



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Instituto de Biología

**CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS, SUS
METABOLITOS HIDROXILADOS Y
ADUCTOS DE AFB₁-ADN EN
HEPATOCARCINOMAS HUMANOS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

MARIANA DÍAZ ZARAGOZA

TUTORA PRINCIPAL: DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO
COMITÉ TUTOR: DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de junio de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **DÍAZ ZARAGOZA MARIANA** con número de cuenta **403012761** con la tesis titulada **"Cuantificación de aflatoxinas, sus metabolitos hidroxilados y aductos de AFB1-ADN en hepatocarcinomas humanos"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO**:

Presidente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
Vocal: DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ
Secretario: DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO
Suplente: DR. GERARDO BALTAZAR ARISTI URISTA
Suplente: DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 9 de agosto de 2010.


Dr. Juan Nñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

A las Instituciones

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la administración, orientación e información de esta Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me otorgó para la realización de esta tesis de Maestría.

Al Instituto de Biología, UNAM por las facilidades en infraestructura, materiales y equipo para la elaboración de mi tesis de Maestría en Ciencias Biológicas.

A las Personas

A mi tutora Principal:

Dra. Magda Carvajal Moreno, por dirigir esta tesis de Maestría, apoyarme para su realización con la tecnología, equipo y materiales necesarios, revisarla con sumo cuidado, incorporarme a su proyecto de investigación y al laboratorio de Micotoxinas del Instituto de Biología, UNAM.

A los integrantes de mi Comité Tutorial:

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre y **Dr. Alejandro Manuel García Carrancá** por las sugerencias acertadas, revisión cuidadosa de mi proyecto de investigación y tesis.

Al **Dr. Gerardo Aristi Urista**, Patólogo del Hospital General de México, SSA en la Ciudad de México, por su amabilidad, conocimiento de la Patología humana y apoyo en la aportación de las muestras de hígado humano.

A la **Dra. María Adelita Vizcaíno Villalobos** y a la **Dra. Dafne Thamara Ayala Dávila** por la extracción de los tejidos hepáticos humanos de autopsias.

Al **Dr. César Mateo Flores Ortiz** por la revisión de mi escrito de tesis y por sus aportaciones hacia mi proyecto.

Al **Dr. Ignacio Méndez** por los análisis estadísticos de alta calidad y rapidez que realizó.

Al **Dr. Martín García Varela** por enseñarme a purificar el ADN de las muestras de hígado, con el Kit de Qiagen.

A la **M. en C. Laura Márquez Valdelamar** por facilitar en forma amable el uso del equipo y tecnología del Laboratorio de Biología Molecular del IBUNAM.

Al **Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chávez** por facilitar el uso del equipo e instalaciones del Laboratorio de Sistemática Molecular del Departamento de Botánica del IBUNAM.

Al **Lic en D. G. Julio César Montero Rojas** por la corrección y diseño de las figuras contenidas en esta tesis.

Al **Ing. Joel Villavicencio Cisneros** y al **Ing. Jorge López Ibarra** por la atención técnica dada a los problemas computacionales y sobre todo por su linda y sincera amistad.

DEDICATORIA

Con mucho amor y cariño a mis padres...

Mariano y Beatriz

A los cuales nunca terminaría de agradecer el apoyo, comprensión y confianza que me han brindado. Siempre tengan presente que cada objetivo cumplido a lo largo de mi vida, es un trofeo que les dedico con todo el corazón, porque ustedes son el principal motor para lograrlo. Gracias por su ejemplo de perseverancia...

...Los quiero, adoro y amo.

*A mis hermanos **José, Alex, Ángelo** y su **nueva familia**.*

Por su apoyo, compañía y consejos, a:

Verónica, gracias compañera por convertirte en mi amiga, hermana y confidente.

Rosa, gracias amiga por compartir conmigo momentos fáciles y difíciles en esta etapa de la vida.

Paty, gracias amiga por darme ánimos y por estar siempre a mi lado. Gracias por nuestra amistad.

*A mis amigas, **Erika, Joovana, Luisa, Lola y Maricela**, que me siguen apoyando a pesar de la distancia.*

*Una vez más, al hombre que me inculcó que el valor del razonamiento y de la humildad son armas muy importantes para triunfar en la vida... Al **Dr. Elías Piedra Ibarra**.*

*A **Jorge**, el hombre que me enseñó que el crecer y madurar no son motivos para renunciar a ser niño y mucho menos para dejar de disfrutar la vida... Gracias por tu amistad, sonrisa, alegría, comprensión... gracias por todo "Niño grande".*

*A mi **tía Lety, Lupita y Belén**, y a mi **tío Emilio, Male y Evelyn**, para los que soy importante y han creído en mí y en mis metas... Los quiero.*

*Y sobre todo a mi **mejor amigo**, el que siempre me acompaña a todo lugar cada minuto de la vida, al que nunca olvidaré que existe, así envejezca...*

A Dios.

"Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico; es también un niño situado ante fenómenos naturales que le impresionan tanto como un cuento de hadas"...

...Marie Curie.

ÍNDICE

CONTENIDO	Página
Título.....	i
Agradecimientos.....	ii
Dedicatoria.....	iv
Índice.....	v
Lista de Tablas.....	xi
Lista de Figuras.....	xiii
Resumen.....	xvii
Abstract.....	xviii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Las aflatoxinas.....	1
I.1.1. Definición.....	1
I.1.2. Estructura química.....	1
I.1.3. Propiedades fisicoquímicas.....	2
I.1.4. Biosíntesis.....	3
I.1.5. Ocurrencia natural.....	6
I.1.6. Métodos de control de aflatoxinas.....	6
I.2. Cáncer.....	8
I.2.1. Definición de cáncer.....	8
I.2.2. La importancia e incidencia del cáncer en el mundo y en México.....	9
I.2.3. El cáncer hepático.....	11
I.2.3.1. Características del hepatocarcinoma (HCC).....	11
I.2.4. Factores de riesgo que contribuyen al desarrollo del hepatocarcinoma...	19
I.2.4.1. Virus de la hepatitis B.....	20
I.2.4.2. Virus de la hepatitis C.....	21
I.2.5. Alimentos con aflatoxinas asociados al hepatocarcinoma.....	22
I.2.6. Prevención y control del cáncer hepático.....	24
I.3. Las aflatoxinas como causa de enfermedades en humanos.....	24
I.3.1. Aflatoxicosis en humanos.....	25
I.3.1.1. Intoxicaciones.....	25
I.3.2. Mecanismos de iniciación del hepatocarcinoma por aflatoxinas.....	26
I.3.3. Estudios en animales.....	26
I.3.4. Citocromo P ₄₅₀	26
I.3.4.1. Definición.....	27
I.3.4.2. Estructura.....	27

CONTENIDO (Continuación)	Página
I.3.4.3. Funciones.....	28
I.3.4.4. Tipos.....	28
I.3.5. La enzima Glutación S-Transferasa.....	29
I.3.5.1. Definición.....	29
I.3.5.2. Estructura.....	30
I.3.5.3. Funciones.....	31
I.3.5.4. Glutación S-transferasa y las aflatoxinas.....	31
I.3.6. Gen supresor de tumores p53.....	31
I.3.6.1. Alteraciones causadas por aflatoxinas.....	32
I.3.7. Los aductos de AFB-ADN y el desarrollo del cáncer.....	33
I.3.8. Oncogenes asociados al cáncer hepático por aflatoxinas.....	35
II. OBJETIVOS.....	37
II.1. Generales.....	37
II.2. Particulares.....	37
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
III.1. Muestreo.....	38
III.2. Cuantificación de AF por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)..	42
III.2.1. Aparatos.....	42
III.2.2. Curvas de calibración.....	42
III.2.2.1. Medición de un $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada AF (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) y de sus metabolitos hidroxilados (AFM₁, AFM₂, AFP₁, AFL) por espectrofotometría.....	42
III.2.2.2. Diluciones de cada aflatoxina para la curva de calibración.....	43
III.3. Cuantificación de AF libres y unidas al ADN.....	44
III.3.1. Cuantificación de AF libres.....	44
III.3.1.1. Técnica de Qian & Yang (1984) para la extracción y concentración de aflatoxinas totales libres en tejido de hígado humano.....	44
III.3.1.2. Técnica de Koeltzow y Tanner (1990) para la detección de aflatoxinas libres en el sobrenadante.....	45
III.3.2. Técnicas de purificación del ADN para detectar a las AF unidas al ADN (aductos).....	45

CONTENIDO (Continuación)	Página
III.3.2.1. Técnica de Gupta (1984) para la purificación del ADN de las muestras de hígado humano control y con HCC.....	45
III.3.2.2. Purificación del ADN de muestras de hepatocarcinomas embebidas en parafina.....	48
III.3.2.3. Técnica con kit de Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit).....	48
III.4. Estudio acerca del efecto del formol sobre el ADN hepático.....	49
III.5. Medición de la pureza y concentración del ADN.....	50
III.6. Procesamiento de las muestras.....	50
III.7. Porcentaje de recuperación por adición de AFB ₁ a hígados control humanos...	50
III.8. Cuantificación de aductos de AFB ₁ -N ⁷ -Gua por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	51
III.8.1. Síntesis del estándar de aductos de AFB ₁ -ADN.....	51
III.8.2. Curva de calibración de AFB ₁ -N ⁷ -Gua.....	53
III.8.3. Medición de los aductos de AFB ₁ -N ⁷ -Gua de las muestras de hígado control y con HCC humanos por HPLC.....	54
III.9. Análisis Estadístico.....	54
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
IV.1. Muestreo.....	56
IV.2. Cuantificación de AF por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).	56
IV.2.2. Curvas de calibración.....	57
a. Curva de calibración de AFB ₁	57
b. Curva de calibración de AFB ₂	58
c. Curva de calibración de AFG ₁	58
d. Curva de calibración de AFG ₂	59
e. Curva de calibración de AFM ₁	60
f. Curva de calibración de AFM ₂	60
g. Curva de calibración de AFP ₁	61
h. Curva de calibración de AFL.....	61
IV.3. Purificación del ADN de las muestras de hígado humano control y con HCC....	62
IV.3.1. Comparación de la técnica de Gupta (1984) y la del kit de Qiagen.....	62
IV.3.1.1. Diferencias entre la concentración de ADN según las técnicas de Gupta, 1984 y el kit de Qiagen.....	63
IV.3.2. Técnica de Gupta (1984).....	64

CONTENIDO (Continuación)	Páginas
IV.3.2.1. Purificación de ADN de las muestras de hígado control y con hepatocarcinoma fijadas en formol al 10%.....	64
IV.3.2.2. Análisis estadístico de la concentración de ADN del grupo de hígados humanos control y con HCC purificado con la técnica de Gupta, 1984.....	65
IV.3.3. Efecto del formol sobre el ADN.....	66
IV.3.3.1. Purificación de ADN de muestras de hígado de pollo con diferentes cantidades de formol.....	66
IV.4. Análisis químico.....	67
IV.4.1. Procesamiento de muestras.....	67
IV.4.1.1. Porcentaje de recuperación por adición de AF a hígados humanos control por la técnica de Qian & Yang (1984).....	67
a) Recuperación de AFB ₁ en hígado humano.....	67
b) Porcentaje de recuperación de la técnica de Qian & Yang, 1984 en hígados humanos fortificados con una mezcla de AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ y AFG ₂	68
IV.4.1.2. Detección de aflatoxinas totales en tejido de hígado humano por la técnica de Qian & Yang (1984).....	70
IV.4.1.2.1. Diferencia entre la capacidad de retención de las columnas LC ₁₈ de cada AF libre extraída con el método de Qian y Yang, 1984.....	73
IV.4.1.2.2. Análisis de varianza de las AF libres extraídas de las muestras de hígado humano control y con HCC con el método de Qian & Yang, 1984.....	75
IV.4.1.3. Detección de aflatoxinas totales de los sobrenadantes por la técnica de Koeltzow & Tanner (1990).....	77
IV.4.1.3.1. Comparación de AF libres de las muestras de hígado humano control y con HCC extraídas con el método de Koeltzow & Tanner, 1990.....	79
IV.4.1.3.2. Modelo de dos criterios de clasificación, interacción y test “de rebanadas” para conocer las diferencias significativas entre la cantidad de AF libres de tres sobrenadantes del kit de Qiagen.....	82

CONTENIDO (Continuación)	Página
IV.5. Cuantificación de aductos de AFB ₁ -N ⁷ -Gua por HPLC.....	92
IV.5.1. Síntesis del aducto de AFB ₁ -N ⁷ -Gua.....	92
IV.5.2. Curva de calibración de AFB ₁ -ADN.....	94
V.5.3. Medición de los aductos de AFB ₁ -ADN de las muestras de hígado control y con HCC humanos por HPLC.....	94
VI. CONCLUSIONES	99
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
VIII. ANEXOS	114
Anexo 1: Ocho muestras con antecedentes de hepatopatías o carcinomas que no pueden ser controles y no se analizaron.....	114
Anexo 2: Siete muestras de hígado humano con carcinoma o hepatopatía, no analizadas, sin marcadores de hepatitis viral ni pruebas serológicas normales.	115
Anexo 3: Muestra de HCC que llegó después del análisis, ya no se incluyó.....	116
Anexo 4: Quince muestras control de hígado humano, sin marcadores de hepatitis viral y pruebas serológicas.....	117
Anexo 5: Diez muestras de hepatocarcinomas humanos con insuficiencia hepática crónica, marcadores de VH- y pruebas serológicas normales fijadas con formol al 10%.....	118
Anexo 6: Cinco muestras con hepatocarcinoma fijadas con formol al 10% y embebidas en parafina.....	119
Anexo 7: Curvas de calibración de AF.	120
Anexo 8: Prueba de t y transformación de Box-Cox de la concentración de ADN del grupo de hígados humanos control y con HCC purificado con la técnica de Gupta, 1984.....	123
Anexo 9: Análisis de varianza de las AF libres extraídas de las muestras de hígado humano control y con HCC con el método de Qian y Yang, 1984.	124
Anexo 10: Prueba de Wilcoxon de las AF libres extraídas de las muestras de hígado humano control y con HCC con el método de Koeltzow & Tanner, 1990.....	126
Anexo 11: Aflatoxinas libres (ng g ⁻¹) en los sobrenadantes de muestras de hígado control humano procesadas con el Kit de Qiagen.....	127
Anexo 12: Aflatoxinas libres (ng g ⁻¹) en los sobrenadantes de muestras de hígado humano con HCC procesadas con el Kit de Qiagen.....	128

CONTENIDO (Continuación)	Página
Anexo 13: Análisis estadístico de la cantidad AFB ₁ de los sobrenadantes de los hígados humanos control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.....	129
Anexo 14: Análisis estadístico de la cantidad AFB ₂ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.....	130
Anexo 15: Análisis estadístico de la cantidad AFG ₁ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.....	131
Anexo 16: Análisis estadístico de la cantidad AFG ₂ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.....	132
Anexo 17: Análisis estadístico de la cantidad AFM ₁ de los sobrenadantes de las muestras de hígados humanos control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.....	133
Anexo 18: Análisis estadístico de la cantidad AFM ₂ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.....	134
Anexo 19: Análisis estadístico de la cantidad AFP ₁ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.....	135
Anexo 20: Análisis estadístico de la cantidad AFL de los sobrenadantes del hígado humano control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.....	136

LISTA DE TABLAS

N°	Tabla	Página
1	Estrategias para reducir la exposición y riesgo de consumo de aflatoxinas en países subdesarrollados (Groopman <i>et al.</i> , 2007).....	7
2	Quince muestras control de hígado humano, sin marcadores de hepatitis viral y pruebas serológicas.....	39
3	Diez muestras de hepatocarcinoma humano con insuficiencia hepática crónica, marcadores de VH- y pruebas serológicas normales fijadas con formol al 20%.....	40
4	Cinco muestras con hepatocarcinoma fijadas con formol al 20% y embebidas en parafina.....	41
5	Listado de muestras de hígado control y con hepatocarcinomas utilizadas para la cuantificación de aflatoxinas libres y purificación de ADN.....	41
6	Pesos moleculares y coeficientes de extinción de cada aflatoxina (Scott, 1995)	43
7	Resumen de los tiempos de retención cromatográficos de las aflatoxinas, bajo las condiciones experimentales.....	57
8	Cuantificación de ADN de muestras de hígado control humano purificadas con la técnica de Gupta (1984) y con kit de Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit).....	63
9	Diferencias estadísticamente significativas de la comparación de los métodos de Gupta, 1984 y del Kit de Qiagen para la purificación de ADN.....	64
10	Concentración de ADN de las muestras de hígado control y con hepatocarcinoma por la técnica de Gupta (1984).....	65
11	Análisis de varianza de la concentración de ADN del grupo de hígados humanos control y con HCC, purificado con la técnica de Gupta (1984) donde no hubo diferencias estadísticamente significativas.	65
12	Cuantificación de ADN en muestras de hígado de pollo fijadas en una solución de formol al 4% y 10%, purificadas con el Kit de Qiagen.	66
13	Porcentaje de recuperación de AFB ₁ de los hígados humanos control fortificados, por la técnica de Qian & Yang, 1984.....	67
14	Porcentaje de recuperación de hígados humanos control fortificados con una mezcla de AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ y AFG ₂ (técnica de Qian & Yang, 1984).....	69
15	Aflatoxinas (ng g ⁻¹) de hígados control humanos y con HCC, en ambas columnas LC ₁₈ con la técnica de Qian y Yang (1984).....	71
16	Prueba de t apareada para conocer la diferencia entre la capacidad de retención de la primera y segunda columna LC ₁₈ de AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFM ₂ y AFL, donde no hubo diferencias estadísticamente significativas.....	74

N°	Tabla (continuación)	Página
17	Diferencias estadísticamente significativas de la Prueba de t apareada para conocer la diferencia entre la capacidad de retención de la primera y segunda columna LC ₁₈ de AFG ₂ , AFM ₁ y AFP ₁	74
18	Cuantificación de aflatoxinas libres (ng g ⁻¹) en los hígados control de humano y con hepatocarcinoma.....	75
19	Diferencias estadísticamente significativas y no significativas del análisis de varianza de las AF libres extraídas de las muestras de hígados humanos control y con HCC con el método de Qian y Yang (1984).....	76
20	Cuantificación por HPLC de aflatoxinas libres (ng g ⁻¹) de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control.....	77
21	Aflatoxinas libres (ng g ⁻¹) de los sobrenadantes de las muestras con HCC humano cuantificadas por HPLC.....	78
22	Prueba de t de las AF libres de muestras de hígados humanos control y con HCC con el método de Koeltzow & Tanner (1990) donde no hubo diferencias estadísticamente significativas.	80
23	Resumen de las Aflatoxinas libres (ng g ⁻¹) de los sobrenadantes de muestras de hígado control humano.	81
24	Aflatoxinas libres (ng g ⁻¹) de los sobrenadantes de muestras de hígados humanos con HCC.	82
25	Diferencia significativa de la concentración de AFB ₁ de los obrenadantes de los hígados humanos control y con HCC con el kit de Qiagen.....	83
26	Diferencia estadísticamente significativa en el análisis de varianza de la concentración de AFB ₂ de los sobrenadantes de las muestras de hígados humanos control y con HCC.....	84
27	No hubo diferencia estadísticamente significativa en el análisis de varianza de la concentración de AFG ₁ de los sobrenadantes de las muestras de hígados humanos control y con HCC.....	85
28	Diferencia estadísticamente significativa de la concentración de AFG ₂ de los sobrenadantes de las muestras de los hígados humanos control y con HCC....	86
29	Diferencia estadísticamente significativa de la concentración de AFM ₁ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC.....	87
30	Diferencia estadísticamente significativa de la cantidad de AFM ₂ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC.....	88
31	No hubo diferencia estadísticamente significativa de la cantidad de AFP ₁ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC.....	89
32	Diferencia estadísticamente significativa de la cantidad AFL de los sobrenadantes del hígado humano control y con HCC.....	89

LISTA DE FIGURAS

N°	Figura	Página
1	Distintas aflatoxinas producidas por especies de <i>Aspergillus</i> (Sweeney & Dobson, 1999).....	2
2	Ruta de biotransformación de AFB ₁ (Eaton <i>et al.</i> , 1994 b).....	4
3	Ruta biosintética de las aflatoxinas (Duarte, 1995).....	5
4	Incidencia de hepatocarcinomas a nivel mundial por cada 100, 000 habitantes (Ferlay <i>et al.</i> , 2004).....	10
5	Hepatocarcinoma uninodular. El lóbulo hepático derecho tiene un tumor redondeado de aspecto parenquimatoso con áreas fibrosas y micronódulos periféricos (Duarte, 1995).....	12
6	Hepatocarcinoma multinodular (Duarte, 1995).....	12
7	Hepatocarcinoma masivo. El tumor ocupa todo el lóbulo izquierdo; también hay nódulos tumorales en el lóbulo derecho. En la parte media inferior se observa la invasión tumoral de la vena porta (Duarte, 1995).....	13
8	Hepatocarcinoma difuso. A) Hígado cirrótico con algunos nódulos amarillentos con signos de necrosis; es difícil discernir entre los nódulos cirróticos y los tumorales (hepatocarcinoma mimetizado en cirrosis). B) Acercamiento del hepatocarcinoma difuso (Duarte, 1995).....	13
9	Hepatocarcinoma trabecular. En el centro se localiza una trabécula circular cortada transversalmente, las células neoplásicas muestran citoplasma granuloso y nucléolos prominentes, y son muy similares a los hepatocitos normales. Las trabéculas se delimitadas de los sinusoides por células endoteliales (Duarte, 1995).....	14
10	Hepatocarcinoma con gran infiltración de vasos sanguíneos (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).	14
11	Hepatocarcinoma con patrón acinar. Células cancerosas arregladas en amplias trabéculas y estructuras pseudoglandulares con espacios dilatados con material proteínico (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).....	15
12	Vista panorámica de un hepatocarcinoma poco diferenciado Las células presentan citoplasma amplio que contiene retículo endoplásmico liso, inclusiones lipídicas, y muchas mitocondrias rodeadas por cisternas curvas. Las células sinusoidales han sido remplazadas por células endoteliales que forman verdaderos vasos capilares (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).....	15
13	Corte histológico a gran aumento de un hepatocarcinoma. Se observan canalículos con pigmento biliar entre los hepatocitos neoplásicos (Duarte, 1995).....	16
14	El citoplasma presenta abundantes mitocondrias con crestas cortas e inclusiones amorfas intramatricales. Hay cisternas dilatadas en el retículo endoplásmico que contiene material amorfo electro-denso (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).....	16

N°	Figura (Continuación)	Página
15	Hepatocarcinoma moderadamente diferenciado. El citoplasma presenta cisternas concéntricas de retículo endoplásmico rugoso e inclusiones lipídicas (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).....	17
16	Hepatocarcinoma rico en glucógeno. Las células contienen abundantes gránulos de glucógeno que separan a los organelos. Los hepatocitos están delimitados por capilares bien formados (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).....	17
17	Hepatocarcinoma poco diferenciado. Células neoplásicas poligonales u ovals con un canalículo biliar primitivo entre las células (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).....	18
18	Aspecto del citoplasma con mitocondrias e inclusiones. Las células muestran un citoplasma amplio con abundantes mitocondrias. Hay núcleos ovalados con nucléolos grandes (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).....	19
19	Estructura del CYP245A1, miembro de la familia del citocromo P ₄₅₀ . Las α -hélices y las hojas- β se presentan con cintas y flechas, respectivamente. El grupo Hemo se presenta en color rojo y la molécula del imidiazol en azul. Los elementos estructurales secundarios están etiquetados de acuerdo a la nomenclatura típica de cualquier citocromo P ₄₅₀ plegado (Makino, 2007).....	27
20	Localización del citocromo P ₄₅₀ en la membrana del retículo endoplásmico (Vergeres & Waskell, 1995).....	28
21	Estructura de la Glutación S-transferasa P1-1 de <i>Homo sapiens</i> . Imagen tomada del (National Center for Biotechnology Information NCBI con MMDB ID: 71079. PDB ID: 19GS (Oakley <i>et al.</i> , 1997).....	30
22	Ruta de la activación metabólica que guía a la formación de aductos por AFB ₁ (Smela <i>et al.</i> 2001).....	35
23	Pico cromatógrafico de cada aflatoxinas detectadas.....	56
24	Curva de calibración de AFB ₁	58
25	Curva de calibración para AFB ₂	58
26	Curva de calibración para AFG ₁	59
27	Curva de calibración para AFG ₂	59
28	Curva de calibración para AFM ₁	60
29	Curva de calibración para AFM ₂	61
30	Curva de calibración para AFP ₁	61
31	Curva de calibración para Aflatoxicol (AFL).....	62
32	Regresión lineal de la comparación de la concentración de ADN de las muestras de hígado humano control, purificado con el método de Gupta (1984) y con Kit de Qiagen.....	64

N°	Figura (Continuación)	Página
33	Cromatogramas de HPLC de las AF libres de la muestra de hígado control 2 extraídas con la técnica de Qian y Yang (1984). A) 1ª columna LC ₁₈ retuvo AFL y AFG ₂ y B) 2ª columna LC ₁₈ retuvo AFL, AFM ₁ y AFB ₂	72
34	Cromatogramas de HPLC de las AF libres de la muestra 2 con hepatocarcinoma (2-HCC) extraídas con la técnica de Qian y Yang (1984). A) 1ª columna LC ₁₈ y B) 2ª columna LC ₁₈	73
35	AF del sobrenadante de la muestra 27 de hígado control	78
36	AF el sobrenadante de la muestra 3 de hepatocarcinoma (3-HCC).....	79
37	AF del primer sobrenadante de la muestra 5 de hígado humano control extraídas con la técnica de Koeltzow y Tanner (1990).....	81
38	AF del segundo sobrenadante de la muestra de hígado humano control extraídas con la técnica de Koeltzow y Tanner (1990).....	81
39	AF del tercer sobrenadante de hígado humano control extraídas con la técnica de Koeltzow y Tanner (1990).....	82
40	Interacción de la Media de AFB ₁ presente en las muestras de hígados humanos control y con HCC.....	83
41	Gráfica de las Medias de AFB ₂ presente en las muestras de hígado humano control y con HCC de los sobrenadantes del kit de Qiagen.....	84
42	Gráfica de las Medias de AFG ₁ presente en las muestras de hígado humano control y con HCC de los sobrenadantes de kit de Qiagen.....	85
43	Interacción de la Media de AFG ₂ presente en las muestras de hígado humano control y con HCC.....	86
44	Interacción de la Media de AFM ₁ presente en las muestras de hígado humano control y con HCC.....	87
45	Interacción de la Media de AFM ₂ presente en las muestras de hígado humano control y con HCC.....	88
46	Interacción de la Media de AFL presente en las muestras de hígado humano control y con HCC.....	90
47	Cromatogramas de HPLC, a) Aducto de AFB ₁ -N ⁷ -Gua sintetizado en el IBUNAM, lab C-119 y eluido de columna de inmutofinidad. El pico cromatográfico tuvo un tiempo de retención (RT) de 22.418 minutos y un área bajo la curva de 2.7 equivalente a 2.1 µg mL ⁻¹ . b) Aducto de AFB ₁ -N ⁷ -Gua reportado por Essigman et al.(1977), con un tiempo de retención de 22 min, y detectado a 365 mn.....	93
48	Cromatograma de HPLC del estándar del aducto de AF-ADN eluido de columna LC ₁₈ . El pico cromatográfico tuvo un tiempo de retención (RT) de 22.396 minutos y un área bajo la curva de 2.0 equivalente a 1.6 µg mL ⁻¹ de AF-ADN.....	93
49	Cromatograma de HPLC para analizar los aductos de AFB ₁ -ADN de la muestra de hígado control 1.....	94

N°	Figura (Continuación)	Página
50	Cromatograma de HPLC para analizar los aductos de AFB ₁ -ADN de la muestra de hepatocarcinoma 15.	94
51	Cromatograma del aducto de AFB ₁ -N ⁷ -Gua de: A) grupo de las muestras de hígado control, y B) grupo de las muestras de hígados con HCC.....	95

RESUMEN

Las aflatoxinas (AF) son metabolitos secundarios producidos principalmente por los hongos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, son peligrosos contaminantes naturales de diversos alimentos como cereales (maíz, arroz, sorgo, etc.), oleaginosas (cacahuate, nueces, semilla de algodón, pistaches, etc.) y especias (chile, pimienta, mostaza, etc.) entre los más importantes y cuando las AF contaminan estos alimentos, son un riesgo para la salud animal y humana. De las cuatro principales AF (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂), la AFB₁ es la más tóxica, es un potente hepatocarcinógeno para animales y un cancerígeno probado para humanos. El hepatocarcinoma celular (HCC) humano es el quinto cáncer más frecuente a nivel mundial, donde el 80% de los casos ocurren en países en vías de desarrollo. El HCC es rápidamente fatal en casi todos los casos, con un índice de supervivencia menor a un año del diagnóstico. La infección crónica por virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), el consumo excesivo de alcohol y la exposición a una dieta contaminada con AF, son considerados los principales factores de riesgo para el desarrollo del HCC. El VHB y las AF tienen una interacción sinérgica en el desarrollo de esta enfermedad. El objetivo de esta investigación fue identificar y cuantificar las AF libres, sus metabolitos hidroxilados y los aductos de AFB₁-ADN en hígados humanos control y con HCC en México, para conocer la exposición de ambos grupos a esta toxina. Se analizaron y compararon muestras de 15 hígados control y 15 con HCC obtenidos de autopsias del Hospital General de México, SSA. La extracción de AF libres de hígado se realizó con columnas LC₁₈ y por columnas de inmunoafinidad para AF totales. Se sintetizó artificialmente el cancerígeno activo AFB₁-N⁷-Gua, con 2 mg mL⁻¹ de AFB₁ y 16 mg de ADN de timo de ternera en presencia de diclorometano y ácido 3-cloro-peroxibenzoico; se detectó en un tiempo de retención de 22 minutos por HPLC y se usó como estándar de identificación. La extracción y purificación del ADN de las muestras de hígados humanos se hizo con la técnica de Gupta (1984). Los aductos de AFB₁-ADN de cada muestra se obtuvieron, al hidrolizar el ADN puro con ácido clorhídrico 0.15 M y calor, se retuvieron con columnas de inmunoafinidad. La cuantificación de las AF libres y de los aductos de AFB₁-ADN se realizó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).

El porcentaje de recuperación de la técnica Qian & Yang (1984) para la extracción de AFB₁ fue de 95 % con un límite de detección (LOD) de 0.1 ng g⁻¹. El porcentaje de recuperación de la mezcla de las 4 AF (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂) fue de 96 % para AFB₁; de 96 % para AFB₂; de 81 % para AFG₁ y de 90% para AFG₂, todas con un LOD de 0.1 ng g⁻¹. El porcentaje de recuperación fue excelente. Con el método de Qian & Yang (1984), en cada muestra de hígado control se identificaron las diferentes AF libres cuyos promedios de concentración (ng g⁻¹) fueron: AFB₁ (0.1), AFB₂ (0.3), AFG₁ (0.2), AFG₂ (17.5), AFM₁ (2.3), AFM₂ (64.1), AFP₁ (87.8) y Aflatoxicol (AFL) (0.8). En las muestras con HCC se encontraron concentraciones (ng g⁻¹) promedio de AF libres: AFB₁ (0.2), AFB₂ (1.0), AFG₁ (0.9), AFG₂ (0.5) y los metabolitos hidroxilados AFM₁ (16.4), AFM₂ (27.3), AFP₁ (104.6) y AFL (1.4). Las AFG₁, AFM₁, AFM₂ y AFP₁ se encontraron en grandes cantidades, por ser productos de la biotransformación de AFB₁ que se convierten a metabolitos hidroxilados menos tóxicos y de fácil excreción, mientras hubo trazas de AFB₁ en ambos grupos de hígado humano. La cantidad promedio de AF en hígados control fue de 173.2 ng g⁻¹ y con HCC de 179.5 ng g⁻¹, las muestras de hígado con HCC tuvieron mayor cantidad de AF que las muestras control, sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas. El análisis de varianza para ver la diferencia entre la concentración de cada una de las AF en hígados control y con HCC por la técnica de Qian & Yang (1984) obtuvo que AFB₂ (P=0.0054*), AFG₁ (P=0.0092*) y AFM₁ (P=0.0001*), sí tuvieron una diferencia estadísticamente significativa, pero no sucedió lo mismo con AFM₂ (P=0.3705), AFP₁ (P=0.6) y AFL (P=0.2332).

La cantidad promedio de AF libres totales de muestras control obtenidas con el método de Koeltzow y Tanner (1990) fue de 37.2 ng g⁻¹, y de hígados con HCC fue de 52.4 ng g⁻¹ pero no hubo diferencia estadísticamente significativa. Respecto a la técnica de Qiagen recuperó más AF libres en la suma de los 3 sobrenadantes 833.95 con promedio de 83.40 ng g⁻¹ que es mayor a la de Gupta que tuvo un total de 221.45 ng g⁻¹ y un promedio de 22.15 ng g⁻¹.

Las muestras de hígado control no tuvieron al aducto AFB₁-N⁷-Gua, mientras que las muestras con HCC (10 g) tuvieron 4.5 µg. La ausencia del aducto en muestras control y su presencia en muestras con HCC, indica que los aductos AFB₁-N⁷-Gua son factores etiológicos para el desarrollo del cáncer hepático.

