

# La exposición a la aflatoxina B<sub>1</sub> en animales de laboratorio y su significado en la salud pública

Doralinda Guzmán de Peña, Dra en Genética y Biología Molecular.<sup>(1)</sup>

Guzmán de Peña D.  
La exposición a la aflatoxina B<sub>1</sub> en animales de laboratorio y su significado en la salud pública.  
Salud Publica Mex 2007;49:227-235.

## Resumen

En México se ha detectado la presencia AFB<sub>1</sub> en humanos: como mutación en el gene p53 en hepatocarcinomas de pacientes de Monterrey, Nuevo León, México, en 1996 y como aducto AFB<sub>1</sub>-lisina en suero de pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social de Matamoros, Tamaulipas, México, en 2003. La aflatoxina B<sub>1</sub> ha sido clasificada por la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer como un agente carcinogénico para humanos. Este compuesto es un contaminante natural encontrado en alimentos y es sintetizado por *Aspergillus flavus* y/o *A. parasiticus* cuando estos hongos crecen en diversos productos alimenticios. Considerando el riesgo que este compuesto representa para los seres humanos, en el presente artículo se revisa y analiza, a nivel molecular, su capacidad carcinogénica, mutagénica y tóxica y se ilustra su relación causal con hepatocarcinomas en humanos. Se destaca que la capacidad carcinogénica y mutagénica están determinadas por la AFB<sub>1</sub>-formamidopirimidina, la cual causa errores en las transcripciones del ADN. Los resultados ilustran que la población mexicana está consumiendo alimentos con bajas concentraciones de AFB<sub>1</sub>. La toxicidad es consecuencia de la acción carcinogénica en el hígado.

Palabras clave: micotoxina; hepatocarcinoma; carcinogénico; mutagénico; aducto AFB<sub>1</sub>-lisina; mutación p53

Guzmán de Peña D.  
Exposure to aflatoxin B<sub>1</sub> in experimental animals and its public health significance.  
Salud Publica Mex 2007;49:227-235.

## Abstract

The presence of AFB<sub>1</sub> in human beings was detected in Mexico in 1996 both as a mutation of the gene p53 in hepatocellular carcinomas in Monterrey, Mexico, and as the adduct AFB<sub>1</sub>-lysine in serum from patients in Matamoros, Mexico in 2003. Aflatoxin B<sub>1</sub> has been classified as a carcinogenic agent to humans by the International Agency for Research on Cancer. The compound is a natural contaminant produced by *Aspergillus flavus* and/or *A. parasiticus* when these fungi grow on different food products. At the molecular level, this review covers the carcinogenic, mutagenic and toxic properties of these mycotoxins and their risk to humans. It also gives insight into the causal relationship between aflatoxins and hepatocellular carcinoma. Information is provided about AFB<sub>1</sub>-formamidopyrimidine, which is a determinant of the carcinogenic and mutagenic capabilities. The results suggest that the Mexican population ingests food containing low amounts of AFB<sub>1</sub>. Analyses is presented of AFB<sub>1</sub> toxicity, which is a consequence of the carcinogenic activity in liver cells.

Key words: mycotoxin; carcinogenic; mutagenic; AFB<sub>1</sub>-lysine adduct; p53 mutation

(1) Laboratorio de Micotoxinas, Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Campus Guanajuato, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Irapuato, Guanajuato. México.

Solicitud de sobretiros: Dra. Doralinda Guzmán de Peña. Departamento de Biotecnología y Bioquímica.  
CINVESTAV-Campus Guanajuato. Apdo Postal 629. Irapuato, Guanajuato, México.  
Correo electrónico: dguzman@ira.cinvestav.mx

La aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) es sintetizada durante el metabolismo secundario de algunas cepas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* y *A. pseudotamarii*<sup>1, 2</sup> cuando estos hongos crecen en cereales, oleaginosas y alimentos procesados bajo condiciones ambientales favorables, como se ha descrito en diferentes revisiones.<sup>3-5</sup> La contaminación puede ocurrir cuando los cultivos están en el campo (pre-cosecha) o durante la cosecha y el almacenamiento. En Estados Unidos la mayor preocupación es la contaminación pre-cosecha, en cambio en países en desarrollo el mayor interés reside en la contaminación durante el almacenamiento.<sup>6-8</sup>

Esta micotoxina se sintetiza por la ruta metabólica de los policétidos y las reacciones involucradas incluyen condensación, oxidación, reducción, alquilación y halogenación, llevando a la formación de una molécula que consiste en un anillo cumarín unido a una unidad bisdihidrofurano y a una ciclopentanona.<sup>9</sup> Estos metabolitos se forman por la condensación del acetyl-coenzima A y malonil coenzima A, dando lugar al acetyl-S Coenzima A, la cual será la molécula iniciadora de la AFB<sub>1</sub>.<sup>10</sup> Dentro de la vía biosintética, la formación de la versicolorina A es particularmente relevante, ya que es la primera molécula en la vía de la AFB<sub>1</sub> que contiene un doble enlace en la posición 8,9 de la molécula del bisfurano. Este doble enlace es el blanco para la activación de una molécula altamente reactiva.<sup>3</sup>

Durante la síntesis ocurren al menos 23 reacciones enzimáticas y se han identificado 15 intermediarios, bien definidos estructuralmente.<sup>11</sup> Los 25 genes involucrados en la mayoría de los pasos de inter conversión han sido secuenciados, confirmados por disrupción génica y por estudios enzimáticos, están agrupados en una región del ADN de 70-kb y su nomenclatura ha sido propuesta por Yu y colaboradores.<sup>11</sup>

La AFB<sub>1</sub> ha despertado un gran interés, debido a que existen suficientes datos experimentales que indican que esta aflatoxina tiene actividad tóxica, carcinogénica y mutagénica en animales experimentales, además diversos estudios epidemiológicos indican que la AFB<sub>1</sub> está involucrada en la incidencia de neoplasias gastrointestinales y hepáticas en países de África, Filipinas y China.<sup>12</sup> Aunado a esto, el Instituto Internacional de Investigación en Cáncer, ha clasificado a la AFB<sub>1</sub> como un carcinógeno Clase 1. En este grupo están considerados los agentes que son carcinogénicos para los seres humanos.<sup>13</sup> Existen datos del importante papel que la aflatoxina B<sub>1</sub> tiene en la etiología de cáncer hepático, sobre todo en aquellos individuos que son portadores del antígeno del virus de la hepatitis B.<sup>14</sup> Finalmente, la exposición a las aflatoxinas se ha asociado con desórdenes en el crecimiento, como enanismo en niños pequeños.<sup>15</sup>

Considerando la importancia de la exposición de los humanos a este compuesto, el presente artículo revisa la carcinogenicidad, mutagenicidad y toxicidad de la AFB<sub>1</sub>. La correlación de la ingestión de alimentos contaminados con AFB<sub>1</sub> y la salud humana, así como datos de esta correlación en algunos países africanos y se presentan datos obtenidos en México.

