

# Revista de Saúde Pública

JOURNAL OF PUBLIC HEALTH

## Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular

### ***Aflatoxins in foodstuffs: current concepts on mechanisms of toxicity and its involvement in the etiology of hepatocellular carcinoma***

Carlos Augusto Fernandes de Oliveira e Pedro Manuel Leal Germano

*Departamento de Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP - Brasil (C.A.F.O.), Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP. São Paulo, SP - Brasil (P.M.L.G.)*

OLIVEIRA, Carlos Augusto Fernandes de, Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. *Rev. Saúde Pública*, 31 (4): 417-24, 1997.

# Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular

## *Aflatoxins in foodstuffs: current concepts on mechanisms of toxicity and its involvement in the etiology of hepatocellular carcinoma*

Carlos Augusto Fernandes de Oliveira e Pedro Manuel Leal Germano

*Departamento de Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP - Brasil (C.A.F.O.), Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP. São Paulo, SP - Brasil (P.M.L.G.)*

### Resumo

Foram revistos os conceitos de maior relevância sobre mecanismos de toxicidade e evidências do envolvimento das aflatoxinas na etiologia do câncer hepático humano. A aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), principal metabólito produzido por fungos do gênero *Aspergillus*, manifesta seus efeitos tóxicos após conversão hepática em AFB<sub>1</sub>-epóxido, o qual reage com macromoléculas celulares, incluindo proteínas, RNA (ácido ribonucléico) e DNA (ácido desoxirribonucléico). A reação com o DNA ocorre através da ligação com guaninas, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53. Em seres humanos, estudos de biomonitoramento individual de derivados AFB<sub>1</sub>-N<sub>7</sub>-guanina tem demonstrado que as aflatoxinas constituem importantes fatores de risco, com uma provável interação sinérgica com o vírus da hepatite B, para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular em populações expostas. Considerando-se a ocorrência freqüente das aflatoxinas em produtos alimentícios, no Brasil, ressalta-se a necessidade de estudos que avaliem criteriosamente o impacto dos níveis de exposição a estas toxinas sobre a saúde humana.

**Carcinoma hepatocelular, etiologia. Aflatoxinas, toxicidade. Alimentos, toxicidade.**

### Abstract

*Current concepts derived from intensive research over the last decade, on biotransformation, mechanisms of toxicity and evidences for the involvement of aflatoxins in the etiology of human liver cancer are summarily presented. Aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>), the main metabolite produced by moulds of genus *Aspergillus*, exerts its effects after conversion to the reactive compound AFB<sub>1</sub>-epoxide, by*

**Correspondência para/Correspondence to:** Pedro Manuel Leal Germano - Av. Dr. Arnaldo, 715 - 01246-904 São Paulo, SP - Brasil.

E-mail: pmlgerma@usp.br

Edição subvencionada pela FAPESP. Processo 96/5999-9.

Recebido em 10.6.1996. Reapresentado em 14.3.1997. Aprovado em 15.4.1997.

*the action of cytochrome P450-dependent enzymes. This epoxide can form derivatives with cellular macromolecules, including proteins, RNA and DNA. The reaction with DNA occurs with guanines in the codon 249 of tumor suppressor gene p53. Primary biotransformation of AFB<sub>1</sub> also produces hydroxylated and less toxic derivatives, such as aflatoxins Q<sub>1</sub> and P<sub>1</sub>. Differences intra and interspecies in the pathways of activation/detoxification are directly related to the susceptibility of animals to aflatoxin effects. In humans, studies of individual biomonitoring of AFB<sub>1</sub> metabolites such as AFB<sub>1</sub>-N<sub>7</sub>-guanine have demonstrated that aflatoxins constitute an important risk factor for hepatocellular carcinoma (HCC) in exposed populations. Some of these studies also show a synergistic action between aflatoxins and the hepatitis B virus in the development of human HCC. In view of these concepts, and taking into account the frequent detection of aflatoxins in Brazilian foodstuffs, the need for investigation into the level of exposure to these toxins and its impact on human health is stressed.*

**Carcinoma, hepatocellular, etiology. Aflatoxins, toxicity. Foods, toxicity.**

## INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos secundários, produzidos por algumas cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, os quais desenvolvem-se naturalmente em produtos alimentícios, como amendoim, milho, feijão, arroz e trigo, entre outros<sup>31</sup>. São conhecidos, atualmente, 17 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub><sup>31</sup>. Estes compostos caracterizam-se pela elevada toxicidade que apresentam. Em saúde animal, várias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos seus efeitos tóxicos agudos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, sendo o fígado o principal órgão atingido<sup>32</sup>. A aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida de G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub><sup>12</sup>. De modo análogo, em saúde pública, as aflatoxinas têm sido identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, conseqüente à ingestão de alimentos contaminados<sup>5,24</sup>. Existem evidências de que outras doenças, como a síndrome de Reye<sup>31</sup> e o kwashiorkor<sup>22</sup>, também são associadas às aflatoxinas.