ABSTRACT

Aflatoxins (AF) are secondary metabolites produced mainly by the fungi *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*, and they turn out to be natural and dangerous contaminants of several foodstuffs such as cereals (maize, rice, sorghum, etc.), oil seeds (peanuts, nuts, cotton seed, pistachos, etc.) and spices (hot peppers, mustard, black pepper, etc.) among the most important, and when AF contaminate these foodstuffs, they represent a risk for both animal and human health. From the four main AF (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂), AFB₁ is the most toxic, it is considered a potent hepatocarcinogen for animals and a proved carcinogen for humans. The human hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most frequent cancer worldwide, with 80% of cases occurring in developing countries. HCC is rapidly fatal in almost all cases with a survival period generally less than 1 year from diagnosis. The chronic infection with hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) infection, excessive alcohol consumption and a diet with AF are considered to be the major risk factors for HCC. HBV and AF exhibit a synergistic interaction in the development of this disease. The aim of this research was to identify and quantify the free AF and their hydroxylated metabolites and adducts AFB₁-DNA in human control livers, and with HCC in Mexico, to know human exposition to this food carcinogen in both groups. Fifteen healthy human livers (controls) and 15 HCC livers, were obtained, analyzed and compared from autopsies of the "Hospital General de Mexico", SSA. The extraction of free AF from liver obtained with LC₁₈ and with immunoaffinity columns for total AF. Two µg mL⁻¹ of AFB₁-ADN adduct standard were synthesized. The AFB₁-N⁷-Gua adduct is not commercially sold by any industry, then it was synthesized with 2 mg mL⁻¹ of AFB₁ and 16 mg of DNA calf thymus in the presence of dichloromethane and 3-chloro peroxybenzoic acid and identified at a retention time of 22 minutes. The DNA extraction and purification was made with the method of Gupta (1984). AFB₁-N⁷-Gua adducts from each sample were obtained hydrolyzing pure DNA from each sample with chloride 0.15 M and heat, they were capted and concentrated by immunoaffinity columns. The quantification of free AF and AFB₁-N⁷-Gua adducts were achieved by high-performance liquid chromatography (HPLC).

The recovery percentage of free AFB₁ extraction by the method Qian & Yang (1984) with LC₁₈ columns was of 95 %, with a detection limit (LOD) of 0.1 ng g⁻¹. The recovery percentage of the four AF mixture (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂), was 96 % for AFB₁; 96 % for AFB₂; 81 % for AFG₁ and 90% for AFG₂, all with a LOD of 0.1 ng g⁻¹. The recovery percentage was excellent. With the Qian & Yang (1984) method, each control liver samples showed an average concentration (ng g⁻¹) of: AFB₁ (0.1), AFB₂ (0.3), AFG₁ (0.2), AFG₂ (17.5), AFM₁ (2.3), AFM₂ (64.1), AFP₁ (87.8) and AFL (0.8). The HCC samples had average concentrations (ng g⁻¹) of AFB₁ (0.2), AFB₂ (1.0), AFG₁ (0.9), AFG₂ (0.5), and the hydroxylated AFM₁ (16.4), AFM₂ (27.3), AFP₁ (104.6) and AFL (1.4). AFG₁, AFM₁, AFM₂ and AFP₁ were found in large amounts, because they are products of the biotransformation of AFB₁ that converts to less toxic metabolites hidroxilated and of easy excretion, while there were only traces of AFB₁ in both groups of human liver. The average amount of AF in control liver was 173.2 ng g⁻¹ and with HCC of 179.5 ng g⁻¹, liver samples with HCC had higher concentrations of AF than control samples, however differences were not statistically significant. Variance analysis of the difference of AF between control and HCC liver samples by Qian & Yang (1984) showed that AFB₂ (P=0.0054*), AFG₁ (P=0.0092*) and AFM₁ (P=0.0001*) had a significant statistical difference, but there were no significant statistical differences for AFM₂ (P=0.3705), AFP₁ (P= 0.6) and AFL (P=0.2332).

The average of total free AF in control samples obtained by Koeltzow y Tanner (1990) method was 37.2 ng g⁻¹, and HCC samples was 52.4 ng g⁻¹, but differences were not statistically significant. Qiagen technique recovered more free AF in the addition of the three supernatants, 833.95 ng g⁻¹ with an average 83.40 ng g⁻¹, more than the recovery of Gupta with a total of 221.45 ng g⁻¹ and an average of 22.15 ng g⁻¹.

Control liver samples had no AFB₁-N⁷-Gua adduct, while samples with HCC had a total of 4.5 µg. The absence of adduct in control samples and its presence in HCC samples, indicates that AFB₁-N⁷-Gua adducts are etiological factors for the development of liver cancer.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Las aflatoxinas.

I.1.1. Definición.

Las AF son un grupo de alrededor de 16 metabolitos secundarios derivados de las furanocumarinas (Bhatnagar *et al.*, 2003). Son producidos principalmente por los mohos *Aspergillus flavus* Link y *A. parasiticus* Speare. *Aspergillus flavus* es un hongo que contamina frecuentemente cereales; *A. bombycis* Peterson *et al.*, *A. ochraceoroseus* Bartoli & Maggi y *A. nomius* Kurtzman *et al.*, son especies que también producen AF, pero no se encuentran comúnmente (Bennett & Klich 2003; García & Heredia, 2006; Mohanamba *et al.*, 2002; Sweeney & Dobson, 1999).

Se trata de hongos toxígenos, capaces de desarrollarse en gran variedad de sustratos, pudiendo contaminar los cultivos (principalmente de cereales, oleaginosas y especias) en el campo, cuando los granos se procesan, transforman o almacenan en condiciones que favorezcan el desarrollo fúngico. El crecimiento de estos hongos y la producción de toxinas dependen de muchos factores ambientales como son la temperatura, humedad, luz, etc. Existen cuatro tipos principales de aflatoxinas (AF): B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) y G₂ (AFG₂) (Bhatnagar *et al.*, 2003; Sodhi *et al.*, 2005).

Las AF son potentes mutágenos y cancerígenos que causan la enfermedad llamada **aflatoxicosis** que puede producir **efectos agudos** cuando se consumen en niveles medios ($\mu\text{g kg}^{-1}$) a altos (mg kg^{-1}) y cuyos síntomas son hemorragias, diarreas, daños al hígado, edema, alteración en la digestión, en el metabolismo de los alimentos, y en ocasiones la muerte. El consumo de niveles bajos (ng kg^{-1}) a moderados de AF ($\mu\text{g kg}^{-1}$) produce **efectos crónicos** como son la baja absorción de los alimentos, crecimiento lento, baja respuesta a vacunas, inmunodepresión, cáncer, síndrome de Reye, hepatitis, cirrosis y problemas renales (Bennett & Klich, 2003). Las AF dañan a todos los seres vivos desde virus hasta el hombre, actúan sobre sus ácidos nucleicos que son la base de la vida (Wyllie and Morehouse, 1978), a nivel económico afectan principalmente a la industria avícola (Oğuz *et al.*, 2000).

I.1.2. Estructura química.

Las AF son bis-dihidrofurano-cumarinas, y se les nombra B y G según los colores con que fluorescen bajo la luz UV, ya sea azul (= **B**lue) o verde (= **G**reen), en cromatografía de capa fina (Sweeney & Dobson, 1999). La estructura química de las

AF de tipo B se caracteriza por un anillo ciclopentanona y las AF de tipo G por un anillo de lactona (Figura 1). Las AFB₂ y AFG₂ tienen un anillo bisfuranil saturado y las AFB_{2a} y AFG_{2a} tienen una estructura bisfuranil hidratada (Bhatnagar *et. al.*, 2003).

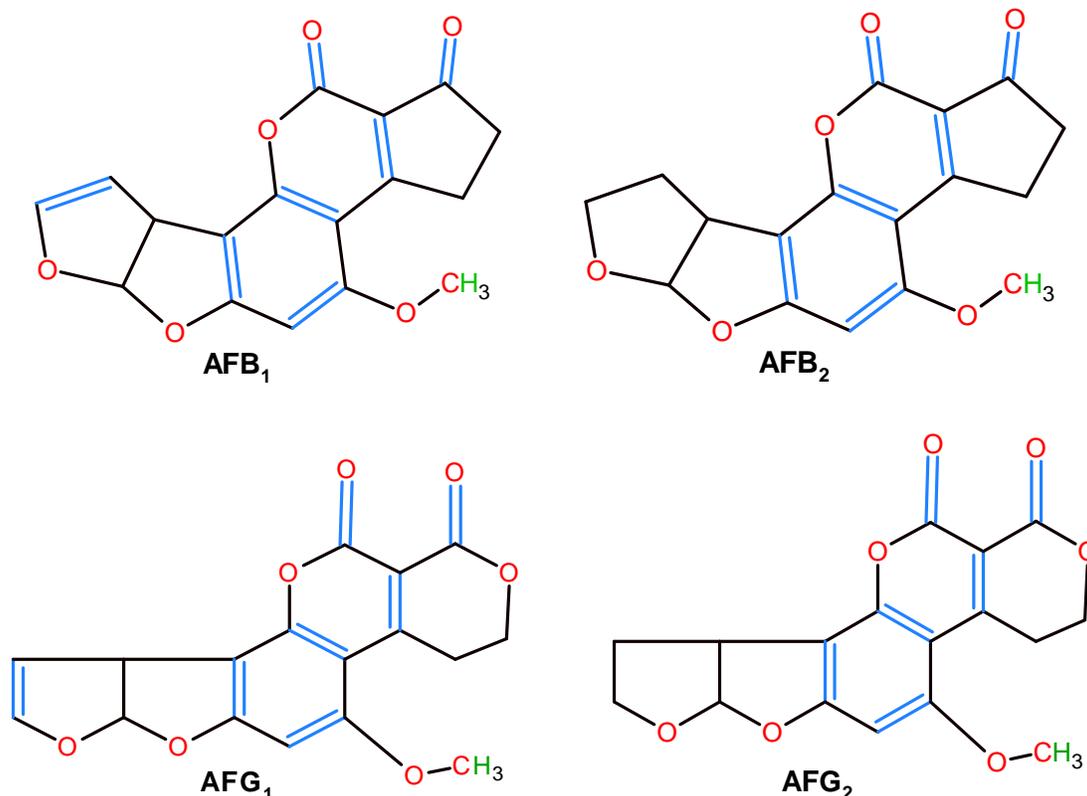


Figura 1: Distintas aflatoxinas producidas por especies de *Aspergillus* (Sweeney & Dobson, 1999).

I.1.3. Propiedades fisicoquímicas (OPS, 1983).

Las AF exhiben una intensa fluorescencia cuando son expuestas a luz UV de onda larga. Esto permite detectar las AF a concentraciones extremadamente bajas (alrededor de 0.5 ng ó menos por mancha en cromatografía de capa fina). Las AF son solubles en disolventes no polares ó medianamente polares como el cloroformo y metanol, especialmente en dimetilsulfóxido, y son insolubles en agua.

Las AF son termo-resistentes y estables a temperaturas elevadas hasta 260°C la AFB₁ y llegando a 320°C la AFM₁. Sin embargo, son inestables cuando se les expone a la luz, particularmente a la radiación UV. Las AF en cloroformo y en benceno son estables por muchos años si se mantienen en lugar oscuro y frío.

Las AF resisten la cocción, fermentación, pasteurización, ultrapasteurización y la nixtamalización, pero pueden destruirse con un calentamiento drástico en autoclave en presencia de amoníaco ó hipoclorito.

Durante la nixtamalización, el anillo de lactona de las AF es susceptible a la hidrólisis alcalina (De longh *et al.*, 1962). Cuando las AF están a un pH alcalino, de 8 a 12, debido al tratamiento de cal en agua, el anillo de lactona se abre y se pierde la fluorescencia, parece que no hay AF. El anillo de lactona se cierra a un pH ácido de 1 a 3, como el que tiene el jugo gástrico del estómago, y cuando el bolo alimenticio regresa a un pH neutro, como sucede al secretarse pancreatina al duodeno, las AF se reactivan y fluorescen otra vez. La presencia de proteínas, el pH y la duración de la nixtamalización pueden modificar la correcta extracción química de las AF (Beckwith *et al.*, 1975; Moctezuma, 2002). Si el tratamiento alcalino es leve, la acidificación invertirá la reacción, reconstituyendo la AF original.

I.1.4. Biosíntesis.

La biosíntesis de las AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ es un proceso controlado por 20 reacciones enzimáticas (Yu *et al.*, 2000). Los genes activos en la biosíntesis de las AF se agrupan en una región de 70 Kb del ADN de *A. flavus* y *A. parasiticus*, bajo control de los genes regulatorios *aflR* (Chang *et al.*, 1993) y *aflJ* (Meyers *et al.*, 1998). La síntesis de las AF se da por reacciones de óxido-reducción, comienza con la conversión de acetato y malonil CoA a una unidad iniciadora hexanoil, por el producto de dos genes de lipasa sintetasa (*fas-1* y *fas-2*), la unidad iniciadora hexanoil es extendida por un policétido sintetasa (*pksA*) a ácido norsolorínico (NOR), que es el primer producto estable de la ruta (Bhatnagar *et al.*, 2003; Sweeney & Dobson, 1999) (**Figura 2**). La conversión de NOR a averantina involucra una deshidrogenasa, codificada por el gen *nor-1* ó *nor-A*. Es posible que los pasos catalíticos en la conversión de averufina a versicolorina B se deban a genes específicos del conglomerado, *cypX*, *moxY* y *avfA*. La cetoreductasa (*ver1*) y mono-oxigenasa (*verA*) son requeridas para la conversión de versicolorina A a dimetil-esterigmatocistina (DMST), a partir de aquí la ruta se bifurca y se presenta la conversión de DMST a AFB₁, AFG₁ por un lado, y por el otro la conversión de O-metil-esterigmatocistina ó dihidro-O-metil-esterigmatocistina a AFB₂ y AFG₂, donde se requiere la presencia de un NADPH-dependiente mono-oxigenasa (*ordA*). La

formación de las toxinas G involucra una enzima adicional codificada por *ordB* (Bhatnagar *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2000).

A continuación presentamos dos figuras, una de la ruta de biotransformación de la AFB₁ (**Figura 2**), y otra de la ruta biosintética de las AF (**Figura 3**), con objeto de precisar tanto los cambios que van ocurriendo a las AF, como las enzimas y genes involucrados.

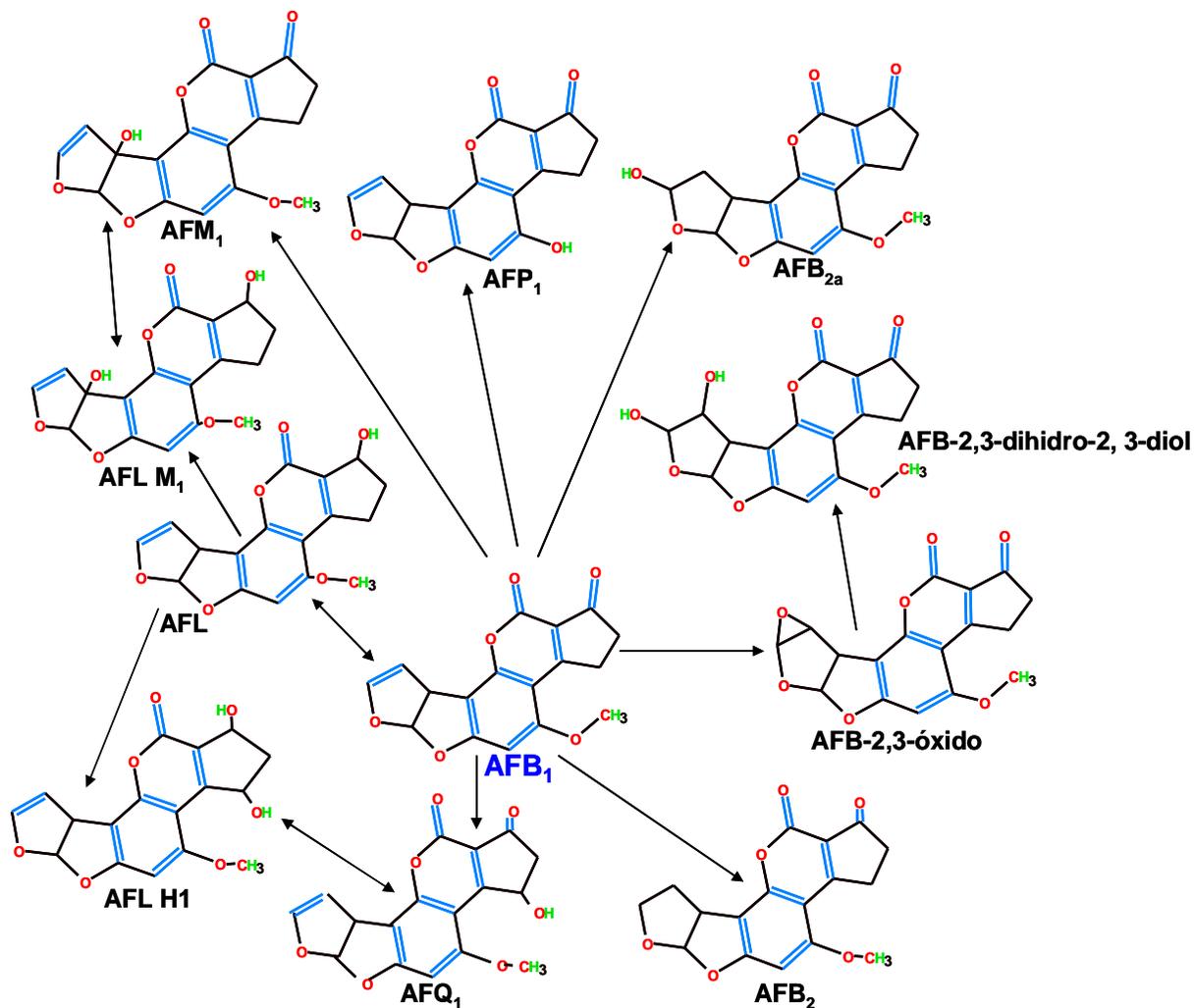


Figura 2: Ruta de biotransformación de AFB₁ (Eaton *et al.*, 1994).

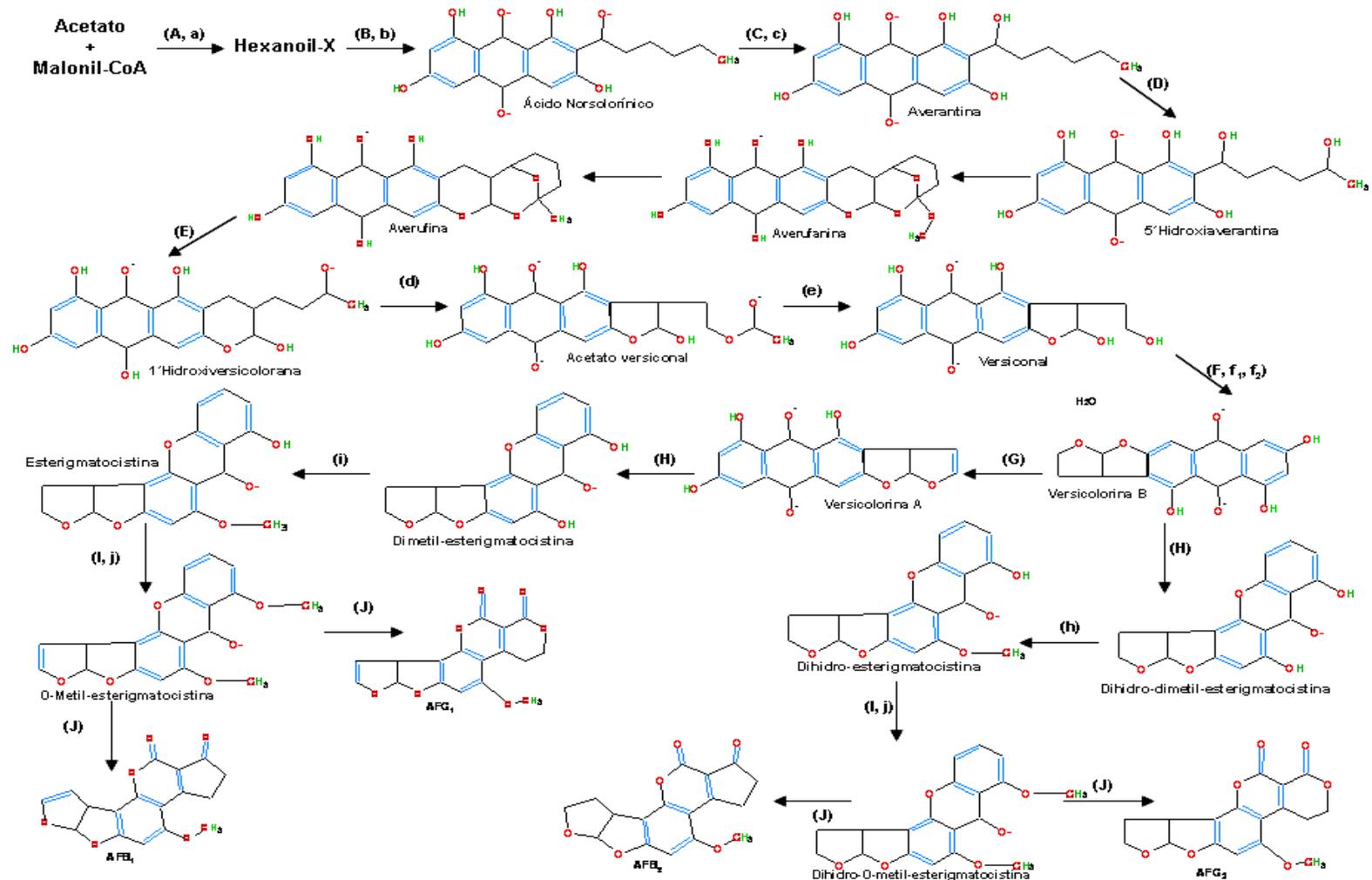


Figura 3: Ruta biosintética de las aflatoxinas. Enzimas involucradas: (a) lipasa sintetasa, (b) policétido sintetasa, (c) ácido norsolorínico reductasa, (d) acetato hemicetal versiconal reductasa, (e) estereasa, (f₁) versicolorina B sintetasa, (f₂) versiconil ciclasa, (g) desaturasa, (h) O-metiltransferasa (MT-II), (i) O-metil transferasa, (j) O-metil transferasa (MT-I). Genes involucrados: (A) *fas-1A* y *fas-2A*, (B) *pksA*, (C) *nor1*, *norA*, (D) *avnA*, (E) *avfI* (*avfIB* y *avfIW*), (F) *vbs*, (G) *verB*, (H) *ver1A* y *afIS*, (I) *omtA* y (J) *ord1* (Sweeney & Dobson, 1999).

I.1.5. Ocurrencia natural.

La contaminación de los alimentos por AF es un fenómeno natural y frecuente, a nivel de campo o de almacenamiento de los granos en países tropicales y subtropicales (Santuario *et al.*, 1999), estas condiciones climáticas de temperatura, de 30°C a 35° C y de humedad relativa entre 20% y 41%, estimulan el crecimiento de los hongos. Asimismo, la producción de AF se incrementa por el estrés de las plantas al ser dañadas por insectos, por la sequía, la baja nutrición o el retraso de la cosecha (Jordan & Pattison, 1996).

Frecuentemente la contaminación del alimento por AF sucede en las tolvas de almacenamiento de las granjas, en particular si la cosecha ha estado mojada. También, porque las AF están presentes en las camas de las aves de corral y el polvo de los locales (Gordon & Jordan, 1985).

Como es muy frecuente la contaminación de los alimentos con AF, la Secretaría de Salud de México ha establecido dos Normas Oficiales para la regulación de AF en granos y cereales. La Norma Oficial NOM-188-SSA1-2002, establece el máximo nivel de AF permitidas en cereales destinados para consumo humano, así como los requerimientos sanitarios para el transporte y almacenamiento de los productos. El nivel máximo de tolerancia permitido para AF totales en humanos, vacas lecheras y aves es de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, y cuando se excede este nivel, los granos y cereales sólo pueden ser utilizados para alimento de animales de engorda. Así, el límite máximo permitido para pollos de engorda es de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, ganado porcino de 100-200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y bovino de 100-300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Secretaría de Salud, 2002).

I.1.6. Métodos de control de aflatoxinas.

El conocimiento de que las AF provocan serios efectos a los humanos y animales, ha llevado a muchos países a establecer niveles máximos de tolerancia en piensos y alimentos en las últimas décadas, para salvaguardar la salud de los humanos, así como el interés económico de productores y comerciantes. El rango mundial de los límites de AFB₁ es de 1 a 20 ng g^{-1} , y de AF totales de 0 a 35 ng g^{-1} (FAO, 2004).

La contaminación de alimentos con AF es más común en países tropicales que en aquellos con clima frío, y esto representa un riesgo para la salud humana. Es necesario establecer controles aplicables a alimentos para humanos. Los grupos humanos con un nivel económico más alto tienen una dieta más diversa y esto

reduce su exposición a las AF, más adelante se describirán eventos fatales, sucedidos en diversos países como Kenia (Strosnider *et al.*, 2006), que no deben repetirse.

Hay diferentes medidas de protección contra la exposición a AF, **Tabla 1**. Estas medidas de control de AF pre y post-cosecha se aplican de modo individual o en grupos.

Las medidas primarias se usan para reducir la exposición, y las secundarias para alterar el metabolismo y la acumulación de AF, se pueden buscar aductos que son biomarcadores específicos de gran eficacia (Kensler *et al.*, 1999). La prevención primaria, tiene como objetivo el reducir la exposición de AF en la dieta. Las medidas de control incluyen variedades de plantas resistentes a plagas de los cultivos de la canasta básica, disminuir el crecimiento de hongos en los cultivos cosechados, mejorar el almacenamiento y usar agentes que atrapen ó bloqueen a las AF (Wild & Hall, 2000).

La prevención secundaria, se aplica a gente con alto riesgo de exposición a las AF, se busca modular el metabolismo de las AF ingeridas con agentes quimiopreventivos, es una desintoxicación, y tiende a reducir la cantidad interna de AF y el riesgo subsecuente (Wild *et al.*, 1986 a; Wild, 2007). Estos agentes preventivos pueden ser naturales o drogas (Wild & Hall, 2000).

Tabla 1. Estrategias para reducir la exposición y riesgo a aflatoxinas en países subdesarrollados (Groopman *et al.*, 2007).

Tipo de medida de control	Propuesta	Resultado	Referencia Bibliográfica
Primaria	Control del almacenamiento Post-cosecha	-Reducción en la exposición a AF.	Yu <i>et al.</i> , 2005.
	Agentes atrapadores (Novasil)	-Decremento de los niveles de aductos de AF-albumina y de AF-ADN en modelos animales y en tratamientos clínicos en humanos.	Afriyie-Gyawu <i>et al.</i> , 2005.
	Clorofilina		Breinholt <i>et al.</i> , 1995.
Secundaria	Polifenoles (Té verde)	-Eficacia para prevenir tumores de hígado en modelos de rata.	Moyers & Kumar, 2004.
	Ditioleiciones (Oltipraz)		Kensler <i>et al.</i> , 2004.
	Sulforafanos (Brócoli)	-Modulación de los biomarcadores de AF (AF-ADN) en tratamientos clínicos en humanos.	Juge <i>et al.</i> , 2007.

Para conocer la exposición a AF en un largo periodo de tiempo, se investigaron los aductos de AF-albúmina (biomarcadores) en la sangre periférica en roedores (Sabbioni *et al.*, 1987) y después se encontraron en gente expuesta (Wild *et al.*, 1990b; Sabbioni *et al.*, 1990). La detección de biomarcadores se ha usado para conocer una exposición crónica extensa, de larga duración y nivel en muchas poblaciones del mundo (Wild *et al.*, 1990a).

I.2. Cáncer

I.2.1. Definición de cáncer

El cáncer es un trastorno del crecimiento y diferenciación celular, que conduce a la formación de masas tumorales, capaces de diseminarse, su origen es multifactorial, y de mal pronóstico. El cáncer es un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y de la célula de origen.

El genotipo y fenotipo de una célula cancerosa son la manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología de la célula, que en conjunto establecen el crecimiento de un tumor clínicamente evidente, e implican el desarreglo de un gran número de rutas metabólicas: auto-producción de las señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la apoptosis, proliferación sin límite, angiogénesis (producción de vasos sanguíneos dentro del tumor), invasión y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000; Frank, 2001; Duesberg & Li, 2003; Beckman & Loeb, 2005). Tales alteraciones genéticas convierten a las células normales en malignas, y al continuar este proceso se produce un cáncer invasivo (Hahn & Weinberg, 2002; Dayaram & Marriott, 2008).

Las etapas que limitan la velocidad del desarrollo de esta enfermedad, son el tipo de lesiones presentes en los órganos, y la edad (Hanahan & Weinberg, 2000; Beckman & Loeb, 2005).

El genoma de las células cancerosas sufre modificaciones en su composición: mutaciones puntuales, pérdida (inactivación de genes supresores de tumores) ó ganancia (activación de proto-oncogenes) de material genético y cambios en los cromosomas (Hanahan & Weinberg, 2000; Hoeijmakers, 2001; Pihan & Doxsey, 2003).

I.2.2. La importancia e incidencia del cáncer en el mundo y en México.

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Más del 70% de todas las muertes por cáncer se producen en los países de ingresos medios y bajos, donde los recursos disponibles para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad son limitados o inexistentes (Schottenfeld & Beebe-Dimmer, 2005). En 2005, de 58 millones de defunciones registradas en todo el mundo, 7.6 millones se debieron a cáncer (Coleman *et al.*, 1993; Tovar-Guzmán *et al.*, 2001; Schottenfeld & Beebe-Dimmer, 2005; OMS, 2005). Entre los tipos de cáncer con mayor mortalidad están los de pulmón (17.8%), estómago (10.4%) e hígado (8.8%) (Ferlay *et al.*, 2004).

El cáncer en México ocupa el cuarto lugar como causa de muerte, con aproximadamente 64,000 muertes en 2005, de las cuales 37,000 personas eran menores de 70 años (OMS, 2005).

El HCC primario es el quinto cáncer más común a nivel mundial, con un estimado de 473 000 nuevos casos anualmente, y ocasiona 600,000 muertes al año (Groopman & Abbioni, 1991; Wogan, 1991; Wild & Hall, 2000; Kensler *et al.*, 2004).

La incidencia de este cáncer varía en diferentes áreas del mundo, siendo los países de Asia y África los más afectados (Wogan, 1991; Groopman & Abbioni, 1991; Kirk *et al.*, 2006; Sornmayura *et al.*, 2007). La edad media de diagnóstico y muerte por HCC está entre los 45 y 55 años (Kensler *et al.*, 2003). La mayoría de los pacientes sobrevive menos que un año después de la diagnosis (Wild & Hall, 2000). El mapa de la **Figura 4**, perteneciente a la base de datos de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer Internacional (IARC por sus siglas en inglés), ilustra la distribución desigual de este cáncer en el mundo. Más del 80% de la incidencia de HCC se presenta en los países subdesarrollados (Ferlay *et al.*, 2004).

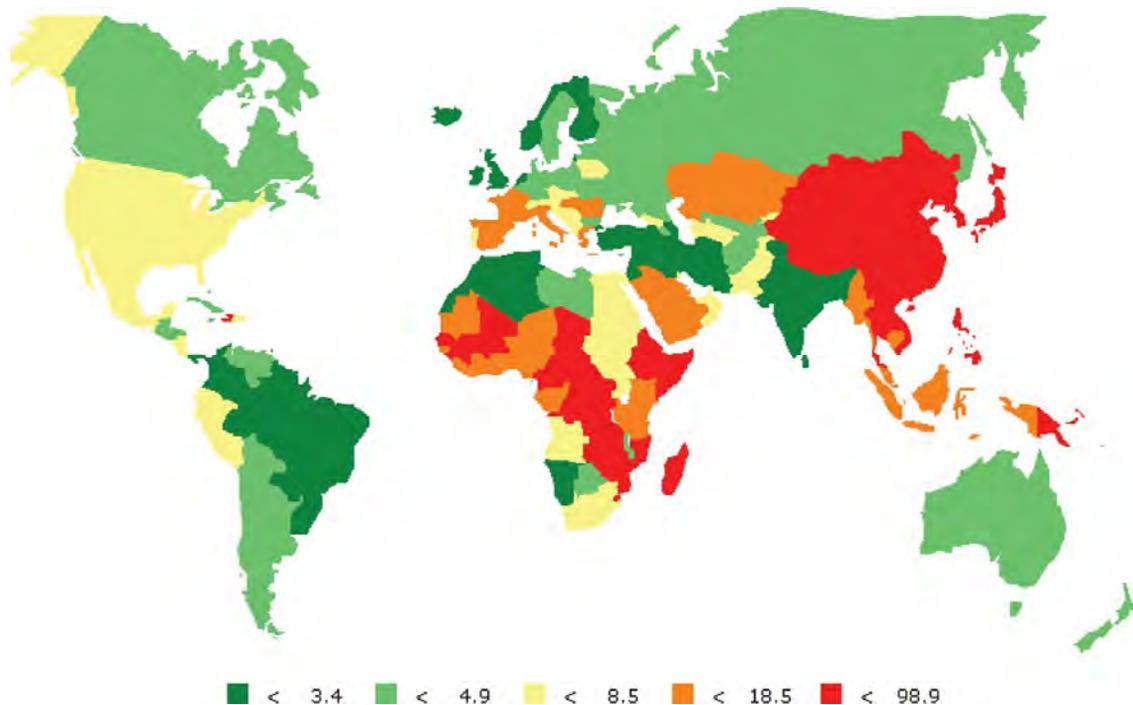


Figura 4: Incidencia de hepatocarcinomas a nivel mundial por cada 100, 000 habitantes (Ferlay *et al.*, 2004).

