Nenhuma amostra apresentou concentração de AFP1, AFQ1, AFB1 e aflatoxicol acima dos limites de detecção estabelecidos.

5.4. Marcadores moleculares relacionados à hepatocarcinogênese

5.4.1. GST-P

A imunomarcção para a enzima GST-P permitiu a identificação de inúmeros FHAs (Fig. 18), sobretudo no fígado dos animais do grupo AFB200 (Figs. 18 e 21). Os ratos pertencentes ao grupo AFB100 também exibiram FHAs (Fig. 20), embora menos frequentes em relação a AFB200. Nos fígados dos animais dos grupos Controle e AFB50 não houve identificação de FHAs, embora houvesse certo grau de marcação no epitélio ductal biliar na região portal (Fig. 19).

Os valores absolutos do número de FHAs e células GST-P positivas/mm² do presente estudo apresentam certa divergência em relação aos dados da literatura. Singh et al. (2015) relatam a presença de 2.000 células GST-P positivas/cm² no fígado de ratos dez semanas após tratamento com AFB1 (duas doses de 1mg/kg peso). No presente estudo, no grupo AFB200, que recebeu doses diárias de 200 µg AFB1/kg ração durante treze semanas (dose total aproximada de 2mg AFB1/kg peso), foram encontradas 4.000 células GST-P positivas/cm². Hiruma et al. (1996) referem 9,6 FHAs GST-P positivos/cm² três semanas após tratamento com dose única de 2,5mg AFB1/kg peso. No presente estudo, no grupo AFB200 foram observados 400 FHAs GST-P positivos/cm². Dez semanas após tratamento com 1mg AFB1/kg peso, Ferk et al. (2014) reportaram 25 FHAs GST-P positivos/cm². No presente estudo, foram encontrados 100 FHAs GST-P positivos/cm² no grupo AFB100, cuja dose total é de cerca de 1mg AFB1/kg peso. A maior frequência de FHAs e de células GST-P positivas encontrada no presente estudo pode ser justificada pela frequência e via de administração da micotoxina, o que também foi observado por Qian et al. (2013). Embora os outros estudos empreguem doses totais similares, administram a aflatoxina por meio de dose única (ou no máximo duas doses) por via intraperitoneal. No presente estudo, os animais receberam a

micotoxina diariamente por via oral durante 90 dias, sendo essa uma forma similar de exposição ao que ocorre com os indivíduos expostos à aflatoxina por meio de dieta contaminada, o que torna essa rota mais relevante para a avaliação do risco de câncer relacionado à AFB1 (Choy, 1993).

No presente estudo, os níveis de AFM1 e de AFB1-N7-guanina na urina apresentaram correlação fortemente positiva ($r= 0,652$ e $0,685$, respectivamente) com o número de focos pré-neoplásicos no fígado (focos de hepatócitos alterados - FHA) identificados por meio de imunomarcagem para a enzima glutathione-S-transferase-p1 (GST-P) (Figs. 36 e 37). O mesmo não foi observado para as concentrações séricas de AFB1-lisina ($r= 0,330$; Fig. 38). A presença de focos GST-P+ no fígado era esperada e está de acordo com diversos trabalhos na literatura. É um marcador pré-neoplásico específico e confiável em diversos modelos de hepatocarcinogênese (Tatematsu et al, 1985, Bannasch, 1986), incluindo o de exposição à AFB1 e pode ser considerado um *endpoint* para avaliar agentes hepatocarcinogênicos (Gradelet et al., 1998; Ha et al., 1999; Jia et al., 2002; Ferk et al., 2013; Quian et al, 2013). Johnson et al. (2014) demonstraram que, após a administração de AFB1 em ratos, o aumento nos níveis de AFB1-N7-guanina na urina ocorreu concomitantemente com o aumento na frequência de focos de hepatócitos alterados marcados por GST-P. Sendo assim, os níveis de AFM1 e de AFB1-N7-guanina na urina podem ser utilizados como biomarcadores confiáveis de lesão-preneoplásica por exposição à AFB1.

5.4.2. Ciclina D1

A imunomarcagem citoplasmática para a Ciclina D1 foi significativamente mais intensa no fígado dos ratos do grupo AFB200 em relação aos demais grupos estudados. Houve, ainda, expressão mais intensa de Ciclina D1 no grupo AFB100 em relação ao grupo Controle. Além do incremento nos níveis hepáticos de Ciclina D1 documentado por avaliação imuno-histoquímica, os resultados do presente estudo também demonstraram aumento na expressão gênica desta proteína no fígado dos ratos intoxicados por AFB1 (grupos AFB100 e AFB200) em comparação aos animais do grupo controle.

As concentrações séricas do aduto AFB1-lis exibiram correlação fortemente positiva com o conteúdo hepático da proteína Ciclina D1 ($r = 0,7269$; Fig. 44). De forma semelhante, as concentrações de AFM1 e AFB1-N7-guanina na urina se correlacionaram positivamente com a intensidade da imunomarcção para a Ciclina D1 no fígado dos ratos intoxicados por AFB1 ($r = 0,5287$ e $0,6050$, respectivamente). A Ciclina D1 é um peptídeo essencial no processo de progressão da célula através da fase G1 do ciclo celular, e níveis aumentados dessa proteína estão fortemente associados às fases de iniciação e de progressão de tumores. Em seres humanos, a superexpressão citoplasmática de Ciclina D1 aparenta ser um evento precoce da hepatocarcinogênese e desempenhar um papel na diferenciação do tumor (Sato et al., 1999, Joo et al., 2001). Dentre os reguladores positivos do ciclo celular, alterações na expressão de Ciclina D1 têm sido associadas ao aumento da proliferação celular e o desenvolvimento de neoplasias (Ito et al., 1999, Huang et al., 2014). Assim como foi encontrado no presente estudo, experimentalmente a exposição à AFB1 acarreta em uma superexpressão de Ciclina D1 no tecido hepático, e isso está relacionado com o surgimento de focos de hepatócitos alterados, que são considerados como fases iniciais da hepatocarcinogênese (Yang et al., 2000, Jia et al., 2002, Yamamoto et al., 2006, Kumar et al., 2011). A marcação de Ciclina D1 após a exposição à AFB1 em ratos aumenta nos estágios iniciais da hepatocarcinogênese (6ª semana) e aumenta significativamente após a 10ª semana (Yang et al., 2000), reforçando o seu papel de um oncogene (Hui et al., 1998). O aumento da expressão de Ciclina D1 pode proporcionar uma vantagem durante a progressão tumoral (Anna et al., 2003), havendo variação na taxa de marcação no citoplasma ou no núcleo (Joo et al., 2001). Yamamoto et al. (2006) encontraram, em camundongos, um aumento na expressão citoplasmática de Ciclina D1 em hepatócitos neoplásicos, associando esta localização da marcação aos estágios iniciais da hepatocarcinogênese murina. Embora a elevação na expressão gênica e proteica de Ciclina D1 já foi identificada durante a hepatocarcinogênese em ratos (Wang et al., 2006) ainda não existem relatos na literatura sobre o papel da Ciclina D1 na carcinogênese hepática induzida pela aflatoxina. O acúmulo de Ciclina D1 pode estar relacionado com aumento de B-Catenina (Anna et al., 2003), e isto está de acordo com os resultados do presente trabalho.

Dada a importância da Ciclina D1 na iniciação da hepatocarcinogênese e sua correlação com os adutos de aflatoxina, ressalta-se que essa avaliação pode ser um bom marcador de formação de lesões-preneoplásicas após a exposição à AFB1.

