UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Letícia de Araujo Apolinario

Efeito da lectina ArtinM na hepatocarcinogênese induzida por Aflatoxina B1

Ribeirão Preto - SP

2017

LETÍCIA DE ARAUJO APOLINARIO

Efeito da lectina ArtinM na hepatocarcinogênese induzida por Aflatoxina B1

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho

Ribeirão Preto - SP

2017

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Apolinario, Letícia de Araujo

Efeito da lectina ArtinM na hepatocarcinogênese induzida por Aflatoxina B1 em modelo experimental com ratos/Letícia de Araujo Apolinario: Orientador Dr. Fernando Silva Ramalho- Ribeirão Preto, 2016.

75f.

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP, 2016.

1. Carcinoma hepatocelular - 2.Hepatocarcinogênese - 3. Aflatoxinas - 4. ArtinM.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha mãe Eleuza, ao meu marido Lucas e a todos aqueles que me amam por serem meu alicerce e minha riqueza.

AGRADECIMENTO

Ao Professor Dr. Fernando Silva Ramalho, por todos os ensinamentos (nas aulas teóricas, nas aulas práticas, no laboratório, nas cirurgias, no hospital e no cotidiano), pelo valioso auxílio na condução desta tese, pela paciência e apoio nos momentos difíceis e de ansiedade, pelo reconhecimento de meus esforços, pelo “empurrão” para formalizar meu casamento e pela disponibilidade de sempre.

À Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho, pelos ensinamentos, pelas discussões valiosas, pelo auxílio e apoio durante a realização desta tese.

Aos professores Carlos F. Oliveira e Maria Cristina Roque-Barreira e aos integrantes de seus laboratório por auxiliarem no desenvolvimento da pesquisa fornecendo a AFB1 e o ArtinM.

À Dra Marlei Josiele Augusto, pelos ensinamentos e auxílio no desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, pela amizade sincera, pelas discussões valiosas sobre espiritualidade e desenvolvimento moral e por ter tido a confiança em me dar a oportunidade de criar um cachorro tão especial que é o Flash.

À minha amiga querida e companheira de experimentos e da vida, a doutoranda Maraiza Silva Gomes, que ora tive como irmã caçula para apoiar, ouvir e ser ouvida, para dividir momentos de alegrias e conquistas, de tristeza ou dificuldades; ora tive como professora, que teve paciência para ensinar uma enfermeira o bê-á-bá de uma bancada de laboratório.

À Deisy Mara da Silva, pelos ensinamentos, auxílio no desenvolvimento das técnicas histológicas e de imunohistoquímica e pelas caronas.

Aos secretários do departamento, Rodrigo, Rosângela e em especial à Camila Luca Zambonini Gimenes, pelo apoio nesses anos todos, por todas as orientações e pela prontidão em ajudar.

Aos técnicos do biotério Ana Carolina L. Veloni e Carlos Henrique de Carvalho por cuidarem com tanto amor e respeito dos meus animais no período de experimentação, pela disposição em me ajudar sempre que precisei e pela amizade.

Ao Antônio de Pádua e aos demais funcionários do departamento pelo apoio nas diversas atividades durante o mestrado.

Aos amigos, Camila Neves Romanato, Fernanda Crizol Bazzaglia, Getúlio Freitas de Paula, Pamela Araujo Silva, Priscila Lassalves Carleto, Rejane Cristina Peralta, Renata Maciel Cortes, por serem como irmãos para mim, por me deixarem ser parte da vida de vocês, por fazerem parte da minha vida, por

compartilharem das minhas alegrias e por me darem a certeza de que sempre poderei contar com vocês.

Aos meus ex-colegas de laboratório, os doutores Sheila Sanches, Maurício Trotta, Natália Alle, Sérgio Figueiredo, Renan e Marcos pelo apoio nos momentos de dificuldade, pelos ensinamentos, pelas discussões científicas, pelas conversas descontraídas e pela amizade.

Em especial à minha família, minha mãe, meus irmãos, meu marido e sua família, por serem meus maiores exemplos de caráter, honestidade e esforço, por serem minha base, meu alicerce, por todo amor e carinho.

À Deus pela vida e pelas oportunidades que coloca em meu caminho.

E às todas as pessoas, que não citei, mas que também contribuíram de alguma forma para a realização desta pesquisa, meu sincero agradecimento.

RESUMO

ArtinM é uma lectina ligante a carboidrato D-manose que se interage a receptores de células fagocíticas induzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios relacionados à resposta imune antitumoral. Aflatoxinas são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*. A aflatoxina B1 (AFB1) é a toxina sintetizada mais abundantemente e a que apresenta o maior poder toxigênico, sendo capaz de induzir carcinoma hepatocelular (CHC) em humanos. O objetivo deste estudo foi investigar o papel da lectina ArtinM na hepatocarcinogênese induzida pela AFB1 em ratos. Setenta e dois ratos recém-desmamados foram divididos em três grupos: Controle - animais tratados com veículo; AFB1 - animais intoxicados com AFB1; AFB1+ArtinM - animais tratados com AFB1 e ArtinM. Ratos Wistar foram intoxicados por gavagem com 400 µg de AFB1 por quilograma de ração ingerida durante três meses, enquanto o grupo AFB1+ArtinM recebeu adicionalmente três doses da lectina por via subcutânea (50 µg por quilograma de peso do animal por dose). Animais foram eutanasiados 3 e 12 meses após início dos tratamentos. A expressão hepática de proteínas relacionadas à hepatocarcinogênese foi avaliada por técnicas de imuno-histoquímica, Western blotting e PCR em tempo real nos animais eutanasiados após 3 meses de intoxicação. A incidência de lesões pré-neoplásicas e de tumores hepáticos foi mensurada 3 e 12 meses após início dos tratamentos, respectivamente. Os animais tratados com ArtinM apresentaram maior expressão hepática de proteínas supressoras tumorais além de redução do número de focos pré-neoplásicos e de tumores hepáticos em relação aos animais que receberam apenas a micotoxina. Conclui-se, portanto, que ArtinM possui efeito protetor durante o processo de hepatocarcinogênese induzida por AFB1.

ABSTRACT

ArtinM is a D-mannose carbohydrate-binding lectin that interacts with phagocytic cell receptors inducing the production of pro-inflammatory mediators related to the antitumor immune response. Aflatoxins are mycotoxins produced by fungi of the genus *Aspergillus*. Aflatoxin B1 (AFB1) is the toxin most abundantly synthesized and the one with the highest toxigenic power, being able to induce hepatocellular carcinoma (HCC) in humans. The aim of this study was to investigate the role of ArtinM lectin in AFB1-induced hepatocarcinogenesis in rats. Seventy-two newly weaned rats were divided into three groups: Control - vehicle-treated animals; AFB1 - animals poisoned with AFB1; AFB1 + ArtinM - animals treated with AFB1 and ArtinM. Wistar rats were gavage-poisoned with 400 µg AFB1 per kilogram of ration fed for three months, while the AFB1 + ArtinM group received three subcutaneous doses of the lectin (50 µg per kilogram of animal weight per dose). Animals were euthanized 3 and 12 months after initiation of treatments. Hepatic expression of hepatocarcinogenesis-related proteins was assessed by immunohistochemistry, Western blotting, and real-time PCR in euthanized animals after three months of intoxication. The incidence of pre-neoplastic lesions and liver tumors was measured 3 and 12 months after the start of treatments, respectively. Animals treated with ArtinM had fewer pre-neoplastic foci and hepatic tumors than the animals that receiving mycotoxin alone, as well as showing greater hepatic expression of tumor suppressor proteins. It is concluded, therefore, that ArtinM has a protective effect during the process of hepatocarcinogenesis induced by AFB1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Etiologias e aspectos moleculares relacionados à hepatocarcinogênese.....	20
Figura 2 Metabolismo da AFB1.....	25
Figura 3 Estrutura química da Aflatoxina B1.....	27
Figura 4 Representação da estrutura da lectina ArtinM.....	31
Figura 5 Esquema representativo dos grupos experimentais.....	35
Figura 6 Esquema representativo dos grupos experimentais.....	37
Figura 7 Avaliação dos níveis plasmáticos da enzima ALT.....	42
Figura 8 Fotomicrografias de fígados corados com HE.....	43
Figura 9 Fotografia de tumor hepático e representação gráfica da incidência tumoral.....	44
Figura 10 Fotografia de tumores hepáticos e representação gráfica da média de tumores por animal.....	45
Figura 11 Fotografia de tumor hepático e representação gráfica da média do volume tumoral por animal.....	46
Figura 12 Fotomicrografias com marcação para GSTP.....	47
Figura 13 Fotomicrografias com marcação para p53.....	48
Figura 14 Fotomicrografias com marcação para p27.....	49
Figura 15 Fotomicrografias com marcação para p16.....	50
Figura 16 Análise quantitativa da expressão hepática do RNAm da ciclina D1.....	51
Figura 17 Análise quantitativa da expressão hepática do RNAm pRb.....	51
Figura 18 Análise quantitativa da expressão hepática do RNAm da proibitina.....	52
Figura 19 Fotomicrografias representativa de Western blot da proteína pbt Análise densitométrica por Western Blot de PBT.....	52
Figura 20 Consumo médio diário de ração.....	75

Figura 21 Formulário para a realização quantificação de ração ingerida pelos animais.....76

LISTA DE ABREVIATURAS

AFB1.....Aflatoxina B1

AFBO.....AFB-8,9-epóxido

CDK Quinase ciclina dependente (do inglês “*Cyclin-dependent kinase*”)

CHC Carcinoma hepatocelular

CDKI Inibidor das proteínas CDKs (do inglês “*cyclin dependent kinase inhibitor*”)

CRDs Domínio de reconhecimento dos carboidratos

GSTP Glutathione-s-transferase placentária

IFN- γ Interferon gama

IL Interleucina

IP Intraperitoneal

LTB₄ Leucotrieno B4

NF κ B Fator Nuclear Kappa b (do inglês “*nuclear factor kappa b*”)

PBT Proibitina

Rb Retinoblastoma

TNF- α Fator de Necrose Tumoral α

VHB Vírus da hepatite B

VHC Vírus da hepatite C

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	14
1.1.1 Epidemiologia.....	16
1.1.2 Aspectos Moleculares.....	17
1.2 AFLATOXINAS.....	21
1.2.1 Metabolização da AFB1.....	23
1.2.2 AFB1, alterações genéticas e hepatocarcinogênese.....	26
1.3 LECTINAS.....	28
1.3.1 Lectina ArtinM (Artocarpina ou KM+)	29
2 JUSTIFICATIVA.....	32
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	34
4.2 ANIMAIS.....	34
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	36
4.4 OBTENÇÃO DA AFB1.....	38
4.5 OBTENÇÃO DA ARTINM.....	38
4.6 PARÂMETROS AVALIADOS.....	39
4.6.1 Bioquímica sérica, Histopatologia e Imunohistoquímica.....	39
4.6.2 Western Blotting.....	40
4.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real.....	40
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 AVALIAÇÃO DO DANO HEPATOCELULAR.....	42
5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO.....	43
5.3 INCIDÊNCIA DE TUMORES HEPÁTICOS.....	44
5.4 INCIDENCIA DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS.....	47
5.5 EXPRESSÃO HEPÁTICA DE P53.....	48
5.6 EXPRESSÃO HEPÁTICA DE P27.....	49

5.7 EXPRESSÃO HEPÁTICA DE P16.....	50
5.8 EXPRESSÃO HEPÁTICA DE CICLINA D1.....	51
5.9 EXPRESSÃO HEPÁTICA DE RB.....	51
5.10 EXPRESSÃO HEPÁTICA DE PROIBITINA.....	52
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICES.....	75
ANEXO.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR

Carcinoma hepatocelular (CHC) ou hepatocarcinoma é a neoplasia constituída pelas principais células do fígado, os hepatócitos, sendo responsável por cerca de 90% dos tumores malignos primários deste órgão (NIU; NIU; WANG, 2015; YANG; ROBERTS, 2010). Por ser bastante agressivo, verifica-se que a taxa de mortalidade atinge valores significativos com sobrevida máxima de 5% em 5 anos, e que o CHC responde por cerca de 4% das mortes por câncer anualmente no Brasil (GOMES et al., 2013; JEANNOT et al., 2012).

O desenvolvimento do CHC está relacionado a diversas afecções crônicas que podem gerar no fígado respostas como: inflamação, estresse oxidativo, necrose e mutações que culminam em lesões no DNA dos hepatócitos e por conseguinte acarretam uma proliferação celular desregulada favorecendo a hepatocarcinogênese (TAO et al., 2016).

A maior ocorrência de CHC está associada à presença de algum grau de hepatopatia crônica em até 90% dos casos, traduzindo-se em importante causa de óbito em pacientes cirróticos (GOMES et al., 2013; YANG; ROBERTS, 2010). Os principais fatores que lesam o fígado cronicamente e que estão descritos na literatura como causais do CHC são: vírus da hepatite B (VHB), vírus da hepatite C (VHC), etilismo, doença gordurosa não alcoólica, algumas doenças metabólicas, como a deficiência de α 1-antitripsina, e o consumo de aflatoxinas (ALVES et al., 2011; LÉVY et al., 2002; LLOVET et al., 2016; TAO et al., 2016).

Dentre estes fatores, sabe-se que os vírus de Hepatite B e C isoladamente podem desenvolver cirrose, falência hepática e indução de tumores, e que a ingestão de alimentos contaminados por AFB1 também pode originar carcinoma hepatocelular; porém, estudos recentes tem observado que há sinergismo entre estes agentes carcinogênicos (AYDIN et al., 2015; JEANNOT et al., 2012; MOUDGIL et al., 2013).

No Brasil, o processo de carcinogênese relacionada ao CHC apresenta, em 72% dos casos, associação com cirrose hepática avançada e discute-se a

possibilidade de que a incidência de CHC em fígados não cirróticos esteja relacionada à exposição crônica a micotoxinas como a AFB1 (GONÇALVES et al., 1997).

Na tentativa de mimetizar o CHC em humanos, pesquisadores utilizam diversos modelos experimentais de lesão hepática que resultam cronicamente em CHC. A AFB1 é considerada um dos agentes químicos mais empregados como hepatocarcinógeno, juntamente com a tiocetamida, o tetracloreto de carbono e a dieta deficiente em colina (HEINDRYCKX; COLLE; VAN VLIERBERGHE, 2009).

O processo de carcinogênese envolve várias etapas, sendo que a carcinogênese química pode ser dividida didaticamente em três estágios: iniciação, promoção e progressão. A iniciação é considerada a primeira etapa, e consiste na exposição da célula ao agente iniciador ou carcinógeno, induzindo mutações no DNA que podem ou não ser reversíveis (VINCENT; GATENBY, 2008; STRICKER; KUMAR, 2010).