En China, surgen 235,000 nuevos casos de este tumor al año, representando casi el 50% del total del mundo. El cáncer de hígado es tres veces más común en hombres que en mujeres. La incidencia de hepatocarcinoma (HCC) representa en 25% de todos los cánceres en hombres en el Oeste de África, y arriba del 10% de la mortalidad masculina (Wild & Hall, 2000).

Los tumores malignos de hígado representan el 1% del total de las defunciones en México, y ocupan el lugar 19 en frecuencia dentro de las neoplasias malignas. Los tumores primarios malignos de hígado más frecuentes son el HCC y el colangiocarcinoma periférico que en conjunto ocupan más del 95% de los casos. Los datos acerca de México son contradictorios, Mondragón-Sánchez *et al.* (2004) reportan que el HCC es un tumor poco frecuente, corresponde a 1.4% de todas las neoplasias malignas, la incidencia en series de autopsia va de 0.56 a 1.2%, menor a la de otros países de Latinoamérica. La incidencia entre hombres y mujeres no es muy marcada, la relación hombre:mujer es 1.5:1. Por otro lado, la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2002) dice que México es el primer lugar, en el continente Americano, en enfermedades hepáticas que van de hepatitis a cirrosis y HCC.

De las 64,000 muertes por cáncer en México, el HCC causa el 6.5% de defunciones en mujeres y el 7% de defunciones en hombres por cada 100,000 habitantes (OMS, 2005).

La incidencia del HCC en México va incrementándose, y se correlaciona con el aumento de la incidencia de hepatitis C (El-Serag & Mason, 1999). La Organización Mundial de la Salud ha estimado que el 80% de los pacientes con hepatitis C aguda desarrollarán hepatitis crónica, de los cuales 20% desarrollará cirrosis y de éstos el 0.4 a 2.5% evolucionarán a HCC (Mondragón-Sánchez *et al.*, 2005).

I.2.3. El cáncer hepático.

I.2.3.1. Características del hepatocarcinoma (HCC).

El HCC es un tumor de crecimiento relativamente lento, que cuando es detectado en una etapa temprana puede ser curado por cirugía. El tiempo de crecimiento va de 1 a 14 meses, con un promedio de cuatro meses. La enfermedad puede estar presente de 3 a 30 años antes de que sea diagnosticada. La mayoría de los tumores podrían ser detectados y retirados cuando no tienen metástasis. Sin embargo, la mayoría de los casos de HCC son diagnosticados en una etapa avanzada, cuando los síntomas se presentan (una masa hepática palpable, dolor abdominal, pérdida de peso, fatiga, y en algunos casos ictericia), el cáncer ha hecho metástasis y el tumor ya tiene un diámetro de 14 cm (Villa *et al.*, 2000; Czauderna & Perilongo, 2004). El tumor se disemina por invasión local hacia ramas de la vena porta y de la arteria hepática, y por metástasis a ganglios linfáticos regionales, a pulmón, hueso, corazón y glándula suprarrenal (Mondragón-Sánchez *et al.*, 2004).

La supervivencia bajo estas condiciones es de dos a cuatro meses, y una supervivencia de dos años es casi nula. En HCC inoperables, la presencia del receptor de estrógeno específico de hígado, es un indicador significativamente negativo para la supervivencia, y su presencia se asocia con el HBs-Ag que indica un peor pronóstico (Villa *et al.*, 2000; Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).

La angiografía y la tomografía computacional llevan al temprano reconocimiento de nódulos sospechosos en el hígado cirrótico y el no cirrótico. Los nódulos regenerativos presentan venas, mientras los nódulos con displasia poseen un incremento en el modelo arterial, y esta característica es proporcional al grado de malignidad (Hayashi *et al.*, 1999).

Macroscópicamente, el hígado con HCC presenta masas nodulares blandas, hemorrágicas y ocasionalmente verdosas por la bilis. Existen cuatro formas macroscópicas para la identificación del HCC: uninodular (**Figura 5**), multinodular (**Figura 6**), masiva (la masa tumoral ocupa la mayor parte de un lóbulo) (**Figura 7**) y difusa (numerosas masas y nódulos pequeños que se mimetizan con nódulos cirróticos) (**Figura 8**) (Duarte, 1995).

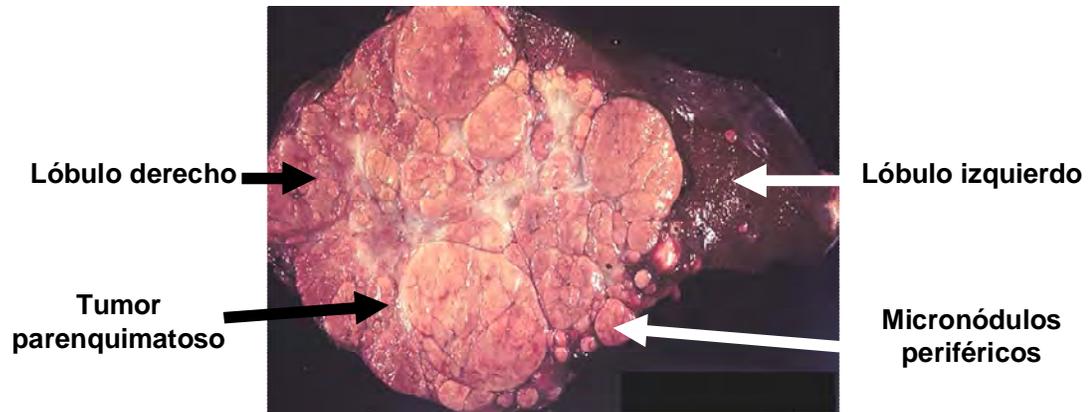


Figura 5: Hepatocarcinoma uninodular. El lóbulo hepático derecho tiene un tumor parenquimatoso redondeado con áreas fibrosas y micronódulos periféricos (Duarte, 1995).



Figura 6: Hepatocarcinoma multinodular (Duarte, 1995).

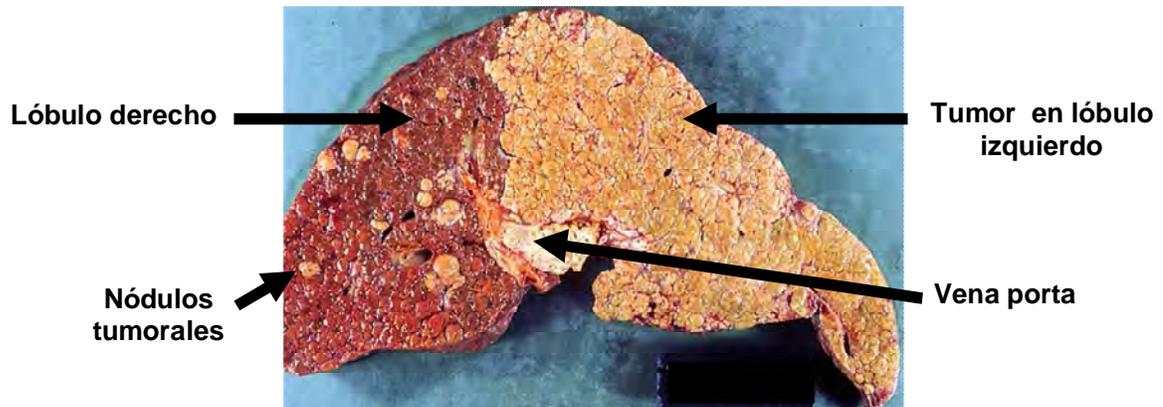


Figura 7: Hepatocarcinoma masivo. El tumor ocupa todo el lóbulo izquierdo; también hay nódulos tumorales en el lóbulo derecho. En la parte media inferior se observa la invasión tumoral de la vena porta (Duarte, 1995).

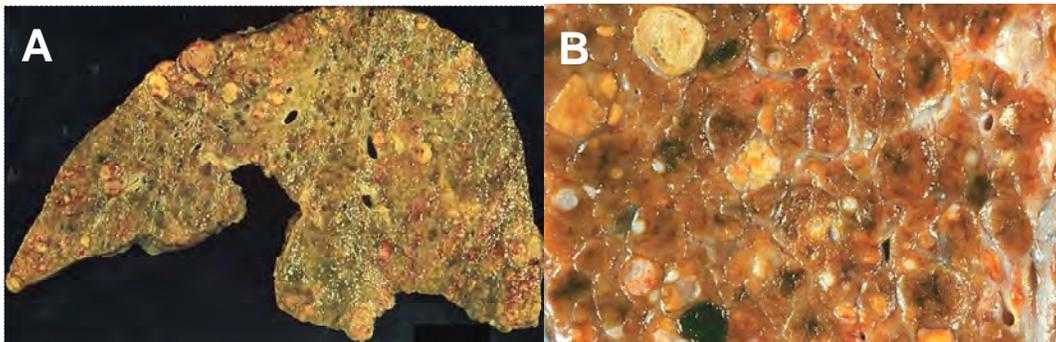


Figura 8: Hepatocarcinoma difuso. A) Hígado cirrótico con algunos nódulos amarillentos con signos de necrosis; es difícil discernir entre los nódulos cirróticos y los tumorales (hepatocarcinoma mimetizado en cirrosis). B) Acercamiento del hepatocarcinoma difuso (Duarte, 1995).

Los HCCs van desde bien diferenciados hasta tumores altamente anaplásicos no diferenciados. En las lesiones bien diferenciadas y moderadamente diferenciadas, las células neoplásicas son parecidas a hepatocitos en un acomodo trabecular o acinar (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).

Las células del tumor son similares a hepatocitos, por lo que los criterios clásicos para la diagnosis histopatológica de un HCC son: el arreglo trabecular (**Figura 9**), el crecimiento intravascular en el tumor (**Figura 10**), la formación de capilares intertrabeculares, y la aparición de canales o acinares (**Figura 11**) (Edmonson, 1985). Además hay que observar si el tumor presenta bilis, esteatosis (hígado graso), inclusiones globulares, glucógeno, la inmuno-reactividad para antitripsina alfa-1 (AAT) y alfa-fetoproteína (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).

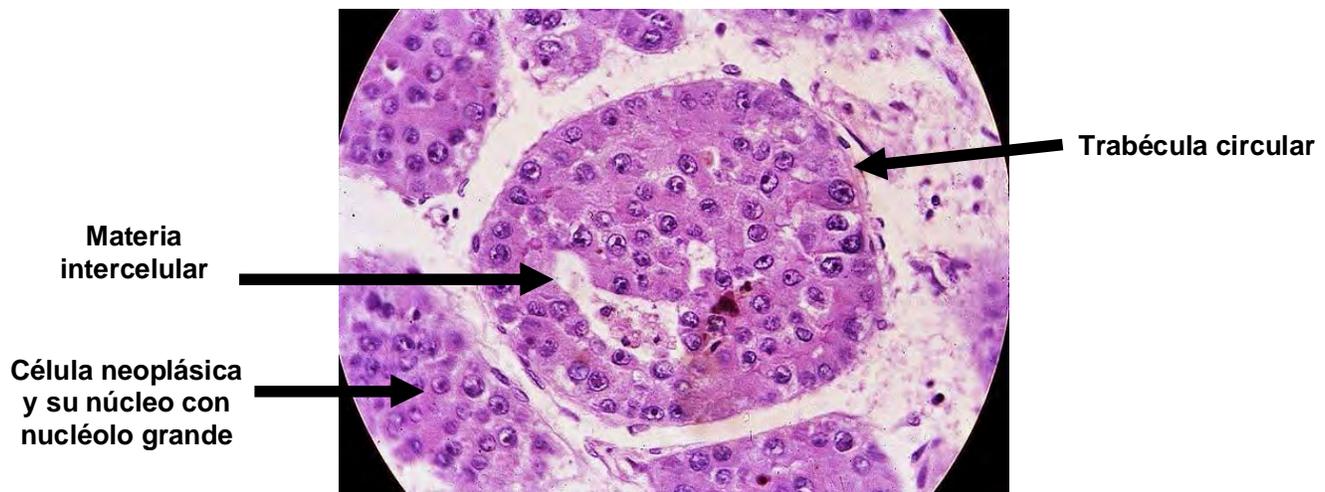


Figura 9: Hepatocarcinoma trabecular. En el centro se localiza una trabécula circular cortada transversalmente, las células neoplásicas muestran citoplasma granuloso y nucléolos prominentes, y son muy similares a los hepatocitos normales (Duarte, 1995).

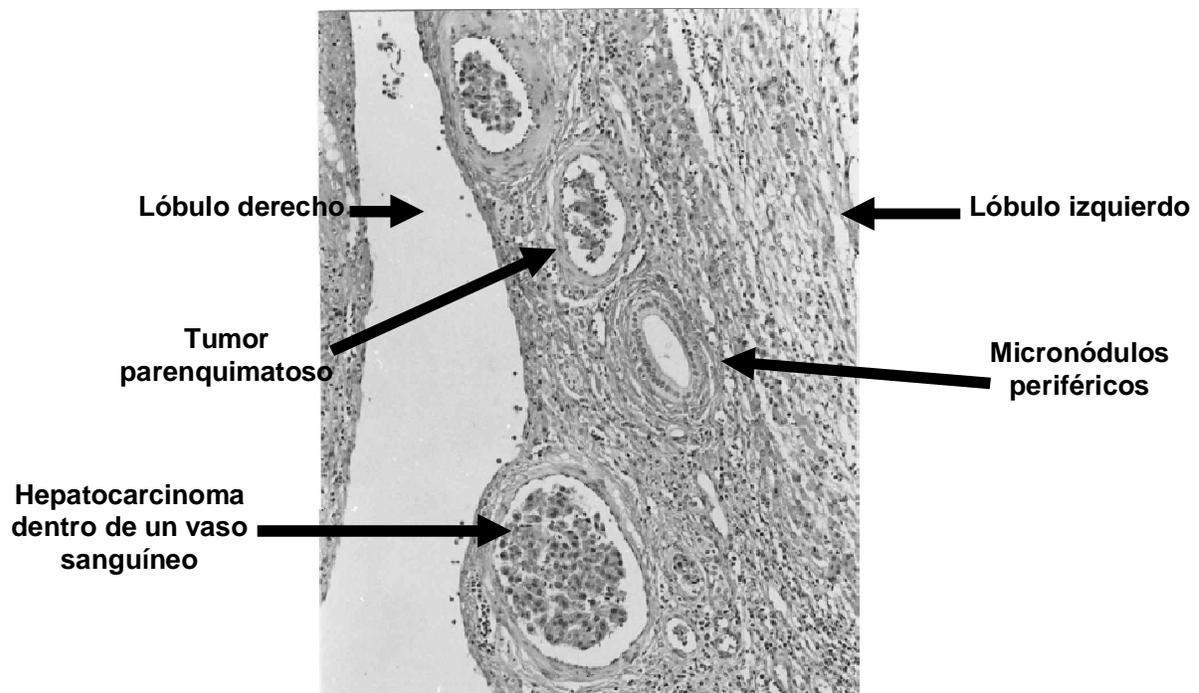


Figura 10: Hepatocarcinoma con gran infiltración de vasos sanguíneos (Dominguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).

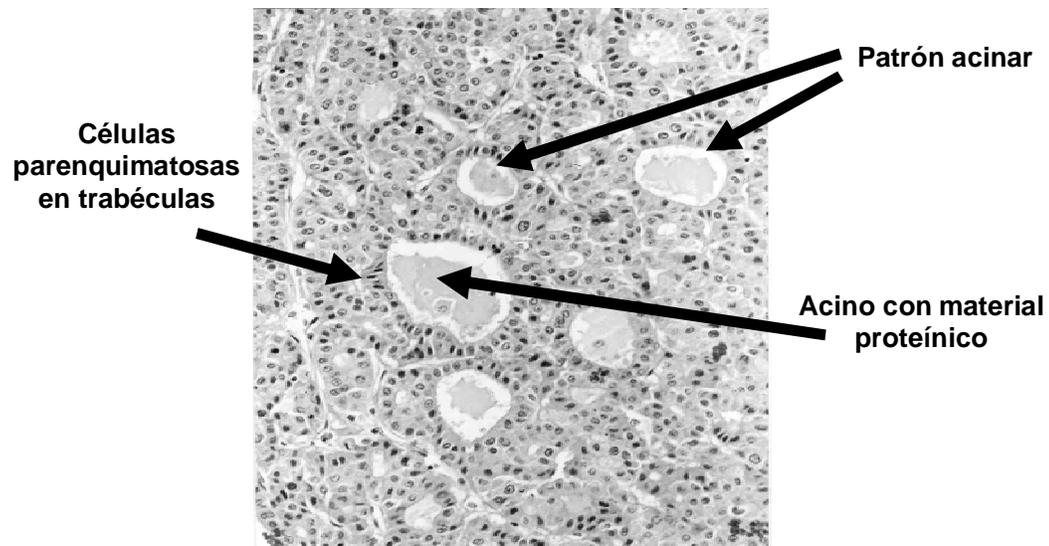


Figura 11: Hepatocarcinoma con patrón acinar. Células cancerosas arregladas en amplias trabéculas y estructurasseudoglandulares con espacios dilatados con material proteínico (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).

Las células de los HCC bien diferenciados, parecen hepatocitos normales. Los hepatocitos preservan su forma poligonal con mucho citoplasma, mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, glucógeno y gotas de lípidos (**Figura 12**).

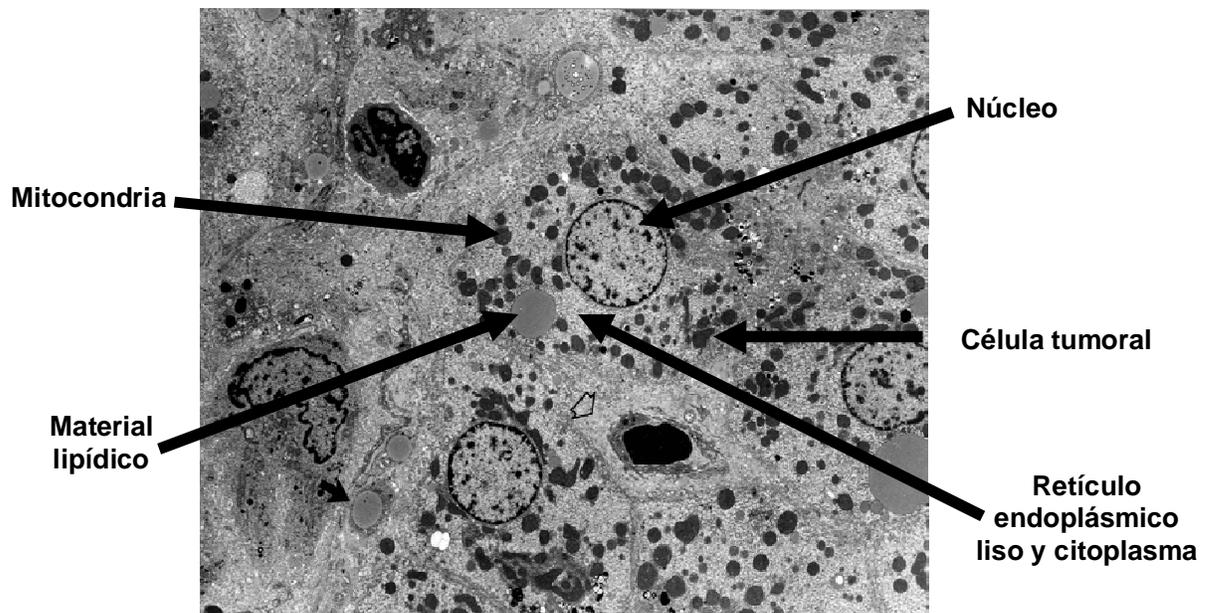


Figura 12: Vista panorámica de un hepatocarcinoma poco diferenciado. Las células presentan citoplasma amplio que contiene retículo endoplásmico liso, inclusiones lipídicas, y muchas mitocondrias rodeadas por cisternas curvas. Las células sinusoidales han sido remplazadas por células endoteliales que forman verdaderos vasos capilares (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).

También hay proliferación de células miofibroblásticas perisinudales, que algunas veces poseen gotas de lípidos (**Figura 12**) (Enzan *et al.*, 1994).

Los canales biliares se forman en el centro de los trabéculas, donde los hepatocitos neoplásicos están unidos por complejos de empalme que forman microvellosidades tipo intestinales (**Figura 13**).

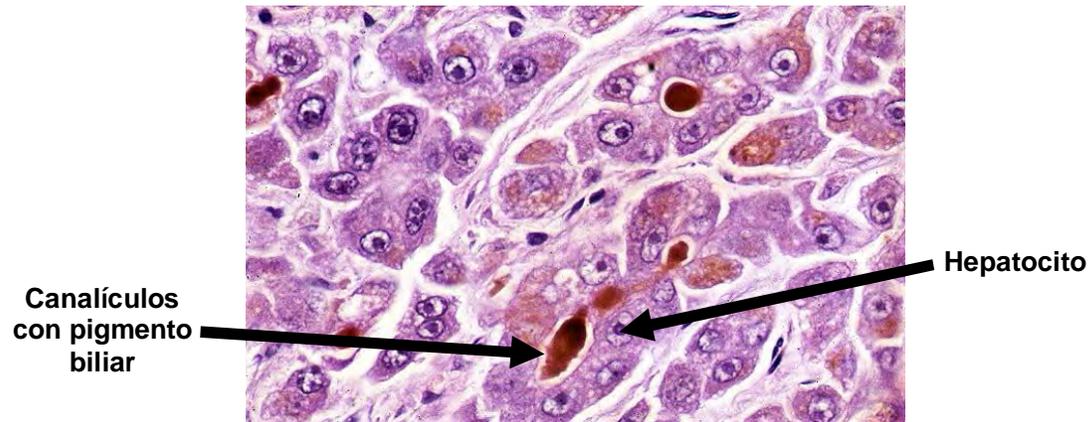


Figura 13: Corte histológico a gran aumento de un hepatocarcinoma. Se observan canales biliares con pigmento biliar entre los hepatocitos neoplásicos (Duarte, 1995).

Con la falta de la diferenciación hay una pérdida progresiva de la organización de los componentes del citoplasma. El número de mitocondrias aumenta, y aparecen inclusiones intramitocóndrias filamentosas ó cristalinas (**Figura 14**).

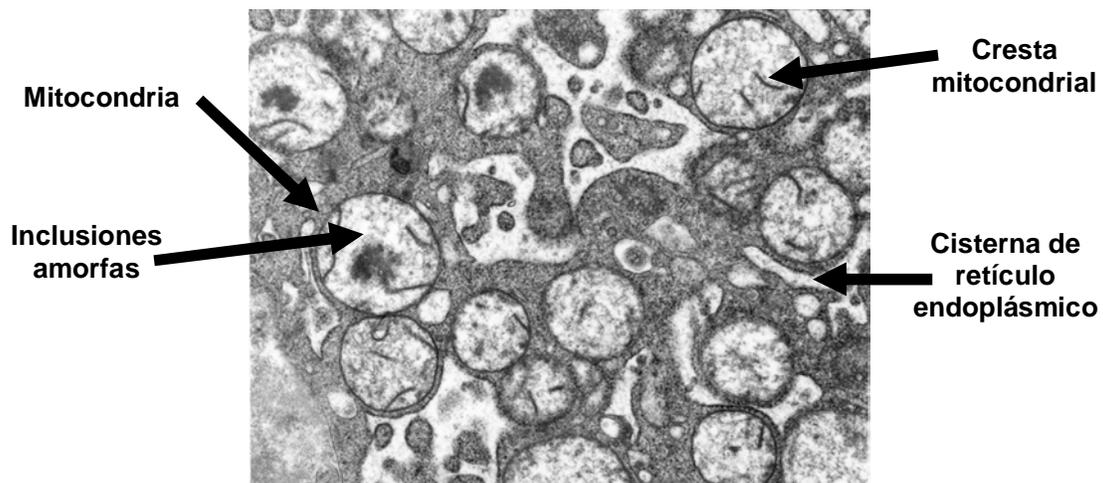


Figura 14: El citoplasma presenta abundantes mitocondrias con crestas cortas e inclusiones amorfas intramitocóndrias. Hay cisternas dilatadas en el retículo endoplásmico que contiene material amorfo electro-denso (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).

El aparato de Golgi y las cisternas del RER se hinchan y contiene material amorfo electro-denso. El retículo endoplásmico rugoso (RER) se arregla concéntricamente en relación a las mitocondrias (**Figura 15**).

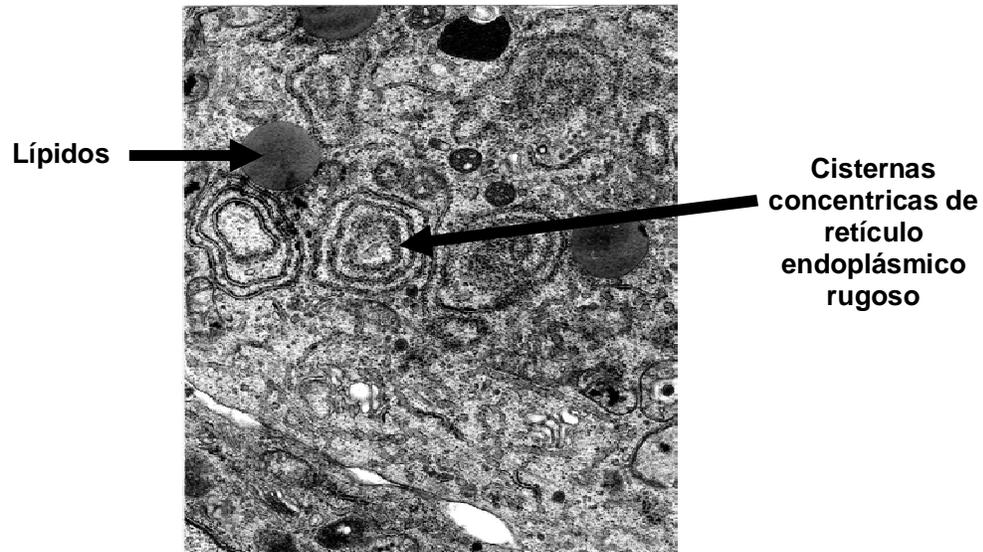


Figura 15: Hepatocarcinoma moderadamente diferenciado. El citoplasma presenta cisternas concéntricas de retículo endoplásmico rugoso e inclusiones lipídicas (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).

En tumores de células claras, las células contienen abundante glucógeno y son llamados HCC ricos en glucógeno (**Figura 16**).

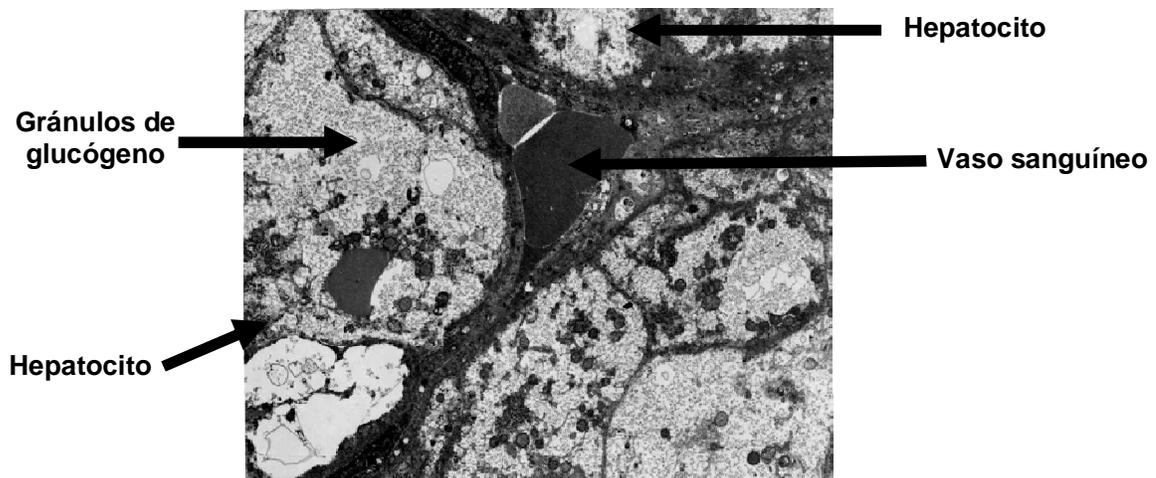


Figura 16: Hepatocarcinoma rico en glucógeno. Las células contienen abundantes gránulos de glucógeno que separan a los organelos. Los hepatocitos están delimitados por capilares bien formados (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).

En tumores pobremente diferenciados, los hepatocitos neoplásicos tienden a perder cohesión. Ellos se unen por pequeños desmosomas, que parecen pequeños hoyos entre las células adyacentes (**Figura 17**). Los canales biliares disminuyen (Ordoñez & McKay, 1983; Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).

En HCC bien y moderadamente diferenciados, hay capilarización de sinusoides (células que rodean los vasos sanguíneos), la cual está ausente en tumores pobremente diferenciados (Park *et al.*, 1998). Las células endoteliales son anormales, contienen pocas menestras, cortas digitaciones y uniones en proceso de empalme.

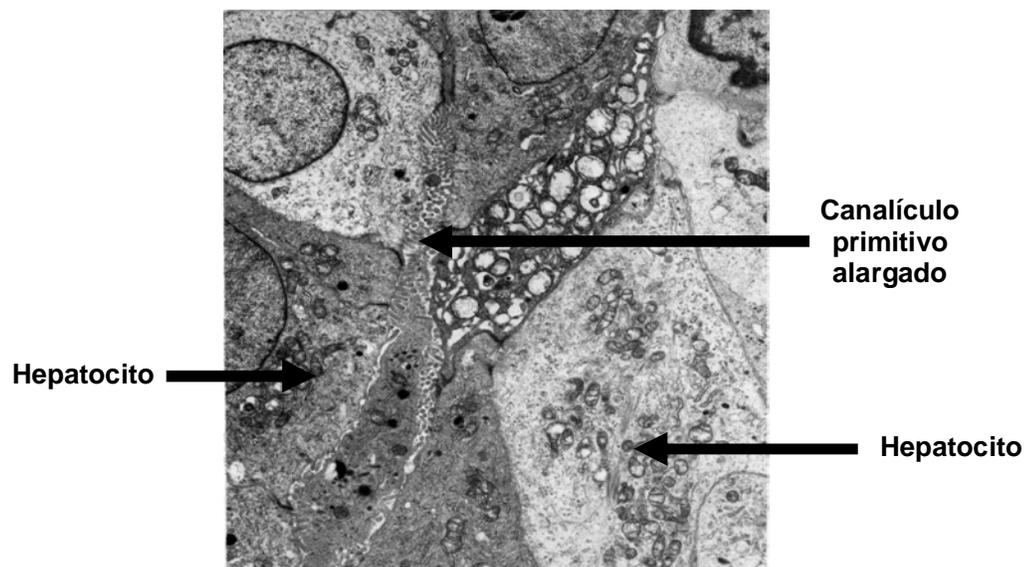


Figura 17: Hepatocarcinoma poco diferenciado. Células neoplásicas poligonales u ovals con un canalículo biliar primitivo entre las células (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).

El espacio de Disse es amplio, tiene linfocitos, eritrocitos, material amorfo nuclear, y a colágeno V que es un material como láminas, con una disminución del colágeno I y II (Tabarin *et al.*, 1987). Las inclusiones citoplasmáticas comunes en los HCC, son vacuolas autofágicas, cuerpos antitripsina alfa-1 (Stromeyer *et al.*, 1980), agregados globulares de retículo endoplásmico liso, e inclusiones globulares hechas de estructuras filamentosas arregladas al azar o paralelamente (**Figura 18**) (MacDonald & Beclard, 1990; Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).

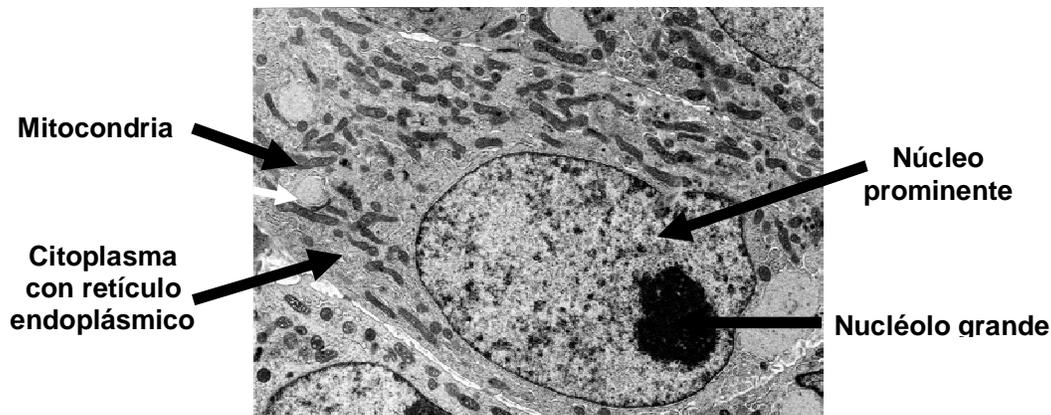


Figura 18: Aspecto del citoplasma con mitocondrias e inclusiones. Las células muestran un citoplasma amplio con abundantes mitocondrias. Hay núcleos ovalados con nucléolos grandes (Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001).

1.2.4. Factores de riesgo que contribuyen al desarrollo del hepatocarcinoma.

Investigaciones epidemiológicas, han señalado que la cirrosis alcohólica, fármacos inmuno-supresores, plaguicidas (Yu, 1995; John, 1996; Kensler *et al.*, 2004; Schottenfeld & Beebe-Dimmer, 2005), la obesidad, la diabetes y el tabaco son inductores del cáncer en hígado (Marrero *et al.*, 2005).