A hipótese de associação causal entre a ingestão de aflatoxinas e o desenvolvimento de enfermidades humanas continua sendo, ainda hoje, objeto de controvérsias<sup>20</sup>. Mesmo assim, desde a descoberta das aflatoxinas, em 1960, diversos países adotaram limites de tolerância para essas toxinas em produtos destinados ao consumo humano. O Brasil, com base nos conhecimentos então disponíveis, estabeleceu, em 1977, o limite de 30 µg/kg para a soma das frações B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> em qualquer tipo de alimento<sup>6</sup>. Desconhece-se,

contudo, se este valor ainda representa ou não risco significativo para o desenvolvimento do câncer hepático. Na última década, porém, intensas pesquisas contribuíram para melhor caracterizar os possíveis efeitos das aflatoxinas sobre a saúde humana, com destaque para os experimentos sobre a atividade biológica da AFB<sub>1</sub> nas células hepáticas, no âmbito molecular, e sua aplicação em estudos populacionais. No presente artigo faz-se uma revisão dos conceitos de maior relevância derivados dessas pesquisas, bem como as principais evidências da participação das aflatoxinas na etiologia do câncer hepático no homem.

## MECANISMOS DE TOXICIDADE DA AFLATOXINA B<sub>1</sub>

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microsossomais do sistema de funções oxidases mistas<sup>4</sup>. Estas enzimas, pertencentes à superfamília de enzimas do citocromo P-450, constituem parte do processo de detoxificação de uma ampla variedade de xenobióticos no organismo<sup>15</sup>. A biotransformação da AFB<sub>1</sub>, particularmente, tem sido estudada com maior interesse, uma vez que guarda estreita relação com seus mecanismos de ação tóxica.

Existe atualmente consenso, entre grande número de especialistas, de que a AFB<sub>1</sub> é, na realidade, um pró-carcinógeno, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos<sup>4,23,46</sup>. A forma ativada da AFB<sub>1</sub> é o composto identificado como 8,9-óxido de AFB<sub>1</sub>, ou AFB<sub>1</sub>-epóxido (anteriormente denominado AFB<sub>1</sub>-2,3 epóxido), originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula de AFB<sub>1</sub><sup>4</sup>. Este

composto é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas<sup>4</sup>. Estas ligações determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas<sup>23</sup>. A AFB<sub>1</sub>-epóxido pode também ser conjugada enzimaticamente com glutathione reduzida, através de glutathione-S-transferases, constituindo importante via de detoxificação deste composto<sup>21</sup>.

A ligação da AFB<sub>1</sub>-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB<sub>1</sub><sup>23</sup>. A formação de adutos ocorre através da ligação com guaninas da molécula de DNA, na posição N<sub>7</sub>, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53<sup>23</sup>. A ocorrência deste tipo de alteração é característica de vários carcinomas no homem, sobretudo o hepático<sup>7,19,33,36</sup>. Estudos efetuados em fígados de ratos demonstraram que os adutos AFB<sub>1</sub>-N<sub>7</sub>-guanina podem ser retirados após a sua formação, deixando sítios apurínicos na molécula de DNA<sup>23</sup>. Os sítios vagos tendem a ser preenchidos com adenina, resultando em transversão de guanina para timina, o que origina um ponto de mutação bastante significativo<sup>1</sup>. Os adutos de DNA, depois de sofrerem depurinação espontânea, podem ser conjugados e excretados, sobretudo através da urina<sup>18</sup>.

O processo de carcinogênese, fundamentado em trabalhos experimentais, envolve, geralmente, duas fases distintas, a iniciação e a promoção do câncer<sup>19,25</sup>. A fase de iniciação é resultante de alterações mutagênicas nas células, ao passo que a de promoção relaciona-se com a expressão fenotípica das modificações ocorridas na primeira fase<sup>19,25</sup>. Neste contexto, as mutações determinadas pelas aflatoxinas representam alterações genéticas permanentes nas células afetadas, o que possibilita a iniciação do processo cancerígeno<sup>23</sup>.