### Activación de la AFB<sub>1</sub>

Para que la acción tóxica de la aflatoxina ocurra es necesario que ésta tenga un cambio metabólico, el cual ocurre cuando la AFB<sub>1</sub> llega al hígado de los seres que la ingieren. Dicho cambio ocurre en las células hepáticas, en la función microsomal citocromo P-450 y participa el O<sup>2</sup>- y las enzimas dependientes del NADPH localizadas en el retículo endoplásmico de las células.<sup>16</sup> Durante la fase I del metabolismo de AFB<sub>1</sub> las formas de citocromo P-450 involucradas en la bioactivación de la aflatoxina B<sub>1</sub> son: IA2, IIA3, IIB7, IIIA3 y IIIA4.<sup>17-19</sup> Estos autores evaluaron la habilidad de 12 citocromos P450 de humanos, para activar AFB<sub>1</sub>, midiendo la producción de revertantes His de *Salmonella typhimurium* en el ensayo de Ames y determinaron que cinco de ellos activan la aflatoxina. Ellos establecen que en la activación metabólica de AFB<sub>1</sub> por el hígado humano participan formas múltiples de citocromo P450.<sup>17</sup> Vale la pena mencionar que Forrester y colaboradores,<sup>20</sup> analizaron la variabilidad individual de los caminos de activación o detoxificación de AFB<sub>1</sub> en 19 muestras de hígado humano, ellos encontraron una correlación entre la expresión de P450III A3/P450III A4 y el metabolismo de AFB<sub>1</sub>, esto debido principalmente a la alta concentración y no porque sean los únicos P450 con la capacidad de metabolizar el sustrato.<sup>20</sup> La velocidad de generación de este metabolito activo es dependiente de la dosis, con la fracción del metabolito representado por el 8,9-epóxido, el cual aumenta cuando la dosis de aflatoxina disminuye.<sup>19, 21</sup> El producto final de la Fase I es el compuesto AFB<sub>1</sub> exo-8,9-epóxido (figura 1), el cual es altamente inestable y se une con alta afinidad a la guanina reaccionando covalentemente con el ADN para formar aductos responsables del efecto carcinogénico y mutagénico de las aflatoxinas.<sup>22, 23</sup> En este proceso metabólico también se originan dos metabolitos hidroxilados: la aflatoxina Q<sub>1</sub> y la aflatoxina M<sub>1</sub>, las cuales son menos tóxicas que el compuesto parental.<sup>24</sup>

El aducto identificado como el 8,9 dihidro-8-(N<sup>7</sup>-guanil)-9-hidroxi-aflatoxina B<sub>1</sub><sup>24</sup> (AFB<sub>1</sub>-ADN) (figura 1b), es el que más se forma tanto in vitro como in vivo.<sup>25, 26</sup> Este aducto, AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Guanidina no es removido del ADN, pero su anillo imidazol se abre y forma una molécula más estable química y biológicamente, la AFB<sub>1</sub>-formamidopirimidina (AFB<sub>1</sub>-FAPY) (figura 1c),

la cual causa errores en las transcripciones subsecuentes del ADN.<sup>26,27</sup>

La forma de resonancia del epóxido hidroxilado (8,9-dihidro-8,9 dihidroxi AFB<sub>1</sub>) se oxida al dialdehído y se condensa con el grupo amino epsilon de la lisina. Este aducto es una base de Schiff, la cual sufre un rearrreglo Amadori para formar una alfa-aminocetona.<sup>16</sup> Este aducto de AFB<sub>1</sub>-albúmina modifica la estructura de la AFB<sub>1</sub> reteniendo sólo los anillos cumarin y ciclo-pentanona del compuesto parental. La hemoglobina se une al 8,9 epóxido en concentraciones muy bajas,<sup>29</sup> en cambio la albúmina del suero se une a la AFB<sub>1</sub> en una concentración mayor, del 1 al 3 % de una dosis de AFB<sub>1</sub> se une a la albúmina del suero después de 24 horas de

haberse inyectado en ratas.<sup>30</sup> El aducto AFB<sub>1</sub>-Lisina tiene una vida media igual a la de la albúmina (20 días), lo que ha permitido que este compuesto se utilice como un marcador biológico para medir la exposición humana a la AFB<sub>1</sub>.<sup>30-32</sup> La concentración alta del AFB<sub>1</sub>-lisina en suero indica una ingestión crónica de la AFB<sub>1</sub>, en cambio concentraciones bajas pueden indicar una sola exposición.<sup>31,33</sup>

La fase II del metabolismo de AFB<sub>1</sub> incluye aquellas reacciones de conjugación enzimática que inactivan al 8,9 epóxido. Este epóxido puede hidrolizarse a 8,9 dihidrodiol, lo cual ocurre espontáneamente, y éste puede conjugarse con glutatión para formar AFB<sub>1</sub>-SG.<sup>34</sup> Este compuesto se forma por la acción catalítica de una familia