Na segunda etapa, as células se encontram geneticamente alteradas e os agentes promotores são capazes, então, de induzir a formação de tumores de forma lenta e gradual por meio de um longo período de tempo de exposição a esses agentes. Entretanto, na fase de promoção, o tumor ainda não é clinicamente identificável. Alguns carcinógenos têm a capacidade de atuar tanto como agentes iniciadores, quanto como promotores (VINCENT; GATENBY, 2008; STRICKER; KUMAR, 2010).

Após o passo de promoção, o crescimento do tumor é eventualmente restrito pela limitação do substrato. O último estágio, denominado progressão, é caracterizado pela proliferação desregulada das células alteradas, sendo que nessa etapa o câncer já encontra-se instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (VINCENT; GATENBY, 2008; STRICKER; KUMAR, 2010).

Uma das formas de se avaliar a efetividade da técnica utilizada para hepatocarcinogênese é a evidência da presença do tumor visível macroscopicamente, entretanto o aparecimento do tumor demanda experimentos mais duradouros. Visto que os tumores são precedidos pela formação de focos de hepatócitos alterados (FHA), em estudos de curta duração pode-se identificar o aparecimento de lesões pré-neoplásicas por meio

da imunomarcção da forma placentária da enzima glutathione S transferase (GST-P). Glutathione S Transferases (GSTs) pertencem a uma super família de enzimas que têm importante papel na detoxificação de substâncias tóxicas ou carcinógenas, como por exemplo a AFB1, tornando-as menos tóxicas e favorecendo sua excreção (HIRUMA et al., 1996; LI et al., 2012).

Por este motivo, GST-P é reconhecido como um marcador pré-neoplásico específico e confiável na carcinogênese hepática (TATEMATSU et al. 1985; KELLY 2000; PERRA et al., 2008).

1.1.1 Epidemiologia

Sabe-se que a maior prevalência de CHC ocorre na Ásia, responsável por 70% da incidência mundial, sendo a infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) a principal etiologia (ASHTARI et al., 2015). No mundo, o CHC representa a segunda maior causa de morte por câncer por ano, além de ser o sexto tipo de neoplasia com maior incidência, correspondendo ao 7º e ao 9º tipo mais comum de câncer em homens e mulheres, respectivamente (CHARNI et al., 2014; PEZ et al., 2013; TAO et al., 2016; WHO, 2002).

Apesar de nas últimas décadas ter ocorrido redução nos índices de mortalidade relacionados ao CHC em partes da Ásia e da Europa, indicadores desfavoráveis foram obtidos na América Latina e nas regiões norte e central europeias devido a taxa de mortalidade decorrente dessa neoplasia (BERTUCCIO et al., 2017).

Em termos nacionais, o CHC não está incluído ainda entre os dez tipos de câncer mais comuns, provavelmente por haver algum grau de subnotificação, porém responde por cerca de 4% das mortes por câncer (GOMES et al., 2013; YANG; ROBERTS, 2010). Estima-se uma incidência média nacional de um caso de CHC para 100.000 habitantes por ano. Essa incidência é maior nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste do que na região Sul (GOMES et al., 2013; PIMENTA; MASSABKI, 2010). Estudo brasileiro revelou o perfil dos pacientes portadores de CHC: num total de 1450 casos, foi observada cirrose em 98%, média de idade de 59 anos, predominância do sexo masculino (78%), secundário a hepatite C em 54% dos casos, hepatite B em 16% e etilismo em 14% (CARRILHO et al., 2010).

1.1.2 Aspectos Moleculares

A hepatocarcinogênese parece ser um processo multifatorial no qual estímulos extrínsecos induzem alterações gênicas em hepatócitos maduros, conduzindo-os à morte celular ou à sucessiva proliferação com produção de populações monoclonais. Essas alterações incluem mutações, translocações, amplificação ou perda de cromossomos, que podem resultar na ativação de oncogenes e na perda ou diminuição da atividade dos genes supressores tumorais transformando células híginas em células malignas (FUJIMORI, 1991).

Evidências sugerem que a hepatocarcinogênese pode se iniciar pelo acúmulo de alterações genéticas e surgimento de novas mutações em lesões pré-neoplásicas, como nos casos dos macronódulos regenerativos e dos nódulos hepáticos com displasia de baixo ou alto grau (THEISE; PARK; KOJIRO, 2002; THOMAS, 2014).

As principais alterações e mutações no CHC abrangem diferentes grupos que foram classificados e subdivididos didaticamente, por Shiraha e colaboradores (2013) em: i) supressores tumorais, que compreendem genes como o p53 e o retinoblastoma (Rb); ii) oncogenes, como myc e K-ras, iii) reativação das vias Wnt e *Hedgehog*, e iv) fatores de crescimento e seus receptores (Figura 1).

Sob o ponto de vista molecular, muitos dos desarranjos moleculares encontrados no CHC podem ser atribuídos à cirrose hepática e à atividade inflamatória, e outras são inerentes aos nódulos displásicos e ao próprio CHC. Nos estágios precoces das hepatites crônicas foram detectadas significativas modificações na expressão de fatores de crescimento, de proteases e de metaloproteinases, além de mutações somáticas, redução de apoptose e aumento na expressão de oncogenes e de fatores transcricionais. 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 (FAUSTO; WEBER, 1993; COLEMAN, 2003).

Sabe-se que danos ao DNA, estresse oxidativo e hipóxia podem ativar o gene supressor tumoral p53, e que após essa ativação, p53 é capaz de desencadear eventos biológicos como apoptose, interrupção do ciclo celular,

senescência, autofagia, reparo do DNA e diferenciação celular. Autores sugerem que, na resposta aguda, p53 pode eliminar células precursoras de tumores enquanto que, a longo prazo, essa cascata de eventos biológicos pode gerar maior susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer hepático (CHARNI et al., 2014). Já está bem estabelecido em humanos que a exposição crônica à AFB1 pode induzir mutação no gene p53, favorecendo o aparecimento do CHC (AGUILAR, HUSSAIN, CERUTTI, 1993; MCMAHON et al., 1990). Essa mutação ocorre após biotransformação da AFB1 em AFB-8,9-epóxido (AFBO), o qual se interage ao DNA induzindo substituição de G:C para T:A no códon 249 do gene p53 (de OLIVEIRA; GERMANO, 1997; HAMID et al., 2013; KENSLER et al., 2011; VILLAR et al., 2012).

Além disso, alterações no gene p53 são as mais frequentes mutações gênicas em humanos, tanto na fase de iniciação quanto na fase de progressão para o CHC. A superexpressão do p53 é considerada fator de risco para que o CHC seja mais indiferenciado, agressivo e com invasão microvascular e da veia porta (NIU; NIU; WANG, 2015).

O p53 pode estar relacionado a outro gene supressor tumoral, a proibitina (PBT), cuja composição se dá por duas proteínas homólogas, a proibitina 1 (PBT1) e a proibitina 2 (PBT2). A PBT1 é uma proteína preservada em variadas espécies e exibe função antiproliferativa. A PBT1 e a PBT2 podem se associar formando um complexo de alto peso molecular, denominado complexo PBT (FUSARO et al., 2003; NIJTMANS et al., 2000). Como normalmente a PBT1 e a PBT2 encontram-se associadas e o papel da PBT2 é apenas complementar, a maioria dos autores reporta-se à PBT1 ou PBT1 ligada à PBT2 utilizando apenas o termo PBT (THEISS; SITARAMAN, 2011).

Estudos têm demonstrado que a PBT é capaz de modular as vias do p53 e do Rb, associando-se a essas proteínas e induzindo alterações em fatores de transcrição, como por exemplo, atuando na inibição da atividade de E2F, resultando na paralisação do ciclo celular e na indução de apoptose (FUSARO et al., 2003; SÁNCHEZ-QUILES et al., 2010). A ação supressora tumoral da PBT foi associada a sua expressão nuclear em células neoplásicas de diversos tumores (FUSARO et al., 2003; WANG et al., 2002).

Atuando como supressor tumoral, PBT reduz, ainda, a translocação nuclear do Fator Nuclear Kappa b (NFkB, do inglês “*nuclear factor kappa b*”)

mediada pelo Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) (THEISS et al., 2009). Além disso, foi observada interação da PBT à membrana mitocondrial interna, onde está envolvida na estabilização de proteínas mitocondriais com a função de redutora do estresse oxidativo (NIJTMANS et al., 2002), principalmente na fase crônica de diversas doenças (THEISS et al., 2009). A deficiência de PBT em hepatócitos de camundongos levou ao desenvolvimento de CHC em oito meses, além de fibrose e lesões resultantes de estresse oxidativo (KO et al., 2010).

Além dos genes p53 e PBT, o CHC é caracterizado por uma considerável perda de heterozigose e inúmeras mutações em genes críticos, como Rb, APC, DLC-1 (deletado no câncer hepático), GSTP1, PTEN, IGF-2, β -catenina, c-myc, e ciclina D1 (FUJIMORI et al., 1991; TORRECILLA, LLOVET, 2015; TSUDA et al., 1992; ZHANG et al., 2006) (Figura 1).

Alterações na atividade das ciclinas (proteínas do ciclo celular) em células transformadas contribuem para acelerar a progressão do ciclo celular. Devido ao fato do ciclo celular ser controlado por enzimas quinase ciclina-dependentes (CDKs-em inglês), estas, quando ativadas pelas ciclinas, promovem a progressão da célula no ciclo celular, enquanto que os inibidores de CDKs (CDKIs), como *p27^{KIP1}* e *p16^{INK4A}*, restringem a evolução do ciclo celular e consequentemente a proliferação celular por meio da inibição dos complexos ciclina/CDKs (PESTELL et al., 2000; SHERR, 1996) (Figura 1).

A expressão aberrante, tanto de CDKs quanto dos CDKIs, tem um importante papel no desenvolvimento do CHC. Acredita-se que a inativação do p16 e do supressor tumoral Rb no CHC esteja diretamente relacionada com a hepatocarcinogênese humana, e que a superexpressão da ciclina D1 seja capaz de proporcionar a inativação destes genes além de favorecer o crescimento tumoral (AZECHI et al., 2001; TORRECILLA, LLOVET, 2015).

O *p27^{KIP1}* é o inibidor de CDK mais extensamente estudado no que diz respeito ao seu papel na evolução do câncer humano, sendo superexpresso nas células não proliferantes. p27 é capaz de desempenhar importante papel na regulação da quiescência e na progressão da fase G1 do ciclo celular, e sua perda favorece a indução e o crescimento de tumores hepáticos (ITO et al., 2001; QIU et al., 2016).

Figura 1: Etiologias e aspectos moleculares relacionados à hepatocarcinogênese. Fatores como aflatoxinas, VHB e VHC além de outros agentes carcinógenos induzem a ocorrência de mutações no DNA, a inativação de genes supressores tumorais e ativação de oncogenes. Modificações como estas promovem alterações no ciclo celular dos hepatócitos acompanhadas de aumento da expressão de ciclina D1 e redução da expressão ou da atividade de ICDKs que culminam na formação do CHC.

1.2 Aflatoxinas

Aflatoxinas são micotoxinas produzidas naturalmente por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente pelas espécies *A. parasiticus* e *A. flavus*, sendo capazes de contaminar diferentes tipos de grãos e cereais durante a etapa de cultivo, colheita ou armazenamento. Esses fungos são prevalentes e crescem naturalmente em condições ideais de desenvolvimento com umidade relativa por volta de 0.9 e em temperatura ambiente ao redor de 25°C (COTTY; JAIME-GARCIA, 2007; KUCUKCAKAN; HAYRULAI-MUSLIU, 2015; PEROMINGO et al., 2016; SACRAMENTO, 2016).

Há, atualmente, mais de 20 compostos similares designados como aflatoxinas. Os principais tipos de interesse médico-sanitário são as aflatoxinas B₁ e B₂ (AFB₁ e AFB₂), e G₁ e G₂ (CREPPY, 2002; KUMAR et al., 2017; SCAGLIONI et al., 2014). As aflatoxinas M₁ e M₂ são metabolitos de AFB₁ e AFB₂, e podem ser isolados do leite e da urina de animais que ingeriram alimentos contaminados. A AFB₁ é a aflatoxina mais abundantemente encontrada em cereais e é a que apresenta maior poder toxigênico (CREPPY, 2002; KUMAR et al., 2017; SCAGLIONI et al., 2014).

A denominação das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ derivam da cor da fluorescência que elas liberam na luz ultravioleta: B devido a coloração azul (*blue*) e G devido a coloração esverdeada (*green*). Esta identificação facilitou a monitorização da contaminação de alimentos por essas micotoxinas a partir da década de 60 (KENSLE et al., 2011). Acredita-se que as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ têm a capacidade de intoxicar os animais e os seres humanos por meio do contato com a pele e mucosas, além da contaminação por inalação (KUMAR et al., 2017).

Uma meta análise de 479 artigos desenvolvidos na China, em Taiwan ou na África subsaariana aponta que a diminuição dos limites detectáveis de aflatoxina resultou na redução da incidência de CHC em até 19% na população em geral, e até 29% na população HBsAg-positiva (LIU et al., 2012). Espera-se, então, uma mudança no quadro epidemiológico do CHC nesses países grandes consumidores de cereais que têm buscado melhoria das práticas agrícolas (GOH; CHANG; TAN, 2015).

Apesar da prevalência de CHC no Brasil não ser superior à dos países Asiáticos, é um país que também apresenta plenas condições para o desenvolvimento desses fungos devido ao clima tropical. 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 como o *Aspergillus flavus* (GONÇALEZ et al., 2013; SABINO et al., 1989).

Em pesquisas nacionais que verificaram o índice de contaminação dos alimentos por micotoxinas, foram observados altos índices de aflatoxinas no amendoim e em outros cereais, além de contaminação indireta no leite (MAZIERO, BERSOT, 2010). No Brasil, o limite estipulado para consumo humano é de 20 µg de aflatoxina por quilograma de cereal, como amendoim, milho e derivados (BRASIL, 2011).

Estudo realizado no interior do Estado de São Paulo avaliou 75 amostras de amendoins e seus derivados provenientes de estabelecimentos comerciais, e obteve uma frequência de contaminação por aflatoxinas acima dos níveis permitidos em 12 amostras (16%) (SILVA et al., 2013). Em outro estudo, os pesquisadores analisaram 42 amostras de amendoim, e obtiveram 22 amostras (52,4%) contaminadas por aflatoxinas acima dos níveis aceitáveis (BOTREL et al., 2011).

O consumo dos alimentos contaminados por aflatoxina pode acarretar uma série de danos à saúde humana, sendo as consequências clínicas denominadas aflatoxicose (SACRAMENTO, 2016). Os principais sintomas relacionados à aflatoxicose são desnutrição, vômito, dor abdominal, edema pulmonar, imunossupressão, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e efeitos carcinogênicos (KENSLER et al, 2011; KUMAR et al., 2017; WU, GROOPMAN, PESTKA, 2014).