Os adutos de RNA e de proteínas determinam lesões bioquímicas, as quais devem, provavelmente, estar envolvidas com os mecanismos de toxicidade aguda da AFB<sub>1</sub>, dado que conduzem à morte celular pela inativação de macromoléculas essenciais às células<sup>23</sup>. A formação destes adutos inicia-se com a hidrólise da AFB<sub>1</sub>-epóxido para produzir 8,9-dihidro-8,9-dihidroxi-B<sub>1</sub> (ou B<sub>1</sub>-diol), o qual reage com amino-grupos primários de proteínas, originando bases de Schiff<sup>9</sup>. Os principais adutos de proteínas são formados com albumina, durante a sua síntese nos hepatócitos<sup>9</sup>.

Além da epoxidação, a biotransformação primária da AFB<sub>1</sub> inclui a hidroxilação, para formar as aflatoxinas M<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub> e B<sub>2a</sub>; e, O-demetilação, para formar aflatoxina P<sub>1</sub><sup>4</sup>. Todos estes compostos contêm o grupo hidroxila na molécula, o que permite a conjugação com ácido glicurônico ou sulfatos<sup>4</sup>. Conseqüentemente, são bastante solúveis em água, possibilitando sua rápida excreção através da urina ou bile e, em seguida, nas fezes<sup>4</sup>. Este fato sugere que a formação destes derivados pode constituir parte do processo de detoxificação da AFB<sub>1</sub>, embora alguns produtos, como a aflatoxina M<sub>1</sub>, apresentem, também, toxicidade apreciável em modelos experimentais<sup>23</sup>.

Diversos autores consideram que a potência dos efeitos da AFB<sub>1</sub>, bem como de seus derivados, sobre células ou organismos, depende, entre outros fatores, do balanço integrado entre as múltiplas vias, tanto de ativação metabólica, quanto de detoxificação<sup>15,28,29</sup>. Os padrões de biotransformação da AFB<sub>1</sub> variam consideravelmente entre as espécies animais, e mesmo entre indivíduos da mesma espécie, o que poderia justificar os diferentes graus de susceptibilidade à AFB<sub>1</sub> observados em cada uma delas.

## CARCINOGENICIDADE DA AFLATOXINA B<sub>1</sub>

### Estudos em Animais de Experimentação

A carcinogênese hepática representa o mais importante efeito de toxicidade crônica das aflatoxinas. Esta capacidade tem sido demonstrada extensivamente, sobretudo em relação à AFB<sub>1</sub>, em muitas espécies animais, incluindo peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas<sup>9</sup>. Nestes animais, a AFB<sub>1</sub> induz à formação de carcinoma hepatocelular (CHC), mesmo quando ingerida em quantidades muito baixas, o que permite considerá-la como um dos mais potentes hepatocarcinógenos naturais<sup>12</sup>. Embora o fígado seja o alvo primário, o desenvolvimento de tumores em outros órgãos, como pâncreas e intestino, tem sido observado em animais alimentados com rações contendo aflatoxinas<sup>9</sup>.

Existem inúmeros estudos sobre a carcinogenicidade da AFB<sub>1</sub> em diferentes espécies animais, sendo que diversas revisões encontram-se publicadas<sup>9,12,31,46</sup>. A dose efetiva de AFB<sub>1</sub> ingerida para a indução de tumores hepáticos varia amplamente entre as espécies, de modo similar ao que ocorre em relação à toxicidade aguda. Peixes e aves são extremamente sensíveis, e a dose efetiva para a indução de hepatomas situa-se entre 10 - 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> na dieta<sup>46</sup>. Contudo, a sensibilidade é particularmen-

te variável entre os roedores, sendo que os ratos respondem nos níveis de 15 - 1.000 µg/kg de AFB<sub>1</sub> na dieta, enquanto que certas cepas de camundongos não apresentam nenhuma resposta em doses de até 150.000 µg/kg<sup>46</sup>. Para a maioria das espécies estudadas, a sensibilidade é acentuadamente maior nos machos do que nas fêmeas<sup>46</sup>.

A comparação quantitativa da potência carcinogênica da AFB<sub>1</sub> entre as espécies animais pode ser facilitada pelo cálculo estatístico da dose média para a produção de tumores (DT<sub>50</sub>), pelo método de Gold e col.<sup>16</sup>, expressa em µg/kg p.c./dia.

Tabela 1 - Valores da dose média para a produção de tumores (DT<sub>50</sub>) após ingestão prolongada de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) na dieta, para diversas variedades de animais.