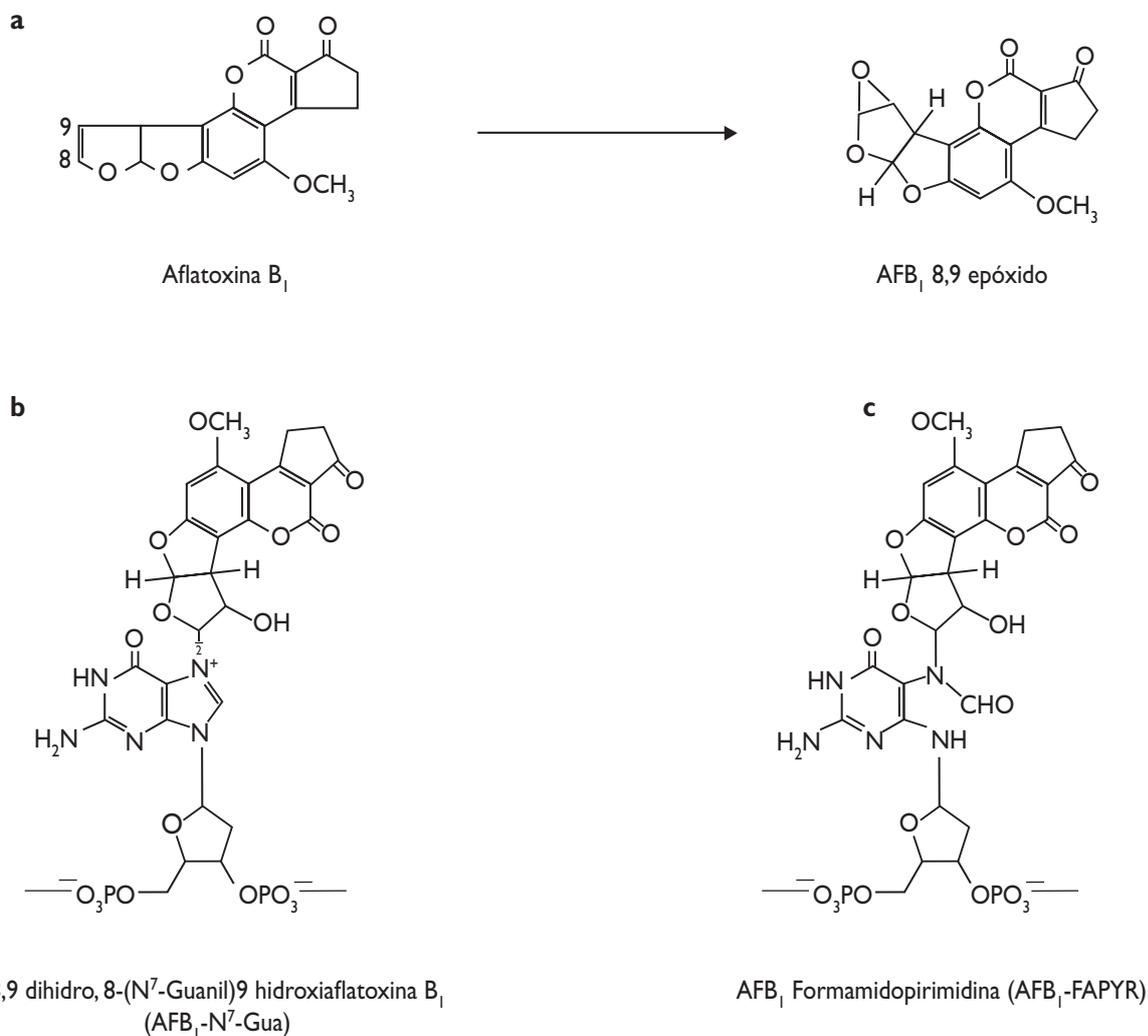


FIGURA I. ESTRUCTURA DE LAS FORMAS ACTIVAS DE AFB<sub>1</sub><sup>22</sup>

de isoenzimas glutatión S-transferasas (GTS). El conjugado AFB-SG es el metabolito biliar más abundante, existe evidencia de que estos compuestos son excretados en orina de diferentes organismos. La utilización de antioxidantes en la dieta, los cuales aumentan los niveles de GTS, han mostrado una mayor eliminación de AFB-SG en la orina de los animales tratados.<sup>16</sup> De ahí que el tipo de dieta de una población podría ser determinante en su respuesta a la ingestión de alimentos contaminados con AFB<sub>1</sub>. Como consecuencia de las reacciones enzimáticas que se llevan a cabo en el hígado se forman la AF-M<sub>1</sub>, AF-Q<sub>1</sub>, AF-P<sub>1</sub>, estas formas hidroxiladas se pueden conjugar con sulfatos o ácido glucurónico para formar ésteres de sulfato o glucurónicos que son excretados por orina o en bilis.<sup>16,32</sup> El aflatoxol se forma por la acción de una reductasa en el citosol, a partir de la aflatoxina B<sub>1</sub>, y el compuesto se reoxida a aflatoxina B<sub>1</sub>.<sup>35</sup>

### Efecto carcinogénico

La molécula AFB<sub>1</sub>-8,9 epóxido es la responsable de la actividad carcinogénica y mutagénica de la aflatoxina B<sub>1</sub>. Debido a su unión con el N<sup>7</sup>-de la Guanina del ADN y la inducción de una carga positiva en el imidazol, lo cual da lugar a un derivado de anillo abierto: la formamidopirimidina (AFB<sub>1</sub>-FAPY). Este compuesto puede estar presente por más de una ronda de replicación del ADN, y se sugiere que es muy importante durante la iniciación del tumor, ya que da lugar a una mutación de G → T en la tercera base del codón 249 del gen p53. La persistencia del aducto AFB<sub>1</sub>-FAPY en tejido hepático y la formación de tumores se ha demostrado en varios modelos experimentales.<sup>28</sup> La unión de estas moléculas in vivo es una función lineal de la dosis a un tiempo dado, después del tratamiento con AFB<sub>1</sub>. El nivel de ADN modificado depende de la especie, se ha reportado que en el hígado de rata de 125 a 1100 residuos de aflatoxina modificaron 10<sup>7</sup> nucleótidos después de haber inyectado intraperitonealmente 0.125-1.0 mg de AFB<sub>1</sub>/kg, en cambio en trucha arcoíris sólo de 1-6 residuos de aflatoxina modificaron 10<sup>7</sup> nucleótidos.<sup>36</sup>

Se ha demostrado que el hígado es el órgano que más aductos AFB<sub>1</sub>-ADN acumula, ratas Fischer 344 expuestas a una sola dosis de AFB<sub>1</sub> (1 mg/kg) mostraron la mayor acumulación en hígado. En general un nivel alto de aducto de AFB<sub>1</sub>-ADN se correlaciona con alta susceptibilidad de especie a la AFB<sub>1</sub>.<sup>35</sup>

El efecto carcinógeno de AFB<sub>1</sub> se ha demostrado en animales experimentales como ratas, patos, trucha arcoíris y mono rhesus.<sup>3</sup> A pesar de que la susceptibilidad puede estar influenciada por la edad del animal, el sexo, la cepa y la ruta de administración la LD<sub>50</sub> de AFB<sub>1</sub> para

la rata varía de 1 a 18 mg/kg. La alimentación continua de 15 ppb de AFB<sub>1</sub> en una dieta purificada durante 52-80 semanas indujo cáncer hepático en un número significativo de ratas macho Fischer.<sup>37</sup> Las truchas son muy sensibles, 90% de truchas de 50 gm desarrollaron hepatomas cuando fueron alimentadas durante 12 meses con 20 µg/k de AFB<sub>1</sub> cristalina absorbida en polvo de alfa celulosa incluida en la dieta.<sup>38</sup> Esta sensibilidad fue confirmada por Bailey y colaboradores,<sup>39</sup> cuando se expusieron embriones de trucha arcoíris a una solución acuosa de 0.5 ppm de AFB<sub>1</sub> durante 15 minutos, los embriones presentaron una incidencia de tumores hepáticos de 62%, un año después del tratamiento. Los patos de siete días de edad alimentados con 35 µg/kg en la dieta durante 14 meses desarrollaron hepatomas en un 73% de la población en estudio. En mono rhesus se ha observado que una dosis total de 1354 mg de AFB<sub>1</sub> dosificada en 147 semanas por vía oral o intraperitoneal causó un 15% de hepatocarcinomas, y 46% de sarcoma hemangioendotelial del hígado.<sup>16</sup>