Dentre todos os órgãos acometidos pela aflatoxicose, o fígado é um dos mais agredidos pelo fato de ser a víscera responsável pela biotransformação das aflatoxinas. Desta forma, a exposição às aflatoxinas, mesmo no curto prazo, já é capaz de induzir esteatose, hemorragias, hiperplasia biliar e necrose hepática (KUMAR et al., 2015; SACRAMENTO, 2016).

A severidade das lesões provocadas pela toxicidade da AFB1 varia conforme diversos fatores como idade, sexo, tempo de exposição e estado

nutricional (FASSBINDER, 2010), sendo a carcinogênese hepática a principal consequência da toxicidade crônica (BUSBY; WOGAN, 1984; SACRAMENTO, 2016). Adicionalmente, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), em 1987, classificou a AFB1 como pertencente à Classe 1 de carcinógenos (KUCUKCAKAN; HAYRULAI-MUSLIU, 2015; ROTHSCCHILD, 1992).

1.2.1 Metabolização da AFB1

Após a ingestão oral, cerca de 50% da aflatoxina é eficientemente absorvida no intestino delgado, sendo transportada até o fígado pelo sistema portal, onde passa por processo de biotransformação. Nos hepatócitos, as aflatoxinas atingem grandes concentrações devido à elevada permeabilidade da membrana celular, sendo excretadas pelas vias urinária e fecal (SACRAMENTO, 2016; WILSON et al., 1985; MACHINSKI, 2008; FASSBINDER, 2010).

No fígado, a AFB1 é metabolizada por reações de oxidação, hidroxilação e redução. A família do citocromo P450 é capaz de hidroxilar AFB1 em aflatoxina M₁ (AFM₁) e aflatoxina Q₁ (AFQ₁) e demetilar AFB1 em aflatoxina P₁ (AFP₁). Na sequência, esses metabólitos são excretados e geralmente não são considerados tóxicos. Entretanto, 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 (de OLIVEIRA; GERMANO, 1997; WILD; TURNER, 2002; HAMID et al., 2013).

As enzimas da família citocromo P450 (CYP), CYP1A2 e CYP3A4 podem oxidar AFB1 diretamente em AFBO, que é uma forma ativa do metabólito e que pode seguir três diferentes vias: (i) ligar covalentemente ao DNA formando a aflatoxina AFB₁-N⁷-guanina (forma cancerígena); (ii) ser metabolizada em AFB1-8,9-dihidrodiol (AFB1—diol) e posteriormente se ligar a albumina (tóxica, encontrada no sangue) ou formar AFB1-diálcool (excretada); (iii) ser detoxificada pela glutathione-s-transferase e ser posteriormente excretada (KENSLE et al., 2011).

A correlação entre os níveis de AFB₁-N⁷-guanina e a incidência de tumor hepático foi primeiramente estabelecida em experimentos com animais (GROOPMAN et al., 1992a), e posteriormente validados em estudos

epidemiológicos, tornando viável sua abordagem em amplos estudos populacionais (GROOPMAN et al., 1992b; GROOPMAN et al., 1992c).

Em um projeto com mais de 18.000 pessoas foi verificada a associação entre os biomarcadores de aflatoxina com o desenvolvimento de CHC, mostrando elevação significativa no risco de desenvolvimento de CHC quando os biomarcadores de aflatoxina foram detectados na urina, principalmente em pacientes portadores do VHB. Dessa forma, a presença na urina de AFB₁-N⁷-guanina, aduto da AFB₁, resulta em maior risco em desenvolver o CHC (ROSS et al., 1992; QIAN et al., 1994).

Em relação ao AFB₁-lisina, verificou-se a presença deste aduto em amostras de soro de 42 indivíduos, e esta identificação foi correlacionada positivamente com a ingestão de AFB₁ e a excreção de AFM₁ na urina. Estimou-se que de 1,4 a 2,3% da AFB₁ ingerida esteja covalentemente ligada à albumina (GAN et al., 1988).

Adicionalmente, as aflatoxinas possuem efeitos imunotóxicos que podem ser verificados por meio da inibição da produção de TNF- α , interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), e estimulação da produção de superóxidos por macrófagos ativados (FERREIRA et al., 2006).

Figura 2: Metabolismo da AFB1. AFB1 após ser absorvida no fígado pode ser metabolizada em AFM1, AFQ1 E AFB1. Quando inativos, são excretados na urina, nas fezes ou no leite. AFM1 pode se ligar ao DNA e formar um aduto conhecido como AFB1-M7-guanina. Uma segunda via para AFB1 é sua epoxidação em AFB1-8,9-epóxido (AFBO). AFB1-8,9-epóxido (AFBO) pode ser detoxificado pela família GST e ser excretada ou pode permanecer na forma ativa e se ligar ao DNA gerando mutações e induzindo o CHC. AFB1-8,9-epóxido (AFBO) pode ainda, se transformar em AFB1-diol que será metabolizado em AFB1-diálcool ou AFB1-lisina encontrados na urina e nas fezes e no sangue, respectivamente. Adaptação (tradução) dos artigos: de OLIVEIRA; GERMANO, 1997; WILD; TURNER, 2002; KENSLER et al., 2011; HAMID et al., 2013.

1.2.2 AFB1, alterações genéticas e hepatocarcinogênese

A agressão à saúde humana de maior relevância advinda da ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas é a formação do CHC (de OLIVEIRA, GERMANO, 1997; FERREIRA, 2006). Embora seja o fígado o alvo primário da carcinogênese induzida pela AFB1, estudos realizados em animais demonstraram que órgãos como rins, pulmão e intestino podem também desenvolver tumores secundários à exposição de aflatoxinas (de OLIVEIRA, 1997; KENSLER et al., 2011; MATSUDA, 2013; MULDER, 2014; KIM et al., 2016).

Evidências sugerem que AFB1, ainda que em pequenas concentrações, possui potencial mutagênico importante em indivíduos cronicamente expostos, e que é possível a identificação precoce da mutação no códon 249 do gene p53 (GURSOY-YUZUGULLU, 2011).

Além disso, foi possível observar a mutação clássica AGG-AGT (R249S) do p53 nos estudos relacionados à AFB1, tanto em pacientes com CHC e sorologia positiva para o VHB, quanto em pacientes com CHC negativos para o VHB (CHITTMITRAPAP et al., 2013). O sinergismo da infecção crônica pelo VHB e a carcinogênese relacionada à AFB1 pode ocorrer porque o VHB estimula, via citocromo P450, a metabolização de AFB1 (inativo) em AFB1-8,9-epóxido (tóxico), além do fato da infecção crônica pelo VHB gerar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, aumentando a susceptibilidade do p53 a mutações pela AFB1 (KEW, 2003).

Hussain e colaboradores (2007) demonstraram relação direta entre consumo de AFB1 e alterações no p53 em casos de CHC. Adicionalmente, o tratamento com AFB1 induz hiperexpressão da proteína p53 visando manter as células latentes na fase S e favorecendo os mecanismos de reparo do DNA. (KIM et al., 2016). Embora a via do p53 desempenhe importante papel na patogênese do CHC na vigência de cirrose, as alterações nos genes reguladores de ciclo celular, como p27^{Kip1}, estão mais envolvidos nos casos de CHC não relacionados à cirrose, os quais poderiam ser, ao menos em parte, atribuídos à intoxicação por aflatoxina (TRETIAKOVA et al., 2010).

Desta forma, outras alterações moleculares no gene p27 também devem ser verificadas em indivíduos expostos à aflatoxina. Além disso, o Rb, outro

gene importante no controle do ciclo celular, foi associado à hepatocarcinogênese induzida pela AFB1. Estudo desenvolvido com ratos que receberam AFB1 e apresentaram deleção do gene Rb exibiam proliferação aberrante de hepatócitos a curto prazo. A longo prazo, os animais com deleção de Rb apresentaram-se mais susceptíveis à tumorigênese induzida por AFB1 por meio da indução de uma via proliferativa “não canônica” (REED et al., 2009).

Estudo experimental desenvolvido com ratos intoxicados por AFB1 demonstrou que AFB1 é capaz de interferir no sistema imune induzindo redução de linfócitos T CD8⁺ e de células “natural killer” (NK), e inibição da expressão de interleucina 4, interferon-gama (IFN- γ) e do *TNF- α* . Além disso, os autores desse estudo apontam que, diferentemente da imunossupressão gerada agudamente, a exposição prolongada a AFB1 pode resultar na estimulação de genes e citocinas pró-inflamatórias e pró-apoptóticas (QIAN et al., 2014).

Figura 3: Estrutura química da Aflatoxina B1. Adaptada do artigo JIANG et al., 2015.

1.3 LECTINAS

Lectina, do latim *legere*, significa selecionar, e se refere à capacidade que algumas proteínas têm de se ligar a carboidratos e aglutinar eritrócitos de um grupo sanguíneo específico. Porém, o conceito atual considera como lectina toda proteína de origem não imune que possui pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar e reconhecer, de forma reversível, a parte glicana de um carboidrato específico sem alterar sua estrutura covalente (GOLDSTEIN et al., 1980; HAJTÓ et al, 2005; PNEUMANS; VAN DAMME, 1995).

As lectinas foram descobertas há mais de cem anos. Em 1888, Stillmark foi o primeiro cientista a extrair uma lectina de sementes de castor tree (*Ricinus communis*), e desde então as lectinas tem sido extraídas de plantas e animais para serem estudadas (GORAKSHAKAR; GHOSH, 2016; SHARON; LIS, 2004).

Ao se interagir à porção glicana das glicoproteínas, glicolípídeos, oligo e polissacarídeos, as lectinas atuam como mediadores na transferência de informação e desenvolvimento de diversas atividades biológicas (HAJTÓ et al, 2005; NILSSON, 2007). Essa capacidade de interação a carboidratos torna as lectinas importantes proteínas em pesquisas que almejam investigar tipos específicos de carboidratos e isolar e caracterizar glicoproteínas (PRANCHEVICIUS, 2012).

As lectinas estão amplamente presentes nos seres vivos e, por meio de sua capacidade de ligação a carboidratos, favorecem processos biológicos como o reconhecimento célula-célula e a migração celular (VAN DAMME et al., 1998).

Algumas lectinas possuem capacidade imunomodulatória, e têm sido consideradas como importantes no tratamento contra agentes infecciosos. Segundo Souza e colaboradores (2013), a lectina ArtinM, por exemplo, possui capacidade imunomodulatória por meio da indução de citocinas da resposta imune Th1 (COLTRI et al., 2008; SOUZA et al., 2013). Nas décadas de 1980-90, pesquisadores isolaram proteínas de mamíferos que se ligam a manose, denominadas MBL (lectina ligadora de manose do inglês *mannose binding lectin*), e descobriram que estas proteínas possuíam capacidade de se ligar a

C1q, e ativar C1r e C1s do sistema complemento (LU et al., 1990; SIM; SCHWAEBLE; FUJITA, 2016).

1.3.1 Lectina ArtinM (Artocarpina ou KM⁺)

Duas lectinas foram extraídas de sementes de *Artocarpus integrifolia* (jaqueira): a jacalina (ROQUE-BARREIRA et al., 1986) e o ArtinM, anteriormente conhecido como Artocarpina ou KM⁺ (MIRANDA-SANTOS et al., 1991).

ArtinM é uma lectina minoritária (apenas 0,5% das proteínas totais do extrato salino de sementes), composta por uma única cadeia polipeptídica contendo 149 resíduos de aminoácidos formando uma estrutura tetramétrica capaz de se ligar seletivamente aos monossacarídeos alfa-D-manose, alfa-D-glucose e alfa-manosidase, desencadeando relevante efeito biológico sem alterar sua estrutura (SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994; ROSA et al., 1999).

Nas últimas décadas, pesquisadores têm estudado a capacidade imunomodulatória e reconstrutiva da lectina ArtinM *in vitro* e *in vivo* (BRAZ et al., 2016; CECÍLIO et al., 2016; CHAHUD et al. 2009; RICCI-AZEVEDO et al., 2016; TOLEDO et al., 2009).

Como estimulador da resposta imune inata, ArtinM é capaz de induzir a ativação e a degranulação de mastócitos sem depender da IgE, provocando a liberação dos mediadores inflamatórios contidos nos grânulos. Tal propriedade é atribuída à sua interação a glicanas do receptor de IgE expresso na superfície celular (MORENO et al., 2003).

Verificou-se que a degranulação de mastócitos induzida por ArtinM resulta em amplificação de sua propriedade de induzir inflamação aguda. A constatação de que a interação de ArtinM às glicanas da superfície de neutrófilos e mastócitos era capaz de desencadear respostas dependentes de sinalização celular levou à hipótese de que a lectina pudesse ativar outras células da resposta imune (MORENO et al., 2003). Sob o estímulo de ArtinM, macrófagos e células dendríticas murinas podem secretar grandes quantidades de IFN- γ , uma importante citocina da resposta imune antitumoral. Demonstrou-se que tal resposta foi induzida pela interleucina 12 (IL-12) produzida em

elevadas concentrações em virtude da interação de ArtinM à superfície de macrófagos esplênicos (COLTRI et al., 2008; GANIKO et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2006).

A produção de IL-12 e consequente indução, proliferação e diferenciação de linfócitos T e produção de citocinas Th1, como IFN- γ , ocorrem quando ArtinM é reconhecida por receptores *Tool-like* tipo 2 (TLR2) associados à molécula MyD88 (molécula de diferenciação primária do gene 88) localizados em macrófagos (COLTRI et al., 2008).

Adicionalmente, ArtinM é capaz de recrutar neutrófilos por meio do mecanismo de haptotaxia estimulando a fagocitose, a produção do ânion superóxido e a secreção do leucotrieno B4 (LTB₄) por estes fagócitos (SOUZA et al., 2013; TOLEDO et al., 2009). Haptotaxia é o movimento no qual a célula, seguindo princípios de orientação mecânica e química, migra ao longo de um gradiente por aderência, podendo ser mobilizada por gradientes locais de adesão ou por moléculas ligadas a um substrato, como citocinas (CARTER, 1967; HAEGER, 2015).

ArtinM possui ainda a capacidade de ativar neutrófilos, estimulando sua habilidade de fagocitar e eliminar patógenos por meio da interação com o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRDs) (TOLEDO et al., 2009). Ricci-Azevedo e colaboradores (2016), após observarem que ArtinM incrementou a habilidade dos neutrófilos de eliminar *Leishmania sp*, sugeriram que ArtinM pode auxiliar na resposta inata à infecções por meio da degranulação de macrófagos e do estímulo à atividade fagocítica de neutrófilos.