5.4.3. p53

De modo semelhante, identificou-se intensa marcação citoplasmática hepatocelular para o p53 nas amostras oriundas dos grupos AFB100 e AFB200 em comparação ao grupo Controle. A análise quantitativa revelou níveis significativamente mais elevados de p53 no fígado dos animais do grupo AFB200, seguido pelos animais do grupo AFB100 em relação ao grupo Controle (Fig. 9). A marcação citoplasmática é observada em casos de CHC (Ueda et al., 1995, O'Brate; Giannakakou, 2003).

Adicionalmente, foram observadas correlações positivas bastante elevadas ($r = 0,6134 - 0,7483$) entre as concentrações dos AFB1-adutos (AFB1-lisina no soro e AFM1 e AFB1-N7-guanina na urina) e o conteúdo hepático da proteína supressora tumoral p53 (Figs. 39 a 41). Esses resultados apenas reiteram dados da literatura, confirmando o envolvimento do gene p53 no processo de hepatocarcinogênese induzida pela aflatoxina. Sabe-se que, quando alterado por meio de mutações, o gene p53 origina peptídeos desprovidos de efeito supressor tumoral, favorecendo o surgimento de neoplasias. Gijssels et al. (1997) mostraram que alguns compostos conhecidos por promover a hepatocarcinogênese, incluindo AFB1, induzem altos níveis de p53 no tecido hepático, atuando na promoção do tumor hepático. Embora o p53 tenha um papel de supressor de tumor, sua constante ativação em fígados expostos a agentes causadores de danos mutagênicos no DNA induz lesões pré-carcinogênicas (Yan et al., 2013). Um aumento na expressão de p53 está correlacionado com alterações no ciclo celular que contribuem para a progressão do CHC (Lee et al., 2004, Zhang et al., 2009).

5.4.4. β -Catenina

Em relação à β -Catenina, constatou-se uma importante participação dessa proteína nas amostras hepáticas oriundas dos grupos AFB200 e AFB100 em relação ao grupo Controle. Pela análise imuno-histoquímica, observou-se importante imunomarcacão citoplasmática para a β -Catenina no parênquima hepático dos animais de ambos os grupos expostos à AFB1. A ativação da via canônica de sinalização Wnt leva à interrupção da degradação do complexo β -catenina, resultando em acúmulo de β -catenina no citoplasma que antecede a translocação para o núcleo (Pez et al., 2013). O acúmulo de β -Catenina no citoplasma ocorre frequentemente na hepatocarcinogênese em ratos e pode ser um evento precoce no desenvolvimento de CHC em ratos (Wang et al., 2006).

Os presentes resultados revelam correlação positiva entre as concentrações dos AFB1-adutos (AFB1-lisina no soro e AFM1 e AFB1-N7-guanina na urina) e a intensidade da imunomarcacão citoplasmática hepática para a β -Catenina, indicando o papel de biomarcador desses adutos na progressão das lesões pré-neoplásicas induzidas por aflatoxina.

A β -Catenina é um conhecido transdutor de sinalização intracelular integrante da Via de Sinalização Wnt. Diversos estudos reportam mutações e hiperexpressão da β -Catenina em uma série de neoplasias, incluindo o carcinoma hepatocelular (Edamoto et al., 2003, Calvisi et al., 2007, Lee et al., 2007, Zucman-Rossi et al., 2010). Cerca de 8 a 30% dos hepatocarcinomas em seres humanos apresentam mutações no gene CTNNB1 da β -Catenina (Pez et al., 2013). Esse resultado obtido no presente trabalho vai ao encontro com um estudo que também utilizou a AFB1 e mostrou o seu efeito regulador da β -catenina na via Wnt / β -catenina estando envolvida na patogenicidade e carcinogenicidade (Fang et al., 2013). Alguns autores reportaram mutações e hiperexpressão da β -Catenina em carcinomas hepatocelulares de humanos oriundos de regiões geográficas com elevada exposição à AFB1 (Devereux et al., 2001; Chen et al., 2004). Entretanto, ainda não há documentação desta importante associação por meio de estudos experimentais controlados.

5.4.5. *Retinoblastoma (Rb)*

A análise da expressão hepática da proteína Retinoblastoma (Rb) revelou que a aflatoxina induziu significativa redução dos níveis dessa proteína supressora tumoral no fígado dos animais. Este efeito foi observado em ambos os grupos de animais intoxicados com AFB1 (AFB100 e AFB200) em comparação ao grupo controle. A imunomarcação foi mais restrita aos hepatócitos periportais nas amostras hepáticas oriundas dos grupos Controle e AFB100, enquanto no grupo AFB200 a expressão para a Rb foi mais intensa nos hepatócitos intralobulares.

Adicionalmente, as correlações entre as concentrações de AFB1-lisina no soro e AFM1 e AFB1-N7-guanina na urina e as quantidades de Rb no fígado mostraram-se francamente negativas (r variando entre -0,5358 e -0,7532). Esses resultados são compatíveis com dados da literatura que reportam inativação ou diminuição da expressão citoplasmática de Rb no carcinoma hepatocelular (Azechi et al., 2001, Huynh, 2004, Moghaddan et al., 2007, Reed et al., 2009). De acordo com Yamamoto et al., (2006), a ativação do complexo Ciclina D1/CDK pode desencadear a fosforilação do Rb, estando as suas expressões negativamente correlacionadas, assim como encontrado no presente estudo.

5.4.6. *Proibitina (PBT)*

Houve leve expressão da proteína Proibitina nas amostras hepáticas dos animais do grupo Controle. Em relação aos animais expostos à AFB1, observou-se expressão significativamente mais intensa de Proibitina nas amostras hepáticas dos animais do grupo AFB100. Os resultados encontrados estão de acordo com Kakehashi et al. (2012), que apontaram um aumento na expressão de proibitina coincidiu com o surgimento de focos GST-P+, concluindo que essa proteína está associada com a indução da proliferação celular e pode ser responsável pela transformação neoplásica de lesões pré-neoplásicas no fígado do rato.

Poucos estudos relacionam a expressão de PBT na hepatocarcinogênese por exposição à AFB1. Quanto ao CHC, a deficiência da PBT foi acompanhada pelo bloqueio da proliferação e da indução de apoptose, fatores estes antineoplásicos,

bem como os níveis da PBT estão aumentados nas células de CHC em humanos (Sánchez-Quiles et al., 2010, Xu et al., 2011).

5.4.7. p27

A avaliação imuno-histoquímica mostrou ausência de imunomarcação para a proteína p27 no fígado dos animais expostos à AFB1 em todas as dosagens estudadas. Contudo, nos grupos de animais intoxicados com AFB1 (AFB100 e AFB200) constatou-se redução significativa da expressão gênica hepática para a proteína p27 em comparação ao Controle. Esse resultado corrobora os achados de Ranchal et al., (2009) que mostrou que após a administração de aflatoxina em um modelo experimental acarreta em redução da expressão gênica de p27. O p27 tem sido descrito como um dos principais reguladores negativos da progressão do carcinoma hepatocelular em humanos e em modelos animais (Fiorentino et al., 2000, Azechi et al., 2001, Ito et al., 2001, Nam et al., 2004, Jinget al., 2005, Ranchal et al., 2009, Chen et al., 2010, Xiaodong et al., 2010, Ranchal, 2013). O p27 é fortemente expresso em células não proliferativas e desempenha um papel importante na regulação tanto da quiescência como da progressão através da fase G1, agindo por inibição da expressão da Ciclina/CDKs através da ligação da proteína aos complexos Ciclina/CDK ativos no núcleo (Nam et al., 2004, Wang et al., 2014). A perda de p27 atua em conjunto com a mutação dos vários oncogenes e genes supressores, facilitando, assim, o crescimento do tumor (Yang et al., 2014). A redução na expressão gênica de p27 em CHC humanos foi descrita por Hui et al., (1998), sendo que um mecanismo que pode estar associado com essa redução na hepatocarcinogênese é a sua hipermetilação, o que conduz à perda da transcrição de p27 mRNA (Lei et al., 2005).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que:

A ingestão subcrônica de aflatoxina B1 (AFB1) em ratos está positivamente correlacionada com a formação de adutos no soro (AFB1-lisina) e na urina (AFM1 e AFB1-N7-guanina). Essa correlação se mostrou dose-dependente nos quatro níveis de concentração de AFB1 na dieta utilizados: 0 (zero), 50 µg/kg, 100 µg/kg e 200 µg/kg.