**Table 1** - Values of tumors dose (DT<sub>50</sub>) after prolonged consumption of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), in the diet for different kinds of animals.

| Animal                   | DT <sub>50</sub><br>(µg/kg p.c./dia) |
|--------------------------|--------------------------------------|
| Rato Fisher macho        | 1,3                                  |
| Rato Fisher fêmea        | 7,5                                  |
| Rato Wistar macho        | 5,8                                  |
| Rato Wistar fêmea        | 6,9                                  |
| Rato Porton macho        | 3,1                                  |
| Rato Porton fêmea        | 12,5                                 |
| Camundongo C3H macho     | > 70                                 |
| Camundongo C57B1 macho   | > 70                                 |
| Camundongo Swiss macho   | > 5.300*                             |
| Macaco <i>Rhesus</i>     | 156                                  |
| Macaco <i>Cynomolgus</i> | 848                                  |

Fonte: Wogan<sup>46</sup> (1992).

\* Valor baseado não na dose efetiva, mas no maior nível administrado aos animais, para o qual não foram observados tumores no fígado ou em outros órgãos.

Os valores da DT<sub>50</sub> apresentados na Tabela 1 refletem, entre outros fatores, as diferenças intra e interespecies observadas na biotransformação da AFB<sub>1</sub>, particularmente em relação aos mecanismos de bioativação e detoxificação. Por exemplo, a habilidade de ativar a AFB<sub>1</sub>, para a formação do epóxido, é mais eficiente em preparações enzimáticas de fígado de ratos, do que de primatas, incluindo o homem; por outro lado, observa-se o oposto em relação à capacidade de formação de derivados hidrossolúveis e conseqüente detoxificação da AFB<sub>1</sub><sup>28</sup>.

#### Carcinogenicidade para a Espécie Humana

O CHC é, mundialmente, um dos tipos mais comuns de câncer, apresentando, porém, uma acentuada variação geográfica no que concerne à incidência, com predomínio em alguns países da África, Ásia e ilhas do Pacífico<sup>34</sup>. A incidência do CHC é maior

nos homens do que nas mulheres, predominantemente na faixa etária de 30 - 50 anos<sup>26</sup>. Entre os países com maior incidência, destacam-se Moçambique, Zimbábue, Etiópia, China (costa sudoeste) e Taiwan<sup>26</sup>. Os países com incidência intermediária incluem Swazilândia, Transkei, Japão e os da parte central e sudoeste da Europa<sup>26</sup>.

As diferenças extremas observadas na incidência do CHC entre os diversos países sugerem o envolvimento de fatores ambientais em sua etiologia. Dentre os fatores identificados, os que apresentam maior importância são as aflatoxinas e o vírus da hepatite B (HBV)<sup>19</sup>.

Diversos autores têm reportado à presença de aflatoxinas no soro<sup>30</sup> e em biópsias de fígado de pacientes com câncer hepático<sup>13</sup>. Entretanto, a hipótese de que a ingestão de aflatoxinas constitui fator de risco para o CHC no homem é melhor amparada por evidências experimentais e epidemiológicas. As experimentais derivam da extrapolação para o homem, dos resultados obtidos em estudos de biotransformação, mutagenicidade e carcinogenicidade em animais e em preparações *in vitro*<sup>29</sup>. As evidências epidemiológicas resultam de estudos efetuados em áreas geográficas onde a contaminação de alimentos por aflatoxinas e o CHC são freqüentes<sup>5,8</sup>. Os resultados de alguns desses trabalhos, onde se constatou uma forte associação estatística entre a incidência de câncer hepático e o grau de exposição às aflatoxinas, são apresentados na Tabela 2. Esta associação é mais evidente em indivíduos do sexo masculino<sup>8</sup>.

Com base nos estudos disponíveis, a "International Agency for Research on Cancer" (IARC)<sup>24</sup> concluiu, em 1987, que existiam evidências suficientes para considerar a AFB<sub>1</sub> como fator etiológico do câncer hepático em populações humanas.

A análise global dos dados sobre a ingestão de aflatoxinas *versus* incidência do CHC, pelo método de Gold e col.<sup>16</sup>, forneceu, de acordo com Wogan<sup>46</sup> (1992), uma DT<sub>50</sub> igual a 132 µg/kg p.c./dia. Este valor está próximo da DT<sub>50</sub> observada em algumas espécies de primatas, porém, é consideravelmente superior às das espécies de roedores mais sensíveis (Tabela 1). Ao comparar esses valores, entretanto, deve-se ressaltar que a DT<sub>50</sub> para o homem é teórica, uma vez que, para o seu cálculo, foram assumidas várias condições, entre elas, a de que a AFB<sub>1</sub> seja a única causa do CHC e que a exposição a este carcinógeno tenha ocorrido continuamente durante cerca de 50 anos da vida do indivíduo<sup>46</sup>.