ArtinM é também capaz de induzir linfócitos TCD+ a produzirem IL-17 por meio de duas principais formas: (i) estímulo à produção de IL-23 e IL-1 por células apresentadoras de antígenos (APCs) e (ii) por meio do reconhecimento direto de N-glicanas por ArtinM, cuja interação induz secreção de IL-17 independentemente de IL-23 e IL-1 (da SILVA et al., 2016).

Adicionalmente, ArtinM parece ser capaz de acelerar o processo de cicatrização e regeneração de epitélios por aumentar a migração local de neutrófilos (CHAHUD et al., 2009).

Considerando que a obtenção de ArtinM em sua forma nativa (n-ArtinM) é trabalhosa e despense custo elevado, foram desenvolvidas formas

recombinantes dessa lectina utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ou *Escherichia coli* system e que, similarmente, é capaz de estimular a resposta do tipo Th1, induzindo a migração e degranulação de neutrófilos, degranulação de mastócitos, produção de IL-10 e IL-12, demonstrando efeitos profiláticos e terapêuticos (BARBOSA-LORENZI et al., 2016; CECÍLIO et al., 2016; COLTRI et al., 2008; da SILVA et al., 2014). Devido ao fato de ArtinM recombinante possuir habilidades semelhantes em relação à capacidade de ligação a glicanos, neste estudo optou-se por empregar o termo ArtinM para ambas as formas.

Figura 4: Representação da estrutura tridimensional da lectina ArtinM com sítios de ligações terminais. Figura adaptada do artigo Rosa et al. 1999.

2 JUSTIFICATIVA

Dado o alto índice de contaminação de produtos alimentícios pela AFB1 no Brasil bem como a elevada prevalência local de carcinoma hepatocelular, muitos deles sem relação etiológica precisa, torna-se evidente a importância de se identificar substâncias capazes de proteger o fígado contra agentes indutores de carcinoma hepatocelular/. Além disso, não há estudos que tenham verificado o papel da lectina ArtinM na carcinogênese hepática induzida pela AFB1.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da lectina ArtinM na hepatocarcinogênese induzida por Aflatoxina B1 em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Verificar os efeitos da ingestão de AFB1 e da administração da lectina ArtinM na expressão hepática de proteínas relacionadas à progressão do ciclo celular (ciclina D1, p16 e p27);

b) Identificar a expressão de proteínas supressoras tumorais (p53, PBT, Rb) no fígado dos animais intoxicados por AFB1 com ou sem tratamento com ArtinM;

c) Avaliar a gênese de focos de hepatócitos alterados (focos pré-neoplásicos) decorrentes da exposição à AFB1 e o efeito de ArtinM sobre esse processo;

d) Analisar a presença, volume e quantidade de tumores presentes nos animais expostos ao tratamento com AFB1 e AFB1+ArtinM.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Ribeirão Preto – USP, processo Nº 127/2013. Todos os animais foram tratados de acordo com o *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (1985).

4.2 ANIMAIS

Ratos machos Wistar recém-desmamados (n=72), provenientes do Serviço de Biotério do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, em uma sala com ciclo de luz-escuro de 12 horas.

Os ratos foram subdivididos aleatoriamente em três grupos experimentais em dois períodos: subcrônico e crônico (Figura 5). Todos foram alocados em 18 caixas grandes (4 animais em cada) de polipropileno com tampas de aço inoxidável contendo maravalha. Os animais receberam ração padrão para animais de laboratório (Purina Nutrimentos Ltda.) e água potável *ad libitum*. As rações foram analisadas para confirmação da ausência de níveis detectáveis de AFB1. As caixas foram trocadas três vezes por semana. Os animais permaneceram uma semana sem receber nenhum tipo de tratamento experimental (AFB1 e/ou ArtinM) para que pudessem se aclimatar ao biotério do departamento.

Figura 5: Esquema representativo dos grupos experimentais. Apresenta número total de animais por grupo antes e pós mortalidade espontânea.

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Setenta e dois ratos foram aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais durante dois períodos (SUBCRÔNICO e CRÔNICO).

Grupo CONTROLE (n=20): constituído por animais que receberam diariamente 400 µg de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5% v/v (veículo) por quilograma de ração consumida (em solução salina) por via oral (gavagem) durante período de 90 dias (Apêndice);

Grupo AFB1 (n=26): constituído por animais que receberam diariamente, por via oral (gavagem), 400 µg de AFB1 por quilograma de ração consumida durante período de 90 dias (ABDEL-WAHHAB et al., 2010; BERGÈS et al., 2004) (Apêndice);

Grupo AFB1+ArtinM (n=26): idêntico ao tratamento anterior, mas que adicionalmente receberam lectina ArtinM por via subcutânea, em três doses de 50 µg por quilograma de peso do animal, nos dias 45, 60 e 75, considerando o período total de 90 dias de intoxicação por AFB1 (BRAZ et al., 2016).

Após 90 dias de intoxicação por AFB1 (**período SUBCRÔNICO**), 25 ratos pertencentes aos três grupos experimentais foram submetidos à eutanásia por meio de exsanguinação sob anestesia inalatória com isoflurano. Para avaliação da ocorrência de tumores hepáticos secundária à intoxicação por AFB1, 47 ratos foram mantidos por 12 meses após o início do tratamento (**período CRÔNICO**), quando também foram eutanasiados sob anestesia com isoflurano (JEANNOT et al., 2012). Foram colhidas amostras de sangue com armazenamento do plasma a -80°C. Amostras hepáticas foram coletadas e fixadas em formalina tamponada a 10% ou congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Todos os animais foram submetidos a eutanásia por meio de exsanguinação sob anestesia inalatória com isoflurano.

Figura 6: Esquema representativo dos grupos experimentais. Subdivisão dos 51 animais analisados em seus grupos experimentais, respectivos tratamentos, sacrifícios e metodologias empregadas.

4.4 OBTENÇÃO DA AFB1

A AFB1 utilizada neste experimento foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira. Foi produzida no Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, da Universidade de São Paulo (LMMA/FZEA/USP).

Para produção da aflatoxina, utilizaram cepa de *Aspergillus parasiticus* NRRL2999 fornecida pelo “United States Department of Agriculture” (USDA) na forma de pellet, mantido em um tubo com água peptonada estéril por 24 horas em temperatura ambiente. O cultivo dos fungos foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, da Universidade de São Paulo (LMMA/FZEA/USP). As cepas foram cultivadas em arroz, conforme Shotwell e colaboradores (1966) e posteriormente o material de cultura obtido foi homogeneizado e armazenado a -20°C. Para este fim, grãos de arroz foram inoculados com cepa *Aspergillus* em frascos de 1 litro e colocados num agitador a 250 rpm durante sete dias em temperatura ambiente. Depois de uma semana, foi adicionado clorofórmio aos frascos deixando-os em repouso por uma noite para inativar o fungo. O material de cultura foi então, seco, moído, homogeneizado e armazenado a -20°C.

4.5 OBTENÇÃO DA ARTINM

A lectina ArtinM utilizada neste experimento foi produzida no Laboratório Imunoquímica e Glicobiologia, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Universidade de São Paulo (Campus de Ribeirão Preto) e gentilmente cedida pela Profa. Dra. Maria Cristina Roque-Barreira.

A lectina ArtinM foi purificada conforme descrito por SANTOS-DE-OLIVEIRA et al. (1994), sob condições estéreis, diluída em solução salina balanceada, obtendo-se uma solução final com concentração de 50 µg/ml, tamponada e isotônica (pH 7,4).

4.6 PARÂMETROS AVALIADOS

4.6.1 Bioquímica sérica, Histopatologia e Imunohistoquímica

Amostras plasmáticas foram empregadas para dosagem da enzima alanina aminotransferase (ALT) utilizando-se kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, Brasil).

Amostras hepáticas embebidas em parafina foram submetidas a análise histopatológica para avaliação da incidência de focos de hepatócitos alterados (FHAs) e da presença de CHC. Os FHAs correspondem a grupos de hepatócitos apresentando as seguintes características: células com citoplasma abundante, aumento na relação núcleo/citoplasma, nucléolo proeminente, aumento do pleomorfismo nuclear e acúmulo de cromatina (GOODMAN et al, 1994; EVERT et al, 2002).

Cortes histológicos adicionais foram preparados e submetidos a estudo imuno-histoquímico para os seguintes marcadores: **p53** (clone DO-2, diluição 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), **p27^{Kip1}** (SX53G8, 1:100; DAKO, Carpinteria, CA, EUA), **p16^{INK4D}** (clone 1E12E10, diluição 1:100; Santa Cruz Biotechnology) e **glutathione-S-transferase-p1** (GSTP1) (3F2C2, diluição 1:50; Santa Cruz Biotechnology), utilizando o método da avidina-biotina-peroxidase (Vectastain Elite ABC Kit Universal, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA). Fast red foi usada como substrato cromógeno. As lâminas foram contrainformadas em hematoxilina de Harris e montadas com Permount. Como controle negativo, todas as espécimes foram submetidos ao mesmo protocolo, porém omitindo-se o anticorpo primário sob mesmas condições.

A análise da expressão de cada marcador foi realizada de maneira cega considerando-se aleatoriamente 30 campos microscópicos representativos por amostra, com aumento de 200x, exceto a contagem do número de focos que foi realizada no aumento de 10x. As contagens do número de células foram realizadas por meio de sistema morfométrico de contagem de positividade nuclear ou citoplasmática, com auxílio do programa ImageJ.

4.6.2 Western Blotting

As amostras hepáticas estocadas a -80°C foram utilizadas para a análise quantitativa de proteínas por método de Western blotting. Fragmentos de fígado (100mg) foram homogeneizados em 1mL de tampão de lise [20mM EDTA 1%, Triton 0,1%, SDS 10mM, NaF 1mM Na₃VO₄, 10mM glicerofosfato, e inibidor de protease (1 tablete para 10ml de solução tampão, Complete, Roche)] por 30 seg. As suspensões foram incubadas em gelo por 15 min e centrifugadas a 4°C e 15.000g por 20 min para remover os restos celulares. Os sobrenadantes foram conservados a -80°C, e a concentração de proteína mensurada por método colorimétrico de Bradford (Protein Assay, BIO-RAD, Hercules, CA, EUA). A seguir, 70µg de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 10% e transferidas para membrana de PVDF (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ, EUA) utilizando-se equipamento Mini-Protean 3 (BIORAD). Após bloqueio, com solução TBS (pH 7,4) contendo 0,05% Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e 5% de leite desnatado, por uma hora em temperatura ambiente, as membranas foram incubadas com anticorpo primário **anti-proibitina** (Sigma Chemical Co.), sendo a proteína GAPDH utilizada como referência. As bandas foram reveladas por quimioluminescência utilizando-se anticorpos secundários e reagentes ECL Prime (Amersham Biosciences Corp), e detectadas e quantificadas pelo aparelho ImageQuant LAS 4000 GE.

4.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real

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 500ng 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 20µL contendo *primers específicos* para os genes **Rb**,

ciclina D1 e **PBT** (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, e todo o experimento realizado em duplicata para confirmação dos resultados. Todos os dados foram normalizados com a fração GAPDH, e relatados em relação à expressão do grupo Controle (MORENO et al., 2010).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio de um microcomputador equipado com o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, EUA). Todos os dados foram descritos como média $\pm$ erro padrão da média. As comparações estatísticas entre os três grupos experimentais foram realizadas pelo teste não paramétrico de Kruskal–Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn ou Mann–Whitney. Valores de probabilidade menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO DANO HEPATOCELULAR

Para avaliar a presença de lesão hepatocelular, foram mensurados os níveis plasmáticos da enzima alanina aminotransferase (ALT). Os níveis de ALT apresentavam-se significativamente aumentados no grupo AFB1 ($72,06 \pm 4,6$) em relação aos grupos Controle ($48,12 \pm 2,6$) e AFB1+ArtinM ($52,46 \pm 4,7$) ($p < 0,01$) (Figura 7).

Figura 7. Avaliação dos níveis plasmáticos da enzima ALT. Animais tratados por 90 dias e sacrificados em seguida. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.

• $p < 0,01$ AFB1 x Controle

$p < 0,01$ AFB1 x AFB1+ArtinM

5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO

A análise histopatológica do fígado após coloração por hematoxilina-eosina permitiu a identificação de múltiplos focos de hepatócitos alterados (FHAs) nos animais intoxicados por AFB1 durante 90 dias e sacrificados logo em seguida. Nos animais mantidos por 12 meses após início da administração de AFB1 foi possível a identificação de massas tumorais hepáticas correspondentes ao carcinoma hepatocelular.

Figura 8. Fotomicrografias representativas de fígado normal de animal do grupo Controle (A, B); de fígado exibindo foco de hepatócitos alterados de animal do grupo AFB1+ArtinM (C,D); e de fígado apresentando carcinoma hepatocelular de animal do grupo AFB1 (E,F) [coloração com H&E, aumentos originais de 200x (A,C,E) e 400x (B,D,F)].

5.3 INCIDÊNCIA DE TUMORES HEPÁTICOS

Três meses de intoxicação por AFB1 não induziram formação de massas tumorais hepáticas. Entretanto, após 12 meses (período crônico), constatou-se tumores hepáticos nos grupos AFB1 e AFB1+ArtinM. Sete entre 11 animais do grupo AFB1 (63,6%) apresentaram um ou mais tumores hepáticos, e três entre nove animais do grupo AFB1+ArtinM (33,3%) apresentaram lesões tumorais hepáticas ($p < 0,001$) (Figura 9).

Figura 9. Fotografia do fígado de animal tratado com AFL apresentando tumor visível macroscopicamente e representação gráfica da incidência tumoral. (A) Fotografia realizada num primeiro momento enquanto o animal ainda estava vivo, sob anestesia e após a retirada do órgão. (B) Representação gráfica da incidência de lesão tumoral nos diferentes grupos experimentais.

- $p < 0,001$ AFB1 x Controle
- + $p < 0,001$ AFB1+ArtinM x Controle
- # $p < 0,001$ AFB1 x AFB1+ArtinM

Apenas os animais pertencentes ao grupo Controle não exibiram tumores hepáticos. Doze meses após início da intoxicação por AFB1, o número médio de tumores hepáticos por animal no grupo AFB1 foi $2,00 \pm 0,63$, valor aparentemente superior em relação ao grupo AFB1+ArtinM, cujo número médio de tumores hepáticos por animal foi $0,50 \pm 0,38$ ($p=0,08$) (Figura 10).

Figura 10. Fotografias exibindo número variável de tumores por fígado. (A) fígado de animal do grupo Controle; (B) fígado de animal intoxicado com AFB1; (C) fígado de animal do grupo AFB1+ArtinM. (D) Representação gráfica do número médio de tumores por animal nos diferentes grupos experimentais. Animais tratados por 90 dias e sacrificados em seguida. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.