A ingestão subcrônica de AFB1 em ratos em concentrações superiores a 100 µg/kg ocasionam no surgimento de focos de hepatócitos alterados (FHA) que apresentam imunomarcagem para Glutathione-S-Transferase Placentária (GST-P), mesmo na ausência de processos inflamatórios. Esse tipo de foco é considerado uma lesão pré-neoplásica que é uma etapa da hepatocarcinogênese. O grupo que recebeu maior dose de AFB1 apresentou maior quantidade de FHA/GST-P+, indicando que a formação dessa lesão também é positivamente correlacionada com o grau de exposição.

A ingestão subcrônica de AFB1 em ratos é capaz de elevar os níveis de ALT e AST em todas as concentrações estudadas, inclusive no grupo no qual não foi observado o surgimento de FHA (concentração de 50 µg/kg na dieta). Isso pode indicar que os danos nos hepatócitos decorrentes da exposição à AFB1 precedem a formação de FHA.

A ingestão subcrônica de AFB1 em ratos em concentrações superiores a 100µg/kg ocasiona alterações na expressão de algumas proteínas. Houve maior imunoexpressão em Ciclina D1, p53, β-catenina e proibitina. Por outro lado, teve redução na imunoexpressão de Rb, e também na expressão gênica de p27. A correlação desses resultados com a formação de FHA/GST-P+ indica que alterações na expressão desses genes e de suas proteínas são mecanismos da hepatocarcinogênese por exposição à AFB1.

Os adutos de AFB1 encontrados na urina, AFB1-N7-guanina e AFM1, apresentaram correlação positiva com a quantidade de FHA/GST-P+ e com todas as alterações na expressão de proteínas estudadas. Esses adutos são encontrados mesmo antes da formação de FHA/GST-P+ e podem ser utilizados como

biomarcadores de exposição e dano ao DNA ocasionados pela ingestão de aflatoxina.

O aduto de AFB1 encontrado no soro, AFB1-lisina, não apresenta correlação com a formação de FHA/GST-P+, embora esteja correlacionado com todas as demais alterações na expressão das proteínas que participam da hepatocarcinogênese. Isso indica que ele pode ser usado como um biomarcador de hepatocarcinogênese ativa, independente de já ter estabelecido ou não as lesões pré-neoplásicas.

REFERÊNCIAS¹

- Abdel-Hadi A, Schmidt-Heydt M, Parra R, Geisen R, Magan N. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. J R Soc Interface. 2012; 9(69): 757-6
- Abrar M, Muhammad FA, Butt MS, Pasha I, Randhawa MA, Saeed F, Waqas F. Aflatoxins: biosynthesis, occurrence, Toxicity, and remedies. Critical Rev Food Sci Nutrit. 2013; 53: 862-874.
- Aguillar F, Hussain SP, Cerutti P. Aflatoxin B1 induces the transversion of G-T in códon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. Proc.Natl. Acad. Sci 1993; 90: 8586-8590.
- Álvares VS, Castro IM, Costa DA, Lima AC, Madruga ALS. Acta Amazonica. 2012; 42(2): 269-74.
- Alves VAF et al. p53 immunostaining pattern in Brazilian patients with hepatocellular carcinoma. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2004; 46(1): 25-31.
- Amaddeo G, Cao Q, Ladeiro Y, Imbeaud S, Nault JC, Jaoui D, Gaston MY, Laurent C, Laurent A, Bioulac-Sage P, Calderaro J, Zucamn-Rossi J. Integration of tumour and viral genomic characterisations in HBV-related hepatocellular carcinomas. Gut. 2014; pii: gutjnl-2013-306228.
- Anna CH, Iida M, Sills RC, Devereux TR. Expression of potential beta-catenin targets, cyclin D1, c-Jun, c-Myc, E-cadherin, and EGFR in chemically induced hepatocellular neoplasms from B6C3F1 mice. Toxicol Appl Pharmacol. 2003 Jul 15;190(2):135-45.
- Arrus K, Blank G, Abramson D, Clear R, Holley RA. J Stored Prod Res. 2005; 41(5): 513–27.
- Astoreca A, Vaamonde G, Dalcero A, Marin S, Ramos A. Abiotic factors and their interactions influence on the co-production of aflatoxin B₁ and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* isolated from corn. Food Microbiology. 2014; 38: 276-83.
- Azechi H, Nishida N, Fukuda Y, Nishimura T, Minata M, Katsuma H, Kuno M, Ito T, Komeda T, Kita R, Takahashi R, Nakao K. Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. Oncology. 2001; 60(4):346-54.
- Bannasch P, Haertel T, Su Q. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia. Toxicol Pathol. 2003; 31(1): 134-9.
- Bannasch, P. Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I. Hepatic preneoplasia. Carcinogenesis. 1986; 7(5): 689-95.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver

Barros G, Torres A, Chulze S. *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. J Sci Food Agric. 2005; 85(14): 2349–2353.

Bennet RA, Essigmann JM, Wogan GN. Excretion of an aflatoxin-guanine adduct in the urine of aflatoxin B₁-treated rats. Cancer Res. 1981; 41: 650-4.

Blonski W, Kotlyar DS, Forde KA. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2010 Aug;16(29):3603-15.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC no 7, da ANVISA, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos.

Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. Nature 1991; 350: 429-31.

Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. Biochim Biophys Acta. 2014; pii: S1874-9399(14)00073-X.

Buchi G, Spitzner D, Paglialunga S, Wogan GN. Synthesis and toxicity evaluation of aflatoxin P₁. Life Sciences. 1973; 13: 1143-9.

Buitrago-Molina LE, Marhenke S, Longerich T, Sharma AD, Boukouris AE, Geffers R, Guigas B, Manns P, Vogel A. The degree of liver injury determines the role of p21 in liver regeneration and hepatocarcinogenesis in mice. Hepatology. 2013; 58:1143-52.

Bulatao-Jayme J, Almero EM, Castro MC, Jardeleza MT, Salamat LA. A case-control dietary study of primary liver cancer risk from aflatoxin exposure. Int J Epidemiol. 1982 Jun;11(2):112-9.

Busby W, Wogan G. Aflatoxins. Chemical carcinogens. Am Chem Soc Monogr. 1984; 2: 954–1136.

Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Lee JS, Conner EA, Schroeder I, Factor VM, Thorgeirsson SS. Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. J Clin Invest. 2007;117: 2713–22.

Castells M, Marin S, Scanchis V, Ramos AJ. Distribution of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial corn flake processing. Int J Food Microbiol. 2008; 123: 81–7.

Chen Ban K, Singh H, Krishnan R, Fong Seow H. Comparison of the expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma in areas with high and low levels of exposure to aflatoxin B₁. J Surg Oncol. 2004; 86: 157-63.

Chen H, Miao J, Li H, Wang C, Li J, Zhu Y, Wang J, Wu X, Qiao H. Expression and prognostic significance of p21-activated kinase 6 in hepatocellular carcinoma. Journal of Surgical Research 2014; 189:81-88.

Chen HL, Chang MH, Ni YH, Hsu HY, Lee PI, Lee CY, Chen DS. Seroepidemiology of hepatitis B virus infection in children: Ten years of mass vaccination in Taiwan. *JAMA*. 1996 Sep 18;276(11):906-8.