Sin embargo, los principales factores de riesgo para el desarrollo del HCC en humanos, son la infección crónica con el virus de la hepatitis B (VHB) (Wogan, 1991; Álvarez *et al.*, 2000; Liaw & Sollano, 2006) ó el virus de la hepatitis C y la exposición a una dieta contaminada con AF, principalmente AFB₁ (Peers & Linsell, 1977; Groopman *et al.*, 1988; De Vries & Lamplugh, 1989; Wogan, 1992; Yu, 1995; John, 1996; Wild & Hall, 2000; Kimura *et al.*, 2004; Kensler *et al.*, 2004; Schottenfeld & Beebe-Dimmer, 2005; Talamini *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2006; Abdel-Wahab *et al.*, 2007; Dash *et al.*, 2007).

La relación entre la hepatitis y el HCC, se fundamenta en la presencia de ADN viral del VHB en células hepáticas tumorales (Álvarez *et al.*, 2000).

Se han realizado estudios sobre el control del HBV y la AFB₁, que demostraron una interacción sinérgica entre estos dos factores para el desarrollo del HCC (Ross *et al.*, 1992; Wild *et al.*, 1993; Qian *et al.*, 1994; Stuver, 1998; Ming *et al.*, 2002; McKillop *et al.*, 2006). La exposición a AF incrementa sustancialmente el riesgo de este cáncer en gente infectada crónicamente con VHB, lo cual ilustra el impacto deletéreo, que aún con niveles bajos de toxina en la dieta, puede tener en la salud humana (Wild *et al.*, 1993; Qian *et al.*, 1994; Ross *et al.*, 1992; Turner *et al.*, 2007).

I.2.4.1. Virus de la hepatitis B.

El VHB es un virus de ADN de doble cadena con una fuerte afinidad por los hepatocitos (Stuver, 1998). La asociación entre el VHB y el HCC fue reconocido debido a las relaciones geográficas entre la infección persistente con el virus y la incidencia del tumor (IARC, 1994).

El VHB, generalmente no tiene efecto oncogénico ó histopatológico sobre los hepatocitos infectados. La transformación maligna ocurre después de un largo periodo de enfermedades crónicas, asociadas con cirrosis, lo que sugiere que un mecanismo no específico es disparado por la respuesta inmune del hospedero. La inflamación crónica del hígado, la muerte celular continua y la proliferación celular consecuente puede incrementar la ocurrencia de alteraciones genéticas y el riesgo de cáncer (Nakamoto *et al.*, 1998).

Se estima que cada año a nivel mundial se diagnostican 50 millones de casos de infección por VHB. La edad de la infección con el VHB es importante para determinar la probabilidad de que una persona tenga una enfermedad aguda ó desarrollo persistente de la infección. El 90% de los bebés infectados vía perinatal será portadores crónicos del VHB, y el 10% de los adultos y adolescentes infectados conservarán el VHB (Stuver, 1998). El 75% de los casos infectados crónicamente son prevalentes en China y países del sureste de Asia, donde el VHB causa hepatitis crónica, cirrosis y HCC (Schottenfeld & Beebe-Dimmer, 2005).

Como el HCC comúnmente se origina junto con la cirrosis, la infección con VHB también es un importante promotor del desarrollo del tumor a través de diversos ciclos de necrosis y regeneración de las células hepáticas (Stuver, 1998). Por su acción en la iniciación y promoción del HCC, el VHB se ha considerado un cancerígeno completo (Trichopoulos *et al.*, 1987).

El VHB es un factor etiológico del HCC, por la detección de secuencias de ADN del VHB integradas clonalmente en las células tumorales en más del 90% de los pacientes con HCC positivos para el antígeno de la hepatitis B (HBsAg). La expresión de los genes virales del VHB, principalmente la proteína X, preS2 y la proteína tardía de la envoltura (LHBs), activan oncogenes *in vitro* y participan en el proceso de tumorigénesis, al incrementar la severidad de enfermedades inmunológicas (Stuver, 1998; Cougot *et al.*, 2005). La proteína X se une a la proteína p53 e inhibe su función (Stuver, 1998)

La presencia del HBsAg en el torrente sanguíneo por seis meses o más es la definición estándar de un "Portador". Este marcador, es el que incrementa el riesgo de cáncer de hígado hasta 50 veces (Wild & Hall, 2000). En estudios hechos en Texas y Taiwán, se estimó que el riesgo de desarrollar HCC aumenta de 25 a 37 veces en portadores del HBsAg en comparación con no-portadores (Sun *et al.*, 2003).

Se recomienda la aplicación de la vacuna, en los primeros años de vida, como prevención de la infección con HBV y del estado de portador (Wild & Hall, 2000). En China la efectividad de la vacuna es de alrededor de 70% en algunas áreas y del 90% en otras (Chen *et al.*, 1996). En África, la introducción de la vacuna en el Programa de Vacunación de los Niños, ha reducido el índice de infección en un 94%. Esta protección se estableció en Taiwán, donde la asociación temporal entre la introducción general de la vacuna del VHB y la reducción de la incidencia de HCC durante la infancia, sugiere el efecto directo de este virus como agente etiológico (Chang *et al.*, 1997).

El 60% de los casos de HCC a nivel mundial se atribuyen a infección crónica por VHB. El 67% de los casos de HCC en los países en vías de desarrollo y el 29% de los casos de los países desarrollados se asocian con el VHB (Stuver, 1998).

1.2.4.2. Virus de la hepatitis C.

Después del VHB, el virus de la hepatitis C (VHC) es el segundo factor de riesgo para el desarrollo de HCC, de hecho el 24% de todos HCC se atribuyen al VHC (Pisani *et al.*, 1997).

Hay una prevalencia del 1% de VHC en la mayoría de los países, aunque Japón, España e Italia tienen índices más altos y Egipto llega a tener una prevalencia del 20%. No hay una vacuna contra el VHC, pero el monitoreo del virus y la protección del paciente durante transfusiones de sangre, han reducido los índices de infección (Wild & Hall, 2000).

El VHC es un virus de ARN de cadena sencilla, no posee la enzima reversa transcriptasa y no se integra al genoma del hospedero (Stuver, 1998). El VHC se transmite de forma perinatal, parenteral por agujas contaminadas y compartidas entre drogadictos, inyecciones médicas, y por transfusiones de sangre contaminada (Schottenfeld & Beebe-Dimmer, 2005). Se estima que el 85% de las personas infectadas con el VHC desarrollan una infección persistente. Aunque la mayoría de

las infecciones crónicas de VHC son asintomáticas, hay niveles elevados de aminotransferasa. Del 20% al 40% de los pacientes infectados con VHC presentan hígado cirrótico (Stuver, 1998).

En la cirrosis hay una replicación viral persistente y este factor predispone al cáncer (Wild & Hall, 2000). Después de un periodo de 20 a 30 años de la infección, de 2% al 4 % de los pacientes con enfermedades crónicas del hígado desarrollan HCC (Schottenfeld & Beebe-Dimmer, 2005). En las personas infectadas con VHC progresan más las enfermedades crónicas del hígado, especialmente en hombres de mayor edad con una infección inicial, co-infecciones con el VHB y con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), inmunosupresión, y el consumo regular de alcohol (Schottenfeld & Beebe-Dimmer, 2005).

1.2.5. Alimentos con aflatoxinas asociados al hepatocarcinoma.

Los alimentos vegetales básicos con alto riesgo de contaminación de AF incluyen cereales (maíz, arroz, cebada, sorgo, etc.), oleaginosas (cacahuete, semillas de algodón, nueces como nuez de Brasil, pistache, etc.), higos, frutas secas y especias (Pittet, 1998). La presencia de AF en alimentos de origen animal como carne, leche, huevo y queso, es porque los animales consumen alimento contaminado con AF que pasan a huevos, leche y carne (Peraica *et al.*, 2002). Las AF se esparcen dentro de los alimentos y se acumulan en las partes grasas (Herzallah, 2009).

Las AFM₁ y AFM₂ son metabolitos hidroxilados termo-resistentes producidos por mamíferos que consumen alimentos contaminados con AFB₁ y AFB₂. Las AFB₁ y AFB₂ de vegetales son metabolizadas por el ganado a AFM₁ y AFM₂, respectivamente, con un índice de conversión de 1 a 3% (Ali *et al.*, 1999; Barbieri *et al.*, 1994).

Los cacahuates son usados en la fabricación de caramelos, dulces, pastas y como materia prima para la producción de aceite. El 60% de la producción mundial de cacahuete se destina a la extracción de aceite. El aceite de cacahuete posee el quinto lugar de los aceites mas consumidos (Santos, 2000). China, India y África son los principales productores de cacahuete (CONAB, 2006). La contaminación de cacahuates con AF, principalmente de AFB₁, es el principal factor que disminuye la calidad de esta oleaginosa y de sus derivados, usados en alimentos humanos y animales (Nakai *et al.*, 2008).

Las oleaginosas como nueces, cacahuates y semillas de algodón son frecuentemente contaminadas por AF (Stroka *et al.*, 2000). Las avellanas y las nueces son usadas como ingredientes en confitería, productos de panadería, helados, barras de chocolate, trufas, avellanas cubiertas con chocolate y dulces en general. El aceite de avellana se usa para preparar alimentos y elaborar cosméticos (Leichtfried *et al.*, 2004). Aunque las frutas de corteza dura son menos susceptibles a la contaminación por hongos, la formación de AF ocurre (Gürses, 2006). Las avellanas se contaminan con AF desde la cosecha hasta la obtención del producto final, principalmente en el descascarado, por lo que son un riesgo para los humanos (Bacaloni *et al.*, 2008).

La contaminación de pistaches por AF se ha estudiado en muchos países, en México, 2.2% de las muestras de pistache analizadas tuvieron más de 20 ng g⁻¹ (JECFA, 2008). En Suecia, 9.5% de las muestras de pistache tuvieron más de 2 ng g⁻¹ de AFB₁ (Thuvander *et al.*, 2001). El Ministerio de Salud de Japón, reportó que de las muestras de pistache analizadas en el periodo de 1972 a 1989, sólo el 2% de las muestras tuvieron arriba de 10 ng g⁻¹ de AFB₁ (JECFA, 1998). Las medicinas tradicionales a base de hierbas son populares en todo el mundo como suplementos alimenticios, y su venta ha crecido exponencialmente (Joshi & Kaul, 2001). En años recientes, la toxicidad de las medicinas herbales ha provocado interés al incrementarse su consumo en los países en vías de desarrollo (WHO, 2000). Los efectos tóxicos de las medicinas herbales has sido atribuidos a diversos factores que incluyen hepatotoxicidad de los componentes y de la contaminación de la materia prima (Bateman *et al.*, 1998). La contaminación por hongos y AF ocurre cuando las medicinas herbales crudas y como plantas, están húmedas ó se almacenan mal durante su preparación (Ali *et al.*, 2005).

Las especias se producen en países tropicales con alta temperatura, humedad y lluvia. Estas condiciones climáticas favorecen la contaminación de las especias por AF. En muchos países, diferentes especias son utilizadas para cocinar los alimentos. El proceso de secado de la pimienta roja consiste en colocarla bajo el sol y al aire abierto, lo que favorece su contaminación por AF (Cho *et al.*, 2008).

1.2.6. Prevención y control del cáncer hepático.

Hay estrategias de quimioprevención efectivas para combatir el efecto cancerígeno de las AF. La reducción de los niveles de aductos de AF-ADN por agentes quimiopreventivos, disminuye el cáncer (Groopman *et al*, 2007).

El agente quimiopreventivo Etoxiquina sobre múltiples dosis de AF, redujo un 95% el área y volumen del hígado con lesiones pre-neoplásicas, y la unión de AFB₁ al ADN hepático, por lo que los aductos AF-ADN se redujeron inicialmente en un 90%, y al final de dos semanas de administración de la dosis, en un 70% (Kensler *et al.*, 1987).

La Etoxiquina previene el desarrollo de hepatocarcinoma en ratas (Kensler *et al.*, 1986), los experimentos han sido repetidos varias veces con diferentes agentes quimiopreventivos, y en todos los casos, los aductos de AF-ADN se redujeron. Sin embargo, la reducción de aductos no es suficiente para reducir el riesgo de tumor, debido al origen multifactorial del cáncer (Groopman *et al.*, 2007).

Con el uso del agente quimioprotector Oltipraz, se estableció la relación existente entre los niveles de AFB₁-N⁷-Gua excretados en la orina y la incidencia de hepatocarcinoma en ratas expuestas a AF. La reducción de los niveles del biomarcador (aducto AF-ADN) reflejó una protección contra la carcinogénesis, pero no se cuantificó el riesgo individual (Roebuck *et al.*, 1991).

La cantidad de aductos de AF-ADN pueden predecir el riesgo de enfermedad en una población, pero no tienen el poder de identificar a las ratas que van a desarrollar HCC (Groopman *et al.*, 2007).

1.3. Las aflatoxinas como causa de enfermedades en humanos.

Las AF producen consecuencias toxicológicas diversas en la población y van desde efectos agudos, incluyendo muerte rápida hasta enfermedades crónicas (Azziz-Baumgartner *et al.*, 2005), como es el desarrollo de cáncer hepatocelular (Ross *et al.*, 1992).

Las AF han sido implicadas en brotes letales de envenenamiento por hongos ó en enfermedades crónicas en poblaciones de humanos expuestos a ellas. Las AF causan diversos efectos adversos a la salud, como son las fallas de crecimiento en niños (Gong *et al.*, 2004).

Datos epidemiológicos han establecido que las AF son hepatotóxicas y potentes hepatocancerígenos para humanos (Ross *et al.*, 1992; IARC, 1993). Un

efecto de las AF en animales es la inmunosupresión (Dean *et al.*, 1994), y la mayor susceptibilidad a infecciones virales y bacterianas, además se reduce la protección dada por vacunas (Denning, 1987). Los efectos más severos se dan en la respuesta inmune (Pestka & Bondy, 1994).

I.3.1. Aflatoxicosis en humanos.

I.3.1.1. Intoxicaciones.

Las AF se consideran los cancerígenos biológicos más potentes (Olsen *et al.*, 1988) y pueden causar efectos agudos y crónicos (Campbell & Salamat, 1971). Se han reportado casos de aflatoxicosis aguda y cáncer de hígado, en humanos en países subdesarrollados, posiblemente por una mayor exposición a las AF. Los síntomas clínicos de la aflatoxicosis son vómito, dolor abdominal, edema pulmonar, hígado graso y necrótico (Shank *et al.*, 1971).

En 1970, al oeste de la India, se registraron envenenamientos por AF, junto con el consumo de maíz altamente contaminado con hongos; las personas que consumieron este maíz murieron (Krishnamachari *et al.*, 1975). La histopatología de los hígados reveló una extensiva proliferación de los conductos biliares, que es una lesión común en animales de laboratorio expuestos a AF (Bhat & Krishnamachari, 1977; Groopman & Kensler, 2005).

Hubo 20 casos de aflatoxicosis aguda en Kenia, a principios de 1980, con 20% de mortalidad y se asoció al consumo de maíz altamente contaminado con AF (Ngindu *et al.*, 1982). En una zona rural de Kenia, en 2005, se reportó un brote de aflatoxicosis con 317 casos y 125 muertes, por ingestión de maíz contaminado con AF. El 55% de los productos de maíz tenían niveles de AF $>20 \mu\text{g kg}^{-1}$; 35% tenían niveles $> 100 \mu\text{g kg}^{-1}$, y el 7% tuvieron niveles $> 1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Azziz-Baumgartner *et al.*, 2005).

En 1995, el consumo de fideos contaminados con AF, $>3 \text{ mg}$ de AF en una sola orden, ocasionó encefalopatía y daños hepáticos agudos en niños de Malasia (Lye *et al.*, 1995).

Algunos síntomas crónicos producidos por aflatoxinas son: inmunodepresión (Pier & McLoughlin, 1985), cáncer (Wogan, 1992), Síndrome de Reye que tiene una encefalopatía y degeneración grasa del hígado (Reye *et al.*, 1963), marasmo y kwashiorkor (Apeagyei *et al.*, 1982) son asociaciones de AF con desnutrición, abortos

y malformaciones de fetos (Llewelyn *et al.*, 1977), hepatitis y cirrosis (Krishnamachari *et al.*, 1975).

I.3.2. Mecanismos de iniciación del hepatocarcinoma por aflatoxinas.

I.3.3. Estudios en animales.

La susceptibilidad a los efectos tóxicos y cancerígenos varía entre especies (Newberne & Butler, 1969; Bedard *et al.*, 2005). Entre los animales de laboratorio, las ratas son las más susceptibles al cáncer de hígado inducido por AFB₁ (Dunaif & Campbell, 1987; Newberne *et al.*, 1990; Akao *et al.*, 2002; Sugiyama *et al.*, 2000; Asare *et al.*, 2007). Sin embargo, los ratones, changos, puercos, sapos, patos y peces, también han sido utilizados como modelos de inducción de cáncer de hígado por AFB₁ (Wogan, 1973; Qin *et al.*, 1983; Chauhan *et al.*, 1984; Bailey *et al.*, 1987; Davie *et al.*, 1987; Uchida *et al.*, 1988; El-Mofty *et al.*, 1994; Bedard *et al.*, 2005).

I.3.4. Citocromo P₄₅₀.

En la fase I de la biotransformación, las AF son modificadas por el citocromo P₄₅₀ mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, para convertirlas en productos hidrosolubles de carácter polar. Dicho cambio ocurre con la enzima microsomal citocromo P₄₅₀, donde participan el O₂⁻ y las enzimas dependientes del NADPH localizadas en el retículo endoplásmico de las células (Groopman *et al.*, 1988). En este proceso metabólico se originan metabolitos hidroxilados: la AFM₁, AFM₂, AFP₁, AFQ₁ y AFL, las cuales son menos tóxicas que la AFB₁ (Eaton & Ramsdell, 1992).

La acción tóxica sucede cuando la AFB₁ llega al hígado y se produce un metabolito electrofílico, el compuesto AFB₁ exo-8,9-epóxido. Este producto es altamente inestable y se une con alta afinidad a la guanina, reaccionando con el ADN para formar los aductos responsables del efecto cancerígeno y mutagénico de las AF (Smela *et al.*, 2001). Durante la fase I del metabolismo de la AFB₁, las formas de citocromo P₄₅₀ involucradas en la bioactivación de la AFB₁ son: IA2, IIA3, IIB7, IIIA3 y IIIA4 (Aoyama *et al.*, 1990; Ramsdell *et al.*, 1991).

I.3.4.1. Definición.

En Omura y Sato (1964) identificaron la hemoproteína de un pigmento en los microsomas hepáticos, capaz de unirse al CO después de ser reducido por NADPH. Esta proteína recibió el nombre de citocromo P₄₅₀ (p=pigmento) (Omura, 1999).

El citocromo P₄₅₀ es miembro de una super familia de monooxigenasas de función mixta, que cataliza reacciones de reducción, hidratación, hidrólisis y oxidación (epoxidación), y metaboliza un elevado número de sustratos (entre ellos xenobióticos) (Conney, 1986; Okey, 1990). En células eucariontes, el citocromo P₄₅₀ se encuentra principalmente en el retículo endoplásmico y en la membrana interna de las mitocondrias (IUPAC, 1997).

I.3.4.2. Estructura.

El citocromo P₄₅₀ es una hemoproteína catalítica, donde el grupo tiolato del aminoácido cisteína se une como quinto ligando al átomo de hierro del grupo hemo, y una molécula de agua actúa como sexto ligando (Ortiz de Montellano & De Voss, 2002). El P₄₅₀ de eucariotas tiene un peso molecular que oscila entre 50 y 60 kD (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2001). La enzima está constituida por una combinación de regiones α -hélice y de hojas β que rodean al grupo hemo, los lugares de anclaje a la membrana y de reconocimiento de sustratos son las regiones más variables (**Figura 19**) (Gotoh, 1992).

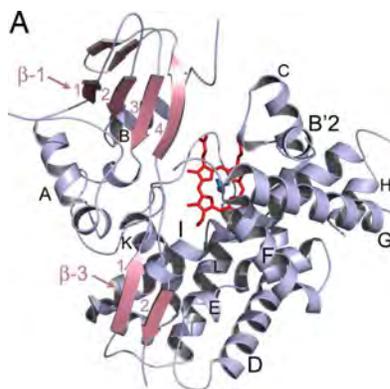


Figura 19: Estructura del CYP245A1, miembro de la familia del citocromo P₄₅₀. Las α -hélices y las hojas- β son presentadas con cintas y flechas, respectivamente. El grupo Hemo se presenta en color rojo y la molécula del imidazol en azul. Los elementos estructurales secundarios están etiquetados de acuerdo a la nomenclatura típica de cualquier citocromo P₄₅₀ plegado (Makino, 2007).

El centro catalítico de la enzima es la región hemo, donde se da un mecanismo común de transferencia de electrones y de protones, y de activación de oxígeno (Williams *et al.*, 2000).

La enzima permanece anclada a la membrana a través de una hélice hidrofóbica cercana al extremo N-terminal, la mayor parte de la proteína se sitúa en la cara citosólica de la membrana (**Figura 20**) (Chapple, 1998).

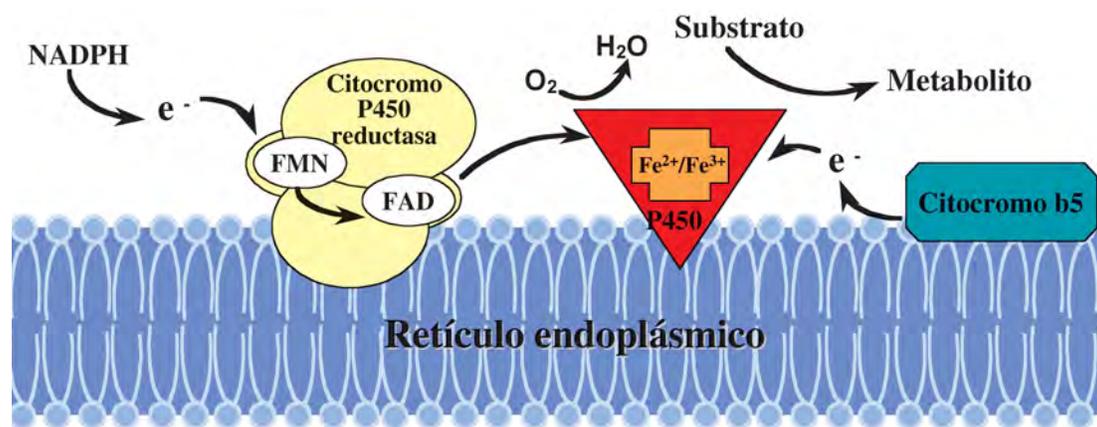


Figura 20: Localización del citocromo P₄₅₀ en la membrana del retículo endoplásmico (Vergeres & Waskell, 1995).

El NADPH da un electrón al citocromo P₄₅₀ reductasa donde el Flavin-mononucleótido (FMN) forma al Flavin-adenin-dinucleótido (FAD) que continuará la transferencia de electrones.

1.3.4.3. Funciones.

El P₄₅₀ requiere oxígeno molecular y NADPH para oxidar el sustrato por medio de reacciones de monooxigenación, en las que sólo uno de los átomos de oxígeno es incorporado a la molécula del sustrato, mientras que el otro es reducido a agua (Conney, 1986; Okey, 1990).

1.3.4.4. Tipos.

Los citocromos P₄₅₀ son identificados con las siglas CYP seguido de un número que designa la familia, una letra que identifica la subfamilia y otro número que corresponde con el gen (CYP1A2) (Nebert, *et al.*, 1987).

Los P₄₅₀ están clasificados en cuatro clases de acuerdo a cómo acceden los electrones desde el NADPH hasta el centro catalítico de la enzima. Los P₄₅₀ de clase I utilizan una reductasa que contiene FAD y una ferrosulfoproteína (ferridoxina). Los de clase II usan una cadena de transferencia de electrones más corta y sólo necesitan una reductasa del citocromo P₄₅₀ que contiene FAD/FMN para la transferencia de electrones. Los de clase III son autosuficientes y no requieren un donador de electrones, mientras que los de clase IV reciben los electrones directamente del NADPH (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2001).

Los citocromos P₄₅₀ están prácticamente en todo el organismo (Ding & Kaminsky, 2003), aunque se pensaba que eran específicos del hígado. El hígado es el principal órgano de metabolización de xenobióticos, al poseer la mayor expresión de citocromos P₄₅₀. Se estima que alrededor del 70% de los citocromos P₄₅₀ hepáticos pertenecen a las familias 1 a 3 (Shimada *et al.*, 1994). Dentro de las familias 1 a 3 están los citocromos P₄₅₀ más importantes para la activación de cancerígenos (Guengerich & Shimada, 1991; Shimada *et al.*, 2001). Las isoenzimas más abundantes en el hígado humano son el CYP3A4 y los CYP2Cs, que representan un 30% y un 20% respectivamente del contenido total de P₄₅₀ (Shimada *et al.*, 1994).

Las insoenzimas CYP1A1 y el CYP1A2, y CYP1B1 constituyen a la familia CYP1A, y participan en procesos de activación de procancerígenos. CYP1A1 y CYP1A2 convierten y activan algunos procancerígenos a metabolitos intermedios que se unen al ADN (Shimada *et al.*, 1996). La expresión CYP1A2 se restringe al hígado, y constituye ~10% del contenido total de P₄₅₀ (Shimada *et al.*, 1994). CYP1A2 participa en la activación de aflatoxina B₁ (Pelkonen & Raunio, 1997).

I.3.5 La enzima Glutación S-Transferasa.

I.3.5.1. Definición.

Las GSTs son una familia de enzimas muy importantes que protegen al organismo, y que están presentes en la fase II de la desintoxicación enzimática de un gran número de metabolitos electrofílicos (Warholm *et al.*, 1985; Andersson *et al.*, 1994), derivados xenobióticos y endógenos (antibióticos, esteroides, prostaglandinas y leucotrenos) (Gertsch, 2008), que poseen efectos cancerígenos y genotóxicos (Mannervik *et al.*, 2005).

Las GSTs fueron por primera vez purificadas de microsomas de hígado de rata (Andersson *et al.*, 1994). La actividad de estas enzimas fue descubierta con una conjugación de la glutatión reducida (GSH) con componentes aromáticos halogenados como el cloronitrobencono. Las GSTs fueron descubiertas en la fracción soluble, las enzimas que se encuentran en el citoplasma son referidas como GSTs solubles o citosólicas, otras están presentes en el núcleo, mitocondria y peroxisomas (Mannervik *et al.*, 2005). Las GST de mamíferos son las enzimas mejor caracterizadas y su principal función es facilitar la ruta de desintoxicación de componentes peligrosos que se conjugan con la GSH (Ziglari *et al.*, 2008).

En la Fase I del citocromo P₄₅₀ se producen reacciones para generar productos hidrosolubles. En la fase II, las Glutatión S-transferasas (GSTs) permiten que estos metabolitos se combinen con moléculas endógenas de carácter polar para formar productos de conjugación que son rápidamente excretados.

I.3.5.2. Estructura.

El plegamiento de todas las GSTs es muy similar según las estructuras cristalográficas, aunque cada una exhibe características únicas, como el sitio activo y el extremo C-terminal. Las GSTs solubles existen como homodímero o heterodímero con una subunidad de 23-28 kDa y con un sitio activo por monómero. Cada subunidad de la GST contiene un sitio específico de unión a GSH (Sitio-G), al cual le sigue un sitio de unión al ligando electrofílico (Sitio-H), que es menos específico y reacciona con diferentes agentes tóxicos (Oakley *et al.*, 1997).



Figura 21: Estructura de la Glutatión S-transferasa P1-1 de *Homo sapiens*. Imagen tomada del (National Center for Biotechnology Information NCBI con MMDB ID: 71079. PDB ID: 19GS (Oakley *et al.*, 1997).

I.3.5.3. Funciones.

Las GSTs catalizan la conjugación de GSH con metabolitos electrofílicos, por medio de un ataque nucleofílico del grupo S-H del glutatión sobre el centro electrofílico de una gran variedad de sustancias potencialmente peligrosas, lo que incrementa la polaridad de los metabolitos y su eliminación de los tejidos (Ziglari *et al.*, 2008; Gertsch, 2008). Con esta reacción se incrementa la solubilidad de los compuestos peligrosos para su pronta excreción (Lumjuan *et al.*, 2007).

Las GSTs promueven reacciones entre la glutatión y compuestos electrofílicos, pero individualmente las transferasas tienen distintos sustratos específicos y catalizan diferentes transformaciones químicas (Mannervik *et al.*, 2005).

Las GSTs se unen a moléculas lipofílicas con una masa molecular >400 daltons (hemina, bilirrubina, sales biliares, esteroides, hormonas tiroideas, ácidos grasos y drogas), ya que las almacenan y rápidamente las transportan en la fase acuosa de la célula (Oakley *et al.*, 1997; Lumjuan *et al.*, 2007).

I.3.5.4. Glutatión S-transferasa y las aflatoxinas.

AFB₁ incluye las reacciones de conjugación enzimática mediadas por la GST, para inactivar el AFB₁-8,9 epóxido. Espontáneamente, el AFB₁-8,9 epóxido es hidrolizado a 8,9 dihidrodiol y se conjuga con GSH para formar AFB₁-Glutatión transferasa (AFB₁-SG) (Kensler *et al.*, 1986). El conjugado AFB-SG es el metabolito biliar más abundante, y es excretado por la orina (Groopman *et al.*, 1988). La inducción de la GST y de la aldehído-AFB₁ reductasa (AFAR), reduce la formación de aductos de AF-ADN y de AF-proteínas, y bloquea la iniciación del cáncer en ratas (Egner *et al.*, 1995), al evitar la unión de la AFB₁ al ADN en diferentes especies (Kimura *et al.*, 2004). La ingesta de antioxidantes en la dieta, aumenta los niveles de GST, y hay una mayor eliminación de AFB-SG en la orina de los animales tratados (Groopman *et al.*, 1988).

1.3.6. Gen supresor de tumores p53

La identificación de una mutación específica en el gen supresor de tumores p53 en HCC de regiones del mundo con alta exposición de AF, ha ayudado como biomarcador para AF (Wild & Hall, 2000).

I.3.6.1. Alteraciones causadas por aflatoxinas.

Mutaciones sin sentido ó la pérdida de la proteína producida por el gen p53, proveen una ventaja selectiva para la expansión clonal de células pre-neoplásicas o neoplásicas. El gen p53 tiene un papel molecular según el tipo de cáncer y en la exposición ligada a ese cáncer (Hussain & Harris, 1998), por lo que se convierte en un biomarcador intermediario para el desarrollo del cáncer.

Se ha comprobado que p53 juega un papel importante en el desarrollo de cáncer hepático (Staib *et al.*, 2003), así como algunos oncogenes y otros genes supresores de tumores. Se ha encontrado que oncogenes como *N-ras*, *c-myc* ó *c-fos* están sobre-expresados, pero sus mutaciones son raras y hay poca evidencia de una implicación directa con este cáncer (Hofseth *et al.*, 2002; Tabor, 1994). En términos de biomarcadores para AF, se ha logrado identificar una mutación específica en p53 en cáncer de hígado de regiones del mundo con alta exposición a AF (Hsu *et al.*, 1991). El codón 249 de p53 es un hotspot (mancha caliente) para la modificación de AFB₁ y la mutación inducida por AFB₁, específicamente **AGGC** → **AGTC** (Smela *et al.*, 2001). En Gambia, se detectó esta mutación en el ADN de casos con HCC, la cual no era frecuente en los pacientes control (Kirk *et al.*, 1999).

La mutación del gen supresor p53, se ha encontrado en 53% de los casos de carcinoma hepatocelular (HCC) de áreas con alta exposición dietética a AFB₁, como lo es México, mientras que en poblaciones expuestas a bajos niveles de esta toxina, las mutaciones se encuentran en 26% de los casos (Soini *et al.*, 1996). En Senegal, donde la gente está expuesta a altas concentraciones de AFB₁ en los alimentos, fueron analizados los tejidos de 15 HCC 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 (Coursaget *et al.*, 1993).

La mutación del gen p53 es la característica más común de todas las neoplasias. En los HCCs, este gen está mutado en 20% de los casos, con importantes variaciones en el índice de mutaciones entre tumores de diferentes lugares geográficas (Staib *et al.*, 2003). La mutación puntual en el codón 249 del gen p53 fue descrito en HCC de regiones con prevalencia de infección de VHB y altos niveles de contaminación de AF en la dieta. El índice de mutaciones del gen p53 es significativamente más alto en tumores relacionados con el VHB que en tumores relacionados con VHC y HCC no virales, independientemente de la exposición a AF (Laurent-Puig *et al.*, 2001).

Recientemente, se ha observado que una reactivación inapropiada de la ruta *Wnt*, resultado de mutaciones en el gen β -catenina (proteína que da movilidad a células neoplásicas), está implicada en el desarrollo de hepatoma (Wong *et al.*, 2001). Las mutaciones en β -catenina son encontradas de 18 a 41% y la sobre-expresión nuclear ocurre de 10 a 90% de los casos de cáncer hepático. Esta desregulación de la β -catenina puede activar transcripcionalmente a los genes blanco de la ruta *Wnt*, por ejemplo: *c-myc*, *ciclina D1* y *PPAR δ* , por lo tanto, puede promover la progresión del tumor por la estimulación de la proliferación celular (Buendía, 2000; Nhieu *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2001).