Em relação ao volume tumoral médio nos animais mantidos por 12 meses após início da intoxicação por AFB1, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos experimentais.

A

B

Figura 11. (A) Fotografia do fígado de animal tratado com AFB1 apresentando tumor visível macroscopicamente para ilustrar a medição do volume tumoral. (B) Representação da média do volume tumoral por animal. O grupo Controle não apresentou nenhum tumor.

5.4 INCIDÊNCIA DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS

A avaliação da incidência de FHAs por meio da imunomarcção para a proteína GST-P revelou maior número de lesões pré-neoplásicas e de hepatócitos GST-P positivos no grupo AFB1 ($78,6 \pm 7,62$ e 2.610 ± 250 , respectivamente) em comparação aos grupos Controle (0 ± 0) e AFB1+ArtinM ($20,6 \pm 2,65$ e 609 ± 124 , respectivamente) ($p < 0,001$) (Figura 12).

Figura 12. Fotomicrografias representativas dos grupos Controle, AFB1 e AFB1+ArtinM. (A) fígado de animal do grupo Controle; (B) fígado de animal intoxicado com AFB1; (C) fígado de animal do grupo AFB1+ArtinM. As amostras hepáticas foram imunomarcadas para a proteína GST-P (aumento original de 100x). Análise quantitativa e comparativa do número de focos de hepatócitos alterados (FHAs) (D) e células (E) imunomarcadas para GST-P. Animais tratados por 90 dias e sacrificados em seguida. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.

• $p < 0,001$ AFB1 x Controle

* $p < 0,001$ AFB1 x AFB1+ArtinM

5.5 EXPRESSÃO HEPÁTICA DE P53

A imunomarcção citoplasmática para a proteína supressora tumoral p53 permitiu a identificação de maior número de células positivas nos fígados de animais do grupo AFB1 ($3,86 \pm 0,99$) e do grupo AFB1+ArtinM ($3,06 \pm 0,68$) em comparação aos fígados de animais do grupo Controle (0 ± 0) ($p < 0,01$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os fígados dos grupos AFB1 e AFB1+ArtinM ($p = 0,59$) (Figura 13).

Figura 13. Fotomicrografias representativas dos grupos Controle, AFB1 e AFB1+ArtinM. (A) fígado de animal do grupo Controle; (B) fígado de animal intoxicado com AFB1; (C) fígado de animal do grupo AFB1+ArtinM. As amostras hepáticas foram imunomarcadas para a proteína p53 (aumento original de 200x). (D) Análise quantitativa e comparativa do número de células positivas para p53. Animais tratados por 90 dias e sacrificados em seguida. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.

• $p < 0,01$ AFB1 x Controle
+ $p < 0,01$ AFB1+ArtinM x Controle

5.6 EXPRESSÃO HEPÁTICA DE P27

A imunomarcção citoplasmática para a proteína p27^{KIP1} revelou maior número de hepatócitos positivos no grupo AFB1+ArtinM (8,875±2,33) em relação aos grupos Controle (0±0) e AFB1 (3,125±0,72) ($p<0,01$) (Figura 14).

Figura 14. Fotomicrografias representativas dos grupos Controle, AFB1 e AFB1+ArtinM. (A) fígado de animal do grupo Controle; (B) fígado de animal intoxicado com AFB1; (C) fígado de animal do grupo AFB1+ArtinM. As amostras hepáticas foram imunomarcadas para a proteína p27^{KIP1} (aumento original de 200x). (D) Análise quantitativa e comparativa do número de hepatócitos imunomarcados para p27^{KIP1}. Animais tratados por 90 dias e sacrificados em seguida. Valores expressos em média ± E.P.M.

- $p<0,01$ AFB1 x Controle
- # $p<0,01$ AFB1 x AFB1+ArtinM
- + $p<0,0001$ AFB1+ArtinM x Controle

5.7 EXPRESSÃO HEPÁTICA DE P16

A imunomarcção nuclear para a proteína inibidora de ciclinas dependentes de quinases $p16^{INK4D}$ revelou maior porcentagem de células positivas no fígado de animais do grupo AFB1 ($57,11 \pm 2,34$) em relação aos fígados de animais dos grupos Controle ($43,13 \pm 1,71$) e AFB1+ArtinM ($46,29 \pm 2,95$) ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os fígados dos grupos Controle e AFB1+ArtinM ($p = 0,56$) (Figura 15).

Figura 15. Fotomicrografias representativas dos grupos Controle, AFB1 e AFB1+ArtinM. (A) fígado de animal do grupo Controle; (B) fígado de animal intoxicado com AFB1; (C) fígado de animal do grupo AFB1+ArtinM. As amostras hepáticas foram imunomarcadas para a proteína $p16^{INK4D}$ (aumento original de 200x).

(D) Análise quantitativa e comparativa da porcentagem de células positivas para $p16^{INK4D}$. Animais tratados por 90 dias e sacrificados em seguida. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.

- $p < 0,05$ AFB1 x Controle
- # $p < 0,05$ AFB1 x AFB1+ArtinM

5.8 EXPRESSÃO HEPÁTICA DE CICLINA D1

A análise da expressão gênica para a Ciclina D1 no fígado evidenciou maior expressão gênica no grupo AFB1 ($2,27 \pm 0,37$) em comparação aos grupos Controle ($0,72 \pm 0,20$) e AFB1+ArtinM ($0,95 \pm 0,12$) ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre aos grupos AFB1+ArtinM e Controle ($p = 0,60$) (Figura 16).

Figura 16. Análise da expressão gênica hepática da Ciclina D1 nos diferentes grupos experimentais. Animais tratados por 90 dias e sacrificados em seguida. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.

• $p < 0,05$ AFB1 x Controle

$p < 0,05$ AFB1 x AFB1+ArtinM

5.9 EXPRESSÃO HEPÁTICA DE Rb

A análise da expressão hepática do gene Rb não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos experimentais (Figura 17).

Figura 17. Análise da expressão hepática de Rb nos diferentes grupos experimentais. Animais tratados por 90 dias e sacrificados em seguida. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.

5.10 EXPRESSÃO HEPÁTICA DE PROIBITINA

A análise da expressão gênica hepática da proteína Proibitina revelou menor expressão gênica no grupo AFB1 ($1,51 \pm 0,17$) em relação ao grupo AFB1+ArtinM ($2,01 \pm 0,19$) ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos AFB1 e Controle ($1,83 \pm 0,36$) ($p = 0,48$), ou entre os grupos AFB1+ArtinM e Controle ($p = 0,76$) (Figura 18).

Figura 18. Análise da expressão gênica da Proibitina no fígado de ratos de diferentes grupos experimentais. Animais tratados por 90 dias e sacrificados em seguida. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.

$p < 0,05$ AFB1 X AFB1+ArtinM

A mensuração dos níveis da proteína Proibitina em amostras hepáticas revelou menor expressão no grupo AFB1 em comparação aos grupos Controle e AFB1+ArtinM ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e AFB1+ArtinM ($p = 0,45$) (Figura 19).

Figura 19. Fotomicrografia representativa de bandas das proteínas Proibitina (PBT) e GAPDH obtidas por Western Blotting de amostras hepáticas de animais pertencentes aos grupos Controle, AFB1 e AFB1+ArtinM.

* $p < 0,05$ AFB1 X Controle; # $p < 0,05$ AFB1 X AFB1+ArtinM

6 DISCUSSÃO

Em regiões de clima tropical, como a África Ocidental e a Ásia Oriental, a população encontra-se exposta a elevados índices de contaminação alimentar pela AFB1, a qual é reconhecidamente um dos principais fatores etiológicos do CHC, juntamente com o etilismo e a infecção crônica pelo VHB e VHC (LADEP et al., 2014; NIU et al., 2015; THOMAS, 2014). As implicações para a saúde humana e animal decorrentes da ingestão de AFB1 são proporcionais à intensidade e ao tempo de exposição à micotoxina, constatando-se, como consequência da aflatoxicose aguda, dor abdominal, febre, vômito e hepatite, e como efeitos crônicos a imunossupressão e a hepatocarcinogênese (KENSLE et al., 2011; KUMAR et al., 2017). Em contrapartida, recentes estudos tem demonstrado que a proteína ArtinM, uma lectina extraída de sementes da jaqueira, exibe um potencial efeito anticarcinogênico (CARVALHO et al., 2011; BRAZ et al., 2016). Desta forma, o presente estudo investigou os efeitos da ArtinM em modelo experimental de carcinogênese hepática induzida por AFB1 em ratos. Os resultados revelam que ArtinM foi capaz de reduzir significativamente a incidência de tumores hepáticos em animais intoxicados por AFB1.

No atual estudo, a administração oral de AFB1 na dose diária de 400µg por quilograma de ração durante 90 dias (dose final de 4mg AFB1 por quilograma de peso corporal) resultou no surgimento de nódulos hepáticos correspondentes a CHC em 64% dos animais 12 meses após o início das intoxicações. Empregando menor dose diária de AFB1 (100µg por quilograma de ração), mas por um período significativamente maior (entre 54 e 105 semanas), Wogan e colaboradores (1974) relataram 100% de incidência de CHC em ratos. Similarmente, Cullen e colaboradores (1987) relataram incidência tumoral de 95% em ratos alimentados com dieta contendo 50µg AFB1/kg durante 19 meses. McMahon e colaboradores (1990) reportaram desenvolvimento de CHC em 100% dos animais após período de um a dois anos utilizando protocolo de administração intraperitoneal diária de AFB1 durante 8 semanas (dose final aproximada de 6mg de AFB1 por quilograma de peso corporal).

No atual estudo foi também mensurada a gênese de lesões pré-neoplásicas no fígado dos animais intoxicados por AFB1. As lesões pré-neoplásicas, identificadas como FHAs, foram imunomarcadas para a proteína GST-P e quantificadas após três meses de intoxicação oral pela AFB1 (grupos subcrônicos). Constatou-se elevada incidência de FHAs (78,6 FHAs/cm²) e de hepatócitos GST-P positivos (2.610 hepatócitos positivos/cm²) nos animais intoxicados por AFB1, verificando-se algumas semelhanças em relação a estudos anteriores. Singh e colaboradores (2015) relataram a presença de 2.000 células GST-P+/cm² no fígado de ratos 10 semanas após tratamento com AFB1 (duas doses de 1mg/kg de peso corporal). No presente estudo, cujos animais receberam doses diárias de 400 µg AFB1/kg ração durante treze semanas (dose total de 4mg AFB1/kg de peso corporal), foram encontradas 2.610 hepatócitos GST-P+/cm². Hiruma e cols. (1996) referem 9,6 FHAs/cm² três semanas após tratamento com dose única de 2,5mg AFB1/kg de peso corporal. No presente estudo foram observados 78,6 FHAs/cm². Dez semanas após tratamento com 1mg AFB1/kg de peso corporal, Ferk e colaboradores (2014) reportaram 25 FHAs/cm². A elevada incidência de lesões tumorais em menor espaço de tempo e o maior número de FHAs encontrados no presente estudo podem ser justificados pelo emprego da via oral e pelo longo período de intoxicação dos animais, se assemelhando às condições de ingestão crônica de alimentos contaminados com AFB1 por populações humanas. Sabe-se que aproximadamente 50% da dose oral de AFB1 é prontamente absorvida no duodeno e, por meio do sistema venoso portal, atinge o fígado, onde é concentrada (WILSON et al., 1985).

Os animais intoxicados por AFB1 e tratados com ArtinM exibiram incidência tumoral média próxima à metade daquela apresentada pelos ratos que apenas sofreram intoxicação por AFB1 (33% x 64% dos animais). Quanto à incidência média de FHAs e ao número médio de hepatócitos imunomarcados para GST-P, os animais tratados com ArtinM apresentaram somente 20,6 FHAs/cm² e 609 hepatócitos positivos/cm², respectivamente 26% e 23% dos valores médios apresentados pelos animais do grupo AFB1 (78,6 FHAs/cm² e 2.610 hepatócitos positivos/cm²). Os animais controle, administrados apenas com o veículo (DMSO), não exibiram lesões hepáticas pré-neoplásicas ou neoplásicas.

Em estudo experimental empregando AFB1 como indutor de carcinogênese hepática, o tratamento dos animais com a benzopirona Cumarina resultou em atenuação na formação de FHAs, cuja identificação foi também realizada por meio da imunomarcagem hepatocelular para a GST-P. Entretanto, a administração de Cumarina após a fase de indução pela AFB1 não foi suficiente para reverter as células que já se encontravam na fase de promoção ou progressão tumoral (KELLY et al., 2000). Por outro lado, no presente estudo, ArtinM foi capaz de reduzir o número de FHAs mesmo após a indução pela AFB1, uma vez que a primeira dose da lectina foi administrada depois de 30 dias de intoxicação pela aflatoxina.

No CHC, contrariamente a outros tipos de câncer, os genes supressores tumorais parecem exercer funções mais importantes que os oncogenes (SHIRAHARA; YAMAMOTO; NAMBA, 2013). Alterações no supressor tumoral p53 correspondem às mais frequentes mutações gênicas encontradas no CHC, e a superexpressão desse gene é considerada um sinal de mau prognóstico (NIU; NIU; WANG, 2015). Neste estudo, foi possível observar hiperexpressão citoplasmática da proteína p53 no fígado dos animais intoxicados por AFB1 em relação aos animais do grupo controle. Similarmente, Trotta (2016), em modelo de indução de focos pré-neoplásicos hepáticos pela AFB1, verificou maior expressão citoplasmática da p53 em hepatócitos de ratos tratados com AFB1 em comparação aos animais do grupo controle. De fato, o sequestro intracitoplasmático aberrante da proteína p53 é considerado um relevante sinal de perda da capacidade de resposta desta proteína frente ao dano sofrido pelo DNA nuclear. O acúmulo citoplasmático da proteína p53 foi anteriormente relatado no CHC, em adenocarcinomas, retinoblastomas e outros tipos de câncer (UEDA et al., 1995; O'BRATE, GIANNAKAKOU, 2003). Além disso, estudos apontam que o acúmulo citoplasmático de p53 pode estar relacionado a alterações na diferenciação celular, ao aumento da capacidade de invasibilidade e metástase tumoral, além de pior resposta frente ao tratamento quimioterápico (HEINZE et al., 1999; ORTEGA, 2016).

Adicionalmente, reforçando os resultados do presente estudo, Sun e colaboradores (2015) identificaram maior expressão gênica de p53 no fígado de animais intoxicados por AFB1 em comparação aos animais do grupo controle. Em relação aos animais tratados com ArtinM, foi possível observar

hiperexpressão de p53 em relação ao grupo controle e discreta redução da expressão em relação ao grupo AFB1. A maior expressão de p53 no fígado de animais intoxicados por AFB1 (grupos AFB1 e AFB1+ArtinM) pode ser resultado da inativação gênica secundária à maior metilação de p53 nesses animais. Sabe-se que a carcinogênese hepática induzida por AFB1 envolve mecanismos relacionados à metilação do DNA (ZHANG et al., 2012).