Chen Li, Yuan D, Wang G, Wang Y, Wu Y, Zhu J. Clinicopathological Significance of Expression of Tspan-1, Jab1 and p27 in Human Hepatocellular Carcinoma. *J Korean Med Sci*. 2010; 25: 1438-42.

Chen YW, Chu HC, Lin ZS, Shiah WJ, Chou CP, Klimstra DS, Lewis BC. p16 Stimulates CDC42-Dependent Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells. *PLoS One*. 2013; 8(7): e69389.

Chittmittrapap S, Chieochansin T, Chaiteerakij R, Treeprasertsuk S, Klaikaew N, Tangkijvanich P, Komolmit P, Poovorawan Y. Prevalence of aflatoxin induced p53 mutation at codon 249 (R249s) in hepatocellular carcinoma patients with and without hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14(12):7675-9.

Choi J, Anders L. Signaling through cyclin D-dependent kinases. *Oncogene*. 2014; 33:1890–903.

Chowdhury I, Thompson W, Thoma K. Prohibitins role in cellular survival through Ras-RAf –Mek-Erk pathway. *J Cell Physiol*. 2014; 229: 998–1004.

Choy W.N. A review of the dose-response induction of DNA adducts by Aflatoxin B1 and its implications to quantitative cancer-risk assessment. *Mut Res*. 1993; 296:181-98.

Christopher P. Wild and Yun Yun Gong. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*. 2010; 31(1): 71-82.

Chu FS. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mutat Res*. 1991; 259:291-306.

Chu X, Zhang T, Wang J, Meng L, Zhang X, Tu J, Sun S, Chen X, Lu F. Alternative splicing variants of human Fbx4 disturb cyclin D1 proteolysis in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 447:158-64.

Coleman WB. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med*. 2003; 3: 573–88.

Copetti MV, Iamanaka BT, Pitt JI, Taniwaki MH. Fungi and mycotoxins in cocoa: from farm to chocolate. *Int J Food Microbiol*. 2014; 178:13-20.

Cotty PJ, Jaime-Garcia R. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *Int J Food Microbiol*. 2007; 119(1-2): 109-15.

Coulombe RA. Aflatoxins. In: Sharma, R.P. & Salunkhe, D.K., eds. *Mycotoxins and phytoalexins*. Boca Raton, CRC Press. 1991:103-143.

Dalezios JI, Wogan GN, Weinreb SM. Aflatoxin P1: A new aflatoxin metabolite in monkeys. *Science*. 1971; 171: 584-585.

Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and CDKs in development and cancer: a perspective. *Oncogene*. 2005; 24:2909-15.

Devereux TR, Stern MC, Flake GP, Yu MC, Zhang ZQ, London SJ, Taylor JA. CTNNB1 mutations and beta-catenin protein accumulation in human hepatocellular carcinomas associated with high exposure to aflatoxin B1. *Mol Carcinog*. 2001; 31: 68-73.

Devereux TR, Stern MC, Flake GP, Yu MC, Zhang ZQ, London SJ, Taylor JA. CTNNB1 mutations and beta-catenin protein accumulation in human hepatocellular carcinomas associated with high exposure to aflatoxin B1. *Mol Carcinog*. 2001; 31: 68-73.

Doi K, Uetsuka K. Mechanisms of Mycotoxin-induced Dermal Toxicity and Tumorigenesis Through Oxidative Stress-related Pathways. *J Toxicol Pathol*. 2014; 27:1-10.

Edamoto Y, Hara A, Biernat W, Terracciano L, Cathomas G, Riehle HM, Matsuda M, Fujii H, Scoazec JY, Ohgaki H. Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *Int. J. Cancer*. 2003; 106:334–41.

Ediage EN, Di Mavungua JD, Songa S, Wub A, Peteghema CV, De Saeger S. A direct assessment of mycotoxin biomarkers in human urine samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chem Acta*. 2012; 741:58-69.

Egner PA, Yu X, Johnson JK, Nathasingh CK, Groopman JD, Kensler TW, Roebuck BD. Identification of aflatoxin M1-N7-guanine in liver and urine of tree shrews and rats following administration of aflatoxin B1. *Chem Res Toxicol*. 2003; 16:1174-80.

El-Agamy, D.S. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B1-induced liver injury in rats. *Arch Toxicol*. 2010; 84:389–96.

El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007 Jun;132(7):2557-76.

Essigmann JM, Croy RG, Bennett RA, Wogan GN. Metabolic activation of aflatoxin B1: patterns of DNA adduct formation, removal, and excretion in relation to carcinogenesis. *Drug Metab Rev*. 1982; 13: 581-602.

Essigmann JM, Croy RG, Nadzan AM, Busby WF, Reinhold VN, Buchi G, Wogan GN. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B1 in vitro. *Proc Natl Acad Sci*. 1977; 74:1870-4.

Fang Y, Feng Y, Wu T, Srinivas S, Yang W, Fan J, Yang C, Wang S. Aflatoxin B1 negatively regulates Wnt/ β -catenin signaling pathway through activating miR-33a. *PLoS One*. 2013 Aug 27;8(8)

Fausto N, Webber EM. Control of liver growth. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1993; 3:117-35.

Ferk F, Huber WW, Grasl-Kraupp B, Speer K, Buchmann S, Bohacek R, Mišík M, Edelbauer L, Knasmüller S. Protective effects of coffee against induction of DNA damage and pre-neoplastic foci by aflatoxin B1. *Mol Nutr Food Res.* 2014 Feb;58(2):229-38

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CanceRbase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.

Fujimori M, Tokino T, Hino O, Kitagawa T, Imamura T, Okamoto E, Mitsunobu M, Ishikawa T, Nakagama H, Harada H. Allelotype study of primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 1991; 51: 89-93.

Fusaro G, Dasgupta P, Rastogi S, Joshi B, Chellappan S. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. *J Biol Chem.* 2003; 278:47853-61.

Gallagher EP, Kunze KL, Stapleton PL, Eaton DL. The kinetics of aflatoxin B1 oxidation by human cDNA-expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicol Applied Pharmacol.* 1996; 141:595– 606.

Gijssels HE, Maassen CB, Mulder GJ, Meerman JH. P53 protein expression by hepatocarcinogens in the rat liver and its potential role in mitoinhibition of normal hepatocytes as a mechanism of hepatic tumour promotion. *Carcinogenesis.* 1997;18:1027–33.

Gomes MA, Priolli DG, Tralhão JG, Botelho MF. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. *Rev Assoc Med Bras.* 2013; 59(5): 514–24.

Gonçalves CS, Pereira FEL, Gayotto LCC. Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of a national survey (Florianopolis, SC, 1995). *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 1997; 39(3): 165-70.

Gong YY, Wilson S, Mwatha JK, Routledge MN, Castelino JM, Zhao B, Kimani G, Kariuki HC, Vennervald BJ, Dunne DW, Wild CP. Aflatoxin exposure may contribute to chronic hepatomegaly in Kenyan school children. *Environ Health Perspect.* 2012 Jun;120(6):893-6

Goodman ZD, Terracciano L. Tumours and tumour-like lesions of the liver. In *MacSween's Pathology of the Liver*, 5th ed.; Burt, A.D., Portmann, B.C., Ferrell, L.D., Eds.; Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia, PA, USA, 2007; 1:761–814.

Gradelet S, Le Bon A, Bergès R, Suchetet M, Astorg P. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B1-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: Role of the modulation of aflatoxin B1 metabolism. *Carcinogenesis*. 1998; 19(3): 403-11.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54:4855-78.

Groopman JD, Hasler JA, Trudel LJ, Pikul A, Donahue PR, Wogan GN. Molecular dosimetry in rat urine of aflatoxin-N7-guanine and other aflatoxin metabolites by multiple monoclonal antibody affinity chromatography and immunoaffinity/high performance liquid chromatography. *Cancer Res*. 1992; 52: 267-74.