Los animales experimentales que no son susceptibles son los hámsters y los ratones. Los hámsters alimentados con 2 mg de AFB<sub>1</sub>/kg de alimento al día durante 19 meses, no presentaron hepatocarcinomas, sin embargo se detectó la presencia de colangiocarcinomas.<sup>40</sup> Los ratones son muy resistentes, ya que tratamientos de 1 mg/kg de AFB<sub>1</sub> en la dieta durante 20 meses no causaron ningún caso de hepatocarcinoma.<sup>41</sup> La hepatocarcinogenicidad de la AFB<sub>1</sub> varía ampliamente y no siempre se correlaciona la sensibilidad de estos animales a la toxicidad aguda. Los conejos, patos pequeños, cerdos, truchas y ratas son moderadamente susceptibles a la toxicidad aguda, pero muy susceptibles a su hepatocarcinogenicidad; en cambio, ratones, hámsters y pollos son resistentes a la toxicidad aguda. Los perros, ovejas y cobayos aparentemente son resistentes a la hepatocarcinogenicidad.<sup>25</sup>

Aunque la AFB<sub>1</sub> causa principalmente carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma, también se ha reportado en varias líneas de ratas el adenocarcinoma renal.<sup>3</sup> Otros tejidos afectados por la toxina incluyen la tráquea y la piel. Se ha reportado que la aflatoxina B<sub>1</sub> se absorbe lentamente por piel, aunque esta absorción se ve afectada por la concentración, el solvente, la solubilidad y la diferencia de especie.<sup>42</sup>

Al administrar AFB<sub>1</sub> a ratones moteados se observó una fuerte y persistente acumulación no sólo en el hígado, sino también en tejidos pigmentados. No se conoce la implicación biológica que pueda tener esta acumulación, pero una unión preferencial de la AFB<sub>1</sub> a la melanina podría indicar un potencial de este compuesto para la inducción de melanomas.<sup>43</sup>

## Efecto mutagénico

Las mutaciones son importantes por dos razones: porque son heredables a la siguiente generación e involucra alteración en los genes y generan cáncer.<sup>44</sup> La mutagenicidad de la aflatoxina B<sub>1</sub> se ha demostrado utilizando bacterias, levaduras, y células de mamíferos (incluyendo humanas), concluyéndose que esta sustancia es uno de los mutágenos más potentes, ya que en *Salmonella typhimurium* se inducen 8 527 mutantes por cada  $\mu\text{g}$  de AFB<sub>1</sub>.<sup>45</sup> AFB<sub>1</sub> induce mutaciones puntuales de GC  $\rightarrow$  TA o GC  $\rightarrow$  AT, los puntos más sensibles (*hot spots*) para la mutagénesis de la AFB<sub>1</sub>, en los ensayos basados en plásmidos *lacZ*, fueron encontrados en las regiones del ADN más ricas en GC, las cuales también son las zonas más sensibles para la formación del aducto AFB-N<sup>7</sup>-Guanina.<sup>27</sup>

Estudios *in vitro* de la activación de los protooncogenes humanos Ha-ras han demostrado la presencia de una transversión G  $\rightarrow$  T al principio o a la mitad del codón 12, en tumores resultados de la transfección con un plásmido modificado con AFB<sub>1</sub>. Los autores sugieren que la AFB<sub>1</sub> metabólicamente activada es capaz de mutar estos oncogenes a su forma oncogénica; sin embargo, debe hacerse notar que esta mutación en los genes Ha-ras no se ha reportado en los hepatocarcinomas que se presentan en las poblaciones expuestas al consumo de alimentos contaminados con AFB<sub>1</sub>.<sup>46</sup> En cambio en ratas, dos mutaciones en el codón 12 del gen Ki-ras fueron identificadas en el ADN aislado de carcinoma hepático inducido con AFB<sub>1</sub>.<sup>47</sup> Los carcinomas aparecieron 56 semanas después de la aplicación de la dosis y el ADN de los carcinomas hepáticos mostró mutaciones GGT  $\rightarrow$  GAT, indicando que la mutación en el gen Ki-ras es un evento dominante en la carcinogénesis inducida por AFB<sub>1</sub>.<sup>47</sup>

## Efecto tóxico

El efecto tóxico de la aflatoxina en animales superiores es de dos tipos: agudo y crónico. El primer tipo se manifiesta como una hepatitis aguda,<sup>48</sup> ya que presenta amarillamiento típico de la hepatitis, fiebre, depresión, falta de hambre y diarrea; el segundo tipo se manifiesta como un hepatocarcinoma,<sup>12</sup> y los síntomas como vómito, dolor abdominal y hepatitis se van presentando paulatinamente hasta causar la muerte.<sup>49</sup>

Los síntomas más evidentes de la intoxicación por aflatoxinas, llamada "aflatoxicosis", en varias especies, incluyendo aves y mamíferos son la hipolipidemia, hipocolesterolemia e hipocarotenemia, asociados con esteatosis hepática severa y pérdida de peso. Se ha sugerido que estos signos de desbalance agudo del metabolismo de los lípidos puede ser resultado de la

modificación química (bloqueo) de residuos de lisina claves en la proteína B-100 de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por la AFB<sub>1</sub>. Estos complejos lipoprotéicos son muy importantes en la distribución de grasas a partir del hígado. Las LDLs modificadas no son reconocidas por sus receptores específicos, y de esta manera son rechazadas por las células periféricas. Una vez de regreso en el hígado, las partículas modificadas se unen a las células sinusoidales. Con este proceso se establece la deficiencia lipídica de los tejidos periféricos mientras las grasas se acumulan en el hígado. Este estado anormal se mantiene y se refuerza por la subsiguiente modificación de las apoproteínas nacientes, las cuales a su vez se vuelven incapaces de recibir una nueva carga de lípidos mientras la aflatoxina continúe presente en el hígado.<sup>50</sup>