No processo de hepatocarcinogênese há participação de uma diversidade de fatores, não se restringindo a um agente químico ou gene isoladamente. A relação entre o gene supressor tumoral RB e o CHC tem sido amplamente estudada (SHIRAHARA; YAMAMOTO; NAMBA, 2013). Acredita-se que, em humanos, a inativação de RB e/ou de p16 possa ser um dos principais mecanismos indutores de carcinogênese hepática (AZECHI et al., 2001; KO et al., 2010). No presente estudo, foi possível observar uma tendência de maior expressão gênica de RB no fígado dos animais tratados com ArtinM em comparação ao grupo AFB1.

A PBT é uma proteína que atua como supressora tumoral por meio da inibição da atividade do fator de transcrição E2F ou do estímulo à atividade de p53, resultando na redução da proliferação celular e na indução de apoptose (WANG et al., 2002; FUSARO et al., 2003; SÁNCHEZ-QUILES et al., 2010; PENG et al., 2015; RAMANI et al., 2016). Neste estudo, verificou-se que as expressões gênica e proteica de PBT no fígado dos animais intoxicados por AFB1 e tratados com ArtinM foram significativamente maiores em comparação aos animais apenas intoxicados por AFB1. Acredita-se que o efeito hepatoprotetor de ArtinM possa ser atribuído às maiores concentrações de PBT no fígado dos animais do grupo AFB1+ArtinM em relação aos animais do grupo AFB1. De fato, camundongos geneticamente deficientes para a PBT exibiram aumento do estresse oxidativo e maior fibrose e apoptose hepáticos, além do desenvolvimento de CHC num período de apenas oito meses (KO et al., 2010). Além disso, hepatócitos deficientes em PBT apresentaram hiperexpressão de dois genes relacionados com a formação do CHC: H19 e fator de crescimento semelhante à insulina (RAMANI, 2016).

O processo de carcinogênese, além de ser regulado negativamente pelos genes supressores tumorais, pode também ser controlado pelos inibidores de CDKs. O aparecimento de mutações nos inibidores de CDKs

pode alterar a expressão desses genes, contribuir para a proliferação desregulada de hepatócitos e, conseqüentemente, favorecer o desenvolvimento do CHC (HUI et al., 1998; NIU et al., 2015). A proteína oriunda do gene *p27^{KIP1}* tem sido descrita como um inibidor de CDK crucial para a regulação negativa da progressão através das fases G1/S do ciclo celular no CHC. A redução dos níveis celulares dessa proteína está diretamente implicada no desenvolvimento de tumores primários (ITO et al., 2001; FIORENTINO et al., 2000). A proteína p27 pode estar expressa tanto no núcleo quanto no citoplasma das células do CHC (ZHANG et al., 2010; WANDER et al., 2011; QIU et al., 2016). Os resultados do presente estudo evidenciaram hiperexpressão hepatocelular citoplasmática de p27 nos animais tratados com AFB1 e ArtinM em comparação aos animais apenas intoxicados por AFB1. De fato, a hiperexpressão de p27 reduziu a proliferação celular, a apoptose e os danos ao DNA na hepatocarcinogênese induzida por AFB1 em cultura de células hepáticas (RANCHAL et al., 2009). Em humanos, de forma similar, verificou-se pior prognóstico para os casos com menores índices de marcação para p27, com taxas de sobrevida máxima de 5 anos em 62% dos pacientes que exibiam baixa expressão, e 93% para aqueles com maior expressão para p27 (MATSUDA et al., 2006; MATSUDA et al., 2013). Neste contexto, acredita-se que o efeito protetor de ArtinM possa também ter sido mediado pelo aumento significativo na expressão hepatocelular da proteína p27.

Além de p27, a proteína p16 é também um conhecido inibidor de CDKs, atuando como um importante regulador da transição G1/S do ciclo celular (AZECHI et al., 2001; HUANG et al., 2014). Azechi e colaboradores (2001) demonstraram inativação de p16 por hipermetilação em 64% dos CHCs estudados. A metilação é considerada o principal mecanismo de inativação do p16, favorecendo, conseqüentemente, o processo de hepatocarcinogênese. Mutações em p53 e metilação em p16 foram frequentemente detectadas em biópsias hepáticas oriundas de pacientes portadores de CHC expostos à AFB1 (TANNAPFEL et al., 2000; ZHANG et al., 2002; ZHANG et al., 2006). No atual estudo, observou-se maior marcação nuclear para a proteína p16 nos fígados dos animais pertencentes ao grupo AFB1 em comparação aos animais dos grupos Controle e AFB1+ArtinM. Uma hipótese para justificar a maior

expressão hepática de p16 nos animais intoxicados por AFB1 é uma possível hipermetilação e consequente inativação de p16 induzidos pela micotoxina. Os animais tratados com ArtinM apresentaram menor expressão para p16 em relação ao grupo AFB1, sugerindo que a lectina possa ter interferido na intensidade das alterações epigenéticas sofridas pelo DNA.

Além da inativação de RB e/ou p16, a carcinogênese hepática pode ser induzida por hiperexpressão de ciclina D1 (AZECHI et al., 2001; HUANG et al., 2014). Uma série de fatores externos pode ativar as ciclinas do tipo D, resultando na formação de complexos com CDK 4 e CDK 6 durante a fase G1, inativação de Rb e prosseguimento do ciclo celular (CHANG 2004; YAMAMOTO et al., 2006). O aumento na expressão de ciclina D1 incrementa a atividade proliferativa hepatocelular e favorece o desenvolvimento de neoplasias menos diferenciadas e mais agressivas (AZECHI et al., 2001; HUANG et al., 2014). No presente estudo foi possível observar hiperexpressão hepática de ciclina D1 nos animais intoxicados com AFB1 em comparação ao grupo Controle, enquanto nos animais tratados com ArtinM houve significativa redução da expressão gênica hepática para a ciclina D1. Recentemente, Braz e colaboradores (2016) também verificaram redução na expressão hepática de ciclina D1 induzida pelo tratamento com ArtinM em modelo de hepatocarcinogênese secundária à exposição crônica à dietilnitrosamina (DEN).

A interação de ArtinM a receptores N-glicosilados na superfície de macrófagos e células dendríticas, resultando na produção de grandes quantidades de IL-12, é considerado o principal evento imunomodulatório mediado pela lectina porque culmina com a direção da resposta imune para o eixo Th1 e confere importante proteção contra patógenos intracelulares. Além disso, foi demonstrado recentemente que ArtinM pode também se interagir a N-glicanas ligadas a moléculas de TLR2 na superfície celular. A resposta mediada por TLR2 e induzida por ArtinM não apenas desencadeia a síntese de IL-12, mas também a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (PANUNTO-CASTELO et al., 2001; MARIANO et al., 2014).

Alguns estudos atuais têm demonstrado que a via de sinalização dos TLR2 pode exercer importante efeito supressor sobre a hepatocarcinogênese. Utilizando camundongos geneticamente deficientes em TLR2, dois grupos de

pesquisadores verificaram maior susceptibilidade desses animais à carcinogênese hepatocelular induzida por DEN. A perda de TLR2 resultou em diminuição da resposta inflamatória mediada por macrófagos e redução da sinalização pró-apoptótica e do fluxo autofágico, culminando na supressão da imunidade antitumoral e no favorecimento do desenvolvimento do CHC. Entretanto, o tratamento dos camundongos deficientes em TLR2 com IFN- γ , uma citocina Th1 e modulador positivo da autofagia e da senescência celulares, foi suficiente para atenuar a carcinogênese e a progressão tumoral hepática (LIN et al., 2012a; LI et al., 2015). Lin e colaboradores (2012b) demonstraram que a imunidade mediada por TLR2 é capaz de induzir senescência intracelular e ativar o fluxo autofágico em hepatócitos, atenuando o desenvolvimento e a progressão do CHC (LIN et al., 2012a; LIN et al., 2012b; LI et al., 2015).

Tendo em vista os achados do presente estudo, pode-se presumir que, por se tratar de um agonista de TLR2, ArtinM também conferiu proteção frente à hepatocarcinogênese induzida por AFB1 por meio da ativação de mecanismos imunológicos mediados por TLR2. Adicionalmente, ArtinM induziu significativa hiperexpressão hepática da proteína supressora tumoral proibitina e do inibidor de CDK p27. Em conformidade com os nossos resultados, estudos empregando cultivos celulares tumorais reportaram efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos independentes de caspase e por meio da ativação de autofagia em consequência da elevação das concentrações intracelulares de p27 (CHEN et al., 2008; JIAN et al., 2010).

Similarmente ao presente estudo, Braz e colaboradores (2016) demonstraram efeito protetor de ArtinM em modelo de carcinogênese hepática induzida por DEN. Os animais tratados com a lectina exibiram menor número de focos pré-neoplásicos hepáticos (FHAs), maior taxa de apoptose e menor índice de proliferação hepatocelular. Os mecanismos subjacentes a esses efeitos parecem estar relacionados ao potencial de ArtinM em estimular a expressão nuclear de p53 e dos inibidores de CDK p21 e p27 e a expressão gênica para o IFN- γ no fígado, além de reduzir os níveis hepáticos de ciclina D1.

Abordando o efeito de ArtinM em cultivos de células leucêmicas, Carvalho e colaboradores (2011) relataram que a lectina foi capaz de suprimir a

proliferação celular através do reconhecimento de N-glicanas na superfície das células leucêmicas. Esse efeito antiproliferativo de ArtinM foi atribuído à indução de morte celular por meio de excessiva produção de espécies reativas de oxigênio e de alterações intracelulares relacionadas à autofagia.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo investigou o papel de ArtinM no processo de carcinogênese hepática induzida por AFB1 em ratos. ArtinM se mostrou capaz de restringir a formação de focos pré-neoplásicos e reduzir a incidência de lesões tumorais no fígado, provavelmente por meio da ativação de mecanismos imunológicos mediados por TLR2 e da inibição da progressão do ciclo celular através da hiperexpressão do inibidor de CDK p27 e da proteína supressora tumoral proibirina. Desta forma, o tratamento com a lectina ArtinM resultou em proteção hepática diante da exposição oral subcrônica ao potente agente genotóxico AFB1.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHHAB, M. A. et al. Red ginseng extract protects against aflatoxin B1 and fumonisins-induced hepatic pre-cancerous lesions in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 48, p. 733-42, 2010.
- AGUILAR, F., HUSSAIN, S. P., CERUTTI, P. Aflatoxin B1 induces the transversion of G-->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A.**; v. 90, n. 18, p. 8586-90, 1993.
- ALVES, R. C. et al. Advanced hepatocellular carcinoma. Review of targeted molecular drugs. **Ann Hepatol**, v. 10, n. 1, p. 21-7, 2011.
- ASHTARI, S. et al. Hepatocellular carcinoma in Asia: Prevention strategy and planning. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 12, p. 1708-1717, 2015. doi:10.4254/wjh.v7.i12.1708.
- AYDIN, M.; BACANLI, M.; BASARAN, N. Aflatoxin levels in chronic hepatitis B patients with cirrhosis or hepatocellular carcinoma in Balıkesir, Turkey. **J Viral Hepat**, v. 22, n. 11, p. 926-35, 2015. doi: 10.1111/jvh.12410.
- AZECHI, H. et al. Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. **Oncology**, v. 60, n. 4, p. 346-54, 2001.
- BARBOSA-LORENZI, V. C. et al. Recombinant ArtinM activates mast cells. **BMC Immunol**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2016. doi: 10.1186/s12865-016-0161-0.
- BERGÈS, R. et al. Comparison of the chemopreventive efficacies of garlic powders with different alliin contents against aflatoxin B1 carcinogenicity in rats. **Carcinogenesis**, 25, p. 1953-9, 2004.
- BERTUCCIO, P. et al. Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality. **J Hepatol**, S0168-8278, n.17, p.30145-9, 2017. doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.011.
- BOTREL, D. A. et al. Contaminação por fungos e presença de Aflatoxinas em amendoim. Revista **Higiene Alimentar**, v. 25, n. 194-5, p. 1052-1054, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 9 março 2011.
- BRAZ, M. M. et al. Inhibition of Hepatocarcinogenesis by ArtinM via Anti-proliferative and Pro-apoptotic Mechanisms. **In Vivo**, v. 30, n. 6, p. 845-52, 2016.

BRESSAC, B. et al. Select G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma in Southern Africa. **Nature**, v. 350, p. 429-31, 1991.

BUSBY, W. F.; WOGAN, G. N. Aflatoxins. In: SEARLE, C. E., ed. **Chemical Cacinogens**. Washington, American Chemical Society, v. 2, p. 945-1136, 1984.

CARTER, S. B. Haptotaxis and the mechanism of cell motility. **Nature**, 213, p. 256–260, 1967.

CARVALHO, F. C. et al. The recognition of N-glycans by the lectin ArtinM mediates cell death of a human myeloid leukemia cell line. **Plos One**, v. 6, n. 11, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0027892.

CARRILHO, F. J. et al. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. **Clinics**, v. 65, n.12, 1285-90, 2010. doi:10.1590/S1807-59322010001200010.

CECÍLIO, N. T. et al. Yeast expressed ArtinM shares structure, carbohydrate recognition, and biological effects with native ArtinM. **Int J Biol Macromol**, v. 82, p. 22-30, 2016. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.062.

CHANG, Y. et al. Inhibition of cell cycle progression by penta-acetyl geniposide in rat C6 glioma cells. **Toxicol App Pharmacol**, v. 198, p. 11-20, 2004.

CHARNI, M. et al. p53 in liver pathologies-taking the good with the bad. **J Mol Med (Berl)**, v. 92, n. 12, p. 1229-34, 2014. doi: 10.1007/s00109-014-1223-5. Review.

CHAHUD, F. et al. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. **Int J Exp Pathol**, v. 90, p. 166-173, 2009.

CHEN, Q et al. Targeting the p27 E3 ligase SCF(Skp2) results in p27- and Skp2-mediated cell-cycle arrest and activation of autophagy. **Blood**, v. 111, p. 4690-9, 2008. doi: 10.1182/blood-2007-09-112904

CHITTMITRAPAP S. et al. 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**, v.14, n. 12, p. 7675-9, 2013.

COLEMAN, W. B. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. **Curr Mol Med**, v. 3, p. 573–88, 2003.