Groopman JD, Hasler JA, Trudel LJ, Pikul A, Donahue PR, Wogan GN. Molecular dosimetry in rat urine of aflatoxin-N7-guanine and other aflatoxin metabolites by multiple monoclonal antibody affinity chromatography and immunoaffinity/high performance liquid chromatography. *Cancer Res*. 1992; 52: 267-74.

Groopman JD, Wild CP, Hasler J, Junshi C, Wogan GN, Kensler TW. Molecular epidemiology of aflatoxin exposures: validation of aflatoxin-N7-guanine levels in urine as a biomarker in experimental rat models and humans. *Environ Health Perspect*. 1993; 99:107-13.

Guengerich FP, Johnsn WW, Ueng YF, Yamazaki H, Shimada T. Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environ Health Perspect*. 1996; 3:557-62.

Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 1999; 39:1-17.

Guengerich, F.P.; Johnson, W.W.; Shimada, T; Ueng, Y; Yamazaki, H.; Langouët, S. Activation and detoxication of aflatoxin B1. *Mutation Res*. 1998; 402, 121-8.

Ha TG, Jang JJ, Kim SG, Kim ND. 2-(Allylthio)pyrazine inhibition of aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Chem. Biol. Interactions*. 1999; 121:209-22.

Hamid AS, Tesfamariam IG, Zhang Y, Zhang ZG. Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention. *Oncol Lett*. 2013; 5:1087-92.

Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione-S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1995; 30(6): 445-600.

Hinton DM, Myers MJ, Raybourne RA, Francke-Carroll S, Sotomayor RE, Shaddock J, WaRbritton A, Chou MW. Immunotoxicity of aflatoxin B1 in rats: effects on lymphocytes and the inflammatory response in a chronic intermittent dosing study. *Toxicol Sci*. 2003 Jun;73(2):362-77.

- Hiruma S, Qin GZ, Gopalan-Kriczky P, Shinozuka H, Sato K, Lotlikar PD. Effect of cell proliferation on initiation of aflatoxin B1-induced enzyme altered hepatic foci in rats and hamsters. *Carcinogenesis*. 1996; 17: 2495-9.
- Hiruma S, Qin GZ, Gopalan-Kriczky P, Shinozuka H, Sato K, Lotlikar PD. Effect of cell proliferation on initiation of aflatoxin B1-induced enzyme altered hepatic foci in rats and hamsters. *Carcinogenesis*. 1996; 17: 2495-9.
- Hsieh DPH, Atkinson DN. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1991; 283:525-32.
- Hu T, Guo H, Wang W, Yu S, Han L, Jiang L, Ma J, Yang C, Guo Q, Nan K. Loss of p57 expression and RhoA overexpression are associated with poor survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2013; 30:1707-14.
- Hu Z, Zhou Z, Xiong G, Wang Y, Lai Y, Deng L, Yan J. Cyclin D1 G870A polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Tumor Biol.* 2014; 35:5607–12.
- Huang B, Han Z, Cai Z, Wu Y, Ren Y. Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2010; 662:62-8.
- Hui A, Makuuchi M, Li X. Cell cycle regulators and human hepatocarcinogenesis. *Hepato-gastroenterology.* 1998; 45: 1635-42.
- Hui AM, Sun L, Kanai Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Reduced p27Kip1 expression in hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett.* 1998;132(1-2):67-73.
- Hussein HS, Brasel JM. Toxicity metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology.* 2001; 167(2): 101-34.
- Huynh H. Overexpression of tumour suppressor retinoblastoma 2 protein (pRb2/p130) in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 2004; 25: 1485-94.
- langawale DK, Mandlik SK, Naik SR. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): A critical discussion. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014; 37:118-33.
- IARC International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some traditional herbal medicines. Some mycotoxins naphthalene and styrene. *IARC Monographs.* 2002; 82: 171-274.
- IARC International Agency for Research on Cancer. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes. *WHO.* 1987;1:83-7.
- Ito Y, Matsuura N, Sakon M, Miyoshi e, Noda K, Takeda T, Umeshita K, Nagano H, Nakamori S, Dono K, Tsujimoto M, Nakahara M, Nakao K, Taniguchi N, Monden M. Expression and prognostic roles of the G1-S modulators in hepatocellular carcinoma: P27 independently predicts the recurrence. *Hepatology.* 1999; 30:90-9.

Ito Y, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Monden M, Matsura N. Expression of p57/Kip2 protein in hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2001; 61:221-225.

Jager AV, Ramalho FS, Ramalho LNZ, Oliveira CAF. Biomarkers of Aflatoxin exposure and its relationship with the hepatocellular carcinoma. In: Ramón Gerardo Guevara-González (Org.). *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology*. 1ed. Shanghai: InTech, 2011; 107-26.

Jager AV, Tedesco MP, Souto PCMC, Oliveira CAF. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. *Food Control*. 2013; 33(1):87-92.

Jager AV, Tonin AG, Baptista GZ, Souto PCMC, Oliveira CAF. Assessment of aflatoxin exposure using serum and urinary biomarkers in São Paulo, Brazil: A pilot study. 2016; 219: 294-300.

Jain S, Singhal S, Lee P, Xu R. Molecular genetics of hepatocellular neoplasia. *Am J Transl Res*. 2010; 2:105-18.

Jia X, Han C, Chen J. Effects of tea on preneoplastic lesions and cell cycle regulators in rat liver. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2002; 11(12):1663–7.

Jing Z. Cell proliferation, apoptosis and the related regulators p27, p53 expression in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(13): 1910-6.

Jing Z, Nan KJ, Hu ML. Cell proliferation, apoptosis and the related regulators p27, p53 expression in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2005 Apr 7;11(13):1910-6.

Johnson et al. Complete protection against aflatoxin b1-induced liver cancer with a triterpenoid: dna adduct dosimetry, molecular signature, and genotoxicity threshold. *Cancer Prev Res*. 2014; 7: 658.

Joo M, Kang YK, Kim MR, Lee HK, Jang JJ. Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Liver*. 2001 Apr;21(2):89-95.

Jung YJ, Lee KH, Choi DW, Han CJ, Jeong SH, Kim KC, Oh JW, Park TK, Kim CM. Reciprocal expressions of cyclin E and cyclin D1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2001; 168: 57-63.

Takehashi A, Ishii N, Shibata T, Wei M, Okazaki E, Tachibana T, Fukushima S, Wanibuchi H. Mitochondrial Prohibitins and Septin 9 Are Implicated in the Onset of Rat Hepatocarcinogenesis. *Toxicol. Sci*. 2011; 119(1):61-72.

Kaur G et al. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44(7): 984-93.

Kensler TW, Roebuck BD, Wogan GN, Groopman JD. Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology. *Toxicological Sciences*. 2011; 120:S28–48.

Kew MC. Aflatoxins as a Cause of Hepatocellular Carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis*. 2013; 22: 305-10.

Kew MC. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver Int*. 2003; 23:405–9.

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, Camus-Randon AM, Mendy M, Goedert JJ, Merle P, Trepo C, Brechot C, Hainaut P, Montesano R. Ser-249 p53 mutations in plasma DNA of patients with hepatocellular carcinoma from The Gambia. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92:148–53.

Kirk GD, Lleonart ME, Villar S, Groopman JD, Mendy M, Hainaut P, Friesen M. Quantitative detection of 249ser TP53 mutations in plasma DNA and risk for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2005; 42:95–6.

Kitagawa M, Kitagawa K, Kotake Y, Niida H, Ohhata T. Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70:4785-94.