Apesar da consistência dos dados apresentados na Tabela 2, não existe, até o presente, uma caracte-

Tabela 2 - Relação entre a ingestão de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), excluídas outras causas, e a incidência de CHC, em países da África e Ásia.

**Table 2** - Relation between the consumption of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), and the incidence of hepatocellular carcinoma (CHC), in counties of Africa and Asia.

| País                       | Ingestão de AFB <sub>1</sub><br>(µg/kg p.c./dia) | Incidência do CHC<br>(por 100.000/ano) | Fonte                                    |
|----------------------------|--|--|--|
| Kenia                      | 3,5  | 1,2                                    | Linsell & Peers <sup>27</sup> (1977)     |
|                            | 5,9  | 2,5                                    |  |
|                            | 10,0   | 4,0                                    |  |
| Moçambique                 | 20,3   | 5,9                                    | Van Rensburg e col. <sup>42</sup> (1985) |
|                            | 38,6   | 5,0                                    |  |
|                            | 77,7   | 12,1                                   |  |
|                            | 86,9   | 9,0                                    |  |
|                            | 87,7   | 15,5                                   |  |
|                            | 131,4  | 17,7                                   |  |
|                            | 183,7  | 14,0                                   |  |
| Swazilândia                | 11,4   | 5,7                                    | Peers e col. <sup>35</sup> (1987)        |
|                            | 14,3   | 2,9                                    |  |
|                            | 18,6   | 6,1                                    |  |
|                            | 32,9   | 11,1                                   |  |
|                            | 38,6   | 5,7                                    |  |
|                            | 40,0   | 9,2                                    |  |
|                            | 42,9   | 19,6                                   |  |
|                            | 72,9   | 23,7                                   |  |
| República Popular da China | 127,1  | 22,4                                   | Yeh e col. <sup>48</sup> (1989)          |
|                            | 158,6  | 24,9                                   |  |
|                            | 21,0   | 175,4                                  |  |
|                            | 157,0  | 182,2                                  |  |
| Transkei                   | 1.232,0  | 288,5                                  | Van Rensburg e col. <sup>43</sup> (1990) |
|                            | 3.545,0  | 613,5                                  |  |
|                            | 5,1  | 5,3                                    |  |
| Transkei                   | 18,0   | 3,2                                    | Van Rensburg e col. <sup>43</sup> (1990) |
|                            | 19,6   | 9,0                                    |  |
|                            | 23,2   | 10,3                                   |  |

rização completa da relação dose-resposta para as aflatoxinas no homem. Isto se deve, entre outras causas, ao fato de que, nos estudos epidemiológicos, o grau de exposição não é preciso, uma vez que foi estimado a partir dos níveis de contaminação por AFB<sub>1</sub> na dieta das populações, e não na dose efetivamente ingerida individualmente, tal como ocorre em animais submetidos à experimentação<sup>5</sup>.

De acordo com Stoloff<sup>41</sup> (1987), a comprovação científica do envolvimento das aflatoxinas na etiologia do câncer hepático, no homem, é dificultada pelo fato de que, em sua grande maioria, os estudos epidemiológicos foram realizados em áreas onde a infecção pelo HBV é endêmica e, também, correlacionada à incidência do CHC. Esta afirmativa encontra respaldo em alguns estudos posteriores, como o efetuado por Cambpbell e col.<sup>10</sup> (1990), os quais não observaram relação entre a ingestão de aflatoxinas e a mortalidade por CHC em 48 áreas da República Popular da China, ao contrário da prevalência de portadores do antígeno de superfície da

hepatite B (HBsAg), a qual revelou-se fortemente associada ao CHC. Esse trabalho, entretanto, foi severamente criticado por Wild e Montesano<sup>45</sup> (1991), notadamente em relação à metodologia empregada para estimar o grau de exposição dos indivíduos às aflatoxinas.

O HBV é considerado o principal fator de risco para o câncer hepático em certas populações, como a de Taiwan. Nesse país, estudos prospectivos demonstraram que existe uma alta incidência do CHC em portadores de HBV<sup>3</sup>. Inversamente, em estudos clínicos, grande parte dos pacientes com CHC revelaram-se HBsAg seropositivos<sup>2</sup>. Sequências do vírus HBV têm sido encontradas no genoma de hepatócitos de pacientes com CHC, embora esta integração não constitua componente obrigatório do câncer hepático ou da hepatite crônica<sup>46</sup>.