1.3.7. Los aductos de AFB-ADN y el desarrollo del cáncer.

Un biomarcador de exposición se refiere a la medición del agente específico de interés, en este caso AF, sus metabolitos o sus productos interactivos específicos en algún compartimiento del cuerpo o en fluidos, e indica la presencia o magnitud de las exposiciones actuales y pasadas. Los biomarcadores de dosis internas y de dosis biológicamente efectivas de AF son generalmente los metabolitos hidroxilados y los aductos de AF-ADN formados a partir de los derivados epóxidos (Jacobsen *et al.*, 1987)

El uso de biomarcadores en las investigaciones etiológicas han sido extendidas para intervenciones preventivas en poblaciones de alto riesgo debido a que los estudios experimentales han establecido ligas temporales entre la modulación de biomarcadores de AF y riesgo de enfermedad.

La identificación temprana de los metabolitos de AF en fluidos humanos (Campbell *et al.*, 1970) estimuló el desarrollo de biomarcadores de exposición de humanos a estas toxinas (IARC, 1982).

La disponibilidad de anticuerpos específicos formaron la base de los enfoques para la detección de los metabolitos de AF en muestras de orina humana (Wild *et al.*, 1986b; Groopman *et al.*, 1985; Zhu *et al.*, 1987).

La **Figura 19**, detalla la ruta del metabolismo de AFB₁ por medio de citocromo P₄₅₀, que guía a la formación de aductos. El AFB₁-8,9 epóxido es el metabolito electrofílico que reacciona covalentemente con el ADN para formar los aductos, que poseen la actividad cancerígena y mutagénica de la AFB₁ (**Figura 22A**). El AFB₁-8,9 epóxido se une con el N⁷ de los residuos de guanina del ADN para formar el 8,9-

dihidro-8-(N⁷-guanil)-9-hidroxi-aflatoxina B₁ (AFB₁-N⁷-Gua), que es el aducto más abundante tanto *in vitro* como *in vivo* (Essigmann *et al.*, 1977; Croy *et al.*, 1978; Smela *et al.* 2001). El anillo imidiazol cargado positivamente del AFB₁-N⁷-Gua promueve depurinación, dando origen a un sitio apurínico. Alternativamente, el anillo imidiazol de AFB₁-N⁷-Gua se abre para formar un aducto más estable química y biológicamente, la formamidopirimidina (AFB₁-FAPY) (**Figura 22B**), que puede estar presente por más de una ronda de replicación del ADN (Hertzog *et al.*, 1982; Sotomayor *et al.*, 2003; Guzmán, 2007).

La mayor cantidad de aducto encontrado a una hora de inyectar AFB₁ en ratas fue la 8,9-dihidro-8-(N⁷-guanil)-9-hidroxi-AFB₁ (AFB₁-Gua), mientras que en tiempos mayores predominó y fue más persistente el aducto secundario AFB₁-formamidopirimidina (AFB₁-FAPY) (Jennings *et al.*, 1992).

El sitio apurínico, AFB₁-N⁷-Gua y el AFB₁-FAPY, individual o colectivamente, son los precursores de los efectos genéticos de la AFB₁. El AFB₁-N⁷-Gua y el AFB₁-FAPY desencadenan el desarrollo de tumores. En todos los sistemas biológicos, la mutación inducida por las formas reactivas de la AFB₁, es la transversión GC → TA (Smela *et al.* 2001). Las transversiones G → T ó transiciones de G→A son producidas en la tercera base del codón 249 del gen p53, y en la primera o segunda base del codón 12 del gen H-ras (Hulla *et al.*, 1993; McMahon *et al.*, 1990; Wogan *et al.*, 2004; Habib *et al.*, 2006; Kamdem *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2007).

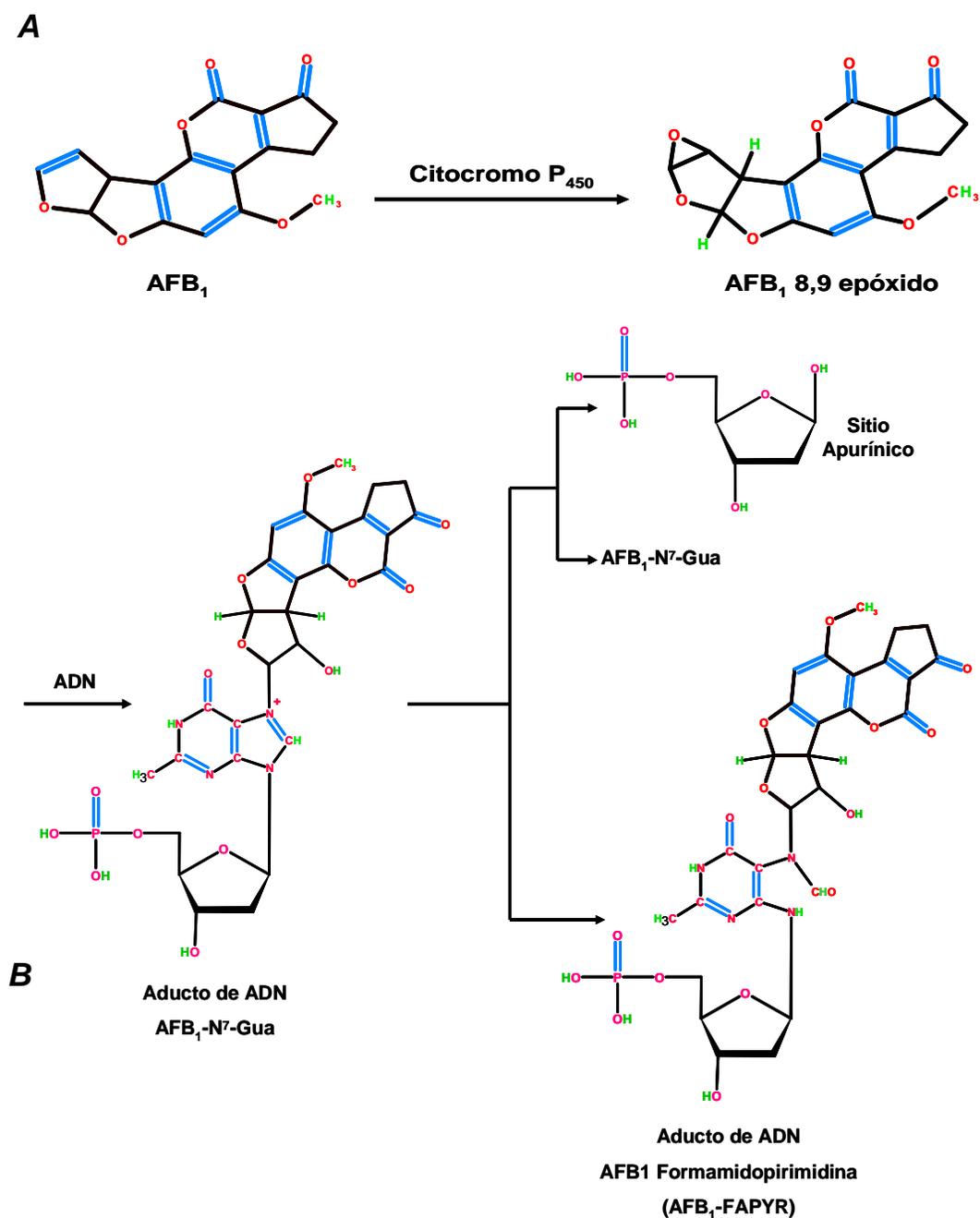


Figura 22. Ruta de la activación metabólica que guía a la formación de aductos por AFB₁ (Smela *et al.* 2001).

I.3.8. Oncogenes asociados al cáncer hepático por aflatoxinas.

Cuando se exponen ratas, ratones y peces a una dieta contaminada con AFB₁, se activan algunos proto-oncogenes, de la familia “*ras*” (Wang & Groopman, 1999; Domínguez-Malagón & Gaytan-Graham, 2001). Altas incidencias de Ki-*ras* y N-*ras*

activados se han observado en carcinomas y adenomas de hígado inducidos con AFB₁. Las mutaciones involucradas predominantemente son transiciones G→A en el codón 12, con baja incidencia de transversiones G→T en el mismo codón (Wang & Groopman, 1999).

Al inyectar vía peritoneal 1.5 mg de AFB₁ a ratas, se desarrollaron hepatomas en los que se identificó un incremento en la expresión de *c-myc* y *c-Ha-ras*, y en uno de los tumores se presentó la amplificación y rearreglo de *c-Ha-ras* (Tashiro *et al.*, 1986). Se examinaron 12 tumores inducidos con AFB₁, en ratas y se encontró que el DNA genómico de 10 tumores se había transformado, y dos de ocho tenían *Ki-ras* activado (McMahon *et al.*, 1986). Se expusieron ratas Fisher macho a AFB₁ y AFG₁, y se indujeron cuatro tumores hepáticos, tres tumores tuvieron activación de *N-ras* y uno una transversión G→A en el codón 12 de *Ki-ras* (Sinha *et al.*, 1988).

Una transfección es la introducción de material genético externo en células eucariontes mediante plásmidos, y que estos últimos son moléculas de ADN procarionte extra cromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientemente del ADN cromosómico. Ahora bien, con la transfección *in vitro* de un plásmido modificado con AFB₁, se indujeron tumores para estudiar la activación del protooncogen *Ha-ras* de humano por AFB₁ y se encontró la presencia de transversiones G→T, en la primera y en la segunda base del codón 12. La AFB₁ metabólicamente activa es capaz de mutar al protooncogen *Ha-ras* a su forma oncogénica *in vitro*, pero no hay reportes de esta mutación en HCC de personas expuestas a AFB₁ (Riley *et al.*, 1997).

Por todos estos argumentos resulta importante determinar la presencia de AF libres (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) como medida de exposición de una persona a las AF de los alimentos; de los metabolitos hidroxilados (AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL) como biomarcadores de dosis internas y de dosis biológicamente efectivas de AF en muestras de hígado control y con HCC humanos de México, así como la presencia de los aductos AFB₁-N⁷-Gua y AFB₁-FAPY como agentes etiológicos de cáncer en hígado a partir del derivado epóxido.

II. OBJETIVOS

Generales:

1. Identificar y cuantificar las aflatoxinas libres (B₁, B₂, G₁, G₂), y sus metabolitos hidroxilados (Aflatoxinas M₁, M₂, P₁, Aflatoxicol) en hígados humanos sanos (controles), y en hígados con HCC de México, para conocer la exposición que tienen los humanos de ambos grupos a esta toxina contaminante de alimentos.
2. Identificar y cuantificar los aductos de AFB₁-ADN en hígados control y con HCC humano, para saber si son un factor etiológico del cáncer en México.

Particulares:

1. Muestreo de hígados del Hospital General de la Secretaría de Salud, fijados en formol: agua destilada (10:90 v/v) y en parafina.
2. Contar con la información de los expedientes médicos con diagnóstico patológico, sexo, edad, etc.
3. Establecer la metodología de purificación de ADN de los tejidos de hígado humano control y con HCC:
 - a. Tejidos en formol.
 - b. Tejidos en parafina.
 - c. Evaluación de las técnicas de extracción de AF libres por Qiagen (2007), Qian y Yang (1984), Gupta (1984).
4. Determinar la mejor técnica de purificación de ADN para tejidos hepáticos fijados con 2 diferentes concentraciones de formol: 4 y 10%.
5. Ensayo de purificación de ADN con el kit de Qiagen en hígados de pollo.
6. Hacer curvas de calibración de las aflatoxinas y sus metabolitos hidroxilados.
7. Cuantificación, por HPLC, de AF libres de hígados control y con HCC.
8. Síntesis artificial del aducto AFB₁-ADN (AFB₁-N⁷-Gua) como estándar de medición de cromatografía de líquidos para su detección en hígados control y con HCC humanos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

III. 1. Muestreo.

El Médico Patólogo Dr. Gerardo Arísti Urista obtuvo y proporcionó 46 muestras de hígados control y con HCC, del Servicio de Patología del Hospital General de la Secretaría de Salud, en la Ciudad de México, y después de una selección de cada caso, el tamaño de la muestra que se analizó fue de 15 hígados humanos sanos (controles), y 15 con HCC.

La relación de las 16 muestras no analizadas es:

Anexo 1 correspondiente a ocho muestras de hígado control obtenidas pero no analizadas debido a que tenían antecedentes de hepatopatías ó de otros carcinomas y no podían ser controles.

Anexo 2 son siete muestras de hígado humano con otros carcinomas ó hepatopatías, como diabetes, sin marcadores de hepatitis viral ni pruebas serológicas normales que también se desecharon como controles y no se analizaron en esta tesis.

Anexo 3 corresponde a una muestra de HCC que llegó fuera de tiempo, después de que el trabajo se había concluido y ya no se analizó.

La **Tabla 2** presenta las 15 muestras control analizadas en la presente tesis, la **Tabla 3** a las 10 muestras con HCC fijadas en formol al 10% y analizadas, y la **Tabla 4** a las cinco muestras de hígado con HCC fijadas en formol al 10% y analizadas a partir de cortes microtómicos de 19 μ de bloques con los tejidos hepáticos embebidas en parafina.

Los criterios de selección de las muestras controles fueron sano ó enfermo (antecedentes de hepatitis B y C), y de las muestras con HCC que el cáncer fuera primario. Los datos del paciente que se tomaron en cuenta para este trabajo fueron sexo, edad, diagnóstico de autopsia, diagnóstico de hígado, marcadores de hepatitis viral negativos, pruebas de función hepática, pruebas serológicas normales, úlcera gástrica, lugar de nacimiento y trabajo.

Tabla 2: Quince muestras control de hígado humano, sin marcadores de hepatitis viral y pruebas serológicas.

Muestra	Fecha de muerte	Diagnóstico de Autopsia	Diagnóstico de Hígado	Sexo	Edad (años)	Pruebas de función hepática	Con úlcera gástrica y sin enfermedades hepáticas	Lugar de Nacimiento	Trabajo
1.A08-278	06/05/08	Tromboembolias pulmonares bilaterales	Normal	M	46	No tiene	No	Chiapas	Ama de casa
2.A08-289	10/05/08	Pénfigo seborreico generalizado	Normal	M	25	Hipoalbuminemia, Rpn.	No	Edo. Méx.	Ama de casa
3.A08-379	16/06/08	Diabetes mellitus tipo 2	Esteatosis macrovesicular	H	57	Hipoalbuminemia y transaminasas altas	Esófago-gástrica	D.F.	Chofer
4.A08-591	26/09/08	Glomerulopatía crónica	S.A.M.	M	33	Hipoalbuminemia, Rpn.	No	Edo.México	Ama de casa
5.A08-592	29/09/08	Choque hipovolémico por embarazo tubario izquierdo roto	S.A.H.	M	26	No realizadas	No	Guadalajara	Ama de casa
6.A08-601	06/10/08	Desnutrición calórico proteica/Tiflitis* infecciosa	S.A.M.	M	55	Hipoalbuminemia, Rpn.	No	Puebla	Ama de casa
7.A08-609	11/08/08	Persistencia del conducto arterioso	Normal	M	51	Normales	No	D.F.	
8.A08-614	13/10/08	Gastritis crónica folicular, choque hipovolémico	Normal	H	55	Normales	Sí	D.F.	Desempleado
9.A08-633	21/10/08	Obesidad mórbida	Normal	M	35	Insuficiencia hepática	No	D.F.	Ama de casa
10.A08-642	28/10/08	Cardiopatía isquémica crónica		M	60		No	D.F.	Ama de casa
11.A08-646	30/10/08	Diabetes mellitus tipo 2	S.A.M.	H	52	Hipoalbuminemia y largos tiempos de coagulación	No	Edo.México	Desempleado
12.A08-651	04/11/08	Lupus eritematoso sistémico	S.A.M.	M	45	Insuficiencia hepática crónica	No	D.F.	Desempleada
13.A08-653	05/11/08	Lupus eritematoso sistémico	Normal	H	34	Hipoalbuminemia y transaminasas altas	No	D.F.	Inactivo
14.A08-682	20/11/08	Diabetes mellitus tipo 2, diagnóstico de 23 años	S.A.H.	H	44	Anemia.	No	D.F.	Estudiante
15.A08-692	26/11/08	Leptomeningitis piógena.	Esteato hepatitis alcohólica	H	24	Insuficiencia hepática crónica	No	D.F.	Sin trabajo

Tiflitis = proceso inflamatorio del ciego con múltiples causas, la más usual es la apendicitis, pero también pueden ser la amebiasis o salmonelosis entre otras.
S.A.M.= Sin alteraciones macroscópicas. S.A.H.= Sin alteraciones histológicas.

Tabla 3: Diez muestras de hepatocarcinomas humanos con insuficiencia hepática crónica, marcadores de VH- y pruebas serológicas normales fijadas con formol al 10%.

Muestra	Fecha de muerte	Diagnóstico de autopsia y del hígado.	Sexo	Edad (años)	Antecedentes de importancia
1-HCC A07-552	27/09/07	Carcinoma hepatocelular y cirrosis idiopática *.	M	57	Diabetes mellitus, alcoholismo ocasional, cirrosis hepática.
2-HCC A08-136	10/03/08	Cirrosis hepática macro y micronodular viral con HCC multinodular poco diferenciado.	M	64	Historia de transfusión sanguínea única 30 años previos en el puerperio **.
3-HCC A07-689	16/12/07	Alcoholismo crónico. Cirrosis hepática macro y micronodular con HCC.	H	58	35 años de alcoholismo, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial sistémica, insuficiencia hepática y hemorragia de tubo digestivo.
4-HCC A07-590	18/10/07	Cirrosis hepática predominantemente macronodular asociado a HCC en el lóbulo derecho.	H	77	Alcoholismo crónico, cirugía renal por nefrolitiasis, hipertensión arterial sistémica.
5-HCC A07-403	12/07/07	HCC multicéntrico originado en hígado cirrótico, afecta ambos lóbulos hepáticos e invade la vena porta.	M	56	Transfusión sanguínea 20 años previos, no se menciona contexto en protocolo de autopsia. Insuficiencia hepática Child-Pugh C.
6-HCC A08-481	04/08/08	Alcoholismo crónico, cirrosis hepática macro y micronodular, con HCC multinodular.	H	48	30 años de alcoholismo y tabaquismo, consumo de marihuana y cocaína.
7-HCC A08-224	15/04/08	Alcoholismo crónico, cirrosis hepática macro y micronodular con HCC poco diferenciado.	H	73	Alcoholismo por 30 años, cirrosis hepática alcohólica y várices esofágicas sangrantes.
8-HCC A07-527	13/09/07	Alcoholismo crónico intenso. HCC bien diferenciado asociado a cirrosis hepática macro y micronodular.	H	71	Alcoholismo y tabaquismo intenso de 20 años, diabetes mellitus tipo 2.
9-HCC A07-598	22/10/07	Cirrosis hepática micro y macronodular asociada a HCC.	H	47	Alcoholismo, hepatitis, septumplastía ***, diabetes mellitus tipo 2.
10-HCC A08-712	08/12/08	Fibrosis hepática con carcinoma hepatocelular bien diferenciado.	H	79	Alcoholismo crónico intenso y enfermedad de Parkinson.

HV - =Marcadores de Hepatitis viral negativa; HCC = Hepatocarcinoma celular; *Idiopática = enfermedad de etiología desconocida, de irrupción espontánea o de causa obscura o desconocida. **Puerperio = Período que sigue al parto, desde 2 horas o postparto a la cuarentena. *** Septumplastía = cirugía para corregir deformidades ó desviaciones del tabique nasal,

Tabla 4: Cinco muestras con hepatocarcinoma fijadas con formol al 20% y embebidas en parafina.

Muestra	Fecha de muerte	Diagnóstico de autopsia y del hígado.	Sexo	Edad (años)	Antecedentes de importancia
11-HCC 03-138 A/B	05/03/03	HCC multicéntrico asociado con cirrosis hepática macronodular.	M	65	Hepatitis inespecífica probablemente C.
12-HCC 03-226 E/D	13/04/03	Cirrosis micronodular con HCC y colangiocarcinoma *.	M	86	Alcoholismo crónico intenso.
13-HCC 03-296 A/D	19/05/03	CA hepatocelular multicéntrico más adenocarcinoma ** de vesícula.	M	78	Ninguno
14-HCC 03-415 A/E	05/07/03	CA hepatocelular multicéntrico con afección de la vena porta.	H	57	Diagnóstico de probable hepatitis viral.
15-HCC 03-458 C/E	01/08/03	CA hepatocelular multicéntrico poco diferenciado. Cirrosis hepática macro y micronodular.	M	65	Alcoholismo crónico intenso.

* Colangiocarcinoma = Cáncer de vías biliares. ** Adenocarcinoma = es un tumor canceroso que aparece en las células glandulares que revisten algunos órganos internos.

Finalmente se escogieron las muestras presentadas en la **Tabla 5** para realizar su análisis de AF libres y en aducto.

Tabla 5. Listado de muestras de hígado control y con hepatocarcinomas utilizadas para la cuantificación de aflatoxinas libres y purificación de ADN.

Hígados Control		Hepatocarcinoma	
N° de muestra	N° de registro	N° de muestra	N° de registro
Fijadas en Formol		Fijadas en Formol	
1	A08-278	1-HCC	A07-552
2	A08-289	2-HCC	A08-136
3	A08-379	3-HCC	A07-689
4	A08-591	4-HCC	A07-590
5	A08-592	5-HCC	A07-403
6	A08-601	6-HCC	A08-481
7	A08-609	7-HCC	A08-224
8	A08-614	8-HCC	A07-527
9	A08-633	9-HCC	A07-598
10	A08-642	10-HCC	A08-712
11	A08-646	Embebidas en Parafina	
12	A08-651	11-HCC	03-138 A/B
13	A08-653	12-HCC	03-226 E/D
14	A08-682	13-HCC	03-296 A/D
15	A08-692	14-HCC	03-415 A/E
		15-HCC	03-458 C/E

III.2. Cuantificación de las AF por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

III.2.1. Aparatos.

La cuantificación de AF por análisis en HPLC se hizo en un cromatógrafo marca Agilent Series 1200, equipado con una bomba isocrática Modelo G1310A y una válvula de inyección con loop de 20 μL . Se utilizó un detector de fluorescencia G1321A de Agilent Series 1200 con excitación a 360 nm, emisión de 450 a 700 nm y la velocidad de flujo de la fase móvil varió de 0.8 a 1.2 mL/min según el análisis de que se trataba. Se usó una columna cromatográfica Phenomenex Prodigy de C_{18} de 250 mm x 4.60 mm 5 μm . El software es Chem Station 32 de Agilent Technologies.

III.2.2. Curvas de calibración

III.2.2.1. Medición de un $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada AF (AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 , AFG_2), y de sus metabolitos hidroxilados (AFM_1 , AFM_2 , AFP_1 , AFL) por espectrofotometría.

Se hicieron diferentes pruebas para establecer las condiciones necesarias para la cuantificación y detección de las AF en el HPLC, donde se utilizaron diferentes velocidades de flujos y proporciones de solventes ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, ACN y MeOH) y así obtener la fase móvil adecuada para separar las diferentes AF (AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 , AFG_2) y sus metabolitos hidroxilados (AFM_1 , AFM_2 , AFP_1 y AFL), y que cada pico cromatográfico fuera independiente para que la cuantificación no se afectara. Las condiciones finales fueron una fase móvil que constó de 65% de $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$: 15% de ACN: 20% de MeOH v/v/v, un flujo para las curvas de calibración de 1.1 mL/ min y una columna Phenomenex C_{18} de 250 mm x 4.60 mm 5 μm ,

Para obtener la concentración conocida ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) del estándar de AFB_1 necesaria para realizar la fortificación de las muestras y así conocer el porcentaje de recuperación de la toxina, se procedió a preparar el estándar de cada AF (AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 y AFG_2) y de sus metabolitos hidroxilados (AFM_1 , AFM_2 , AFP_1 y AFL), los cuales sirvieron para elaborar las curvas de calibración. La preparación de los estándares consistió en diluir el stock puro en 1 mL de benceno:acetonitrilo (98:2 v/v), de acuerdo a las indicaciones sugeridas por los Métodos Oficiales AOAC 970.43 para micotoxinas (Scott, 1995).

Se midió la absorbancia de cada AF en un espectrofotómetro Genesys 10 UV Modelo Thermo Electron Corporation, y se aplicó la siguiente fórmula para obtener la concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AF, por ejemplo:

$$\frac{\text{Absorbancia de AFB}_1 \text{ a } 360\text{-}362 \text{ nm} \times \text{peso molecular (PM)}}{\text{Coeficiente de extinción de la AFB}_1 \text{ (CE)}} =$$

$$\text{Ejemplo con la AFB}_1 = \frac{0.748 \times 312}{21800} = 0.010705321800$$

después se dividió 1 entre 0.010705321800 = 93.4 que son los μL de AFB_1 que se pusieron en el vial. Se restaron 1000 μL menos 93.4 μL , se redondeó a 93 μL , y dan 907 que son los μL de MeOH que se mezclaron en el vial para dar la solución de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Cada solución patrón original tuvo que ser calculada con los pesos moleculares y coeficientes de extinción específicos de cada AF (**Tabla 6**).

Tabla 6: Pesos moleculares y coeficientes de extinción de cada aflatoxina (Scott, 1995.)

AF	Peso molecular (PM)	Coeficiente de extinción (CE)
AFB₁	312	21,800
AFB₂	314	24,000
AFG₁	328	17,700
AFG₂	330	17,100
AFM₁	328	21,250
AFM₂	328	22,900
AFL	314	14,100

III.2.2.2. Diluciones de cada aflatoxina para la curva de calibración.

Se elaboraron curvas de calibración para cada AF a partir de diferentes diluciones de los estándares de cada AF (AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 , AFG_2) y de sus metabolitos hidroxilados (AFM_1 , AFM_2 , AFP_1 y AFL) disueltos en metanol grado HPLC (MeOH). Las diluciones fueron 1 ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), 1:1 ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$), 1:2 ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$), 1:4 ($125 \mu\text{g mL}^{-1}$), 1:8 ($62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$), 1:16 ($31.25 \mu\text{g mL}^{-1}$), 1:32 ($15.63 \mu\text{g mL}^{-1}$) y 1:64 ($7.8 \mu\text{g mL}^{-1}$). Se usó HPLC para identificar las diferentes AF libres y en aducto.

Las diferentes diluciones se cuantificaron por HPLC y las áreas obtenidas se graficaron por regresión lineal para obtener el coeficiente de correlación ($R \approx 1$) de cada curva de calibración con el programa Microsoft Excel 2003.

III.3. Cuantificación de AF libres y unidas al ADN.

III.3.1. Cuantificación de AF libres

III.3.1.1. Técnica de Qian & Yang (1984) para la extracción y concentración de aflatoxinas totales libres en tejido de hígado humano.

1. Un gramo de cada muestra de hígado humano se homogeneizó con solución de cloruro de sodio saturada en el homogeneizador Ultra turrax T-25 basic IKA-Werke.
2. Cada muestra se agitó en un vortex-2 (Scientific industries Modelo G-560) por 10 minutos, y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min (Centrifuga Cool Working System 4235).
3. El total de sobrenadante de cada muestra, se vertió en una columna Supelclean LC₁₈ SPE (Cat. 57054) (LC₁₈) desechable de fase reversa, previamente lavada con 5 mL de MeOH y con 5 mL de H₂O_{dest.}
4. El filtrado de cada columna LC₁₈, aproximadamente 11 mL, que representa el 75% de la muestra original, se diluyó con H₂O_{dest} (1:5 v/v), hasta que el contenido de MeOH fue del 20 %.
5. El filtrado diluido (36 mL) se transfirió a una segunda columna LC₁₈ de fase reversa desechable, prelavada con 5 mL de MeOH y se le pusieron otros 5 mL de H₂O_{dest.}
6. Se secó la segunda columna LC₁₈ a temperatura ambiente por toda la noche.
7. Las AF totales se eluyeron con 2 mL de acetona (Merck, 501766) al 5% en cloruro de metileno (J.T. Baker, N° Cat. 9315-3).
8. El eluido se evaporó a sequedad a 40 °C y se resuspendió en 200 µL de acetonitrilo (ACN) (J.T. Baker, Cat. 901703) y 800 µL de solución derivatizante (5 mL de ácido trifluoroacético + 2.5 mL de ácido acético glacial + 17.5 mL de agua desionizada) con objeto de aumentar la fluorescencia de las AF.
9. Para cuantificar las AF se inyectó el eluido derivatizado en inyecciones de 50 µL por triplicado, a la columna cromatográfica del HPLC (Phenomenex C₁₈ de 250 x 4.60 mm 5 µ).
10. Los restantes 850 µL del eluido derivatizado se refrigeraron.

Modificación del método.

El método original no menciona eluir la primera columna LC₁₈, y cuantificar las AF de este eluido por HPLC, después se sumó la cuantificación del 2° eluido de la segunda columna LC₁₈ con objeto de conocer cuánta AFB₁ se retenía en cada columna LC₁₈. Se sumaron las mediciones de ambas columnas.

III.3.1.2. Técnica de Koeltzow y Tanner (1990) para la detección de aflatoxinas libres en el sobrenadante.

- 1a. El sobrenadante de cada muestra de hígado, a la que se purificó de ADN con la técnica de Gupta (1984), se evaporó a un volumen máximo de 1.2 mL y se llevó a un volumen de 10 mL con NaCl 15mM/Citrato trisódico 1.5 mM a pH de 7.4.
- 1b. Cuando se procesaron las muestras de hígado para la purificación de ADN con el kit de Qiagen, se recolectaron los tres sobrenadantes que resultan en cada muestra por separado. Cada sobrenadante se llevó a un volumen de 5 mL con PBS pH 7.4.
2. Cada sobrenadante ya diluido en el buffer de pH 7.4 se agitó en el vortex. El total del sobrenadante se pasó por una columna de inmunoafinidad Easi-Extract para aflatoxinas totales, prelavada con 20 mL de PBS para activarla, cuidando que no se secase. La columna de inmunoafinidad contiene un gel de agarosa con anticuerpos monoclonales que retienen a las AF totales, por una reacción antígeno-anticuerpo.
3. Después se lavó la columna con 20 mL de H₂O_{dest} desionizada y se secó haciendo pasar aire por ella.
4. Se eluyó con 2 mL de MeOH y se colectó el eluido en un vial de vidrio ámbar.
5. El eluido se evaporó a sequedad a 40 °C, se resuspendió en 200 µL de acetonitrilo y 800 µL de solución derivatizante, y se inyectaron 50 µL por triplicado a la columna cromatográfica del HPLC. Los restantes 850 µL del eluido se refrigeraron.

III.3.2. Técnicas de purificación del ADN para detectar a las AF unidas al ADN (aductos).

III.3.2.1. Técnica de Gupta (1984) para la purificación del ADN de las muestras de hígado humano control y con HCC.

Esta técnica de Gupta se aplicó a la purificación del ADN de muestras de hígado humano control y con HCC fijadas en formol al 10% o bien embebidas en parafina. La técnica de Gupta (1984) fue estandarizada en el laboratorio para 0.4 g de tejido. Describiremos a continuación la técnica de Gupta aplicada a muestras en formol al 10%.

1. Se homogenizaron 0.4 g de tejido de hígado control con 1.2 mL de cloruro de potasio 150 mM (=11.18 g/L) helado en el homogeneizador (Ultra turrax T-25 basic IKA-Werke).
2. Se precipitó el homogeneizado con 3.6 mL de etanol helado y se mezcló bien.
3. Se centrifugó durante 15 minutos a 2600 rpm.
4. Se decantó el sobrenadante N° 1 claro y se secó la pastilla al vacío. El sobrenadante N° 1 se almacenó a -20 °C, al que se le hizo extracción de AF libres con la técnica de Técnica de Koeltzow y Tanner (1990) descrita en la sección **III.3.1.2**.
5. Se colocó la pastilla en un tubo de centrifuga con 2.0 mL de 1% SDS (detergente dodecilsulfato sódico), en una concentración de 1 g en 100 mL de agua destilada y 1mM EDTA (ácido etilen diamino tetra acético) (0.037224 g/100 mL). Se homogeneizó brevemente para resuspender la pastilla.
6. Se centrifugó 5 minutos a 2 600 rpm para dispersar la espuma y se agregó 1.0 mg de Proteinasa K en 60 µL de agua. Se incubó por 30 minutos a 37°C.
7. Se agregaron 100 µL de 1M de Tris-HCl (1.2114 g en 10 mL de agua destilada) ajustado a pH 8 y se extrajo con un volumen igual de fenol (2.0 mL). Se mezcló muy bien y se centrifugó a 2600 rpm por 5 minutos. Para obtener todo el ADN de la muestra, se añadió SDS al 1% y se centrifugó de nuevo. Se recuperó el sobrenadante y se continuó con la técnica.
8. Se removió la fase acuosa superior y se agregaron 2.0 mL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) y se mezcló muy bien. Se centrifugó durante 5 minutos a 2 600 rpm.
9. Se tomó la fase acuosa superior y se agregaron 2 mL de cloroformo HCl₃: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló muy bien y se centrifugó durante 5 minutos a 2 600 rpm.
10. Se tomó la fase acuosa superior y se puso en otro tubo de centrifuga, se le agregaron 200 µL de 5M de NaCl (1.461 g/5 mL) + 6 mL de etanol helado y se dejó a -20 °C toda la noche.
11. Se centrifugó a 2 600 rpm por 15 minutos, se decantó el etanol y se lavó la pastilla con etanol al 70%, después con acetona: etanol (1:1 v/v) y después con acetona. Si la pastilla estaba poco compacta, se centrifugaba de nuevo durante 5 minutos a 2 600 rpm. Si estaba compacta, sólo se lavaba.
13. Se secó la pastilla al vacío.