Ko KS, Tomasi ML, Iglesias-Ara A, French BA, French SW, Ramani K, Lozano JJ, Oh P, He L, Stiles BL, Li T, Yang H, Martínez-Chantar M.L, Mato JM, Lu SC. Liver-specific deletion of prohibitin 1 results in spontaneous liver injury, fibrosis, and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*. 2010; 52:2096–108.

Köhle C, Schwarz M, Bock KW. Promotion of hepatocarcinogenesis in humans and animal models. *Arch Toxicol*. 2008 Sep;82(9):623-3.

Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg*. 2003; 197:634–59.

Kumar M, Verma V, Nagpal R, Kumar A, Gautam SK, Behare PV, Grover CR, Aggarwal PK. Effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on gene expressions and genotoxicity during AFB₁-induced hepatocellular carcinoma. *Gene*. 2011; Dec 15;490(1-2):54-9.

Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, Monges G, Thomas G, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*. 2001 Jun;120(7):1763-73.

Leach FS, Elledge SJ, Sherr CJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B. Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. *Cancer Res*. 1993; 53:1986-999.

Lee HS, Park MH, Yang SJ, Park PC, Kim NS, Kim YS, Kim DI, Yoo HS, Choi EJ, Yeom YI. Novel candidate targets of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells. *Life Sci.* 2007; 80:690–8.

Lee TK, Man K, Poon RT, Lo CM, Ng IO, Fan ST. Disruption of p53-p21/WAF1 cell cycle pathway contributes to progression and worse clinical outcome of hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2004 Jul;12(1):25-31.

Leeson S, Diaz Gj, Summers JD. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. Guelph University Books, 1995.

Lei PP, Zhang ZJ, Shen LJ, Li JY, Zou Q, Zhang HX. Expression and hypermethylation of p27 kip1 in hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 2005;11(29):4587-91.

Liao, J.; Tsai, S.; Hwang, J.; Pang, V.F.; Jeng, C.; Wang, S. Aflatoxin B1 and 2-acetylaminofluorene induced hepatic carcinogenicity and gamma-glutamyltranspeptidase expression via chronic feeding in rats. *Plant Prot Bull.* 2002; 44:37-50.

Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34:1–10.

Loguercio C, Cuomo A, Tuccillo C, Gazzero P, Cioffi M, Molinari AM, Del Vecchio Blanco C. Liver p53 expression in patients with HCV-related chronic hepatitis. *J Viral Hepat.* 2003; 10:266-70.

López C, Ramos L, Bulacio L, Ramadán S, Rodríguez F. Aflatoxin B1 content in patients with hepatic diseases. *Medicina (B Aires).* 2002; 62:313-6.

Magnussen A, Parsi MA. Aflatoxins, hepatocellular carcinoma and public health. *World J Gastroenterol.* 2013; 19: 1508-12.

Malumbres M, Barbacid M. Mamalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.* 2005; 30:630-41.

Masri MS, Haddon WF, Lundin RE, Hsieh DPH. Aflatoxin Q1: A newly identified major metabolite of aflatoxin B1 in monkey liver. *J Agric Food Chem.* 1974; 22: 512-4.

Matsuda Y, Wakai T, Kubota M, Takamura M, Yamagiwa S, Aoyagi Y, Osawa M, Fujimaki S, Sanpei A, Genda T, Ichida T. Clinical significance of cell cycle inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol.* 2013; 46:185–92.

McCoy L, Scholl PF, Schleicher R, Groopman JD, Powers C, Pfeiffer CM. Analysis of aflatoxin B1-lysine adducts in human serum by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005; 19: 2203-10.

McKillop IH, Moran DM, Jin X, Koniaris LG. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Surg Res.* 2006; 136:125-35.

Merle P, Trepo C. Molecular Mechanisms Underlying Hepatocellular Carcinoma. *Viruses*. 2009; 1:852-72.

Miller JD. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research, *J Stored Prod Res*. 1995; 31:1–16.

Mishra R. Cell-cycle regulatory cyclins and their deregulation in oral cancer. *Oral Oncol*. 2013; 49:475-81.

Moghaddam SJ, Haghighi EN, Samiee S, Shahid N, Keramati AR, Dadgar S, Zali MR. Immunohistochemical analysis of p53, cyclinD1, RB1, c-fos and N-ras gene expression in hepatocellular carcinoma in Iran. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(4): 588–593.

Moss MO. Recent studies of mycotoxins. *J. Applied Microbiol. Symposium*. 1998; 84:62S- 76S.

Moudgil V, Redhu D, Dhanda S, Singh J. A Review of Molecular Mechanisms in the Development of Hepatocellular Carcinoma by Aflatoxin and Hepatitis B and C Viruses. *J Envir Pathol Toxicol Oncolo*. 2013; 32:165-75.

Mykkänen H, Zhu H, Salminen E, Juvonen RO, Ling W, Ma J, Polychronaki N, Kemiläinen H, Mykkänen O, Salminen S, El-Nezami H. Fecal and urinary excretion of aflatoxin B1 metabolites (AFQ1, AFM1 and AFB-N7-guanine) in young Chinese males. *Int J Cancer*. 2005 Jul 20; 115(6):879-84.

Nan KJ, Jing Z, Gong L. Expression and altered subcellular localization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004 May 15;10(10):1425-30.

Neal GE, Eaton DI, Judah DJ, Verma A. Metabolism and toxicity of aflatoxins M1 and B1 in human-derived in vitro systems. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998; 151:152-8.

Newberne PM, Butler WH. Acute and chronic effects of Aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. *Cancer Res*. 1969; 29:236-50.

Nijtmans IG, Artal SM, Grivell IA, Coates PJ. The mitochondrial PHB complex: Roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cell Mol Life Sci*. 2002; 59:143-55.

Nili-Ahmadabadi et al. Protective effect of pretreatment with thymoquinone against Aflatoxin B1 induced liver toxicity in mice. *Daru*. 2011; 19(4): 282–7.

Nita ME, Alves VAF, Carrilho FJ, Ono-Nita SK, de Mello ES, Gama-Rodrigues JJ. Molecular aspects of hepatic carcinogenesis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo [online]*. 2002; 44(1):39-48.

Nogueira JA, Ono-Nita SK, Nita M. 249 TP53 mutation has high prevalence and is correlated with larger and poorly differentiated CHC in Brazilian patients. *BMC Cancer*. 2009; 9: 204.

O'Brate A, Giannakakou P. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resist Updat*. 2003; 6: 313-22.

OECD. *Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070707-en>

Ozturk M. Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis. *Semin Liver Dis*. 1999; 9:235-42.

Peng SY, Chou SP; Hsu HC. Association of downregulation of cyclin D1 and of overexpression of cyclin E with p53 mutation, high tumor grade and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 1998; 29:281-9.

Pestell KE, Ducruet AP, Wipf P, Lazo JS. Small molecule inhibitors of dual specificity protein phosphatases. *Oncogene*. 2000; 19:6607-12.

Pez F, Lopez A, Kim M, Wands JR, Caron de Fromentel C, Merle P. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *J Hepatol*. 2013; 59: 1107-17.

Pimenta JR, Massabki PS. Carcinoma hepatocelular: um panorama clínico. *Rev. Bras. Clin. Med*. 2010; 8: 59-67.

Pok S, Wen V, Shackel N, Alsop A, Pyakurel P, Fahrer A, Farrel GC, Teo NC. Cyclin E facilitates dysplastic hepatocytes to bypass G1/S checkpoint in hepatocarcinogenesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2013; 28:1545-54.

Pritchard DJ, Butler WH. The ultrastructural features of aflatoxin-B1-induced lesions in the rat liver. *Br. J. Exp. Path*. 1988;69:793-804.