El sistema inmune también se ve afectado y se alteran las respuestas inmunes específicas e inespecíficas. Se ha demostrado que en pollos alimentados con 1ppm de AFB<sub>1</sub> se disminuyen las funciones de los linfocitos y podría afectar también a los macrófagos que los asisten,<sup>51</sup> los cuales juegan un papel importante en la defensa del huésped contra tumores y bacterias.<sup>52</sup> El daño al sistema inmune se refleja en parámetros como la fijación de complemento, la fagocitosis e hipersensibilidad tardía. Se ha propuesto que la inmunosupresión causada por estas sustancias podría estar mediada por sus efectos sobre la involución del timo y los linfocitos derivados de éste, interfiriendo de esta manera con la respuesta inmune celular del huésped.<sup>53</sup>

## Asociación de la ingestión de AFB<sub>1</sub> con la formación de tumores en humanos

Estudios epidemiológicos conducidos durante los años setenta ilustraron la relación existente entre el consumo de AFB<sub>1</sub> y la incidencia de cáncer hepático en humanos en diferentes partes del mundo. Los rangos de ingestión variaban de 3 - 22  $\mu\text{g}$  AFB<sub>1</sub>/kg de peso por día y los valores de incidencia de cáncer variaban de 2 a 35 casos por cada 100,000 habitantes por año. Los estudios evidenciaron una asociación positiva entre ingestión de aflatoxina y alta incidencia de cáncer.<sup>54</sup> Esta incidencia en varios de los estudios fue una función lineal del logaritmo del consumo de aflatoxina.<sup>16</sup>

## Biomarcador: aducto AFB<sub>1</sub>-lisina

La cuantificación por inmunoensayo del aducto AFB<sub>1</sub>- lisina en suero humano permite determinar la exposición humana a la aflatoxina. Wild y colaboradores<sup>33</sup> realizaron un estudio en el cual se determinó el aducto-AFB<sub>1</sub>-lisina en niños y adultos de poblaciones del sudeste de Asia, este y oeste de África y Europa.

Los sueros de los europeos fueron negativos, en cambio 100% de los sueros de los 116 niños de Gambia tenían concentraciones detectables de aducto-AFB<sub>1</sub>-lisina y los 20 adultos de este mismo país tenían niveles de 25 a 200 pg AFB<sub>1</sub>-lisina/mg de albúmina. El límite de detección de este método inmunológico fue de 5 pg AFB<sub>1</sub>-lisina/mg albúmina.<sup>33</sup> Este método y el de cromatografía líquida de alta resolución con fluorescencia fueron muy utilizados para realizar los primeros estudios; sin embargo, la aplicación de los anticuerpos monoclonales utilizados en radioinmunoanálisis (RIA) permiten una detección más eficiente.<sup>32</sup>

Este último método consiste en separar la AFB<sub>1</sub>-lisina del suero, después de haberse sometido a una hidrólisis enzimática y separar por centrifugación y columna monoclonal de Aflatest. Para cuantificar por radioinmunoensayo se realizan los siguientes pasos: 1) se prepara una dilución marcada de aflatoxina<sup>3</sup>H-AFB<sub>1</sub>; 2) utilizando esta aflatoxina marcada se determina el 50% de inhibición de los anticuerpos monoclonales AFB<sub>1</sub>; 3) se determina la concentración de unión de la aflatoxina fría y 4) se mezclan las muestras con la concentración adecuada de "tracer", precipitar y leer en un contador de centelleo. Con este método se realizó un estudio en México, en 2003, para determinar el nivel de AFB<sub>1</sub>-lisina en humanos sanos y con patologías relacionadas con aflatoxicosis, tales como cáncer de tubo digestivo, hepatitis B, hepatitis C, cirrosis hepática, cáncer de mama y tuberculosis. Tanto los individuos sanos como los enfermos eran originarios de Matamoros, Tamaulipas, región noreste de México, donde se ha descrito una alta incidencia de aflatoxina en maíz.<sup>55</sup> Todos los individuos muestreados sanos (15) y enfermos (32), de estratos sociales diferentes, consumían maíz en su dieta diaria, eran hombres y mujeres de diversas edades (16-65 años). Las muestras de sangre tomadas en 2001 contenían niveles de aducto-AFB<sub>1</sub>-lisina de 0.82-1.35 pg/mg de albúmina; en las muestras de 2002 se analizaron 15 sueros de cáncer de mama, cuatro de cirrosis, tres de cáncer de laringe, tres de cáncer de páncreas y tres de cáncer gástrico, los niveles del aducto-AFB<sub>1</sub>-lisina fueron de 0.5-2.4 pg/mg de albúmina y sólo un suero de cáncer de mama presentó 5.5 pg/mg albúmina.<sup>56</sup> Los valores encontrados son indicativos de que la población ha ingerido alimentos con AFB<sub>1</sub>; sin embargo, en este estudio no se pudo establecer ninguna correlación con las patologías presentes. Los valores encontrados en este estudio son muy bajos comparativamente con lo reportado por Wild y colaboradores<sup>33</sup> en pacientes africanos, cuyos niveles de aducto AFB<sub>1</sub>-lisina fueron de 5 hasta más de 350 pg aducto-AFB<sub>1</sub>-lisina equivalente/mg proteína.

Wang y colaboradores<sup>57</sup> examinaron 56 casos de hepatocarcinomas en Taiwán, durante 1991-1995. Las muestras de sangre fueron analizadas para determinar

la concentración de aducto-AFB<sub>1</sub>-lisina, AFB<sub>1</sub>-ADN en orina y los marcadores para hepatitis B y C. Se encontró que los portadores de antígeno HBsAg tenían los más altos niveles de AFM<sub>1</sub> en orina y que el riesgo relativo para desarrollar hepatocarcinoma era de 59%. Debido a que estos estudios fueron realizados con un número significativo de casos, controles, cuestionarios y muestras, los resultados apoyan fuertemente la relación causal entre el virus de la hepatitis B y la exposición a las aflatoxinas en el desarrollo de hepatocarcinomas.<sup>14</sup>