COLTRI, K. C. et al. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a Toll-Like receptor 2-dependent mechanism. **Am J Pathol**, v. 173, p. 423-32, 2008. doi: 10.2353/ajpath.2008.080126

COTTY, P. J.; JAIME-GARCIA R. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. **Int J Food Microbiol**, v. 119, n.1-2, p. 109-15, 2007. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.060.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicol Lett**, v. 127, n. 1-3, p. 19-28, 2002.

CULLEN, J. M. et al. Carcinogenicity of Dietary Aflatoxin M1 in Male Fischer Rats Compared to Aflatoxin B1. **Cancer Res**, v. 47, p. 1913-17, 1987.

DA SILVA, T. A. et al. Activation of spleen cells by ArtinM may account for its immunomodulatory properties. **Cell Tissue Res**, v. 357, p. 719–730, 2014. doi 10.1007/s00441-014-1879-8.

DA SILVA, T. A. et al. IL-17 Induction by ArtinM is Due to Stimulation of IL-23 and IL-1 Release and/or Interaction with CD3 in CD4+ T Cells. **Plos One**, v. 11, n. 2, 2016 e0149721, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0149721.

DE OLIVEIRA, C. A.; GERMANO, P. M. Aflatoxins: current concepts on mechanisms of toxicity and their involvement in the etiology of hepatocellular carcinoma. **Rev Saude Publica**, v. 31, n. 4, p. 417-24, 1997.

EVERT, M. et al. Morphology and morphometric investigation of hepatocellular preneoplastic lesions and neoplasms in connexin32-deficient mice. **Carcinog**, v.23, n.5, p. 697-703, 2002.

FAUSTO, N.; WEBBER, E. M. Control of liver growth. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 3, p. 117-35, 1993.

FASSBINDER, E. F. **Estudo bibliográfico sobre a incidência de Aflatoxinas em alimentos, e o poder carcinogênico da aflatoxina B1**. 2010. 74f. Tese de Conclusão de Curso (Graduação). Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Chapecó, 2010.

FERREIRA, H. et al. **Ambiência - Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 2, n 1, p. 113-127, 2006.

FUJIMORI, M. et al. Allelotype study of primary hepatocellular carcinoma. **Cancer Res**, v. 51, p. 89-93, 1991.

FUSARO, G. et al. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. **J Biol Chem**, v. 278, p. 47853-61, 2003. doi: 10.1074/jbc.M305171200

GAN, L. S. et al. Serum albumin adducts in the molecular epidemiology of aflatoxin carcinogenesis: correlation with aflatoxin B₁ intake and urinary excretion of aflatoxin M₁. **Carcinogenesis**, v. 9, p. 1323-5, 1988.

GANIKO, L. et al. Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM⁺. **Glycoconj J**, v. 15, p. 527-530, 1998.

GOH, G. B.; CHANG, P. E.; TAN, C. K. Changing epidemiology of hepatocellular carcinoma in Asia. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 29, n. 6, p. 919-28, 2015. doi: 10.1016/j.bpg.2015.09.007.

GOLDSTEIN, I. J. et al. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 2005. doi: 10.1038/285066b0

GOMES, M. A. et al. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. **Rev Assoc Med Bras**, v. 59, n. 5, p. 514-24, 2013. doi: 10.1016/j.ramb.2013.03.005.

GONÇALEZ, E. et al. Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim. **Arq Inst Biol [online]**, v.80, n.3, p.312-317, 2013. ISSN 1808-1657.

GONÇALVES, C. S.; PEREIRA, F. E. L.; GAYOTTO, L. C. C. Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of a national survey. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v. 39, p. 165-70, 1997. ISSN 1678-9946

GOODMAN, D. G. et al. Proliferative and selected other lesions in the liver of rats. **Guides for toxicologic pathology**, p. 1-24, 1994.

GORAKSHAKAR, A. C.; GHOSH K. Use of lectins in immunoematology. **Asian Journal of Transfusion Science**, v. 10, n. 1, p. 12-21, 2016. doi:10.4103/0973-6247.172180.

GROOPMAN, J. D. et al. Molecular dosimetry of aflatoxin-N7-guanine in human urine obtained in The Gambia, **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 1: 221-7, 1992a.

GROOPMAN, J. D. et al. 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**, v. 52, p. 267-74, 1992b.

GROOPMAN, J. D. et al. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi autonomous region, People's Republic of China. **Cancer Res**, 52: 45-52, 1992c.

GURSOY-YUZUGULLU, O. et al. Aflatoxin genotoxicity is associated with a defective DNA damage response bypassing p53 activation. **Liver Int**, v. 31, n. 4, p. 561-71, 2011. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02474.x.

HAEGER, A. et al. Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. **Trends Cell Biol**, v. 25, n. 9, p. 556-66, 2015. doi: 10.1016/j.tcb.2015.06.003.

HAJTÓ, T. et al. Oncopharmacological Perspectives of a Plant Lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): Overview of Recent Results from In vitro Experiments and In vivo Animal Models, and Their Possible Relevance for Clinical Applications.

Evid Based Complement Alternat Med, v. 2, n. 1, p. 59–67, 2005.
doi:10.1093/ecam/neh058

HAMID, A. S. et al. Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention. **Oncol Lett**, v. 5, n. 4, p. 1087-1092, 2013.

HEINDRYCKX, F., COLLE I.; VAN VLIERBERGHE H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. **Int J Exp Pathol**, 90, 367–386, 2009.

HEINZE, T. et al. Determination of the oncogenes p53 and C-erb B2 in the tumour cytosols of advanced hepatocellular carcinoma (HCC) and correlation to survival time. **Anticancer Res**, v. 19, p. 2501–2503, 1999.

HIRUMA, S. et al. Effect of cell proliferation on initiation of aflatoxin B1-induced enzyme altered hepatic foci in rats and hamsters. **Carcinog**, v. 17, n. 11, p. 2495-2499, 1996.

HUANG, X. H. et al. Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of macrophage migration inhibitory factor (MIF) suppressed cyclin D1 expression and hepatocellular carcinoma cell proliferation. **Oncotarget**, v. 5, n. 14, p. 5570-5580, 2014.

HUI, A. M.; MAKUUCHI, M.; LI, X. Cell cycle regulators and human hepatocarcinogenesis. **Hepatogastroenterology**, v. 45, n. 23, p. 1635-42, 1998.

HUSSAIN, S. P. et al. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. **Oncogene**, v. 26, p. 2166-76, 2007. doi: 10.1038/sj.onc.1210279.

ITO, Y. et al. Expression of p57/kip2 protein in hepatocellular carcinoma. **Oncology**, v. 61, p. 221-5, 2001. doi: 55378.

JEANNOT, E. et al. Increased incidence of aflatoxin B1-induced liver tumors in hepatitis virus C transgenic mice. **Int J Cancer**, v. 130, n. 6, p. 1347-56, 2012. doi: 10.1002/ijc.26140.

JIANG, M. et al. Aflatoxin B1 Detection Using a Highly-Sensitive Molecularly-Imprinted Electrochemical Sensor Based on an Electropolymerized Metal Organic Framework. DeRosa MC, ed. *Toxins*. 2015;v. 7, n. 9, p. 3540-3553. doi:10.3390/toxins7093540.

KELLY, V. P. et al. Chemoprevention of aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis by coumarin, a natural benzopyrone that is a potent inducer of aflatoxin B1-aldehyde reductase, the glutathione S-transferase A5 and P1 subunits, and ND(P)H:quinone oxidoreductase in rat liver. **Cancer Res**, v. 60, n. 4, p. 957-69, 2000.

KENSLER, T. W.; ROEBUCK, B. D.; WOGAN, G. N.; GROOPMAN, J. D. Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 120, s. 1, p.28-48, 2011. doi:10.1093/toxsci/kfq283.

KEW, M. C. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. **Liver Int**, v. 23, n. 6, p. 405-9, 2003.

KIM, J. et al. Interference with mutagenic aflatoxin B1-induced checkpoints through antagonistic action of ochratoxin A in intestinal cancer cells: a molecular explanation on potential risk of crosstalk between carcinogens. **Oncotarget**, v. 7, n. 26, p. 39627-39639, 2016. doi:10.18632/oncotarget.8914.

KO, K. S. et al. Liver-specific deletion of prohibitin 1 results in spontaneous liver injury, fibrosis, and hepatocellular carcinoma in mice. **Hepatology**, v. 52, n. 6, p. 2096-108, 2010.

KUCUKCAKAN, B.; HAYRULAI-MUSLIU, Z. Challenging Role of Dietary Aflatoxin B1 Exposure and Hepatitis B Infection on Risk of Hepatocellular Carcinoma. **Open Access Maced J Med Sci**, v. 3, n. 2, p. 363-9, 2015. doi: 10.3889/oamjms.2015.032.

KUMAR, M. et al. Effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on gene expressions and genotoxicity during AFB₁-induced hepatocellular carcinoma. **Gene**, v. 490, n. 1-2, p. 54-9, 2011. doi: 10.1016/j.gene.2011.09.003.

KUMAR, D. S. et al. Amelioration of hepatotoxicity induced by aflatoxin using citrus fruit oil in broilers (*Gallus domesticus*). **Toxicol Ind Health**, v. 31, n. 11, p. 974-81, 2015. doi: 10.1177/0748233713485893.

KUMAR, P. et al. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. **Front Microbiol**, v. 17, n. 7, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2016.02170.

LADEP, N. G. et al. Problem of hepatocellular carcinoma in West Africa. **World J. Hepatol**, v. 6, n. 11, p. 783-92, 2014. doi: 10.4254/wjh.v6.i11.783.

LÉVY, L. et al. Genetics of hepatocellular carcinoma. **Ann N Y Acad Sci**, v. 13, n. 16, p. 21–36, 2002.

LI, C. G. et al. Predictive role of glutathione-S-transferase gene polymorphisms in risk and prognosis of hepatocellular carcinoma. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 7, p. 3247-52, 2012.

LI, S. et al. TLR2 limits development of hepatocellular carcinoma by reducing IL18-mediated immunosuppression. **Cancer Res**, v. 75, n. 6, p. 986-95, 2015.

LIN, H. et al. Loss of immunity-supported senescence enhances susceptibility to hepatocellular carcinogenesis and progression in Toll-like receptor 2-deficient mice. **Hepatology**. 2013; 57: 171-82. doi: 10.1002/hep.25991

LIN, H.; HUA, F.; HU, Z. W. Autophagic flux, supported by toll-like receptor 2 activity, defends against the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. **Autophagy**, v.8, p. 1859-61, 2012. doi: 10.4161/auto.22094

LIU, Y. et al. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis. **Eur J Cancer**, v. 48, p. 2125-36, 2012.

LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Dis Primers**, v. 14, n. 2, 2016. doi:10.1038/nrdp.

LU, J. H. et al. Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. **J Immunol**, v. 144, n. 6, p. 2287–2294, 1990.

MACHINSKI JUNIOR, M. Aflatoxins: análise em amendoim por cromatografia em camada delgada. In: MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. Guanabara Koogan S. A., 2008, cap. 21, p. 194-9.

MARIANO, V. S. et al. Recognition of TLR2 N-glycans: critical role in ArtinM immunomodulatory activity. **PLoS One**, v. 9, n. 6, e98512, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0098512

MATSUDA, Y.; ICHIDA, T. P16 and P27 are functionally correlated during the progress of hepatocarcinogenesis. **Med Mol Morphol**, v. 39, p.169–75, 2006. doi:10.1007/s00795-006-0339-2

MATSUDA, Y. et al. Mycotoxins are conventional and novel risk biomarkers for hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 19, p. 2587-90, 2013.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. MICOTOXINAS EM ALIMENTOS PRODUZIDOS NO BRASIL. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010. ISSN 1517-8595

MCMAHON, G. et al. Characterization of c-Ki-ras and N-ras oncogenes in aflatoxin B1-induced rat liver tumors. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 87, p. 1104-1108, 1990.

MIRANDA-SANTOS, I. K. F. et al. Activation of T and B cells by a crude extract of *Artocarpus integrifolia* is mediated by a lectin distinct from jacalin. **J Immunol Methods**, v.140, p. 197-203, 1991.

MORENO, A. N. et al. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 132, p. 221-30, 2003.

MORENO, M. et al. Ghrelin attenuates hepatocellular injury and liver fibrogenesis in rodents and influences fibrosis progression in humans. **Hepatology**. v. 51 p. 974-85, 2010.

MOUDGIL, V. et al. A review of molecular mechanisms in the development of hepatocellular carcinoma by aflatoxin and hepatitis B and C viruses. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v. 32, n. 2, 2013.

MULDER, J. E. et al. Up-regulation of nucleotide excision repair in mouse lung and liver following chronic exposure to aflatoxin B₁ and its dependence on p53 genotype. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 275, n. 2, p. 96-103, 2014. doi: 10.1016/j.taap.2013.12.016.

NIJTMANS, L. G. et al. Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. **Embo J**, v. 19, n.11, p. 2444-51, 2000.

NIJTMANS, L. G. et al. The mitochondrial PHB complex: Roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, p. 143-55, 2002.

NILSSON, C. L. Lectins analytical tools from nature. in: NILSSON, C. L. et al. **Lectins: analytical technologies**. Amsterdam: Elsevier, 2007. Cap. 1, p. 1-14.

NIU, Z. S.; NIU, X. J.; WANG, M. Management of hepatocellular carcinoma: Predictive value of immunohistochemical markers for postoperative survival. **World J Hepatol**, v. 7, n. 1, p. 7-27, 2015. doi: 10.4254/wjh.v7.i1.7.

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

ORTEGA, J. F. et al. Suppressing activity of tributyrin on hepatocarcinogenesis is associated with inhibiting the p53-CRM1 interaction and changing the cellular compartmentalization of p53 protein. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 24339-47, 2016. doi:10.18632/oncotarget.8248.

PANUNTO-CASTELO, A. et al. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, v. 11, n. 12, p. 1035-42, 2001.

PESTELL, K. E. et al. Small molecule inhibitors of dual specificity protein phosphatases. **Oncogene**, 19: 6607-12, 2000.

PENG, Y. T. et al. Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis. **Apoptosis**, v. 20, p. 1135-1149, 2015.

PEROMINGO, B. et al. Effect of temperature and water activity on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on cured meat model systems. **Meat Sci**, v. 122, p. 76-83, 2016. doi: 10.1016/j.meatsci.2016.07.024.

PERRA, A. et al. Alpha-lipoic acid promotes the growth of rat hepatic pre-neoplastic lesions in the choline-deficient model. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 1, p. 161-8, 2008. doi:10.1093/carcin/bgm205

PEZ, F. et al. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. **J Hepatol**, v. 59, n. 5, p. 1107-17, 2013. doi: 10.1016/j.jhep.2013.07.001.

PIMENTA, J. R.; MASSABKI, P. S. Carcinoma hepatocelular: um panorama clínico. **Rev Bras Clin Med**, v. 8, p. 59-67, 2010.