As conclusões da IARC, porém, foram bastante favorecidas a partir do final da década de 80, pelos resultados obtidos em estudos de biomonitoramento individual de adutos de AFB<sub>1</sub> com proteínas e DNA

em populações expostas, sobretudo na China. Isto possibilitou uma quantificação mais precisa do grau de exposição às aflatoxinas. Groopman e col.<sup>17</sup> (1988) concluíram que, no homem, cerca de 1 - 2% da AFB<sub>1</sub> ingerida liga-se covalentemente à albumina plasmática, e que a dosagem destes adutos evidencia exposição à AFB<sub>1</sub> ao longo de aproximadamente 20 dias.

Wild e col.<sup>44</sup> (1990) pesquisaram a presença de adutos de albumina plasmática em adultos e crianças de vários países, como Kenia, Senegal, Gâmbia e Uganda, observando positividade entre 12 - 100% das amostras. Na Tailândia, os níveis destes adutos foram menores, sendo que nenhuma amostra foi positiva entre indivíduos da Polônia e França. Esses resultados são compatíveis com as incidências do CHC nos países citados.

Estudos experimentais demonstraram que a formação de adutos AFB<sub>1</sub>-DNA é diretamente proporcional à dose de AFB<sub>1</sub> ingerida, e à indução de tumores hepáticos em animais expostos<sup>11</sup>. Com relação a seres humanos, Groopman e col.<sup>18</sup> (1992) observaram uma alta correlação entre a ingestão total de AFB<sub>1</sub> e a excreção urinária total de adutos AFB<sub>1</sub>-N<sub>7</sub>-guanina. Com base nestes fatos, Ross e col.<sup>37</sup> (1992), em estudo prospectivo realizado em Shangai, República Popular da China, evidenciaram que a exposição às aflatoxinas potencializou o risco de câncer hepático associado ao HBV. Os autores observaram que o risco relativo para os indivíduos com seropositividade para o HBsAg, e com presença de adutos AFB<sub>1</sub>-N<sub>7</sub>-guanina na urina, foi de 60,1; em contraste, o risco relativo para os indivíduos com seropositividade para o HBsAg, e com ausência de adutos e outros derivados da AFB<sub>1</sub> na urina, foi de 4,8.

Apesar da intensa discussão sobre este assunto, a tendência atual entre os pesquisadores, de modo geral, é considerar a etiologia do câncer hepático como multifatorial, com uma provável interação sinérgica entre as aflatoxinas, atuando como iniciadoras do processo cancerígeno, e o HBV, o qual teria um efeito promotor sobre o desenvolvimento do tumor (fenótipo transformado)<sup>19,46,48</sup>. Cova e col.<sup>14</sup> (1990), experimentalmente, observaram ação sinérgica

entre a AFB<sub>1</sub> e o vírus da hepatite B de patos (DHBV), no desenvolvimento de hepatomas em animais expostos a ambos os fatores. Este mesmo efeito foi constatado por Sell e col.<sup>40</sup> (1991), com relação a camundongos transgênicos, ou seja, com seqüências do HBV no genoma, expostos à ingestão de AFB<sub>1</sub>.

No Brasil, apesar da legislação em vigor, a ocorrência de aflatoxinas tem sido observada com frequência, e em altos níveis, principalmente no Estado de São Paulo, em alimentos utilizados para consumo humano e animal, como, milho<sup>38</sup>, amendoim e derivados<sup>39</sup>. A contaminação de derivados de amendoim, como paçocas e outros doces, assume destacada relevância em saúde pública, dado que as crianças constituem os principais consumidores desses produtos. Contudo, não existem estimativas acerca do grau de exposição da população através da ingestão de alimentos contaminados. Desconhece-se, também, o impacto das aflatoxinas sobre a incidência do CHC ou outras doenças, em nossas condições.

Tendo em vista os conceitos apresentados, bem como os princípios básicos para a avaliação do risco à saúde representado por contaminantes químicos em alimentos<sup>47</sup>, considera-se fundamental a realização, no Brasil, de estudos sobre:

- a mensuração dos níveis de exposição da população às aflatoxinas, mediante a utilização de técnicas atuais de biomonitoramento de derivados metabólicos da AFB<sub>1</sub>;
- a avaliação dos níveis de exposição encontrados, à luz dos conhecimentos disponíveis, particularmente em relação à atividade biológica da AFB<sub>1</sub> em células humanas;
- a contribuição das aflatoxinas para a incidência do CHC na população, considerando-se os níveis de exposição através dos alimentos contaminados, excluídas outras possíveis causas, como o HBV.