Durante junio de 2004, en Kenia, 317 individuos presentaron deficiencia hepática aguda y 125 de ellos murieron. Algunas muestras de suero de estos pacientes fueron analizadas y todos fueron negativos para virus que se sabe causan hepatitis en ese país. Entonces se consideró la posibilidad de que se trataba de una aflatoxicosis como resultado de haber ingerido maíz contaminado. Al realizar el análisis químico de muestras de maíz de las áreas afectadas, se encontraron concentraciones de 4400 ppb, las cual eran 220 veces más que las 20 ppb que se consideran como el límite para alimentos. Azziz-Baumgartner y colaboradores<sup>58</sup> realizaron un estudio de caso-control para identificar si la ingesta de maíz contaminado estaba implicada en esta deficiencia hepática y cuantificar biomarcadores asociados con aflatoxicosis aguda. Las concentraciones de AFB<sub>1</sub> encontradas en el maíz que ingerían los individuos del caso eran mayores (345 ppb) que las concentraciones que tenía el maíz de los controles (44.1 ppb). Con respecto al aducto AFB<sub>1</sub>-lisina en suero, los casos de pacientes tenían concentraciones de 1.2 ng/mg de albúmina, en contraste con los pacientes control que presentaban 0.15 ng/mg de albúmina. Los autores encontraron una asociación positiva entre concentración de AFB<sub>1</sub> en maíz y concentración del AFB<sub>1</sub>-lisina. Además, por cada aumento de 1 mg en la concentración de AFB<sub>1</sub> en maíz, hubo un aumento de 0.5 pg/mg del valor logaritmo de la concentración del aducto AFB<sub>1</sub>-lisina. Es importante mencionar que 18 de los 40 pacientes del caso fallecieron durante el estudio, ellos tuvieron las concentraciones más altas de aducto de AFB<sub>1</sub>-lisina. Este es el primer estudio que cuantifica el aducto de AFB<sub>1</sub>-lisina en suero de pacientes durante un brote de aflatoxicosis aguda en humanos.<sup>58</sup> Esta investigación ilustra el riesgo que implica la presencia de la AFB<sub>1</sub> en los alimentos para consumo humano.

### **Detección de mutaciones en el codón 249 del gen p53 y su posible uso como biomarcador**

La relación entre la exposición a la AFB<sub>1</sub> y el desarrollo de hepatocarcinoma quedó claramente ilustrada por las mutaciones que ocurren en el gen supresor p53.

Esta mutación se ha encontrado en 53% de los casos de carcinoma hepatocelular (HCC) de áreas con alta exposición dietética a AFB<sub>1</sub>, mientras que en poblaciones expuestas a bajos niveles de esta toxina, las mutaciones se encuentran en 26% de los casos.<sup>59</sup> En Senegal, donde la gente está expuesta a altas concentraciones de AFB<sub>1</sub> en los alimentos, fueron analizados los tejidos de 15 hepatocarcinomas para buscar la mutación del codón 249 del gen *p53*. La mutación fue encontrada en 10 de 15 tumores, siendo la más alta descrita hasta ahora.<sup>60</sup> Mayor evidencia fue aportada por los estudios de Aguilar y colaboradores,<sup>61</sup> quienes examinaron la frecuencia de mutación en los genes *p53* de muestras de hígado normales provenientes de tres regiones con diferente nivel de exposición a la AFB<sub>1</sub>, Estados Unidos, Tailandia y Qidong, China. La mutación fue más frecuente en muestras de tejido provenientes de la región Qidong de China, donde la exposición a AFB<sub>1</sub> es muy alta. Estos datos fortalecen el papel causal de la AFB<sub>1</sub> en la hepatocarcinogénesis humana.<sup>19</sup> En años recientes se planteó la posibilidad de determinar esta mutación en el plasma del hepatocarcinoma.<sup>62</sup> En estudios realizados en China la mutación fue detectada en 44% de todas las muestras de plasma en donde se diagnosticó cáncer hepático en Qidong, República Popular de China donde, como ya se mencionó, la incidencia de AFB<sub>1</sub> en alimentos es muy alta.

Soini y colaboradores,<sup>59</sup> buscaron mutaciones en el codón 249 del gen *p53* en células de carcinomas hepáticos humanos de Monterrey, Nuevo León, México, en 1996 y se realizaron pruebas para detectar la presencia de antígenos de hepatitis B y/o C en los pacientes. En tres de 16 casos se encontró la mutación en el gen *p53* y la concentración de AFB<sub>1</sub>-lisina en los 16 pacientes fue de 0.54 a 4.64 pmol AFB<sub>1</sub>-lisina/mg de albúmina. Los antígenos para virus de la hepatitis B y/o C fueron positivos en 12 de 20 casos. Los autores concluyen que la población mexicana está expuesta a la aflatoxina y que debido al alto consumo de maíz en la dieta, aún a concentraciones relativamente bajas de AFB<sub>1</sub>, pueden resultar en una situación de alto riesgo, dada la exposición diaria.<sup>59</sup>

### Asociación de AFB<sub>1</sub> con otras enfermedades hepáticas

Dos enfermedades hepáticas que se han relacionado con la ingestión de la AFB<sub>1</sub> son Kwashiorkor y Síndrome de Reye. Los síntomas de la primera son hipoalbuminemia, hígado graso e inmunosupresión, en la segunda se presenta encefalopatía con degeneración grasa de las vísceras. La AFB<sub>1</sub> fue encontrada en las necropsias del tejido

hepático de 36 niños que fallecieron con la enfermedad de Kwashiorkor. De igual manera en varios pacientes, en diferentes partes del mundo, incluyendo Estados Unidos, que padecieron el Síndrome de Reye tenían AFB<sub>1</sub> en sus tejidos.<sup>12</sup> Estos hallazgos sugieren que la AFB<sub>1</sub> está involucrada en la etiología de ambas enfermedades.

### Conclusión

La activación de la AFB<sub>1</sub> en el anillo furano, por la acción de las enzimas del microsoma hepático de los animales superiores, la convierte en un potente agente carcinogénico. Este compuesto ha sido clasificado como cancerígeno tipo I, de acuerdo con el Instituto de Investigación en Cáncer.<sup>13</sup> Este hecho, aunado a la frecuente contaminación de los alimentos con AFB<sub>1</sub>, determina el alto riesgo que las poblaciones humanas tienen de desarrollar cáncer hepático u otras enfermedades relacionadas. La mayor parte del conocimiento sobre la correlación entre ingestión de aflatoxina y hepatocarcinomas en humanos ha surgido de estudios epidemiológicos de países africanos. Estos estudios se han facilitado con el hallazgo de biomarcadores en animales experimentales, y actualmente permiten medir la exposición humana a las aflatoxinas de una manera directa. A través del conocimiento obtenido con la cuantificación del aducto-AFB<sub>1</sub>-lisina y de la identificación de las mutaciones en el codón 249 del gen *p53* en células de los hepatocarcinomas, provenientes de aflatoxicosis agudas en humanos, se apoya fuertemente la relación causal entre la AFB<sub>1</sub> y los hepatocarcinomas. También se ha demostrado el riesgo que implica la presencia de la AFB<sub>1</sub> en los alimentos para consumo humano. Los datos obtenidos de ambos biomarcadores en mexicanos que viven en regiones descritas de alta incidencia de AFB<sub>1</sub> en maíz, sólo ilustran que la población está consumiendo en forma rutinaria alrededor de 1 µg de AFB<sub>1</sub> al día. Esta ingestión crónica podría determinar un aumento en el número de casos de hepatocarcinomas, como se ha observado en modelos animales. Los datos mostrados en esa revisión ilustran, por un lado, las graves consecuencias que sufren los humanos cuando se exponen al consumo de alimentos contaminados con aflatoxina B<sub>1</sub>, y por otro lado, la necesidad de realizar estudios caso-control en México, utilizando el biomarcador AFB<sub>1</sub>-lisina debido principalmente al hecho de que el maíz es la base de la alimentación en este país. Es necesario que se valore el riesgo de la población asociado a la ingestión de AFB<sub>1</sub> en maíz y determinar, tanto la severidad como el grado de exposición a este contaminante carcinogénico.