Qi LN. et al. The p53 mutation spectrum in hepatocellular carcinoma from Guangxi, China : role of chronic hepatitis B virus infection and aflatoxin B1 exposure. *Liver Int*, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/liv.12460>. Acesso em: 25 abr. 2014

Qian G, Wang F, Tang L, Massey ME, Mitchell NJ, Su J, Williams JH, Phillips TD, Wang J. Integrative toxicopathological evaluation of Aflatoxin B1 exposure in F344 rats. *Toxicol Pathol*. 2013; 1-13.

Qu K, Xu X, Liu C, Wu Q, Wei J, Meng F, Zhou L, Wang Z, Lei L, Liu P. Negative regulation of transcription factor FoxM1 by p53 enhances oxaliplatin-induced senescence in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*. 2013; 331:105-114.

Qureshi H, Ali SS, Iqbal M, Siddiqui AA, Khan NA, Hamid SS. Aflatoxins and Hepatitis B, C Viral Associated Hepatocarcinogenesis. *J Cell Sci Ther*. 2014; 5:179.

Raisuddin S, Singh KP, Zaidi SIA, Paul BN, Ray PK. Immunosuppressive effects of aflatoxin in growing rats. *Mycopathologia*. 1993; 124:189–94.

Ranchal I, González R, Bello RI, Ferrín G, Hidalgo AB, Linares CI, Aguilar-Melero P, González-Rubio S, Barrera P, Marchal T, Nakayama KI, de la Mata M, Muntané J. The reduction of cell death and proliferation by p27(Kip1) minimizes DNA damage in an experimental model of genotoxicity. *Int J Cancer*. 2009 Nov 15;125(10):2270-80.

Raney KD, Shimada T, Kim DH, Groopman JD, Harris TM, Guengerich FP. Oxidation of aflatoxins and sterigmatocystin by human liver microsomes: significance of aflatoxin Q1 as a detoxication product of aflatoxin B1. *Chem Res Toxicol*. 1992; 5:202-10.

Rawi SM, Waggas AM. Impact of 90-day oral dosing with naturally occurring aflatoxin mixture on male Sprague-Dawley rat neurochemistry and behavioral pattern. *Middle-East J. Sci. Res*. 2013; 14(2):228-38.

Reed CA, Mayhew CN, McClendon AK, Yang X, Witkiewicz A, Knudsen ES. Rb has a critical role in mediating the in vivo checkpoint response, mitigating secondary DNA damage and suppressing liver tumorigenesis initiated by aflatoxin B1. *Oncogene*. 2009; 28: 4434-43.

Reis TA, Baquião AC, Atayde DD, Grabarz F, Corrêa B. Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from organic Brazil nuts using a polyphasic approach. *Food Microbiol*. 2014; 42: 34-9.

Reis TA, Oliveira TD, Baquião AC, Gonçalves SS, Zorzete P, Corrêa B. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. *Int. J. Food Microbiol*. 2012; 159: 61–68.

Romanov VS, Pospelov VA, Pospelova TV. CyclinDependent Kinase Inhibitor p21Waf1: Contemporary View on Its Role in Senescence and Oncogenesis. *Biochemistry (Moscow)*. 2012; 77:575-84.

Roze L, Hong S, Linz J. Aflatoxin Biosynthesis: Current Frontiers. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2013; 4:293–311.

Rubert J, Soler C, Manes J. Optimization of Matrix Solid- Phase Dispersion method for simultaneous extraction of aflatoxins and OTA in cereals and its application to commercial samples. *Talanta*. 2010; 82:567–74.

Sabbioni G, Skipper PL, Buchi G, Tannenbaum SR. Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B1 in vivo in rats. *Carcinogenesis*. 1987; 8: 819-24.

Sanchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol*. 2005; 16:311-21.

Sánchez-Quiles V, Santamaría E, Segura V, Sesma I, Rieto J, Corrales FJ. Prohibitin deficiency blocks proliferation and induces apoptosis in human hepatoma cells: molecular mechanisms and functional implications. *Proteomics*. 2010; 10:1609-20.

Sancho-Bru P et al. Bradykinin attenuates hepatocellular damage and fibrosis in rats with chronic liver injury. *Gastroenterology*. 2007; 133(6): 2019-28.

Santos RL, Kasper N, Sardinas S, Marín V, Sanchis AJ, Ramos AJ. Effect of Capsicum carotenoids on growth and aflatoxins production by *Aspergillus flavus* isolated from paprika and chilli. *Food Microbiol*. 2010; 27:1064–70.

Sato T, Saito H, Swensen J, Olifant A, Wood C, Danner D, Sakamoto T, Takita K, Kasumi F, Miki Y, Skolnick M, Nakamura Y. The human prohibitin gene located on chromosome 17q21 is mutated in sporadic breast cancer. *Cancer Res*. 1992; 52:1643-46.

Sato Y et al. Association of cyclin D1 expression with factors correlated with tumor progression in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 1999; 34: 486-93.

Scott, P.M. Natural poisons. In: Helrich, K., ed. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. Arlington, Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990; 2:1184-213.

Shen HM, Ong CN. Mutations of the p53 tumor suppressor gene and ras oncogenes in aflatoxin hepatocarcinogenesis. *Mutat Res*. 1996; 366:23-44.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*. 1996; 274:1672-77.

Shyamal S, Latha PG, Suja SR, Shine VJ, Anuja GI, Sini S, Pradeep S, Shikha P, Rajasekharan S. Hepatoprotective effect of three herb extracts on aflatoxin B1-intoxicated rat liver. *Singapore Med J*. 2010; 51:326-31.

Singh KB, Maurya BK, Trigun SK. Activation of oxidative stress and inflammatory factors could account for histopathological progression of aflatoxin-B1 induced hepatocarcinogenesis in rat. *Mol Cell Biochem*. 2015; 401: 185-96.

Smela ME, Currier SS, Bailey EA, Essigmann JM. The chemistry and biology of aflatoxin B1: from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2001; 22:535–45.

Soffritti M, McConnell EE. Liver foci formations during Aflatoxin B1 carcinogenesis in the rat. *Annals New York Acad Sci*. 1988; 534:531-40.

Soliman GZA, Hashen AM, Arafa M. Protective Effect of Curcuma Longa or Nigella Sativa on Aflatoxin B1 -Induced Hepato-Toxicity in Rats in Relation to Food Safety on Public Health. *Med. J. Cairo Univ*. 2012; 80(2): 191-203.

Souza MF. Inhibition by the bioflavonoid Ternatin of Aflatoxin-B1-induced lipidic peroxidation in rat liver.

Strosnider H, Azziz-Baumgartner E, Banziger M. Work group report: Public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environ Health Perspect*. 2006; 114:1898- 903.

Terashima M, Kim KM, Adachi T, Nielsen PJ, Reth M, Köhler G, Lamers MC. The IgM antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin-related protein. *Embo J*. 1994; 3:3782-92.

Theise ND, Park YN, Kojiro M. Dysplastic nodules and hepatocarcinogenesis. *Clin Liver Dis*. 2002; 6:497-512.

Theiss AL, Sitaraman SV. The role and therapeutic potential of prohibitin in disease. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 6:1137-43.

Theiss AL, Vijay-kumar M, Obertone TS, Jones DP, Hansen JM, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV. Prohibitin is a novel regulator of antioxidant response that attenuates colonic inflammation in mice. *Gastroenterology*. 2009; 137:199-208.

Theumer MG, Cánepa MC, López AG, Mary VS, Dambolena JS, Rubinstein HR. Subchronic mycotoxicoses in Wistar rats: assessment of the in vivo and in vitro genotoxicity induced by fumonisins and aflatoxin B(1), and oxidative stress biomarkers status. *Toxicology*. 2010; 268:104-10.

Thuaud F, Ribeiro N, Nebigil CG, Désaubry L. Prohibitin ligands in cell death and survival: Mode of action and therapeutic potencial. *Chem Biol*. 2013; 20(3):316-23.