O esclarecimento dessas questões poderá contribuir para uma melhor caracterização do risco à saúde humana representado pelo consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas, bem como orientar a revisão e a elaboração de normas legais de tolerância para essas toxinas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUILLAR, F.; HUSSAIN, S.P.; CERUTTI, P. Aflatoxin B<sub>1</sub> induces the transversion of G→T in códon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**: 8586-90, 1993.
2. BEASLEY, R.P. Hepatitis B virus: the major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **61**: 1942-56, 1988.
3. BEASLEY, R.P.; HWANG, L.Y.; LIN, C.C.; CHIEN, C.S. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22.707 men in Taiwan. *Lancet*, **2**: 1129-33, 1981.
4. BIEHL, M.L. & BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. *J. Food Protec.*, **50**: 1058-73, 1987.
5. BOSCH, F.X. & PEERS, F. Aflatoxins: data on human carcinogenic risk. In: O'Neill, I.K.; Chen, J.; Bartsch, H., ed. *Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins*. Lyon, IARC, 1991. p.48-53. (IARC Scientific Publications, 105).
6. BRASIL. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 34/76; fixa limites de tolerância para as aflatoxinas em alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 19 jan. 1977. Seção I, p.710.
7. BRESSAC, B.; KEW, M.; WANDS, J.; OZTURK, M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, **350**: 429-31, 1991.
8. BRUCE, R.D. Risk assessment for aflatoxin. II. Implications of human epidemiology data. *Risk Anal.*, **10**: 561-9, 1990.
9. BUSBY, W.F. & WOGAN, G.N. Aflatoxins. In: Searle, C.E., ed. *Chemical carcinogens*. 2nd ed. Washington, American Chemical Society, 1984. v.2., p.945-1136.
10. CAMPBELL, T.C.; CHEN, J.; LIU, C.; LI, J.; PARPIA, B. Nonassociation of aflatoxin with primary liver cancer in a cross-sectional ecological survey in the People's Republic of China. *Cancer Res.*, **50**: 6882-93, 1990.
11. CHOY, W.N. A review of the dose-response induction of DNA adducts by aflatoxin B<sub>1</sub> and its implications to quantitative cancer-risk assessment. *Mutat. Res.*, **296**: 181-98, 1993.
12. COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P. & Salunkhe, D.K. *Mycotoxins and phytoalexins*. Boca Raton, CRC Press, 1991. p.103-43.
13. COULTER, J.B.S. Aflatoxins in liver biopsy from Sudanese children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**: 365-7, 1986.
14. COVA, L.; WILD, C.P.; MEHROTRA, R.; TURUSOV, V.; SHIRAI, T.; LAMBERT, V.; JACQUET, C.; TOMATIS, L.; TRÉPO, C.; MONTESANO, R. Contribution of aflatoxin B<sub>1</sub> and hepatitis B virus infection in the induction of liver tumors in ducks. *Cancer Res.*, **50**: 2156-63, 1990.
15. FORRESTER, L.M.; NEAL, G.E.; JUDAH, D.J.; GLANCEY, M.J.; WOLF, C.R. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism in human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**: 8306-10, 1990.
16. GOLD, L.S.; SAWYER, C.B.; MAGAW, R.; BLACKMAN, G.M.; DE VECIANA, M.; LEVINSON, R.; HOOPER, N.K.; HAVENDER, W.R.; BERNSTEIN, L.; PETO, R.; PIKE, M.C.; AMES, B.N. A carcinogenic potency database of the standardized results of animal bioassays. *Environ. Health Perspect.*, **58**: 9-322, 1984.
17. GROOPMAN, J.D.; CAIN, L.G.; KENSLER, T.W. Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **19**: 113-45, 1988.
18. GROOPMAN, J.D.; JIAQI, Z.; DONAHUE, P.R.; PIKUL, A.; LISHENG, Z.; JUN-SHI, C.; WOGAN, G.N. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi Autonomous region, People's Republic of China. *Cancer Res.*, **52**: 45-52, 1992.
19. HARRIS, C.C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.*, **51**(Suppl.): 5023s-44s, 1991.
20. HARRISON, J.C.; CARVAJAL, M.; GARNER, R.C. Does aflatoxin exposure in the United Kingdom constitute a cancer risk? *Environ. Health Perspect.*, **99**: 99-105, 1993.
21. HAYES, J.D.; JUDAH, D.J.; MCLELLAN, L.I.; NEAL, G.E. Contribution of the glutathione-S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B<sub>1</sub>. *Pharmacol. Ther.*, **50**: 443-72, 1991.
22. HENDRICKSE, R.G. Kwashiorkor: the hypothesis that incriminates aflatoxins. *Pediatrics*, **88**: 376-9, 1991.
23. HSIEH, D.P.H.; ATKINSON, D.N. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **283**: 525-32, 1991.
24. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. *Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1 to 2*. Lyon, World Health Organization, 1987. p.83-7. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Supplement 7).
25. KALDOR, J.M. & BOSCH, F.X. Multistage theory of carcinogenesis: the epidemiological evidence for liver cancer. *Bull. Cancer*, **14**: 163-74, 1991.
26. KEEHN, D.M. & FRANK-STROMBORG, M. A worldwide perspective on the epidemiology and primary prevention of liver cancer. *Cancer Nurs.*, **14**: 163-74, 1991.
27. LINSELL, C.A. & PEERS, F.G. Aflatoxin and liver cell cancer. *Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **71**: 471-3, 1977.
28. MASSEY, T.E.; STEWART, R.K.; DANIELS, J.M.; LIU, L. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B<sub>1</sub> carcinogenicity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **208**: 213-27, 1995.
29. McLEAN, M. & DUTTON, M.F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacol. Ther.*, **65**: 163-92, 1995.
30. OLUBUYIDE, I.O. The natural history of primary liver cell carcinoma: a study of 89 untreated adult Nigerians. *Cent. Afr. J. Med.*, **38**: 25-30, 1992.

31. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. *Micotoxinas*. Washington, 1983. (Critérios de Salud Ambiental, 11).
32. OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: what role do fungal toxins play in illness and production losses? *Vet. Med.*, **85**: 89-94, 1990.
33. OZTURK, M. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet*, **338**: 1356-9, 1991.
34. PARKIN, D.M.; STJERNSWÄRD, J.; MUIR, C.S. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. *Bull. World Health Organ.*, **62**: 163-82, 1984.
35. PEERS, F.G.; BOSCH, F.X.; KALDOR, J.; LINSELL, A.; PLUIJMEN, M. Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland. *Int. J. Cancer*, **39**: 545-53, 1987.
36. PUISIEUX, A.; LIM, S.; GROOPMAN, J.; OZTURK, M. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer Res.*, **51**: 6185-9, 1991.
37. ROSS, R.K.; YUAN, J.M.; YU, M.C.; WOGAN, G.N.; QUIAN, G.S.; TU, J.T.; GROOPMAN, J.D.; GAO, Y.T.; HENDERSON, B.E. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet*, **339**: 943-6, 1992.
38. SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E.I.; PEDROSO, M.O.; GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins in maize in Brazil. Part II. *Food Addit. Contam.*, **6**: 327-31, 1989.
39. SABINO, M.; ZORZETTO, M.A.; PEDROSO, M.O.; MILANEZ, T.V. Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de São Paulo, no período de 1980 a 1987. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **49**: 41-4, 1989.
40. SELL, S.; HUNT, J.M.; DUNSFORD, H.A.; CHISARI, F.V. Synergy between hepatitis B virus expression and chemical hepatocarcinogens in transgenic mice. *Cancer Res.*, **51**: 1278-85, 1991.
41. STOLOFF, L. Carcinogenicity of aflatoxins. *Science*, **237**: 1283-4, 1987.
42. VAN RENSBURG, S.J.; COOK-MOZAFFARI, P.; VAN SCHALKWIK, D.J.; VAN DER WATT, J.J.; VINCENT, T.J.; PURCHASE, I.F. Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. *Br. J. Cancer*, **51**: 713-26, 1985.
43. VAN RENSBURG, S.J.; VAN SCHALKWIK, G.C.; VAN SCHALKWIK, D.J. Primary liver cancer and aflatoxin intake in Transkei. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, **10**: 11-6, 1990.
44. WILD, C.P.; JIANG, Y.-Z.; ALLEN, S.J.; JANSEN, L.A.M.; HALL, A.J.; MONTESANO, R. Aflatoxin-albumin adducts in sera from different regions of the world. *Carcinogenesis*, **11**: 2271-4, 1990.
45. WILD, C.P.; MONTESANO, R. Correspondence re: T. Colin Campbell e col., Nonassociation of aflatoxin with primary liver cancer in a cross-sectional ecological survey in the People's Republic of China. *Cancer Res.*, **51**: 3825-7, 1991.
46. WOGAN, G.N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **374**: 123-37, 1992.
47. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food*. Geneva, 1987. (Environmental Health Criteria, 70).
48. YEH, F.S.; YU, M.C.; MO, C.C.; CHI-CHUN; LUO, S.; TONG, M.J.; HENDERSON, B.E. Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in Southern Guangxi, China. *Cancer Res.*, **49**: 2506-9, 1989.