## Referencias

1. Ito Y, Peterson SW, Wicklow DT, Goto T. *Aspergillus pseudotamari*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *flavi*. *Mycol Res* 2001;105:233-239.
2. Kurtzman CP, Horn BW. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. *Antonie van Leeuwenhoek* 1987;53:147-158.
3. Groopman JD, Busby WF, Donahue PR, Wogan GN. Aflatoxins as risk factors for liver cancer: An application of monoclonal antibodies to monitor human exposure. *Cancer Biochem Mol Epidemiol* 1986;233-256.
4. Scheidegger KA, Payne GA. Unlocking the secrets behind secondary metabolism: A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *J Toxicol-Toxin Rev* 2003;22:423-459.
5. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1106-1122.
6. Bucio-Villalobos CM, Guzmán de Peña D, Peña-Cabrales JJ. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, México. *Rev Iberoam Micol* 2001;18:83-87.
7. Bucio-Villalobos CM, Peña-Cabrales JJ, Guzmán-de-Peña D. Producción de aflatoxinas en maíz in vitro. *Revista Mexicana de Fitopatología* 2001;19:218-222.
8. Cardwell KF, Desjardins A, Henry HS, Munkvold G, Robens J. Mycotoxins: the cost of achieving food security and food quality. APS net (monografía en internet). St. Paul, MN: American Phytopathological Society, (Consultado 1-25 de agosto) 2001. Disponible en: <http://www.apsnet.org/online/feature/mycotoxin/>
9. Steyn PS, Vleggaar R, Wessels PL. The biosynthesis of aflatoxin and its congeners. En: Steyn PS, ed. *The biosynthesis of mycotoxins: A study in secondary metabolism*, New York: Academic Press, 1980:105-155.
10. Steyn PS, Vleggaar R. Application of biosynthetic techniques in the structural studies of mycotoxins. En: Cole RJ, ed. *Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxin*, New York: Academic Press, 1986:177-206.
11. Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, et al. Clustered genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microb* 2004;70:1253-1262.
12. Task Force Report. *Mycotoxins and human disease*. En: Cast, ed. *Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems*. 2003. Council for Agricultural Science and Technology 139.
13. International Agency for Research on Cancer. *Aflatoxins (Naturally occurring mixtures)*. *Monogr Eval. Carcinog Risks Hum*. 2002; 82. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr>
14. Groopman JD, Kensler TW. Role of metabolism and viruses in aflatoxin-induced liver cancer. *Toxicol Appl Pharm* 2005;206:131-137.
15. Gong Y, Egal S, Hounsa A, Turner P, Hall A, Cardwell K, et al. Determinants of aflatoxin exposure in young children from Benin and Togo, West Africa: the critical role of weaning. *Int J Epidemiol* 2003;32:556-562.
16. Groopman JD, Cain LG, Kensler TW. Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. *Critical Review in Toxicology* 1988;19:113-145.
17. Aoyama T, Yamano S, Guzelian PS, Gelboin HV. Five forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B<sub>1</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4790-4793.
18. Macé K, Aguilar F, Wang JS, Vautravers P, Gómez-Lechón M, González F, et al. Aflatoxin B<sub>1</sub>-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis* 1997; 18:1291-1297.
19. Ramsdell HS, Parkinson A, Eddy AC, Eaton DL. Bioactivation of aflatoxin by human liver microsomes: Role of Cytochrome P450 IIIA Enzymes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991;108:436-447.
20. Forrester LM, Neal GE, Judah DJ, Glancey MJ, Wolf CR. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P450 in aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism in human liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8306- 8310.
21. Gallagher EP, Kunze KL, Stapleton PL, Eaton DL. The kinetics of aflatoxin B<sub>1</sub> oxidation by human cDNA expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;141:595-606.
22. Smela ME, Currier SS, Bailey EA, Essigmann J. The chemistry and biology of aflatoxin B<sub>1</sub>: from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2001;22: 535-545.
23. Farombi EO. Aflatoxin contamination of foods in developing countries: Implications for hepatocellular carcinoma and chemopreventive strategies. *African Journal of Biotechnology* 2006; 5:1-14
24. Eaton DL, Ramsdell HS. Species and diet-related differences in aflatoxin biotransformation. En: Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK, ed. *Handbook of Applied Mycology: Mycotoxins in Ecological Systems*. New York Marcel Dekker 1992:157-182.
25. Groopman JD, Croy RG, Wogan GN. In vitro reactions of aflatoxin B<sub>1</sub> adducted DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:5445-5449.
26. Dennisenko MF, Cahill J, Koudriakova TB, Gerber N, Pfeifer GP. Quantitation and mapping of aflatoxin B<sub>1</sub>-induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxin B<sub>1</sub>-8,9-epoxide and microsomal activation systems. *Mutat Res* 1999; 6: 205-211.
27. Lillehoj EB. Aflatoxin: Genetic mobilization agent. En: Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK, ed. *Handbook of Applied Mycology: Mycotoxins in Ecological Systems*, New York: Marcel Dekker 1992:1-22.
28. Wang JS, Groopman JD. DNA damage by mycotoxins. *Mutat Res* 1999; 424:167-181.
29. Pereira MA, Chang LV. Binding of chemical carcinogens and mutagens to rat hemoglobin. *Chem Biol Interac* 1981;33:301-305.
30. Skipper PL, Hutchins DH, Turesky RJ, Sabbioni G, Tannenbaum SR. Carcinogen binding to serum albumin. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1985; 26:356-361.
31. Sabbioni G, Skipper PL, Buchi G, Tannenbaum SR. Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B<sub>1</sub> in vivo in rats. *Carcinogenesis* 1987; 8:819-824.
32. Sheabar FZ, Groopman JD, Qian GS, Wogan GN. Quantitative analysis of aflatoxin-albumin adducts. *Carcinogenesis* 1993; 14:1203-1208.
33. Wild CP, Jiang YZ, Sabbioni G, Chapot B, Montesano R. Evaluation of methods for quantitation of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. *Cancer Res* 1990;50:245-251.
34. Kensler TW, Egner PA, Davidson NE, Roebuck BD, Pikul A, Groopman JD. Modulation of aflatoxin metabolism, aflatoxin-N<sub>7</sub>- guanine formation, and hepatic tumorigenesis in rats fed ethoxyquin: Role of induction of glutathione S-transferases. *Cancer Res* 1986; 46:3924-3931.
35. Busby WF Jr, Wogan GN. Aflatoxins. En: Searle CE, ed. *Chemical carcinogens*. Washington, DC: American Chemical Society, 1985:945-1136.
36. Croy RG, Essigmann JM, Reinhold VN, Wogan GN. Identification of the principle aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct formed in vivo in rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978;75:1745-1749.
37. Wogan GN, Newberne PM. Dose-response characteristics of aflatoxin B<sub>1</sub> carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 1967;27:2370-2376.
38. Halver JE. Aflatoxicosis and Trout hepatoma. En: Goldblatt LA, ed. *Aflatoxin Scientific background, control and implications*. New York: Academic Press, 1969: 265:306
39. Bailey GS, Williams DE, Wilcox JS, Loveland PM, Coulombe RA, Hendricks JD. Aflatoxin B<sub>1</sub> carcinogenesis and its relation to DNA adduct persistence in sensitive and resistant salmonid fish. *Carcinogenesis* 1988;9:1919-1926