14. Se volvió a disolver en 0.8 mL (de 1.5 mM de cloruro de sodio (0.008766 g/100 mL), 0.15 mM de citrato trisódico (0.0044115 g /100 mL) en 1 mM de EDTA (0.037224 g/100 mL) [(0.01 x citrato de sodio salino (SSC)].
15. Se agregaron 10 μ L de 1 mM Tris HCl (0.12114 g/L) pH 7.4 y 750 unidades de RNAasa T₁ (0.6 μ L) (de una botella de 500 000/botella de 0.98 mL).

Tratamiento para RNAasa A:

Se hicieron 10 mg mL⁻¹ en agua destilada (alcanzó para 16 muestras de 0.4 g). Se hirvió a 90 °C por 10 minutos y de esta botella se agregaron 60 μ L a la preparación del DNA. Las alícuotas de RNAasa restantes se almacenaron en tubos pequeños de 10 mg en 1 mL. Se incubó a 37 °C por 15 minutos.

16. Se agregaron 25 μ L de 1 M Tris-HCl pH 8 y otros 800 μ L de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1 v/v). Se mezcló muy bien y se centrifugó 5 minutos a 2 600 rpm.
17. Se tomó la fase acuosa y se le agregaron 800 μ L de CHCl₃: alcohol isoamílico (24:1 v/v). Se mezcló muy bien y se centrifugó a 2 600 rpm por 5 minutos.
18. Se tomó la fase acuosa del sobrenadante y se agregaron 80 μ L de 5 M NaCl (29.22 g /100 mL) y 2.4 mL de etanol helado y se dejó reposar a - 90°C por 45 minutos ó a - 20° C toda la noche.
19. Se centrifugó a 2 600 rpm por 15 minutos, se decantó el etanol y se lavó con etanol helado. Si no estaba bien precipitado se agregaba etanol al 70% para formar la pastilla. Se añadió etanol: acetona (1:1 v/v), después se puso acetona pura. Se secó la pastilla sin acetona durante 15 minutos a vacío.
20. Se redisolvió la pastilla en 2 mL de 15 mM de carbonato de sodio (Na₂ CO₃) (0.159 g/100 mL) + 30 mM de carbonato hidrogenado de sodio (bicarbonato de sodio) (0.252 g/100 mL) para abrir el anillo de AF a una forma estable. Se puso a pH 9.5 e incubó a 37°C por 2 horas.
20. Se agregaron 200 μ L de 5 M de NaCl (29.22 g/100 mL) y 15 mL de etanol helado y se dejó reposar a - 90°C por 45 minutos o a -20 °C toda la noche.
21. Se centrifugó a 2 600 rpm por 15 minutos, se decantó el etanol, se lavó con etanol al 70%, etanol: acetona (1:1) y acetona pura. Se secó completamente al vacío hasta que quedó como gis.
22. Se redisolvió en 800 μ L de 15mM NaCl/ 1.5 mM Citrato trisódico. Se incubó a 37°C si la pastilla no se disolvía fácilmente.
23. Para medir la pureza del ADN se midió su absorbancia en luz UV a 260 nm. El blanco fue NaCl/Citrato trisódico. También se midió la proteína a 280 nm.

Posteriormente se midió la pureza del ADN como se detalla en la **Sección III.5.**

III.3.2.2. Purificación del ADN de muestras de hepatocarcinomas embebidas en parafina.

Algunas muestras de HCC fueron entregadas en bloques de parafina. Con un microtomo (Erma, Inc. 1-5-32 Yushima Bonkyoku, Tokio, Japón) se cortaron rebanadas delgadas de 19 μm de cada bloque, y se guardaron por separado a 4°C.

1. De las rebanadas de 19 μ de cada muestra de HCC embebida en parafina se pesaron 200 mg en una balanza analítica (Denver Instrument Co. Modelo 100 A), y se colocaron por separado en tubos de microcentrífuga.
2. Se les colocaron 1200 μL de xileno, y se agitó vigorosamente en el vortex.
3. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C).
4. Se removió el sobrenadante con una pipeta, sin tocar la pastilla.
5. Se agregaron 1200 μL de etanol al 100% a la pastilla para remover residuos de xileno, y se mezcló en el vortex.
6. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C).
7. Se removió el etanol por pipeteo, sin tocar la pastilla.
8. Se repitieron los pasos 6 a 7 otra vez más.
9. Se incubó el tubo de microcentrífuga abierto a 37°C de 10 a 15 min hasta que se evaporó el alcohol.
10. Se resuspendió el tejido del pellet en 1.2 mL de cloruro de potasio 150 mM helado y se homogeneizó.
11. Para purificar el ADN, se continuó con la técnica de Gupta (1984) descrita en la sección **III .3.2.1.**

III.3.2.3. Técnica con kit de Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit).

Con objeto de usar una metodología moderna para la purificación de ADN se usó el kit de Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit 250. Cat. N° 51306).

1. Se colocaron 25 mg de tejido de hígado en nitrógeno líquido, y se trituró vigorosamente con pistilo en un mortero. Se decantó el nitrógeno líquido y permaneció el tejido pulverizado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. El nitrógeno líquido se

evaporó, pero no se dejó secar el tejido. Se agregaron 180 μL de Buffer ATL (Ác. Edético o EDTA al 2.5-10%).

2. Se agregaron 20 μL de Proteinasa K, se mezcló en el vortex, y se incubó a 56 °C toda la noche.
3. Se agregaron 4 μL de RNAsa A (100 mg mL^{-1}), se mezcló por agitación en vortex durante 15 seg, y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200 μL del buffer AL (cloruro de guanidinio de 25-50%) a la muestra. Se mezcló en vortex por 15 seg, y se incubó a 70 °C por 10 min.
4. Se agregaron 200 μL de etanol helado (100%) a la muestra, y se mezcló en vortex por 15 seg.
5. Se aplicó cuidadosamente la mezcla del paso 4 a una columna Mini spin QIAamp con tubo colector de 2 mL. Se cerró la tapa, y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. Se colocó la columna Mini spin QIAamp en un segundo tubo colector limpio de 2 mL, y se usó el filtrado N° 1 para buscar las AF libres.
6. Cuidadosamente se abrió la columna Mini spin QIAamp y se agregaron 500 μL del Buffer AW1 (cloruro de guanidinio del 50-100%). Se cerró la tapa, y se centrifugó a 8000 rpm. Se colocó la columna Mini spin QIAamp en un tubo colector limpio de 2 mL, y se usó el filtrado N° 2 para buscar AF libres rescatadas del Método de Qiagen.
7. Cuidadosamente se abrió la columna Mini spin QIAamp y se agregaron 500 μL de Buffer AW2. Se cerró la tapa y se centrifugó a 14 000 rpm por 3 min.
8. Se colocó la columna Mini spin QIAamp en un tubo de microcentrífuga, y se usó el filtrado N° 3 para detectar AF libres por el Método de Qiagen. Se abrió cuidadosamente la columna Mini spin QIAamp y se agregaron 200 μL de Buffer AE (10mM Tris-Cl + 0.5 mM EDTA pH 9.0). Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto, y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. Se cerró el tubo de microcentrífuga con el ADN y se midió la concentración a 260 nm.

Posteriormente se cuantificaron las AF libres de los 3 filtrados del Método de Qiagen por HPLC.

III.4. Estudio acerca del efecto del formol sobre el ADN hepático.

Para conocer la cantidad de ADN que se degrada en una muestra de hígado que fue fijada en formol al 10%, se purificó el ADN de muestras de hígado de pollo con diferentes cantidades de formol.

Se compraron en el supermercado tres hígados de pollo el día 10 de marzo del 2009. Un hígado fue congelado sin tratamiento alguno, considerado como fresco. Un segundo hígado fue fijado con formol al 4% y el tercer hígado se colocó en formol al 10%, y se refrigeraron.

De cada hígado se obtuvieron 3 submuestras, a las que por separado, el día 11 de marzo, se les extrajo el ADN, con la técnica del kit de Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit). Lo mismo se les hizo a los hígados el día 12 de mayo, y el 2 de junio del año 2009.

III.5. Medición de la pureza y concentración del ADN.

Para la medición de la pureza y concentración del ADN de las muestras procesadas con la técnica de Gupta (1984), el ADN se redisolvió en un mL de solvente (NaCl 15mM + Citrato de Sodio 1.5 mM), y se agitó.

El ADN de las muestras procesadas con el Kit de Qiagen, estaba diluido en el buffer AE, y su concentración se midió se la siguiente forma:

1. Se prendió el espectrofotómetro.
2. Se midió el blanco (agua destilada) a 260 nm.
3. Se obtuvo la Absorbancia (Abs) del ADN a 260 nm y de la proteína libre a 280 nm de cada una de las muestras. Se dividió la Abs del ADN entre la Abs de la proteína y el resultado del cociente debe ser alrededor de 1.8 para aceptarse.
4. Para obtener la concentración de ADN (mg mL^{-1}) se dividió la Absorbancia a 260 nm entre 20.

III.6. Procesamiento de las muestras.

En la Unidad de Patología del Hospital General de México, las muestras se fijaron en formol al 10%. Para su transportación del Hospital General de México al laboratorio, se suspendieron en una solución de cloruro de potasio (KCl) 150 mM y se mantuvieron en un recipiente con hielo. Una vez en el laboratorio, las muestras se congelaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un ultracongelador REVCO, hasta su análisis.

III.7. Porcentaje de recuperación por adición de AFB₁ a hígados control humanos.

Para obtener el porcentaje de recuperación de la técnica, se fortificó un gramo de cada una de 6 muestras de hígado control con AFB₁ y se aplicó un gramo de cada una de 6 muestras con una mezcla de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂.

- a. Se prepararon 5 diferentes concentraciones de la mezcla de estándares de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 ng mL⁻¹), para fortificar las muestras.
- b. Se homogeneizó cada gramo de hígado control por separado en un tubo de centrifuga de 50 mL con 2 mL de solución de cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker, 3624-19) saturada un tubo de centrifuga de 50 mL.
- c. A cada homogeneizado se le añadieron 2.5 mL H₂O_{dest} y 10 mL de metanol (MeOH) (Fermont, N° Cat. 06123), para hacer una solución de MeOH/H₂O (81:19 v/v).
- d. Finalmente, se fortificó cada gramo de tejido homogeneizado con las concentraciones de AFB₁ y la mezcla de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ por separado.
- e. Las muestras fortificadas se dejaron reposar en el refrigerador por 24 horas.
- f. Se hizo la extracción y concentración de AF por la técnica de Qian & Yang (1984) de la **sección III.3.1.1.** para la obtención de las AF libres.

III.8. Cuantificación de aductos de AFB₁-N⁷-Gua por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

III.8.1. Síntesis del estándar de aductos de AFB₁-ADN.

Para establecer un buen grado de purificación, se sintetizó el doble del estándar del aducto AFB₁-ADN con objeto de que una vez hidrolizado, la mitad se pasó por columna de inmunoafinidad y la otra mitad por una columna LC₁₈. Este aducto se requiere para utilizarlo como estándar en la técnica de ELISA y para HPLC.

La síntesis del aducto se hizo de la siguiente forma:

1. La síntesis de AFB₁-N⁷-Gua se realizó siguiendo el método de Swenson *et al.* (1977) con modificaciones de Harrison *et al.* (1991). Se trabajó en un laboratorio de alto riesgo con todas las medidas de precaución posibles para evitar accidentes fatales. Se hizo y midió una concentración de 1 µg mL⁻¹ de AFB₁ en etanol, después esa concentración se llevó a 2000 veces para obtener 2 mg mL⁻¹.
2. Se agregaron los 2 mg mL⁻¹ de AFB₁ y 10 mL de diclorometano (DCM) en un vial de vidrio, se esperaron 5 min para que se formara el aducto de AFB₁-Cl₂.
3. Se disolvieron 4 mg de ácido 3-cloro peroxibenzoico (Sigma) en 5.4 mL de diclorometano y se le adicionó la solución del paso 2.
4. Se predisolvieron 16 mg de ADN de timo de ternera (Calf thymus DNA de Sigma) en 4 mL de agua destilada y 5 mL del buffer de fosfato de sodio 20 mM a pH 7.4, y se agregó la solución del paso 3. Se mantuvo en agitación en oscuridad a 37°C por toda

la noche. El vial con el ADN se tapó, se selló y cubrió con aluminio para protegerlo del calor y la luz.

5. Se extrajo el aducto de AFB₁-ADN mezclando con un volumen igual de cloroformo 3 veces, cada vez se recuperaba la fase acuosa superior, después se centrifugó a 3600 rpm por 5 minutos para remover la AFB₁ no unida al ADN que quedó en la fase inferior.
7. Se tomó la fase acuosa superior con el ADN y se le añadieron 200 µL de NaCl 5 M y 6 mL de etanol helado y se dejó a -20°C por toda la noche.
8. Se centrifugó a 2600 rpm por 15 min y se decantó el etanol, se lavó con etanol helado y después con etanol-acetona (1:1 v/v), finalmente se lavó con acetona pura. Se secó el pellet bajo vacío por 15 min.
9. Se redisolvió el pellet con 5 mL de Na₂CO₃ 15 mM / Na HCO₃ 30 mM para abrir el anillo de lactona de la AF del aducto AFB₁-N⁷-Gua hacia una forma estable de imidazol en anillo abierto llamado AFB₁-formamidopirimidina (AFB₁-FAPY). Se incubó a 37°C por dos horas. Ver **Figura 22**.
10. Se añadieron 500 µL de NaCl 5 M y 15 mL de etanol helado y se dejó a - 90°C por 45 minutos.
11. Se centrifugó a 2600 rpm, se decantó el etanol y secó el pellet bajo vacío completamente hasta que quedó como gis. Se redisolvió en 2 mL de NaCl 15 mM / Citrato de Sodio 1.5 mM (1:1 v/v). Se midió la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro, se usó la solución amortiguadora de NaCl 15 mM / Citrato de Sodio 1.5 mM (1:1 v/v) como blanco.

- **Hidrólisis del ADN unido a la AFB₁.**

1. El ADN unido a la AFB₁ fue sometido a una hidrólisis ácida con HCl 0.15 M durante 70°C por 30 minutos (Harrison *et al.*, 1991). El hidrolizado se puso en hielo y se neutralizó con acetato de potasio 1 M pH 5.0 e hidróxido de potasio 1 N hasta tener un pH 7.4.

- **Purificación del estándar de AFB₁-ADN.**

Posteriormente el hidrolizado se aplicó a uno de 2 tratamientos:

a. Columnas de inmunoafinidad:

1. Se activó la columna de inmunoafinidad para AF totales con 20 mL de NaCl 15 mM /1.5mM Citrato Trisódico a pH 7.4 por medio de goteo por gravedad, sin dejar que se secase.
2. Se aplicó el estándar del aducto de AF-ADN a la columna de inmunoafinidad.
3. Se lavó con 20 mL de H₂O destilada y se dejó pasar aire a través de ella para que no quedaran residuos de agua.
4. Se eluyó la columna con 5 mL de MeOH en un vial ámbar y se evaporaron a sequedad a 40°C.
5. Se resuspendió en 1 mL de MeOH y se inyectaron 20 µL al HPLC.

b. Columnas LC₁₈:

1. Se activó la columna LC₁₈ con 20 mL de NaCl 15 mM /1.5mM Citrato trisódico a pH 7.4 por medio de goteo por gravedad, sin dejar que se secase.
2. Se aplicó el estándar del aducto de AFB₁-ADN a la columna LC₁₈, y se recuperó el estándar filtrado.
3. Se activó una segunda columna LC₁₈ con 20 mL de NaCl 15 mM /1.5mM Citrato trisódico a pH 7.4 y se pasó el filtrado recuperado del paso 2.
6. Ambas columnas se dejaron secar por toda la noche.
7. Se eluyó cada columna por separado con 5 mL de MeOH y se evaporaron a sequedad a 40°C.
8. Se resuspendió en 1 mL de MeOH y se inyectaron 20 µL al HPLC.

III.8.2. Curva de calibración de AFB₁-N⁷-Gua.

Para medir la cantidad de cada AFB₁-ADN se hizo una curva de calibración con nueve concentraciones (1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 50 y 100 ng mL⁻¹) en MeOH. También se elaboró una segunda curva de calibración con las nueve diluciones ya mencionadas pero en ACN y derivatizadas con TFA. Todas las diluciones se inyectaron por triplicado. Las diluciones indicaron la cantidad de AF-ADN por área cromatográfica del estándar en sus diferentes diluciones, que será la base para conocer la cantidad de AF-ADN en las muestras problema.

El primer paso para hacer la medición de los estándares de cada AF fue hacer una solución base de 1 µg mL⁻¹, como se explica en la sección III.2.2.1.

Las diferentes diluciones se cuantificaron por HPLC y las áreas obtenidas se graficaron por regresión lineal para obtener el coeficiente de correlación ($R \approx 1$) de la curva de calibración con el programa Microsoft Excel 2003.

Se inyectó al aducto de AFB₁-N⁷-Gua sintetizado, en el HPLC con diferentes gradientes (80:20; 60:40; 40:60 y 20:80 v/v) de MeOH:H₂O como fase móvil para hacer visible al pico cromatográfico y establecer las condiciones adecuadas para la cromatografía de líquidos, siguiendo la recomendación de Essigman *et al.*(1977). También se probaron diferentes velocidades de flujo de la fase móvil 0.8, 1.0 y 1.2 mL por minuto.

III.8.3. Medición de los aductos de AFB₁-N⁷-Gua de las muestras de hígado control y con HCC humanos por HPLC.

El ADN de las 15 muestras de hígado control y de las 15 muestras de HCC fueron hidrolizadas como se indica en la **sección III.8.1.** y el aducto de AF-ADN de cada muestra fue purificado por medio de una columna de inmutafinidad como se describió en la **sección III.8.1.a.**

Por otro lado, considerando que el método de HPLC no tiene la sensibilidad suficiente para cuantificar a los aductos de cada muestra individual, que a veces son picogramos, se decidió purificar el ADN de la suma de 10 g correspondientes a 1 g de cada una de 10 muestras de hígado humano con HCC, para medirlas en HPLC en conjunto, ya que el ADN del grupo de muestras con HCC presentaría mayor cantidad de aducto y quizá se pudiera cuantificar por HPLC.

III.9. Análisis Estadístico.

Se hicieron los Análisis Estadísticos para comparar la eficiencia de cada uno de los métodos utilizados para la extracción de AF libres y de ADN con el Software JMP8.

Se hizo un Análisis de varianza de la comparación de los métodos de Gupta (1984) y del Kit de Qiagen para la purificación de ADN. También se realizaron un Análisis de varianza, prueba de t y la transformación de Box-Cox de las concentraciones de ADN del grupo de hígados humanos control y con HCC purificado con la técnica de Gupta.

Se hizo una prueba de T apareada para conocer la diferente capacidad de retención de AF de las 2 columnas LC₁₈ de Qian y Yang (1984), y conocer si había diferencias significativas entre la cantidad de AF libres de las muestras de hígado control y con HCC.

La comparación de AF libres extraídas con el método de Koeltzow & Tanner (1990) para saber si la media de las muestras de hígado humano control se parece a las muestras con HCC, se hizo con pruebas *t*. Asimismo, se aplicó la prueba de Wilcoxon a las AF libres extraídas de las muestras de hígado humano control y con HCC con el método de Koeltzow & Tanner (1990), para convertir los datos a valores no paramétricos

El análisis de varianza, el test de rebanadas y las gráficas de interacción, se aplicaron a los datos del primer, segundo y tercer sobrenadante de las muestras de hígado control y con HCC obtenidos con el kit de Qiagen para saber cual contenía mayor cantidad de AF.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Muestreo.

Se obtuvieron 15 muestras de hígado control, 10 de HCC de 5 g cada una y 5 muestras de HCC embebidas en parafina, las cuales se enlistaron en la **Tabla 5**.

IV.2. Cuantificación de AF por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Se obtuvo el cromatograma de las AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ aparecen como AF primarias de alimentos, los metabolitos AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL son toxinas formadas por el metabolismo animal, en el hígado, con objeto de bajar la toxicidad de las toxinas primarias de alimentos y eliminarlas por fluidos y sólidos de excreción (orina, heces fecales, ácidos biliares y leche) (**Figura 23**).

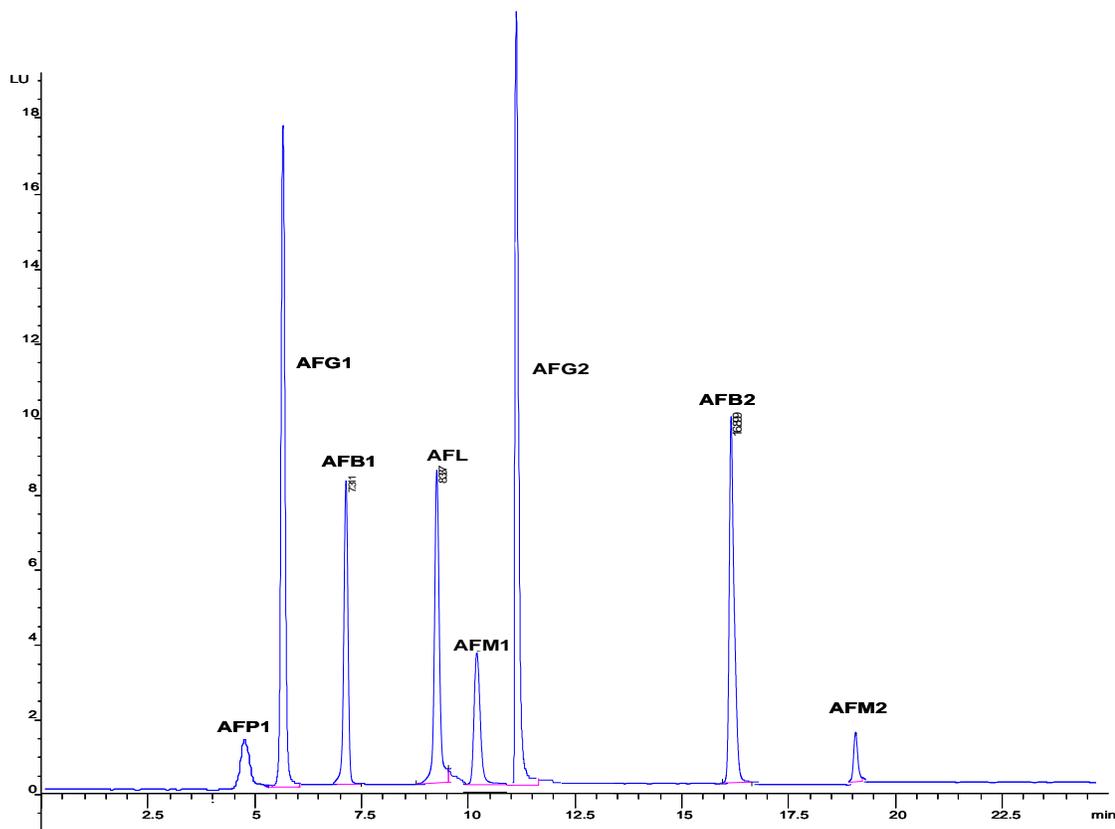


Figura 23. Pico cromatográfico de cada aflatoxina detectada en el HPLC.

IV.2.2. Curvas de calibración.

Para elaborar las curvas de calibración, se hicieron concentraciones de 2, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100 y 200 ng mL⁻¹ para AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁ y AFL derivatizadas. Para AFM₂ y AFP₁, las concentraciones fueron de 7.8, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 ng mL⁻¹.

Las curvas de calibración se elaboraron de acuerdo al tiempo de retención en que salieron los picos cromatográficos (**Tabla 7**) y su área bajo la curva.

Tabla 7: Resumen de los tiempos de retención cromatográficos de las aflatoxinas, bajo las condiciones experimentales.

Aflatoxina	Tiempo de retención en minutos
AFB ₁	7.307 a 7.320
AFB ₂	16.646 a 16.853
AFG ₁	5.706 a 5.846
AFG ₂	10.925 a 11.636
AFM ₁	10.079 a 10.815
AFM ₂	18.791 a 19.406
AFP ₁	5.128 a 5.560
AFL	8.421 a 8.835

A continuación se muestran las gráficas correspondientes a las curvas de calibración de cada AF con su respectivo coeficiente de correlación (**Figuras 24 a 31**).

a. Curva de calibración de AFB₁.

Las diluciones utilizadas para la curva de calibración de AFB₁, se encuentran dentro del intervalo de concentración de 2 a 200 ng mL⁻¹, el tiempo de retención para esta toxina se localiza en el rango de 7.307 a 7.320 minutos (**Anexo 7, Tabla A**). En la **Figura 24** se presentan gráficamente los datos de la curva de calibración de AFB₁ después de analizarlos por medio de una regresión lineal, la cual dio un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9991754$.

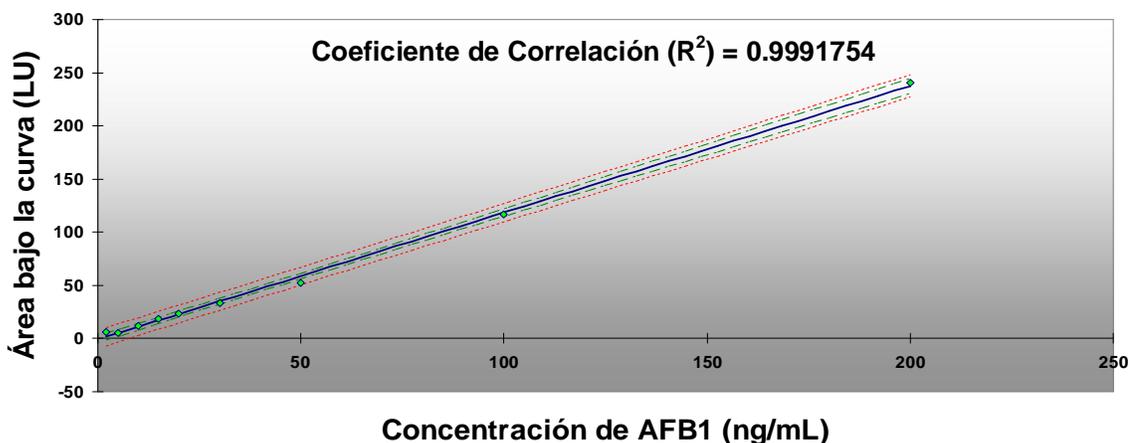


Figura 24: Curva de calibración de AFB₁.

b) Curva de calibración de AFB₂.

Las concentraciones para la elaboración de la curva de calibración de AFB₂ están dentro del intervalo de concentración de 2 a 200 ng mL⁻¹, su tiempo de retención está dentro del rango de 16.646 a 16.853 minutos (**Anexo 7, Tabla B**). En la **Figura 25** se presenta gráficamente los datos de la curva de calibración, donde se observa un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.99954443$ obtenido por regresión lineal.

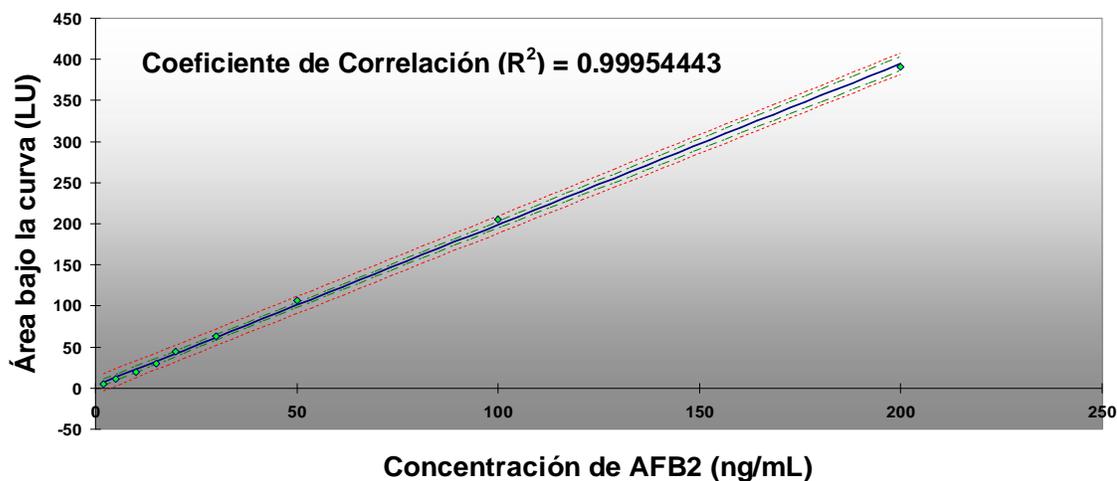


Figura 25: Curva de calibración para AFB₂.

c) Curva de calibración de AFG₁.

Las diluciones para la elaboración de la curva de calibración de AFG₁, se encuentran dentro del intervalo de concentración de 2 ng mL⁻¹ a 200 ng mL⁻¹, el tiempo de retención para esta toxina se localiza en el rango de 5.706 a 5.846 minutos (**Anexo 7**

Tabla C). En la **Figura 26** se presentan gráficamente los datos de la curva de calibración de AFG₁ después de analizarlos por una regresión lineal, se obtuvo un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.99991355$.

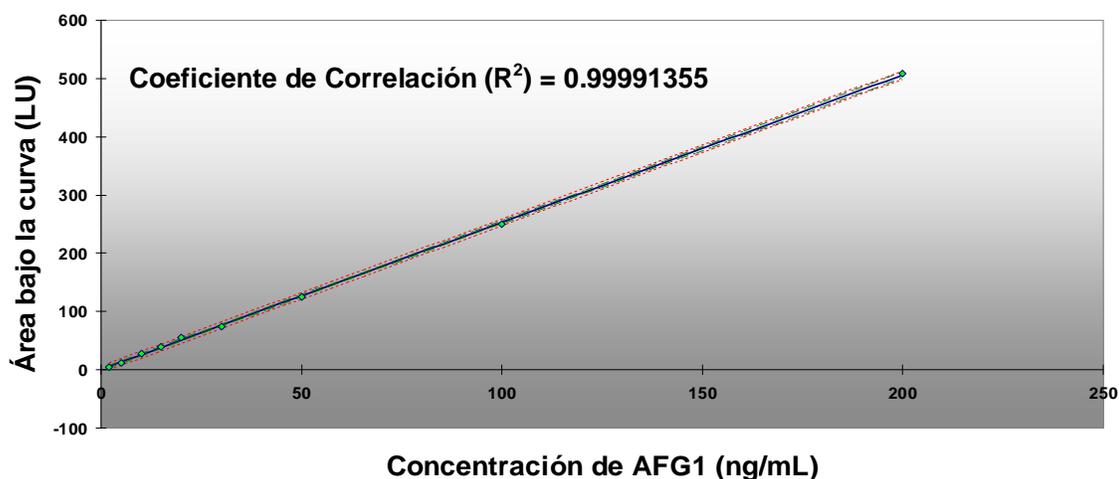


Figura 26: Curva de calibración para AFG₁.

d) Curva de calibración de AFG₂.

Las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFG₂, se encuentran dentro del intervalo de concentración de 2 a 200 ng mL⁻¹, el tiempo de retención para esta toxina se localiza en el rango de 10.925 a 11.636 minutos (**Anexo 7 Tabla D**). En la **Figura 27** se presentan los datos de la curva de calibración de AFG₂ de forma gráfica y por una regresión lineal se obtuvo un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.99684213$.

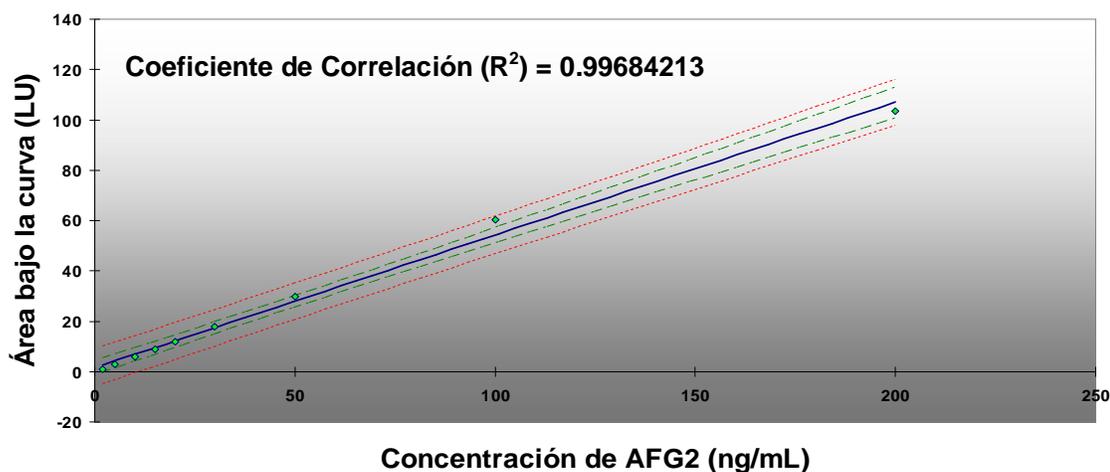


Figura 27: Curva de calibración para AFG₂.

e) **Curva de calibración de AFM₁.**

Las diluciones para la elaboración de la curva de calibración de AFM₁, se encuentran dentro del intervalo de concentración de 2 a 200 ng mL⁻¹, el tiempo de retención para esta toxina se localiza en el rango de 10.079 a 10.815 minutos (**Anexo 7 Tabla E**). En la **Figura 28** se presentan gráficamente los datos de la curva de calibración de AFM₁ después de analizarlos por una regresión lineal, se obtuvo un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.99991278$.