Tsai CF et al. Hepatoprotective effect of electrolyzed reduced water against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food Chem Toxicol*. 2009; 47(8): 2031-6.

Tseng TC. Recent aspects of aflatoxin Research in Taiwan. *J Toxicol Toxin Rev*. 1994; 13:229-41.

Tsuda H, Oda T, Sakamoto M, Hirohashi S. Different pattern of chromosomal allele loss in multiple hepatocellular carcinomas as evidence of their multifocal origin. *Cancer Res*. 1992; 52: 1504-9.

Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K. Overexpression of a Mitochondrial Protein Chaperon, Prohibitin, in Cells Expressing Hepatitis C Virus Core Protein. *Hepatology*. 2009; 50:378-86.

Tu T, Budzinska MA, Maczurek AE, Cheng R, Bartolomeo A, Warner F, McCaughan GW, McLennan SV, Shacke NA. Novel aspects of the liver microenvironment in hepatocellular carcinoma pathogenesis and development. *Int J Mol Sci*. 2014; 15:9422-58.

Turner PC. The Molecular Epidemiology of Chronic Aflatoxin Driven Impaired Child Growth. *Scientifica*. 2013:152879.

Ueda H et al. Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nat Genet*. 1995; 9: 41-7.

Venegas AC, Guerra JJH, Navas MCN. Exposición a aflatoxina: un problema de salud pública. *Latreia*. 2014; 27(1): 42-52.

Ventura M, Gómez A, Anaya I, Díaz J, Broto F, Agut M, Comellas L. Determination of aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr.* 2004; 1:25-9.

Villar S, Ortiz-Cuaran S, Abedi-Ardekani B, Gouas D, Nogueira da Costa A, et al. Aflatoxin-Induced TP53 R249S Mutation in Hepatocellular Carcinoma in Thailand: Association with Tumors Developing in the Absence of Liver Cirrhosis. *PLoS ONE.* 2012; 7(6): e37707.

Wang J, Chenivesse X, Henglein B, Brechot C. hepatitis b virus integration in a cyclin a gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature.* 1990; 343:555-7.

Wang QM, Yang KM, Zhou HY, Yu ZH, Li X, Yang HJ. Role of beta-catenin in hepatocarcinogenesis of rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2006 Feb;5(1):85-9.

Wang S, Fusaro G, Padmanabhan J, Chellappan SP. Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene.* 2002; 21:8388–96.

Wang Y, Yu Y, Song S, Li T, Xiang J, Zhang H, Lu M, Ji F, Hu L. JAB1 and phosphor-Ser10 p27 expression profile determine human hepatocellular carcinoma prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014; 140:969–78.

Warth B, Sulyok M, Fruhmann P, Berthiller F, Schuhmacher R, Hametner C, Adam G, J Frohlich J, Krska R. Assessment of human deoxynivalenol exposure using an LC–MS/MS based biomarker method. *Toxicol Lett.* 2012; 211:85-90.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 1995; 81:323-30.

Wild CP, Hasegawa R, Barraud L, Chutimataewin S, Chapot B, Ito N, Montesano R. Aflatoxin-albumin adducts: a basis for comparative carcinogenesis between animals and humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996 Mar;5(3):179-89.

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

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; 80:1106-22.

Wilson R, Ziprin R, Ragsdale S, Busbee D. Uptake and vascular transport of ingested aflatoxin. *Toxicol Lett.* 1985; 29: 169-76.

Wogan G, Kensler TW, Groopman JD. Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma. A review. *Food Additives & Contaminants: Part A,* 2011; 29:249-57.

Wogan GN, Edward GS, Shank RC. Excretion and tissue distribution of radioactivity from aflatoxina B1-C14 in rats. *Cancer Res.* 1967; 27:1729-36.

Wogan GN, Newberne PM. Dose-response characteristics of AFB1 carcinogenesis in the rat. *Cancer Res.* 1967; 27:2370–6.

Woogan, GN; Paglialunga S; Newberne PM. Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B1 in rats. *Cosmet Toxicol.* 1974; 12, 681-5.

World Health Organization. Evaluation of certain mycotoxins in food. Geneva: World Health Organization. (WHO Technical Report Series, 906). 2002.

Wu F, Groopman JD, Pestka JJ. Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2014; 5: 351-72.

Wu HC, Santella R. The Role of aflatoxins in Hepatocellular Carcinoma. *Hepat Mon.* 2012; 12: 1-16.

Xu Z, Wu J, Zha X. Up-regulation of prohibitin 1 is involved in the proliferation and migration of liver cancer cells. *Sci China Life Sci.* 2011 Feb;54(2):121-7.

Yamamoto M, Tamakawa S, Yoshie M, Yaginuma Y, Ogawa K. Neoplastic hepatocyte growth associated with cyclin D1 redistribution from the cytoplasm to the nucleus in mouse hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog.* 2006;45(12):901-13.

Yan HX, Wu HP, Zhang HL, Ashton C, Tong C, Wu H, Qian QJ, Wang HY, Ying QL. p53 promotes inflammation-associated hepatocarcinogenesis by inducing HMGB1 release. *J Hepatol*2013; 59: 762-8.

Yang C, Fan J, Zuang Z, Fang Y, Zhang Y, Zhang Y, Wang S. The role of NAD⁺ dependent isocitrate dehydrogenase 3 subunit α in AFB1 induced liver lesion. *Toxicol Lett.* 2014; 224:371-9.

Yang G , Zhang A, Hong F et al. The expression of cyclin d1 protein of lithium carbonate on the development of rat hepatic carcinoma induced by aflatoxin b1 and its significance. *Carcinogenesis Teratogenesis Mutagenesis.* 2000; 12(2): 82-3.

Yang W, Lian J, Feng Y, Srinivas S, Guo Z, Zhong H, Zhuang Z, Wang S. Genome-wide miRNA-profiling of aflatoxin B1-induced hepatic injury using deep sequencing. *Toxicol Lett.* 2014; 226:140-9.

Yang X, Zhang Z, Wang X, Wang Y, Zhang X, Lu H, Wang SL. Cytochrome P450 2A13 enhances the sensitivity of human bronchial epithelial cells to aflatoxin B1-induced DNA damage. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 270:114-21.

Yang YF, Wang F, Xiao JJ, Song Y, Zhao Y, Cao Y, Bei Y, Yang C. MiR-222 overexpression promotes proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by downregulating p27. *Int J Clin Exp Med.* 2014; 7:893-902.

Zang I, Xie F, Fang Xu J, Qin Y, Shen RX, Yang JM, He J. P16 gene hypermethylation and hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2011; 17: 3043-8.

Zhang MF, Zhang ZY, Fu J, Yang YF, Yun JP. Correlation between expression of p53, p21/WAF1, and MDM2 proteins and their prognostic significance in primary hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*. 2009 Dec 22;7:110.

Zhou TB, Qin YH. Signaling pathways of prohibitin and its role in diseases. *J Recept Signal Transduct Res*. 2013; 33:28–36.

Zucman-Rossi J. Molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2010 Jul;42 Suppl 3:S235-41.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 032/2013, sobre o projeto intitulado “*Correlação entre ingestão de aflatoxina B1 na dieta, expressão hepática de genes e proteínas relacionadas à hepatocarcinogênese e concentração de AFB1-adutos no soro, urina e fígado de ratos Wistar.*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Fernando Silva Ramalho** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de maio de 2013.

We certify that the protocol nº 032/2013, entitled “*Relationship between dietary intake of aflatoxin B1, hepatic expression of the genes and proteins related to hepatocarcinogenesis, and AFB1-adduct concentration in serum, urine and liver of Wistar rats*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 05/27/2013.

Ribeirão Preto, 27 de maio de 2013.

Prof. Dr. Omeiro Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal FMRP-USP