40. Moore RM, Pitot HC, Miller EC, Miller JA. Cholangiocellular carcinomas induced in Syrian golden hamsters administered aflatoxin B<sub>1</sub> in large doses. *J Natl Cancer I* 1982; 68:271-279.
41. Wogan GN. Aflatoxin carcinogenesis. En: Busch H, ed. *Methods in cancer research*. New York: Academic Press, 1973:309.
42. Kempainen BW, Riley RT, Pace JG. Skin absorption as a route of exposure for aflatoxin and trichothecenes. *J Toxicol- Toxin Rev* 1989;7:95-120.
43. Larsson P, Larsson BS, Tjolve H. Binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to melanin. *Food Chem Toxicol* 1984;26:579-586.
44. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. ed. *Recombinant DNA*. 2a.edición. New York: Scientific American Books, 1997.
45. Mori H. Genotoxicity of naturally occurring metabolites: structural analogs of aflatoxin and related chemicals. En: Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK, eds. *Handbook of Applied Mycology: Mycotoxins in Ecological Systems*. New York: Marcel Dekker, 1992:231-253.
46. Riley J, Mandel HG, Sinha S, Judah DJ, Neal GE. In vitro activation of the human Harvey-ras protooncogene by aflatoxin B<sub>1</sub>. *Carcinogenesis* 1997;18:905-910.
47. Neela RS, Wogan GN. Activation of the c-Ki-ras oncogene in aflatoxin B<sub>1</sub>-induced hepatocellular carcinoma and adenoma in the rat: Detection by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:2045-2049.
48. Ngindu A, Kenya PR, Ocheng DM, Omonde TN, Ngare W, Gate D, et al. Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. *Lancet* 1982;1:1346-1348.
49. Etzel R. Mycotoxins. *JAMA* 2002; 287:425-427.
50. Amaya-Farfan J. Aflatoxin B<sub>1</sub>-induced hepatic steatogenesis: role of the carbonyl compounds and active diols on steatogenesis. *Lancet* 1999; 353:747-748.
51. Ghosh RC, Chauhan HVS, Jha GJ. Suppression of cell-mediated immunity by purified aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler chicks. *Vet Immunol Immunopathol* 1991; 28:165-172.
52. Moon EY. Inhibition of various functions in murine peritoneal macrophages by aflatoxin B<sub>1</sub> exposure in vivo. *Int J Immunopharmacol* 1999; 21:47-58.
53. Silvotti L, Petterin C, Bonomi A, Cavais E. Immunological effects on piglets of feeding sows diets containing aflatoxins. *Vet Rec* 1997; 141:469-472.
54. Bilgrami KS, Sinha KL. Aflatoxins: Their biological effects and ecological significance. En: Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK, ed. *Handbook of Applied Mycology: Mycotoxins in Ecological Systems*. New York: Marcel Dekker, 1992:59-86.
55. Guzmán-de-Peña D. Estudio de las aflatoxinas en México. En: Guzmán-de-Peña D, Ruiz-Herrera J, Peña-Cabriales JJ eds. *Perspectivas de la microbiología en México*. México, DF: Instituto Politécnico Nacional, 1997:42.
56. Morón GA. Detección de aductos de aflatoxina B<sub>1</sub>-albúmina sérica por radioinmunoanálisis en pacientes con patologías asociadas con su presencia en Matamoros, Tam. México (tesis). Monterrey, NL: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2003
57. Wang L, Hatch M, Chen C, Levin B, You S, Lu S, et al. Aflatoxin exposure and risk of hepatocarcinoma in Taiwán. *Int J Cancer* 1996; 67: 602-625.
58. Azziz-Baumgartner E, Lindblade K, Gieseke K, Roger HS, Kieszak S, Njapau H, et al. Aflatoxin investigative group. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environ Health Persp* 2005; 113:1779-1782.
59. Soini Y, Chia SC, Bennet WVP, Groopman JD, Wang JS, DeBenedetti VMG, et al. An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in hepatocellular carcinomas from México. *Carcinogenesis* 1996; 17:1007-1012.
60. Coursaget N, Depril M, Chabaud R, Nandi V, Mayelo P, LeCann B, et al. High prevalence of mutations at codon 249 of the p53 gene in hepatocellular carcinomas from Senegal. *Brit J Cancer* 1993;67:1395-1397.
61. Aguilar F, Harris CC, Sun T, Hollstein M, Cerutti P. Geographic variation of p53 mutational profile in non-malignant human liver. *Science* 1994; 264:1317-1319.
62. Jackson PE, Kuang SY, Wang JB, Strickland PT, Munoz A, Kensler TW, et al. Prospective detection of codon 249 mutations in p53 in plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Carcinogenesis* 2003;10:1657-1663.