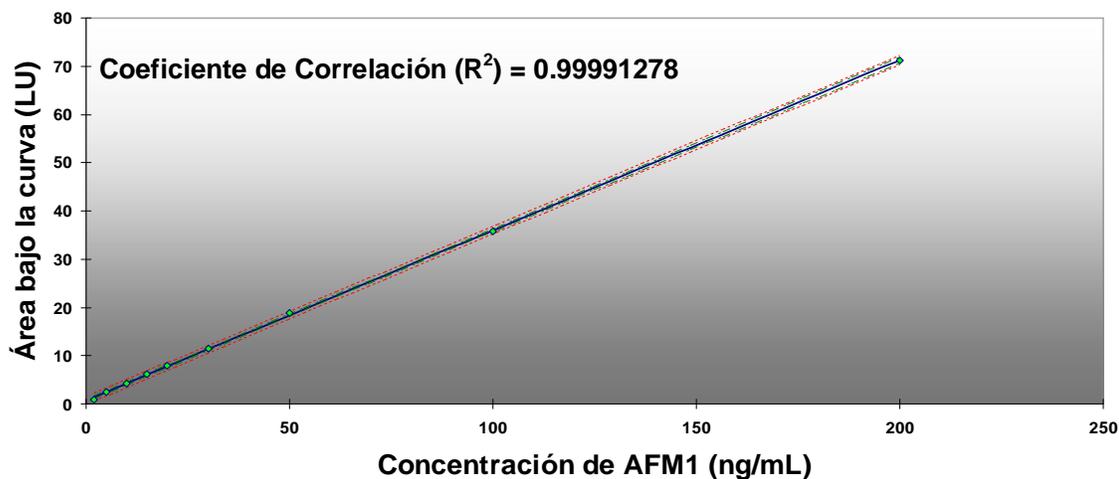


Figura 28: Curva de calibración para AFM₁.

f) **Curva de calibración de AFM₂.**

Las diluciones utilizadas para la curva de calibración de AFM₂ están dentro del intervalo de concentración de 7.8 mL⁻¹ a 1000 mL⁻¹, su tiempo de retención está dentro del rango de 18.791 a 19.406 minutos (**Anexo 7 Tabla F**). En la **Figura 29** se presentan gráficamente los datos de la curva de calibración, donde se observa un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.99613295$ obtenido por una regresión lineal.

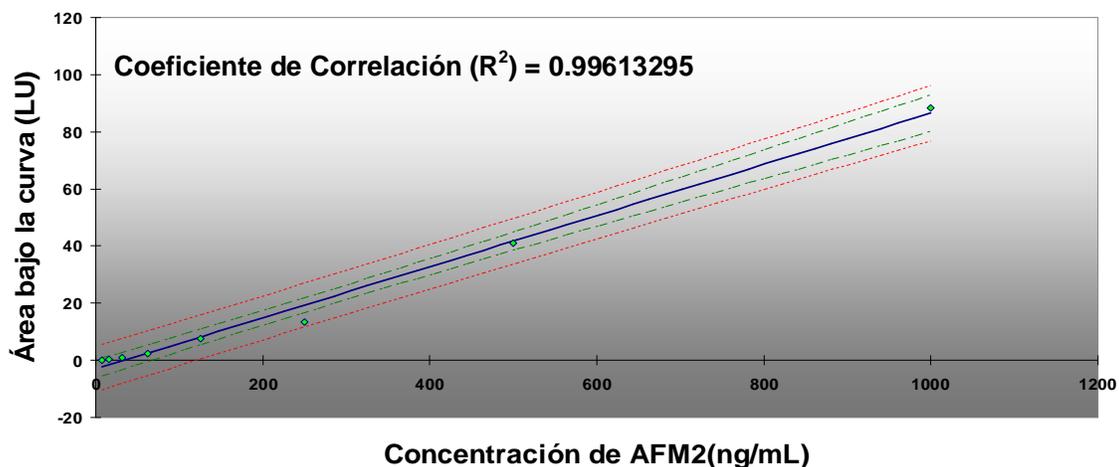


Figura 29: Curva de calibración para AFM₂.

g) Curva de calibración de AFP₁.

Las diluciones utilizadas para la curva de calibración de AFP₁ se encuentran dentro del intervalo de concentración de 7.8 mL⁻¹ a 1000 mL⁻¹, su tiempo de retención está dentro del rango de 5.128 a 5.403 minutos (**Anexo 7 Tabla G**). En la **Figura 30** se presenta gráficamente los datos de la curva de calibración, donde se observa un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.99389504$ obtenido por una regresión lineal.

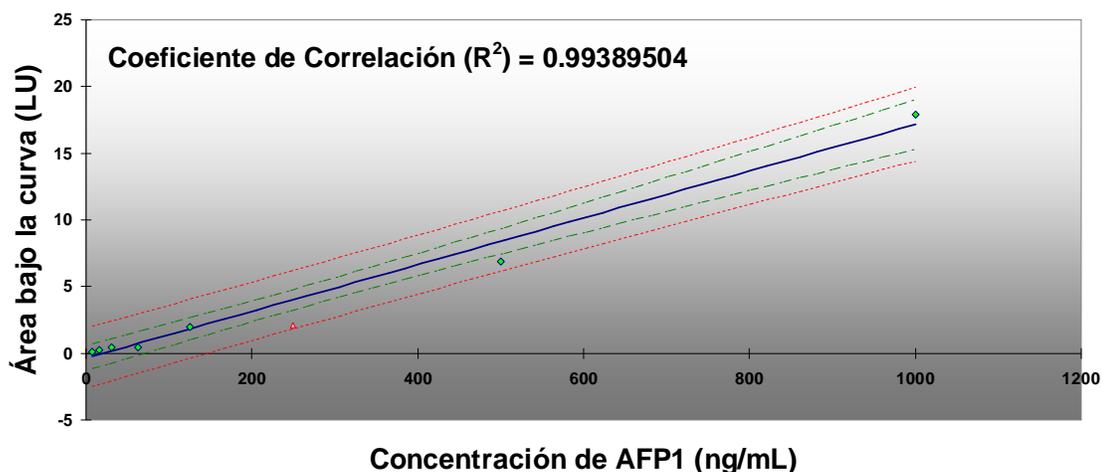


Figura 30: Curva de calibración para AFP₁.

h) Curva de calibración de AFL.

Las diluciones utilizadas para la curva de calibración de AFL se encuentran dentro del intervalo de concentración de 2 a 200 ng mL⁻¹, y su tiempo de retención está dentro del

rango de 8.421 a 8.834 minutos (**Anexo 7 Tabla H**). En la **Figura 31** se presentan gráficamente los datos de la curva de calibración, donde se observa un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9937866$ obtenido por una regresión lineal.

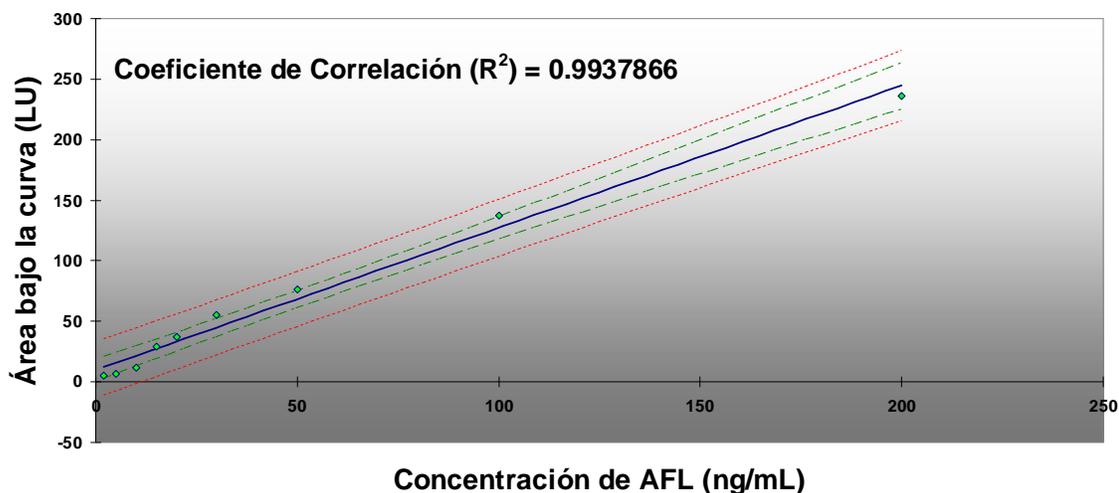


Figura 31: Curva de calibración para Aflatoxicol (AFL).

IV.3. Purificación del ADN de las muestras de hígado humano control y con HCC.

IV.3.1. Comparación de la técnica de Gupta (1984) y la del kit de Qiagen.

Se purificaron 10 muestras de hígado control por la técnica de Gupta (1984), donde se utilizaron 400 mg de cada muestra. La pureza y la concentración del ADN de cada una de las 10 muestras se presentan en la **Tabla 8**.

La concentración de ADN por esta técnica fue de 21 a 90 ng μL^{-1} , cantidad suficiente para medir aductos de AFB₁-N⁷-Gua por el método de ELISA Inhibitoria Indirecta y por HPLC. La pureza del ADN de las 10 muestras control tiene un índice de pureza recomendable de ≈ 1.8 , aunque algunas muestras no llegaron a esta medida.

Cómo la técnica de Gupta (1984), es larga y costosa, se utilizó el kit comercial QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen, donde el tamaño de muestra requerido es de 25 mg. Sin embargo no se obtuvo una cantidad de ADN mayor a 15 ng μL^{-1} , y al medirlo en el espectrofotómetro, éste daba una señal no válida (No Detectado = ND).

La concentración de ADN de las muestras de hígado control purificado con el kit de Qiagen se presentan en la **Tabla 8**, donde las muestras 3 (número de autopsia A08-379), 7 (A08-609) y 16 (A08-611) tuvieron una concentración de ADN de 269 ng μL^{-1} , 26 ng μL^{-1} y 56 ng μL^{-1} , respectivamente, mientras las muestras restantes fueron ND.

Por lo anterior, se utilizó la técnica de Gupta (1984), para purificar el ADN de todas las muestras de hígado control y con HCC analizadas en este estudio.

Tabla 8. Cuantificación de ADN de muestras de hígado control humano purificadas con la técnica de Gupta (1984) y con kit de Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit).

Hígados Control		Métodos de purificación de ADN		
N° de registro	N° de autopsia	Gupta, 1984		Kit de Qiagen
		Concentración de ADN (ng μL^{-1}) con muestra de 400 mg	Pureza del ADN	Concentración (ng μL^{-1}) de ADN en muestras de 25 mg de hígado
1	A08-278	28	1.0	ND
2	A08-289	33	1.1	ND
7	A08-609	55	1.2	26
3	A08-379	90	1.1	269
8	A08-614	48	0.7	ND
16	A08-611	30	1.0	56
17	A08-390	24	1.0	21
18	A08-608	21	1.0	ND
19	A08-382	48	1.0	ND
20	A08-384	52	1.0	ND
Suma		429	9.91	327
Promedio		42.9	0.991	32.7

ND= cantidades menores a 15 ng μL^{-1} no detectadas por el espectrofotómetro.

IV.3.1.1. Diferencias entre la concentración de ADN según las técnicas de Gupta, 1984 y el kit de Qiagen.

La **Figura 32** muestra la regresión lineal de la comparación de las concentraciones de ADN de las muestras de hígado control purificadas con los métodos de Gupta, 1984 y del Kit de Qiagen. Ambos métodos de purificación de ADN tienden a tener concentraciones bajas, sin embargo, al aplicar la regresión lineal se observa que los métodos no se parecen en nada, y el análisis de varianza indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) (**Tabla 9**).

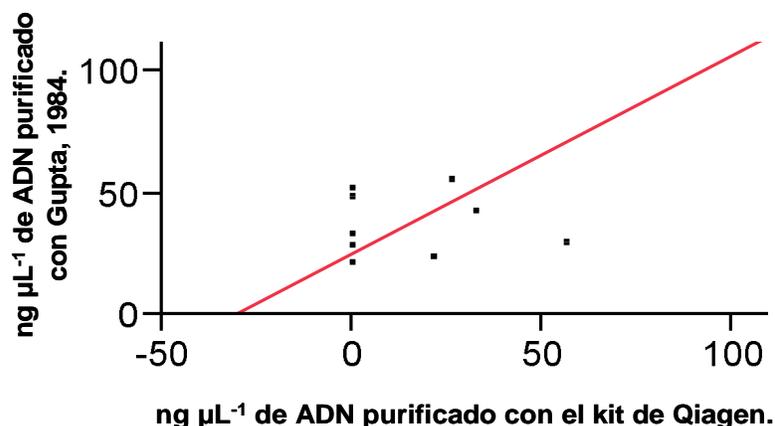


Figura 32: Regresión lineal de la comparación de la concentración de ADN de las muestras de hígado humano control, purificado con el método de Gupta (1984) y con el Kit de Qiagen.

Tabla 9: Diferencias estadísticamente significativas de la comparación de los métodos de Gupta, 1984 y del Kit de Qiagen para la purificación de ADN.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	1	93773.46	93773.5	20.08	0.0012*
Error	10	46699.88	4670.0		
Total	11	140473.34			

* Estadísticamente significativo.

IV.3.2. Técnica de Gupta (1984).

IV.3.2.1. Purificación de ADN de las muestras de hígado control y con hepatocarcinoma fijadas en formol al 10%.

En la **Tabla 10** se muestra la concentración de ADN de las muestras de hígado control y con HCC purificado por la técnica de Gupta, 1984. La concentración de ADN de las muestras de hígado control va de 16 ng μL^{-1} a 108 ng μL^{-1} con un índice de pureza de 0.8 a 1.9. En las muestras de HCC fijadas en formol al 10%, la concentración es de 17 ng μL^{-1} a 150 ng μL^{-1} con una pureza de 0.6 a 1.3. La concentración de ADN en las muestras con HCC embebidas en parafina, fue de 31 ng μL^{-1} a 96 ng μL^{-1} con una pureza de 0.8 a 1.4. La cantidad de ADN purificado de cada una de las muestras fue suficiente para la detección de aductos de AFB₁-N⁷-Gua por el método de ELISA inhibitoria Indirecta y por HPLC.

Tabla 10: Concentración de ADN de las muestras de hígado control y con hepatocarcinoma por la técnica de Gupta (1984).

Hígados Control				Hepatocarcinoma			
N° de muestra	N° de registro	ADN (ng μL^{-1}) con muestra de 400 mg	Pureza	N° de muestra	N° de registro	ADN (ng μL^{-1}) con muestra de 400 mg	Pureza
1	A08-278	28	1.0	Formol			
2	A08-289	33	1.1	1-HCC	A07-552	47	1.1
3	A08-379	52	1.0	2-HCC	A08-136	33	1.1
4	A08-591	16	0.9	3-HCC	A07-689	29	0.9
5	A08-592	64	1.2	4-HCC	A07-590	63	1.1
6	A08-601	84	0.8	5-HCC	A07-403	17	0.6
7	A08-609	55	1.2	6-HCC	A08-481	18	0.6
8	A08-614	90	1.1	7-HCC	A08-224	38	0.9
9	A08-633	45	1.0	8-HCC	A07-527	26	0.8
10	A08-642	28	0.9	9-HCC	A07-598	150	1.0
11	A08-646	36	1.0	10-HCC	A08-712	140	1.3
12	A08-651	108	1.4	Parafina			
13	A08-653	28	0.9	11-HCC	03-138 A/B	30	1.1
14	A08-682	49	1.0	12-HCC	03-226 E/D	31	1.2
15	A08-692	23	1.9	13-HCC	03-296 A/D	96	1.4
				14-HCC	03-415 A/E	32	0.8
				15-HCC	03-458 C/E	55	1.0

IV.3.2.2. Análisis estadístico de la concentración de ADN del grupo de hígados humanos control y con HCC purificado con la técnica de Gupta, 1984.

La prueba de t aplicada a la concentración de ADN de las muestras de hígados humanos control y con HCC tratadas con la técnica de Gupta (1984), mostró que no existen diferencias significativas ($P=0.7360$) entre ambos grupos estudiados (**Tabla 11**), porque la variabilidad entre las muestras de ambos grupos es grande. Además, la concentración de ADN de las muestras 9-HCC y 10-HCC originaba dos puntos atípicos en el análisis, por lo que el cálculo de las medias se realizó con intervalos de confianza muy abiertos, pero tampoco se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos ni una distribución normal en los datos. Con la transformación Box-Cox los datos paramétricos se convirtieron a valores no paramétricos, donde los puntos atípicos ya no se alejaron tanto, pero no hubo diferencia significativa ($P=0.88$) entre las concentraciones de ADN de los grupos, porque los datos no presentan normalidad (**Anexo 8**).

Tabla 11: Análisis de varianza de la concentración de ADN del grupo de hígados humanos control y con HCC, purificado con la técnica de Gupta (1984) donde no hubo diferencias estadísticamente significativas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	1	145.20	145.20	0.1160	0.7360
Error	28	35050.27	1251.80		
Total	29	35195.47			

IV.3.3. Efecto del formol sobre el ADN.

IV.3.3.1. Purificación de ADN de muestras de hígado de pollo con diferentes cantidades de formol.

Las muestras control de hígado humano y con HCC provenientes del Hospital General de la Ciudad de México, fueron fijadas con formol al 10% para evitar el contagio de una enfermedad viral o bacteriana. Sin embargo, después de purificar el ADN de estas muestras con el kit de Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit), no se obtuvo la concentración de ADN esperada, ya que el formol degrada al ADN, además que la cantidad de tejido utilizado en esta técnica no fue suficiente.

La **Tabla 12** muestran los datos de las concentraciones de ADN de muestras frescas de hígado de pollo fijadas en formol al 4% y en formol al 10%, para conocer la cantidad de ADN que se degrada cuando la muestra de hígado se fija con formol al 10%.

La cantidad promedio de ADN inicial de los hígados frescos sin formol fue de 193 ng mL⁻¹, de los hígados fijados en formol al 4% fue de 162 ng mL⁻¹ y de hígados fijados en formol al 10% fue de 138 ng mL⁻¹. El 12 de mayo, la concentración de ADN en el hígado fresco se mantuvo con 205 ng mL⁻¹, de los hígados en formol al 4% se redujo a 65 ng mL⁻¹, y en los hígados fijados en formol al 10%, el ADN ya no se detectó (ND).

El 02 de junio, la concentración de ADN en el hígado fresco se mantuvo, pero en los hígados en formol al 4 y al 10%, la concentración de ADN ya no fue cuantificable y se reportó como ND.

Tabla 12. Cuantificación de ADN en muestras de hígado de pollo fijadas en una solución de formol al 4% y 10%, purificadas con el Kit de Qiagen.

Hígados Sin formol	Cantidad (ng mL ⁻¹) de ADN en hígado de pollo.		
	11 /marzo/09	12/mayo/09	02/junio/09
1	190	197	186
2	260	195	243
3	129	224	266
Promedio	193	205	232
Hígados fijados en formol al 4%.			
4	183	70	No detectado
5	108	34	No detectado
6	194	91	21
Promedio	162	65	7
Hígados fijados en formol al 10%.			
7	140	ND	ND
8	142	ND	ND
9	132	ND	ND
Promedio	138	ND	ND

ND = No detectado.

Estos datos indican que la fijación del tejido de hígado con formol afecta la cantidad del ADN que se puede obtener de la muestra. El kit comercial de Qiagen no es recomendable para la purificación de ADN de muestras de hígado fijadas con formol al 10%, ya que se degrada a los 60 días.

IV.4. Análisis químico.

IV.4.1. Procesamiento de muestras.

IV.4.1.1. Porcentaje de recuperación por adición de AF a hígados humanos control por la técnica de Qian & Yang (1984).

a) Recuperación de AFB₁ en hígado humano.

El promedio del porcentaje de recuperación, cuando la AFB₁ se puso sola a los hígados humanos, fue de 94.7%. El porcentaje de recuperación de AFB₁ de la muestra 14 de hígado control humano fortificado con 0.1 ng g⁻¹ fue del 100%, al recuperar la cantidad de AFB₁ fortificada más la cantidad de 0.71 ng g⁻¹ de AFB₁ basal. Al fortificar con 0.5 ng g⁻¹ de AFB₁, se obtuvo un porcentaje de recuperación del 72%, al recobrar sólo 0.36 ng g⁻¹ de AFB₁. En las muestras de hígado humano control fortificado con 1.0, 2.0 y 5.0 ng g⁻¹ de AFB₁ se recuperó el 100% de la toxina más algunos ng de AFB₁ basal. El porcentaje de recuperación de la muestra fortificada con 10.0 ng g⁻¹ fue de 96.4% al obtener sólo 9.66 ng g⁻¹ de AFB₁ (**Tabla 13**).

El límite de detección de AFB₁, extraída con la técnica de Qian & Yang (1984) y cuantificada por HPLC, fue de 0.1 ng g⁻¹, la cantidad más pequeña detectada. Todo valor por debajo de esta cantidad se consideró como No Detectado (ND).

Tabla 13: Porcentaje de recuperación de AFB₁ de los hígados humanos control fortificados, por la técnica de Qian & Yang, 1984.

Muestra de Hígado control N°	Recuperación de AFB ₁ en hígado humano (ng g ⁻¹)					
	Control		Fortificación			
	AFB ₁ basal	AFB ₁ adicionada	1ª Columna	2ª Columna	Total de AFB ₁ recuperada	Porcentaje de recuperación %
10	0	0.1	0.24	0.57	0.81	100 +
6	0	0.5	0.20	0.16	0.36	72
5	<LOQ 0.01	1.0	0.26	0.82	1.08	100 +
12	0	2.0	1.15	1.49	2.65	100 +
11	0	5.0	3.42	2.59	6.01	100 +
9	<LOQ 0.02	10.0	0.41	9.25	9.66	96.4
	0.03	18.6	5.68	14.89	20.57	94.7

<LOQ = Bajo límite de cuantificación.

b) Porcentaje de recuperación de la técnica de Qian & Yang, 1984 en hígados humanos fortificados con una mezcla de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂.

Se elaboró una mezcla de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ para fortificar muestras de hígado humano control y conocer el porcentaje de recuperación de cada una de las AF.

En la **Tabla 14** se muestra que el porcentaje de recuperación promedio de la AFB₁ puesta en conjunto con las otras tres AF, fue de 100% sin embargo se puede observar en las muestras 14, 16, 19 y 20 que la recuperación fue de 100 % + esto quiere decir que se recuperó más AF que la suma de la AF basal y la adicionada. Esto puede deberse a que se analizaron 2 diferentes gramos de cada muestra, uno para obtener la AF basal y el otro para adicionarse, que aunque fueron de la misma muestra son de diferentes sitios del hígado control. Como las AF no se distribuyen homogéneamente en el hígado, es natural que no se haya obtenido la misma cantidad de cada AF del gramo de muestra de hígado control usado para obtener la AF basal con respecto al gramo con la AF recuperada. Lo importante fue el promedio de recuperación para cada AF (**Tabla 14**) que: para AFB₁, AFB₂ y AFG₂ fue del 100% y para AFG₁ fue de 95 %. Son cantidades tan pequeñas con las que se trabajó que se considera un excelente porcentaje de recuperación de cada AF.

El límite de detección para la mezcla de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ fue de 0.1 ng g⁻¹, que es la cantidad más pequeña detectada. Todo valor por debajo de esta cantidad se consideró como No Detectado (ND).

Tabla 14: Porcentaje de recuperación de hígados humanos control fortificados con una mezcla de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (técnica de Qian & Yang, 1984).

Muestras de Hígado Control N°	Recuperación de AFB ₁ en hígado humano (ng g ⁻¹)					
	Control		Fortificación			
	AFB ₁ basal	AFB ₁ adicionada	1 ^a Columna	2 ^a Columna	Total de AFB ₁ recuperada	Porcentaje de recuperación %
10	0	0.1	0.32	0.51	0.83	> 100
6	0	0.5	0.52	0.46	0.99	> 100
5	<LOQ 0.01	1.0	0.71	1.70	2.41	> 100
12	0	2.0	0.86	1.79	2.64	> 100
11	0	5.0	1.68	2.57	4.25	85
9	<LOQ 0.02	10.0	0.56	8.38	8.94	89
Total	0.03	18.6	4.65	15.41	20.07	> 100
	Recuperación de AFB ₂ en hígado humano (ng g ⁻¹)					
	Control		Fortificación			
	AFB ₂ basal	AFB ₂ adicionada	1 ^a Columna	2 ^a Columna	Total de AFB ₂ recuperada	
10	0.1	0.1	0.29	0.05	0.34	> 100
6	0.7	0.5	0.07	0.79	0.86	72
5	0.1	1.0	1.68	0.10	1.78	> 100
12	<LOQ 0.03	2.0	3.17	0.38	3.55	> 100
11	<LOQ 0.03	5.0	2.16	2.75	4.91	98
9	<LOQ 0.04	10.0	0.16	8.91	9.07	90
Total	1.4	18.6	7.53	12.98	20.52	> 100
	Recuperación de AFG ₁ en hígado humano control (ng g ⁻¹)					
	Control		Fortificación			
	AFG ₁ basal	AFG ₁ adicionada	1 ^a Columna	2 ^a Columna	Total de AFG ₁ recuperada	
10	0.1	0.1	0.21	0.21	0.42	> 100
6	0.1	0.5	0.34	0.05	0.39	65
5	<LOQ 0.04	1.0	0.35	0.15	0.50	48
12	0.1	2.0	1.13	1.50	2.64	> 100
11	0.1	5.0	2.18	2.09	4.27	84
9	<LOQ 0.05	10.0	4.65	5.33	9.98	99
Total	0.5	18.6	8.86	9.33	18.19	95.2
	Recuperación de AFG ₂ en hígado humano (ng g ⁻¹)					
	Control		Fortificación			
	AFG ₂ basal	AFG ₂ adicionada	1 ^a Columna	2 ^a Columna	Total de AFG ₂ recuperada	
10	22.5	0.1	2.39	20.20	22.59	100
6	15.6	0.5	0.92	15.09	16.01	99
5	10.7	1.0	10.56	11.88	22.44	> 100
12	14	2.0	1.40	14.56	15.96	98
11	12.8	5.0	1.18	15.39	16.57	100
9	19.6	10.0	3.07	25.99	29.06	98
Total	95.2	18.6	19.52	103.11	122.63	> 100

> Recuperación mayor a la AF basal más la adicionada; <LOQ=Bajo límite de cuantificación.

El límite de detección para la mezcla de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ fue de 0.1 ng g⁻¹, que es la cantidad más pequeña detectada. Todo valor por debajo de esta cantidad se consideró como No Detectado (ND).

IV.4.1.2. Detección de aflatoxinas totales en tejido de hígado humano por la técnica de Qian & Yang (1984).

La cuantificación de aflatoxinas libres (ng g⁻¹) de los hígados control y con HCC de humano se hizo con la técnica de Qian & Yang (1984). Como ambas columnas LC₁₈ utilizadas en este método se componen de igual fase sólida y se utilizan bajo las mismas condiciones, se hizo una modificación del método en el laboratorio de Micotoxinas del Instituto de Biología, para comprobar que ambas columnas retienen AF. Se reporta aquí que se deben de sumar las AF retenidas por ambas columnas LC₁₈ para obtener una cantidad total y confiable de AF (Díaz-Zaragoza, 2007).

En la **Tabla 15** presenta cada AF retenida en la primera y segunda columnas LC₁₈, de las muestras de hígado control y con HCC humano. La segunda columna LC₁₈ retuvo la mayor cantidad de AF (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁ y AFM₂) de las muestras de hígado humano control, aunque la primera columna también las retuvo.

En las muestras de HCC, la retención de la AFB₁ fue equivalente en la primera y segunda columnas LC₁₈. Hubo mayor retención de AFG₂, AFM₁, AFP₁ y AFL en la segunda columna LC₁₈, mientras que la primera columna retuvo más AFB₂, AFG₁ y AFM₂.

Este tipo de columnas LC₁₈ retienen componentes de media y baja polaridad y no existe un comportamiento similar en su capacidad de retención para cada AF. Aunque la segunda columna haya retenido la mayor cantidad de AF que son compuestos de polaridad media, la primera columna retuvo desde trazas hasta 40 ng g⁻¹, de compuestos de baja polaridad como la grasa, de modo que para conocer la concentración precisa de cada AF se deberán sumar las AF retenidas por ambas columnas. Este hecho se atribuye a la distribución heterogénea y focal de las AF, y debe considerarse para la valoración del método en cada sustrato o matriz.

Tabla 15. Aflatoxinas (ng g⁻¹) de hígados control humanos y con HCC, en ambas columnas LC₁₈, técnica de Qian & Yang (1984).

N° de muestra	Cantidad ng g ⁻¹ de AF en hígado humano control. <LOQ = Bajo Límite de cuantificación.															
	Hígados control															
	AFB ₁		AFB ₂		AFG ₁		AFG ₂		AFM ₁		AFM ₂		AFP ₁		AFL	
	columna	columna	columna	columna	columna	columna	columna	columna	columna	columna	columna	columna	columna	columna	columna	columna
1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
1	0	0.1	<LOQ 0.01	0.2	0.1	0.8	0.1	0.1	<LOQ 0.04	2	25	29	29	22	0.1	0.2
2	0	<LOQ 0.03	1.3	0.1	0	<LOQ 0.02	0.44	0.1	0.6	2.1	39	46	129	21	0.1	0.3
3	0.2	<LOQ 0.01	<LOQ 0.003	<LOQ 0.02	0	0.02	0.1	1.4	<LOQ 0.03	0.2	25	26	15	17	<LOQ 0.004	<LOQ 0.02
4	0	<LOQ 0.001	<LOQ 0.003	<LOQ 0.04	<LOQ 0.02	0.1	1.1	22.3	0.1	0.1	31	27	17	23	<LOQ 0.01	<LOQ 0.03
5	0	<LOQ 0.01	<LOQ 0.02	<LOQ 0.03	<LOQ 0.01	<LOQ 0.03	0.1	11	0.1	0.1	27	27	15	20	<LOQ 0.01	<LOQ 0.01
6	0	0	<LOQ 0.001	0.7	<LOQ 0.03	<LOQ 0.04	<LOQ 0.04	16	0.1	0.1	28	34	13	27	<LOQ 0.02	<LOQ 0.02
7	0.2	<LOQ 0.04	1.3	0.2	0	0.1	0.44	0.1	0.6	11.1	39	40	129	27	0.1	0.3
8	0	<LOQ 0.02	<LOQ 0.01	<LOQ 0.01	0.1	0.01	0.1	17	<LOQ 0.04	0.1	30	27	29	19	0.1	0.03
9	0	<LOQ 0.02	<LOQ 0.02	<LOQ 0.02	<LOQ 0.01	<LOQ 0.04	0.4	19	0.2	0.1	25	27	16	19	<LOQ 0.01	<LOQ 0.03
10	0	0	<LOQ 0.01	0.1	<LOQ 0.03	0.1	1.6	21	<LOQ 0.03	0.1	26	28	25	28	<LOQ 0.04	<LOQ 0.01
11	0	0	<LOQ 0.01	<LOQ 0.02	0	0.1	0.2	13	0.1	<LOQ 0.04	25	26	14	20	<LOQ 0.03	0.6
12	0	0	<LOQ 0.01	<LOQ 0.02	0	0.1	0.1	14	0.1	0.1	26	26	18	20	0.2	<LOQ 0.03
13	0	0.3	<LOQ 0.002	0.10	<LOQ 0.04	<LOQ 0.03	0.6	54	1.01	0.1	29	27	16	22	<LOQ 0.02	0.1
14	0.1	0.3	0.1	0.1	0.42	0.5	4.4	33.8	1.0	5.7	34.4	137	146.7	347.5	1.9	0.7
15	0	0	0.4	0.1	0.38	0.3	6.4	26	9.0	0.5	21.7	3.3	0	72.8	3.5	1.9
Total	0.5	0.8	3.2	1.8	1.1	2.3	16.1	248.8	12.8	22.4	431.1	530	612	705.3	6.1	4.3
Promedio	0.04	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	1.1	16.6	0.9	1.5	28.7	35.3	40.8	47.0	0.4	0.3
Σ columnas	0.09		0.33		0.23		17.7		2.4		64.1		87.8		0.7	
Hepatocarcinomas humanos																
	AFB ₁		AFB ₂		AFG ₁		AFG ₂		AFM ₁		AFM ₂		AFP ₁		AFL	
1-HCC	0.1	0	0.9	0.1	0.2	0.5	1.0	0.7	1.0	27.0	27	27	38	102	0.2	1.6
2-HCC	0	0	0.6	1.1	0.1	0.7	<LOQ 0.03	0.3	5.8	18.1	27	25	52	118	1.2	1.5
3-HCC	0	0	0.7	0.2	0.6	0.7	0.3	0.2	0.4	14.2	32	25	0	140	0.6	0.8
4-HCC	0.1	0.2	0.4	0.1	0.4	0.5	0.3	0.8	1.5	18.6	28	27	0	142	0.1	0.6
5-HCC	0.3	0	0.8	0.2	0.2	0.4	0.2	0.4	0.7	6.8	30	33	0	164	3.1	0.9
6-HCC	<LOQ 0.02	0.1	0.9	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.9	10.3	25	26	0	190	0.1	1.1
7-HCC	<LOQ 0.01	0.1	0.3	0.2	0.04	0.2	0.1	0.1	0.4	11.3	27	25	0	25	0.2	0.2
8-HCC	0.1	0.1	0	0.1	0.3	0.3	<LOQ 0.04	0.1	0.2	8.4	28	26	0	32	0.2	0.2
9-HCC	0	0.2	0.3	2	2.3	1.1	0.1	<LOQ 0.04	0.9	15.6	30	25	0	0	0.6	0.3
10-HCC	<LOQ 0.04	0.1	0.3	0.9	0.6	0.2	0.1	0.1	0.4	21.1	27	26	0	43	0.03	0.2
Total	0.7	0.7	5.3	4.9	4.7	4.5	2.1	2.8	12.2	151.3	281	265	90	956	6.5	7.2
Promedio	0.1	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	1.2	15.1	28.1	26.5	9	95.6	0.7	0.7
Σ columnas	1.4		10.2		9.2		4.9		163.5		273		1046		13.7	

Los metabolitos hidroxilados (AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL) y los aductos de AF-ADN formados a partir de los derivados epóxidos son biomarcadores de dosis internas y biológicamente efectivas.