PRANCHEVICIUS, M C. S. et al. Characterization and optimization of ArtinM lectin expression in *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**, p.12-44, 2012.

QIAN, G. S. et al. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 3, p. 3-10, 1994.

QIAN, G. et al. Aflatoxin B1 modulates the expression of phenotypic markers and cytokines by splenic lymphocytes of male F344 rats. **J Appl Toxicol**, v. 34, n 3, p. 241-9, 2014. doi: 10.1002/jat.2866.

QIU, H. et al. Modification of p27 with O-linked N-acetylglucosamine regulates cell proliferation in hepatocellular carcinoma. **Mol Carcinog**, p. 1-14, 2016. doi: 10.1002/mc.22490.

RAMANI, K. et al. Prohibitin 1 Regulates the H19-Igf2Axis and Proliferation in Hepatocytes. **J Biol Chem**, v, 291, n. 46, 2016.

RANCHAL, I. et al. The reduction of cell death and proliferation by p27(Kip1) minimizes DNA damage in an experimental model of genotoxicity. **Int J Cancer**, v. 125, n. 10, p. 2270-80, 2009. doi: 10.1002/ijc.24621.

REED, C. A. et al. 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**, v. 28, n. 50, p. 4434-43, 2009.

RICCI-AZEVEDO, R. et al. Neutrophils Contribute to the Protection Conferred by ArtinM against Intracellular Pathogens: A Study on *Leishmania major*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, 2016. doi: 10.1371/journal.pntd.0004609.

ROQUE-BARREIRA, M. C. et al. IgA-affinity purification and characterization of the lectin jacalin. **Braz J Med Biol Res**, v. 19, n. 2, p. 149-57, 1986.

ROSA, J. C. et al. KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. **Protein Sci**, v. 8, n. 1, p. 13-24, 1999.

ROSS, R. K. et al. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 339, n. 8799, p. 943-6, 1992.

ROTHSCHILD, L. J. IARC classes AFB₁ as class 1 human carcinogen. **Food Chem News**, v. 34, p. 62-6, 1992.

SABINO, M.; PURCHIO, A.; ZORZETTO, A. P. Variations in the level of aflatoxin in cows milk consumed in the city of São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 6, n. 3, p. 321-326, 1989.

SACRAMENTO, T. R. Importância da Contaminação de Alimentos por Aflatoxinas para a incidência de câncer hepático. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, 2016.

SÁNCHEZ-QUILES, V. et al. Prohibitin deficiency blocks proliferation and induces apoptosis in human hepatoma cells: molecular mechanisms and functional implications. **Proteomics**, v. 10, n. 8, p. 1609-20, 2010. doi: 10.1002/pmic.200900757.

SANTOS-DE-OLIVEIRA, R. et al. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **J Immunol**, v. 153, n. 4, p. 1798-807, 1994.

SCAGLIONI, P. T. et al. Aflatoxin B₁ and M₁ in milk. **Anal Chim Acta**. v. 4; p. 829:68-74, 2014. doi: 10.1016/j.aca.2014.04.036.

SHARON, N; LIS, H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

SHERR, C. J. Cancer cell cycles. **Science**, 274: 1672-7, 1996.

SHIRAHA, H.; YAMAMOTO, K.; NAMBA, M. Human hepatocyte carcinogenesis (review). **Int J Oncol**, v. 42, n. 4, p. 1133-8, 2013. doi: 10.3892/ijo.2013.1829.

SHOTWELL, O. L. et al. Production of aflatoxin on rice. **Applied Microbiology**, Washington, v.14, p.425-428, 1966.

SILVA, R. A. DA; YAMAMOTO, I. T.; FERREIRA, L. O.; MARQUES, L. R. M. Detecção e quantificação de aflatoxinas em amostras de grãos de amendoim e derivados comercializados na região de Marília – SP, 2002-2009. **Braz J F Nutr**, v. 24, n. 1, p. 61-64, 2013.

SOUZA, M. A. et al. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on Artin M properties. **Glycoconj J**, v. 30, n. 7, 2013.

STRICKER, T. P.; KUMAR, V. Neoplasias. In: Robbins, S. L. et al. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier: 2010. Cap. 7. p. 259-327.

SUN, Q. et al. Cinnamaldehyde inhibits fungal growth and aflatoxin B₁ biosynthesis by modulating the oxidative stress response of *Aspergillus flavus*.

Appl Microbiol Biotechnol, v. 100, n. 3, p.1355-64, 2016. doi:10.1007/s00253-015-7159-z.

TANNAPFEL A. I. Frequency of p16 (INK4A) alterations and K-ras mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma of the liver. **Gut**, v. 47, n. 5, p. 721-7, 2000.

TAO, J. et al. Modeling a human hepatocellular carcinoma subset in mice through coexpression of met and point-mutant β -catenin. **Hepatology**, v. 64, n. 5, p. 1587-1605, 2016. doi: 10.1002/hep.28601.

TATEMATSU, M. et al. Relative merits of immunohistochemical demonstrations of placental, A, B and C forms of glutathione S-transferase and histochemical demonstration of gamma-glutamyl transferase as markers of altered foci during liver carcinogenesis in rats. **Carcinogenesis**, v. 6, n. 11, p. 1621-6, 1985.

TEIXEIRA, C. R. et al. Potential of KM+ lectin in immunization against Leishmania amazonensis infection. **Vaccine**, 24: 3001-8, 2006.

THEISE N. D.; PARK Y. N.; KOJIRO M. Dysplastic nodules and hepatocarcinogenesis. **Clin Liver Dis**, v. 6, n. 2, p. 497-512, 2002.

THEISS, A. L. et al. Prohibitin is a novel regulator of antioxidant response that attenuates colonic inflammation in mice. **Gastroenterology**, v. 137, n. 1, p. 199-08, 2009.

THEISS, A. L.; SITARAMAN, S. V. The role and therapeutic potential of prohibitin in disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 6, 2011.

THOMAS, M. B. Systemic and targeted therapy for biliary tract tumors and primary liver tumors. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 23, n. 2, p. 369-81, 2014. doi:10.1016/j.soc.2013.11.004.

TOLEDO, K. A. et al. Neutrophil activation induced by Artin M: release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. **Immunol Lett**, 123: 14–20, 2009.

TORRECILLA, S.; LLOVET, J. M. New molecular therapies for hepatocellular carcinoma. **Clin Res Hepatol Gastroenterol**, v.39, s. 80-5. doi: 10.1016/j.clinre.2015.06.016.

TRETIKOVA, M. S. et al. Genomic and immunophenotypical differences between hepatocellular carcinoma with and without cirrhosis. **Histopathology**. v. 56, n. 6, p. 683-93, 2010.

TROTTA, M. R. **Correlação entre ingestão de Aflatoxina B1, concentração sérica e urinária de AFB1-adutos e expressão hepática de marcadores moleculares relacionados à hepatocarcinogênese em ratos**. 2016. 103 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

TSUDA, H. et al. Different pattern of chromosomal allele loss in multiple hepatocellular carcinomas as evidence of their multifocal origin. **Cancer Res**, v. 52, n. 6, p. 1504-9, 1992.

UEDA, H. et al. Synergism between the hbx gene and aflatoxin B-1 in the development of murine liver-cancer. **Int J Oncol**, v. 7, n. 4, 735-40, 1995.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit Rev Plant Sci**, v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998.

VINCENT, T. L.; GATENBY, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **International Journal of Oncology**, v. 32, p. 729-737, 2008.

VILLAR, S. et al. Aflatoxin-induced TP53 R249S mutation in hepatocellular carcinoma in Thailand: association with tumors developing in the absence of liver cirrhosis. **Plos One**, v. 7, n. 6, p. 1-7, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0037707

WANDER, A. S. et al.: PI3K/mTOR inhibition can impair tumor invasion and metastasis in vivo despite a lack of antiproliferative action in vitro: implications for targeted therapy. **Breast Cancer Res Treat**, v. 156, n. 2, 405-6, 2016. doi: 10.1007/s10549-016-3752-9.

WANG, S. et al. Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. **Oncogene**, v. 21, n. 55, p. 8388-96, 2002. doi: 10.1038/sj.onc.1205944

WILD, C. P.; TURNER, P. C. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. **Mutagenesis**. v. 17, n. 6, p. 471-81, 2002.

WILSON, R. et al. Uptake and vascular transport of ingested aflatoxin. **Toxicol Lett**, v. 29, n. 2-3, p. 169-76, 1985.

WOGAN, G. N.; PAGLIALUNGA, S.; NEWBERNE, P. M. Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B1 in rats. **Food Cosmet Toxicol**, v. 12, n. 5-6, p. 681-5, 1974.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 906, p. i-viii, 1-62, 2002.

WU, H. C.; SANTELLA, R. The role of aflatoxins in hepatocellular carcinoma. **Hepat Mon**, v. 12, n. 10, 2012. doi: 10.5812/hepatmon.7238.

WU, F.; GROOPMAN, J. D.; PESTKA, J. J. Public health impacts of foodborne mcotoxins. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 5, p. 351-72, 2014. doi: 10.1146/annurev-food-030713-092431.

YAMAMOTO, M. et al. Neoplastic hepatocyte growth associated with cyclin D1 redistribution from the cytoplasm to the nucleus in mouse hepatocarcinogenesis. **Mol Carcinog**, v. 45, n. 12, p. 901-13, 2006.

YAMAN, T.; YENER, Z.; CELIK, I. Histopathological and biochemical investigations of protective role of honey in rats with experimental aflatoxicosis. **BMC Complement Altern Med**, v. 16, p. 232, 2016. doi:10.1186/s12906-016-1217-7.

YANG, J. D.; ROBERTS, L. R. Hepatocellular carcinoma: A global view. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 7, n. 8, p. 448-58, 2010.

ZHANG Y. J. et al. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A and p16 and its relationship to aflatoxin B1-DNA adduct levels in human hepatocellular carcinoma. **Mol Carcinog**, v. 35, n. 2, p. 85-92, 2002.

ZHANG, Y. J. et al. Aflatoxin B1 and polycyclic aromatic hydrocarbon adducts, p53 mutations and p16 methylation in liver tissue and plasma of hepatocellular carcinoma patients. **Int J Cancer**, v. 119, n. 5, p. 985-91, 2006.

ZHANG, D. et al. Silencing kinase-interacting stathmin gene enhances erlotinib sensitivity by inhibiting Ser¹⁰ p27 phosphorylation in epidermal growth factor receptor-expressing breast cancer. **Mol Cancer Ther**, v. 9, n. 11, p. 3090-9, 2010.

ZHANG, Y. J. et al. Global hypomethylation in hepatocellular carcinoma and its relationship to aflatoxin B(1) exposure. **World J Hepatol**. v. 4, n. 5, p. 169-75, 2012. doi: 10.4254/wjh.v4.i5.169.

APÊNDICES

Para que os animais fossem intoxicados com 400 µg por quilo de ração ingerida de DMSO 0,5% ou AFB1. Diariamente, a ração era pesada para se avaliar o consumo de ração de um dia para o outro e assim, estipulava-se a dose que cada animal receberia. Ao final dos noventa dias foi possível observar que o consumo médio de ração semanal em cada grupo demonstrou algumas diferenças estatisticamente significativas. Sendo a média de gramas de consumo semanal do grupo Controle ($35,0 \pm 1,07$) superior às dos grupos AFB1 ($33 \pm 0,88$) e AFB1+ArtinM ($33 \pm 0,79$) e $p < 0,01$ (Figuras 20, 21 e Tabela 1 – Apêndice).

Em relação aos valores mínimo e máximo, foi possível observar que na primeira semana de experimento não houve diferença significativa, sendo os valores médios 26g de consumo no grupo Controle e 25g nos grupos que receberam AFB1. No entanto, pode-se observar que ao longo do tratamento os animais do grupo Controle chegaram a atingir uma média de 41g de consumo diário por animal, enquanto que os valores máximos para os outros grupos foram de 35g no grupo AFB1 e 36g no grupo AFB1+ArtinM.

Foi possível observar ainda, que durante as 13 semanas, só não houve diferença de consumo entre os grupos AFB1 e AFB1+ArtinM em duas semanas. Destas 11 semanas que foram encontradas diferenças entre os dois grupos, em sete delas o consumo do grupo AFB1+ArtinM foi superior ao consumo do grupo AFB1.

Figura 20. Consumo médio diário de ração. Representação do consumo de ração de ratos tratados com DMSO (Controle), AFB1 e AFB1+Artinm durante 13 semanas (90 dias) de gavagem. Os valores são expressos em média, $n = 8-9$ animais/grupo.

DATA		/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
CAIXA	Ração sobra (g)											
	Ração colocada (g)											
	peso (g) animal	0										
		1										
		2										
		3										
4												

DATA		/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
CAIXA	Ração sobra (g)											
	Ração colocada (g)											
	peso (g) animal	0										
		1										
		2										
		3										
4												

Figura 21: Formulário utilizado para a realização do controle da quantidade de ração ingerida pelos animais.

Tabela 1: Tabela correlacionando o consumo individual de ração diário em gramas com a dose de AFB1 OU DMSO 0,5% a ser administrada em ml.

Consumo Ração (g)	Dose (ml)	Consumo Ração (g)	Dose (ml)	Consumo Ração (g)	Dose (ml)
15	0,38	25	0,63	35	0,88
15,5	0,39	25,5	0,64	35,5	0,89
16	0,40	26	0,65	36	0,90
16,5	0,41	26,5	0,66	36,5	0,91
17	0,43	27	0,68	37	0,93
17,5	0,44	27,5	0,69	37,5	0,94
18	0,45	28	0,70	38	0,95
18,5	0,46	28,5	0,71	38,5	0,96
19	0,48	29	0,73	39	0,98
19,5	0,49	29,5	0,74	39,5	0,99
20	0,50	30	0,75	40	1,00
20,5	0,51	30,5	0,76	40,5	1,01
21	0,53	31	0,78	41	1,03
21,5	0,54	31,5	0,79	41,5	1,04
22	0,55	32	0,80	42	1,05
22,5	0,56	32,5	0,81	42,5	1,06
23	0,58	33	0,83	43	1,08
23,5	0,59	33,5	0,84	43,5	1,09
24	0,60	34	0,85	44	1,10
24,5	0,61	34,5	0,86	44,5	1,11

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética no Uso de Animais – FMRP - USP

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 127/2013, sobre o projeto intitulado “*Efeito da lectina Artin M na hepatocarcinogênese induzida pela Aflatoxina B1*”, 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 janeiro de 2014.

We certify that the protocol nº 127/2013, entitled “*Effect of Lectin Artin M on hepatocarcinogenesis induced by aflatoxin B1*”, 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 01/27/2014.

Ribeirão Preto, 27 de janeiro de 2014.

A handwritten signature in black ink, belonging to Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto, is positioned above the printed name.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP - USP