En la **Figura 33** se muestran los cromatogramas de HPLC de la capacidad de retención de las AF de ambas columnas LC₁₈ de la muestra de hígado control 2. La **Figura 33 A**, muestra el cromatograma de la primera columna LC₁₈, con picos cromatográfico del AFL y la AFG₂. El cromatograma de la segunda columna LC₁₈ muestra los picos correspondientes al AFL, AFM₁ y AFB₂ (**Figura 33 B**).

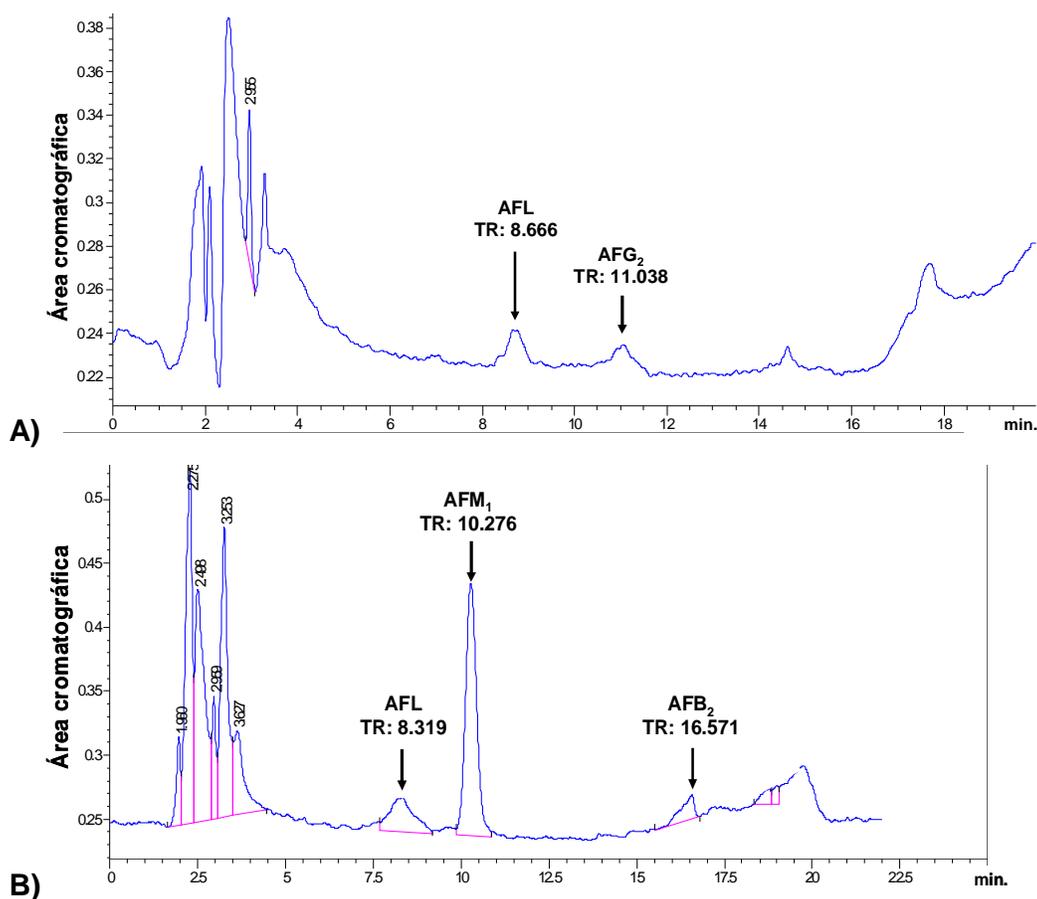


Figura 33: Cromatogramas de HPLC de las AF libres de la muestra de hígado control 2 extraídas con la técnica de Qian y Yang (1984). A) 1^a columna LC₁₈ retuvo AFL y AFG₂ y B) 2^a columna LC₁₈ que retuvo AFL, AFM₁ y AFB₂.

La **Figura 34** muestra las diferencias de retención de las columnas LC₁₈ de la muestra de HCC 2. En el cromatograma de la primera columna se observan los picos cromatográficos de AFL, AFM₁ y AFB₂ (**Figura 34 A**). Los picos cromatográficos de las AFP₁, AFG₁, AFL, AFM₁ y AFB₂ se muestran en la **Figura 34 B**.

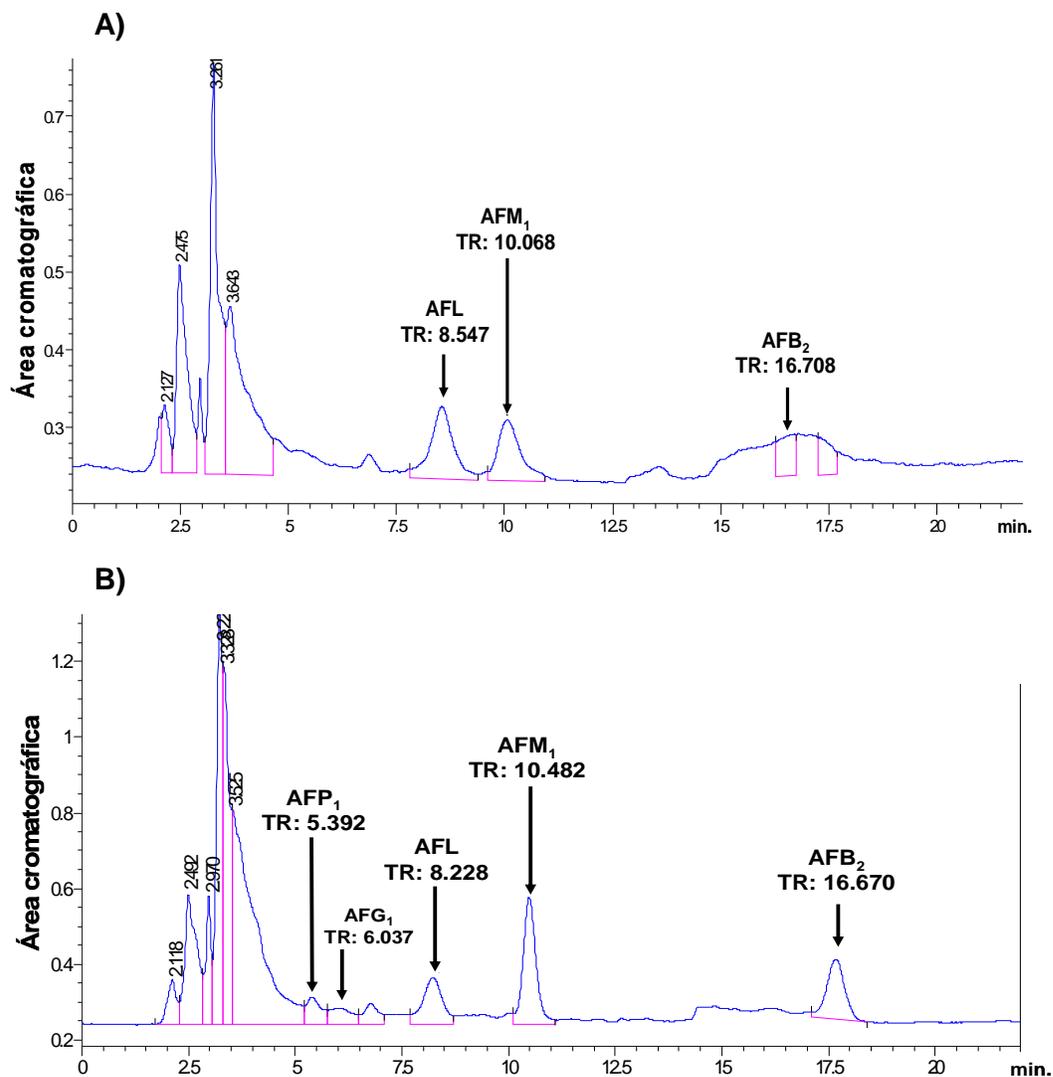


Figura 34: Cromatogramas de HPLC de las AF libres de la muestra 2 con hepatocarcinoma (2-HCC) extraídas con la técnica de Qian y Yang (1984). A) 1ª columna LC₁₈ y B) 2ª columna.

IV.4.1.2.1. Diferencia entre la capacidad de retención de las columnas LC₁₈ de cada AF libre extraída con el método de Qian y Yang, 1984.

La prueba de T apareada (Matched pairs) indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las capacidades de retención de la primera y segunda columnas LC₁₈ para AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFM₂ y AFL (**Tabla 16**). Aunque el AFL que se retuvo más por la primera columna, hubo diferencia estadísticamente significativa entre la mayor capacidad de retención de la segunda columna de AFG₂, AFM₁ y AFP₁. (**Tabla 17**).

Tabla 16: Prueba de t apareada para conocer la diferencia entre la capacidad de retención de la primera y segunda columna LC₁₈ de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFM₂ y AFL, donde no hubo diferencias estadísticamente significativas.

Pruebas de t apareada											
Tipo de AF	Primera columna	Segunda columna	Diferencia de Medias	Error Estándar	Superior 95%	Inferior 95%	Corr.	t exp.	Prob > t	Prob < t	Prob > t
AFB1	0.0468	0.0652	0.0184	0.0246	0.0692	-0.0323	0.00371	0.749589	0.2304	0.7696	0.4608
AFB2	0.3360	0.2704	-0.0656	0.12026	0.1826	-0.3138	0.06172	-0.54517	0.7047	0.2953	0.5907
AFG1	0.2392	0.2796	0.0404	0.06645	0.1775	-0.0967	0.7098	0.607983	0.2745	0.7255	0.5489
AFM2	28.48	31.812	3.328	4.24803	12.096	-5.440	0.50399	0.783423	0.2205	0.7795	0.4410
AFL	0.4990	0.4672	-0.0318	0.14566	0.2689	-0.3324	0.64469	-0.21804	0.5854	0.4146	0.8292

* Estadísticamente significativo. T exp. = T experimental, Corr. = Correlación.

Tabla 17: Diferencias estadísticamente significativas de la Prueba de t apareada para conocer la diferencia entre la capacidad de retención de la primera y segunda columna LC₁₈ de AFG₂, AFM₁ y AFP₁.

Pruebas de t apareada											
Tipo de AF	Primera columna	Segunda columna	Diferencia de Medias	Error Estándar	Superior 95%	Inferior 95%	Corr.	t exp.	Prob > t	Prob < t	Prob > t
AFG2	0.7356	10.0696	9.334	2.618	14.7373	3.9307	0.48408	3.565322	0.0008*	0.9992	0.0016*
AFM1	1.01	6.9536	5.9436	1.63031	9.30839	2.5788	0.12911	3.645693	0.0006*	0.9994	0.0013*
AFP1	28.068	66.452	38.384	15.6028	70.5867	6.1813	0.30723	2.460065	0.0107*	0.9893	0.0215*

* Estadísticamente significativo. T exp. = T experimental, Corr. = Correlación.

En la **Tabla 18** se presenta la cuantificación total y los tipos de AF de las muestras de hígado control y con HCC. En cuanto a la cuantificación promedio de las AF libres, las muestras de hígado control presentaron cantidades grandes de AFG₂ (17.5 ng g⁻¹), AFM₂ (64.1 ng g⁻¹) y AFP₁ (87.8 ng g⁻¹); los hígados con HCC tuvieron AFM₁ (16.4 ng g⁻¹), AFM₂ (27.3 ng g⁻¹) y AFP₁ (104.6 ng g⁻¹).

Los hígados control tuvieron trazas de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFM₁ y AFL. Mientras en las muestras con HCC hubo trazas de AFB₁, AFG₁, AFG₂ y AFL (**Tabla 18**).

La cuantificación promedio total de AF libres en las muestras de hígado control es de 173.2 ng g⁻¹ y de las muestras con HCC es de 179.5 ng g⁻¹.

Tabla 18: Cuantificación de aflatoxinas libres (ng g⁻¹) en los hígados control de humano y con hepatocarcinoma.

N° de muestra	Cantidad ng g ⁻¹ de AF en hígado humano.								
	Hígados Control								
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFM ₂	AFP ₁	AFL	AF totales
1	0.1	0.2	0.9	0.1	1.6	54	51	0.3	108.1
2	<LOQ 0.03	1.4	<LOQ 0.02	0.5	2.7	85	150	0.4	240.0
3	0.2	<LOQ 0.02	<LOQ 0.02	1.5	0.2	51	32	<LOQ 0.02	84.9
4	<LOQ 0.001	<LOQ 0.04	0.1	23.4	0.1	58	40	<LOQ 0.04	121.7
5	<LOQ 0.01	0.1	<LOQ 0.04	10.7	0.2	54	35	<LOQ 0.02	100.1
6	0	0.7	0.1	15.6	0.2	62	40	<LOQ 0.04	118.6
7	0.2	1.5	0.1	0.5	11.7	79	156	0.4	249.4
8	<LOQ 0.02	<LOQ 0.02	0.1	17.0	0.1	57	48	0.1	122.4
9	<LOQ 0.02	<LOQ 0.03	<LOQ 0.04	19.6	0.2	52	35	<LOQ 0.04	107.0
10	0	0.1	0.1	22.5	0.1	54	53	0.1	129.8
11	0	<LOQ 0.03	0.1	12.8	0.1	51	34	0.6	98.6
12	0	<LOQ 0.03	0.1	14.0	0.1	52	38	<LOQ 0.2	104.4
13	0.3	0.1	0.1	54.3	1.1	56	38	0.1	150.0
14	0.4	0.2	1.0	38.2	6.6	171.2	494.2	2.6	714.4
15	0	0.5	0.7	32.4	9.4	25	72.8	7.3	148.1
Total	1.3	5.0	3.5	263.1	34.4	961.2	1317	12.3	2597.5
Promedio	0.1	0.3	0.2	17.5	2.3	64.1	87.8	0.8	173.2
Hepatocarcinomas humanos									
1-HCC	0.1	1.0	0.7	1.7	27.9	54	140	1.8	227.2
2-HCC	0	1.7	0.7	0.3	23.9	52	170	2.7	251.3
3-HCC	0	0.8	1.3	0.5	14.6	57	140	1.4	215.6
4-HCC	0.3	0.5	0.9	1.1	20.1	55	142	0.7	220.6
5-HCC	0.3	1.0	0.6	0.6	7.5	63	164	4.0	241.0
6-HCC	0.1	1.0	0.2	0.2	11.2	51	190	1.2	254.9
7-HCC	0.1	0.5	0.2	0.2	11.7	52	25	0.4	90.1
8-HCC	0.1	0.1	0.6	0.1	8.6	54	32	0.3	95.8
9-HCC	0.2	2.3	3.4	0.1	16.5	55	0	0.9	78.4
10-HCC	0.1	1.2	0.8	0.1	21.5	53	43	0.2	119.9
Total	1.3	10.1	9.4	4.9	163.5	546	1046	13.6	1794.8
Promedio	0.1	1.0	0.9	0.5	16.4	54.6	104.6	1.4	179.5

<LOQ= Bajo límite de cuantificación.

IV.4.1.2.2. Análisis de varianza de las AF libres extraídas de las muestras de hígado humano control y con HCC con el método de Qian y Yang, 1984.

La **Tabla 19** y el **Anexo 9** muestran al análisis estadístico y las gráficas de las medias con desviación estándar de la comparación de AF libres de las muestras de hígados humanos control y con HCC. La concentración de AFB₁ no fue estadísticamente diferente (P=0.2561), ya que la cantidad promedio de ambos

grupos fue la misma. Las muestras de hígado con HCC tienen mayor cantidad de AFB₂ (P=0.0054*), AFG₁ (P=0.0092*) y AFM₁ (P=0.0001*) que las muestras control, y sí hubo diferencia estadísticamente significativa. Las muestras de hígado humano control tienen más AFG₂ con diferencia estadísticamente significativa (P=0.0019*) entre ambos grupos. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de AFM₂ (P=0.3705) AFP₁ (P=0.6) y AFL (P=0.2332) de ambos tratamientos.

Tabla 19: Diferencias estadísticamente significativas y no significativas del análisis de varianza de las AF libres extraídas de las muestras de hígados humanos control y con HCC con el método de Qian y Yang (1984).

Análisis de Varianza						
Tipo de AF	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
AFB ₁	Tratamiento	1	0.02037	0.02037	1.356	0.2561
	Error	23	0.34541	0.01502		
	Total	24	0.3658			
AFB ₂	Tratamiento	1	2.8516	2.852	9.419	0.0054*
	Error	23	6.9632	0.303		
	Total	24	9.8149			
AFG ₁	Tratamiento	1	3.1567	3.1567	8.095	0.0092*
	Error	23	8.969	0.3990		
	Total	24	12.1257			
AFG ₂	Tratamiento	1	-	-	3.51	0.0019*
	Error	23	-	-		
	Total	24	-			
AFM ₁	Tratamiento	1	1174.99	1174.99	43.307	<.0001*
	Error	23	624.03	27.13		
	Total	24	1799.02			
AFM ₂	Tratamiento	1	540.740	540.740	0.8343	0.3705
	Error	23	14907.029	648.132		
	Total	24	15447.770			
AFP ₁	Tratamiento	1	1693.44	1693.4	0.1593	0.6935
	Error	23	244515.28	10631.1		
	Total	24	246208.72			
AFL	Tratamiento	1	2.759	2.759	1.499	0.2332
	Error	23	42.327	1.840		
	Total	24	45.086			

*Estadísticamente significativo.

IV.4.1.3. Detección de aflatoxinas totales de los sobrenadantes por la técnica de Koeltzow & Tanner (1990).

Se recolectó el sobrenadante de cada muestra control de hígado humano, y se procesó con la técnica de Koeltzow y Tanner (1990) con columnas de inmunofinidad para concentrar a las AF libres y asegurarnos que eran AF y no otro metabolito, ya que esta técnica las separa por medio de anti-aflatoxinas totales por una reacción antígeno-anticuerpo. Para evaluar cuál de las dos técnicas de purificación de ADN: a) De Gupta (1984) (Tablas 20 y 21), y b) del kit de Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit) es la más recomendable para nuestro estudio se cuantificaron por HPLC las AF libres de los sobrenadantes de ambas técnicas por separado.

El promedio de AF libres totales de hígados control con el método de Koeltzow y Tanner (1990) fue de 37.2 ng g⁻¹, mientras que con el método de Qian y Yang (1984) fue de 173.2 ng g⁻¹ (Tabla 18).

Tabla 20. Cuantificación por HPLC de aflatoxinas libres (ng g⁻¹) de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control.

N° de muestra	Cantidad ng/g de AF en hígado control humano.								
	Sobrenadantes de las muestras procesadas con la técnica de Koeltzow y Tanner, 1990.								
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFM ₂	AFP ₁	AFL	AF totales
1	<LOQ 0.01	<LOQ 0.04	<LOQ 0.04	0.5	0.6	0	8.7	0.1	10.0
2	0.1	<LOQ 0.03	0.1	0.4	0.6	10.2	0	0.1	11.4
3	<LOQ 0.01	0.1	<LOQ 0.04	0.3	0.2	8.2	28.3	<LOQ 0.01	37.1
4	0.2	0.1	0.1	0.5	0.7	5.0	22.8	0.1	29.6
5	0.1	0.1	0.3	0.4	0.5	2.0	61.3	0.1	64.5
6	0.1	<LOQ 0.02	0.2	0.4	0.6	3.0	34.2	0.1	38.7
7	<LOQ 0.02	<LOQ 0.03	<LOQ 0.01	0.4	0.3	3.5	6.2	0.1	10.5
8	<LOQ 0.02	<LOQ 0.01	0.1	0.7	0.6	16.7	15.0	0.1	33.1
9	0.2	<LOQ 0.03	0.2	10.3	0.5	1.5	36.6	0.1	49.3
10	0.2	0.1	0.2	0.8	0.9	4.8	39.4	0.1	46.3
11	0.1	<LOQ 0.02	0.4	0.4	0.4	1.5	52.0	0.3	55.2
12	<LOQ 0.04	0	0.4	0.2	0.2	4.1	30.9	<LOQ 0.03	35.8
13	0.3	0.1	0.2	0.6	0.6	4.9	34.2	0.2	41.0
14	0.2	<LOQ 0.02	0.2	0.3	0.5	1.5	25.0	0.2	27.9
15	0.2	<LOQ 0.01	0.3	0.4	0.5	2.3	63.1	0.6	67.3
Total	1.8	0.5	2.6	16.6	7.5	69.0	457.5	2.1	557.6
Promedio	0.1	0.04	0.2	1.1	0.5	4.6	30.5	0.1	37.2

<LOQ = Bajo límite de cuantificación (Limit of quantification).

A continuación se presenta el Cromatograma de HPLC de las AF libres del sobrenadante de la muestra 27 de hígado control, donde se observan los picos cromatográficos de la AFP₁, AFG₁, AFL, AFM₁ y AFB₂ (Figura 35).

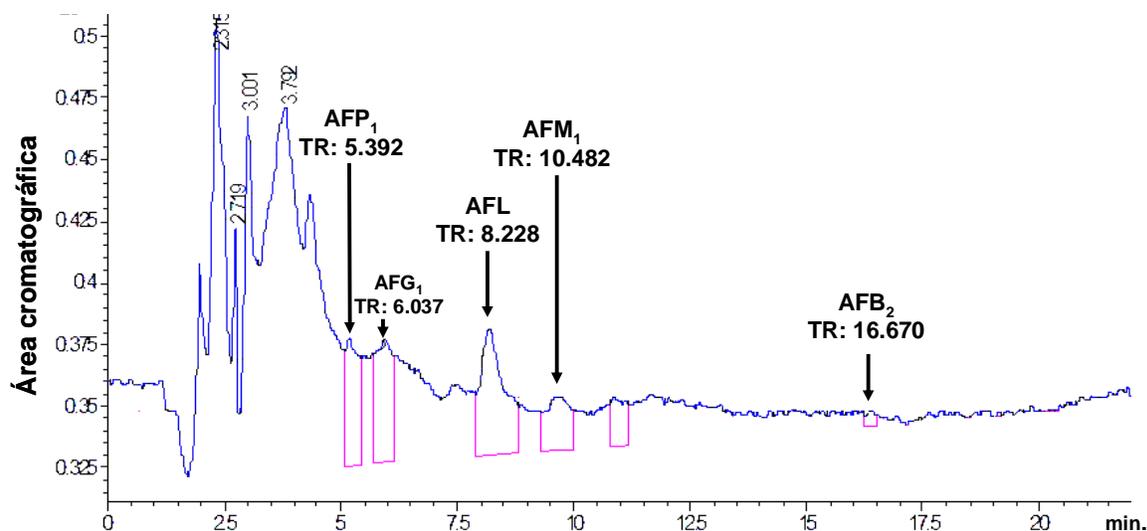


Figura 35: AF del sobrenadante de la muestra 27 de hígado control.

El promedio de AF libres en hígado con HCC por método de Koeltzow y Tanner (1990) fue de 52.4 ng g^{-1} , mientras que con el método de Qian y Yang (1984) fue de 179.5 ng g^{-1} (Tabla 21).

Tabla 21: Aflatoxinas libres (ng g^{-1}) de los sobrenadantes de las muestras con HCC humano cuantificadas por HPLC.

N° de muestra	Cantidad ng g^{-1} de AF en hepatocarcinomas humanos.								
	Sobrenadantes de las muestras procesadas con la técnica de Koeltzow y Tanner, 1990.								
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFM ₂	AFP1	AFL	AF totales
1-HCC	0.0	0.1	0.9	0.7	0.8	5.0	82.4	0.2	90.0
2-HCC	0.0	0.1	9.1	1.0	1.1	3.5	13.1	1.4	29.3
3-HCC	0.6	<LOQ 0.04	2.2	0.4	0.4	2.3	16.2	0.2	22.3
4-HCC	0.3	<LOQ 0.04	0.5	0.4	0.5	1.5	56.1	0.2	59.4
5-HCC	0.3	0.1	0.3	0.3	0.4	1.9	66.9	0.1	70.3
6-HCC	0.1	<LOQ 0.03	0.3	0.3	0.4	6.9	42.0	0.1	50.1
7-HCC	0.1	0.1	0.2	0.4	0.4	2.3	29.9	0.1	33.5
8-HCC	0.2	0.1	0.5	0.4	0.5	2.4	122.3	0.2	126.5
9-HCC	0.0	0.1	0.2	0.5	0.7	3.3	100.4	0.2	105.3
10-HCC	0.2	<LOQ 0.03	0.1	0.2	0.6	1.5	32.2	0.1	34.9
11-HCC	0.1	0.1	0.2	0.4	1.6	2.8	31.4	0.1	36.6
12-HCC	0.2	<LOQ 0.02	0.1	0.6	0.3	0.8	52.8	0.1	54.8
13-HCC	0.1	<LOQ 0.01	0.1	0.2	0.2	2.8	25.0	0.1	28.4
14-HCC	0.1	<LOQ 0.02	0.1	0.1	0.3	2.2	19.3	0.1	22.1
15-HCC	0.2	<LOQ	0.1	0.2	0.3	4.0	17.8	0.4	23.0
Total	2.3	0.7	14.8	5.9	8.4	43.0	707.7	3.4	786.2
Promedio	0.2	0.04	1.0	0.4	0.6	2.9	47.2	0.2	52.4

<LOQ = Bajo límite de cuantificación.

La **Figura 36** presenta el cromatograma de HPLC de las AF libres del sobrenadante de la muestra 3 de hígado con HCC, donde se observan los picos cromatográficos de la AFP₁, AFB₁, AFL, AFM₁, AFB₂ y AFM₂.

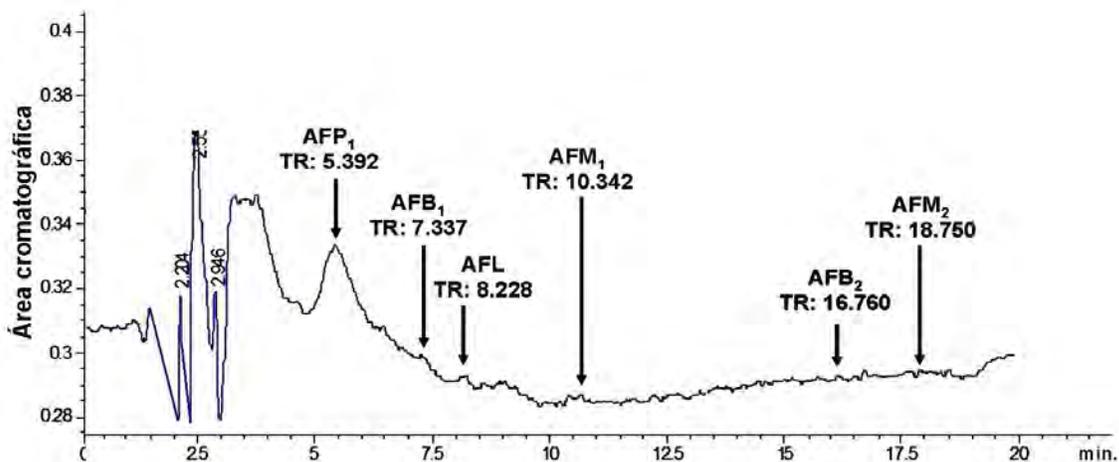


Figura 36: AF del sobrenadante de la muestra 3 con hepatocarcinoma (3-HCC).

IV.4.1.3.1. Comparación de AF libres de las muestras de hígado humano control y con HCC extraídas con el método de Koeltzow & Tanner, 1990.

Cuando se aplicaron las pruebas t a las AF libres de las muestras control y con HCC, **Tabla 22**, no hubo diferencias significativas, porque los datos no presentaron un comportamiento normal, ya que algunos valores se alejan de la media.

La prueba de Wilcoxon, tampoco dió una diferencia significativa entre la cantidad de AF libre encontrada en ambos grupos (**Anexo 10**).

Tabla 22: Prueba de t de las AF libres de muestras de hígados humanos control y con HCC con el método de Koeltzow & Tanner (1990) donde no hubo diferencias estadísticamente significativas.

Prueba de t						
Tipo de AF	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
AFB ₁	Tratamiento	1	0.0163	0.0163	1.0164	0.3220
	Error	28	0.4499	0.0161		
	Total	29	0.4663			
AFB ₂	Tratamiento	1	0.0013	0.0013	0.8645	0.3604
	Error	28	0.0432	0.0015		
	Total	29	0.0445			
AFG ₁	Tratamiento	1	4.888	4.888	1.8318	0.1867
	Error	28	74.724	2.669		
	Total	29	79.612			
AFG ₂	Tratamiento	1	3.675	3.675	1.1231	0.2983
	Error	28	91.619	3.272		
	Total	29	95.294			
AFM ₁	Tratamiento	1	0.0213	0.0213	0.2520	0.6196
	Error	28	2.371	0.0847		
	Total	29	2.392			
AFM ₂	Tratamiento	1	22.533	22.53	2.1755	0.1514
	Error	28	290.021	10.358		
	Total	29	312.555			
AFP ₁	Tratamiento	1	2085.0	2085.0	2.8877	0.1003
	Error	28	20216.5	722.02		
	Total	29	22301.6			
AFL	Tratamiento	1	0.0617	0.0617	0.9472	0.3388
	Error	28	1.8225	0.0651		
	Total	29	1.8841			

Para las muestras de hígado humano control, donde el ADN se purificó con el kit de Qiagen, se recolectaron los tres sobrenadantes de cada muestra y se procesaron por separado, los picos cromatográficos de las AF libres identificadas se presentan en las **Figuras 37, 38 y 39**, y la cuantificación por muestra se presenta en el **Anexo 11**, mientras la cuantificación total y promedio por sobrenadante se presenta en la **Tabla 23**. La técnica de Qiagen recuperó más AF libres en la suma de los 3 sobrenadantes, 833.95 con promedio de 83.40 ng g⁻¹, que la de Gupta con un total de 221.45 ng g⁻¹ y un promedio de 22.15 ng g⁻¹.

Tabla 23. Resumen de las Aflatoxinas libres (ng g⁻¹) de los sobrenadantes de muestras de hígado control humano.

N° de muestra	Cantidad ng g ⁻¹ de AF en hígado humano procesado con el Kit de Qiagen.								
	Primer Sobrenadante								
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFM ₂	AFP ₁	AFL	AF totales
Total	1.3	3.1	9.6	17.7	157.9	961.1	365.1	3.6	1519.5
Promedio	0.1	0.3	1.0	1.8	15.8	96.1	36.5	0.4	151.9
Segundo Sobrenadante									
Total	3.7	2.6	2.1	58.3	49.9	702.9	384.0	2.7	1206.2
Promedio	0.4	0.3	0.2	5.8	5.0	70.3	38.4	0.3	120.6
Tercer Sobrenadante									
Total	4.2	14.9	4.0	29.1	17.0	469.4	3404.3	3.1	3946.4
Promedio	0.4	1.5	0.4	2.91	1.70	46.9	340.4	0.3	394.6
Suma total	9.2	20.5	15.7	105.1	224.9	2133.4	4153.4	9.4	6671.6
Prom. total	0.9	2.1	1.6	10.5	22.5	213.3	415.3	0.9	667.2

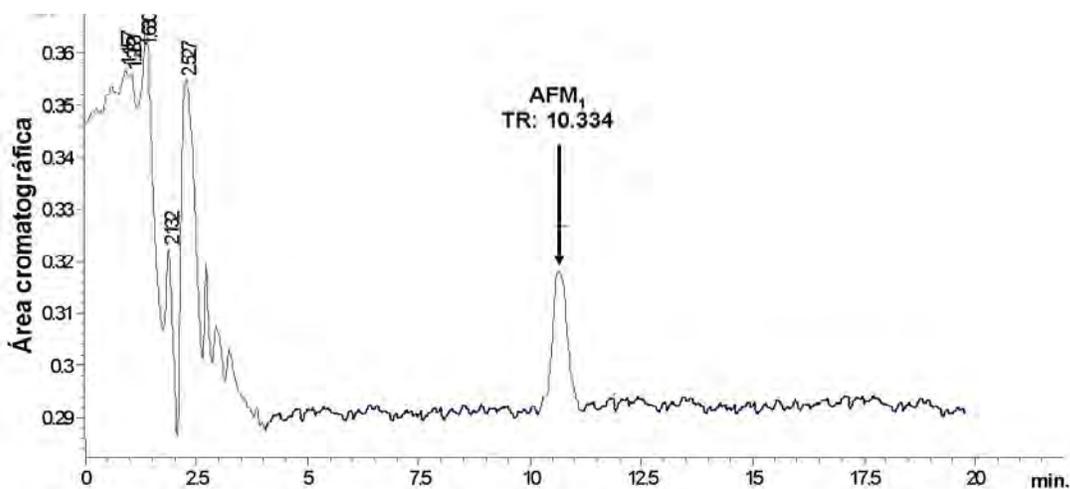


Figura 37: AF del primer sobrenadante de la muestra 5 de hígado humano control extraídas con la técnica de Koeltzow y Tanner (1990).

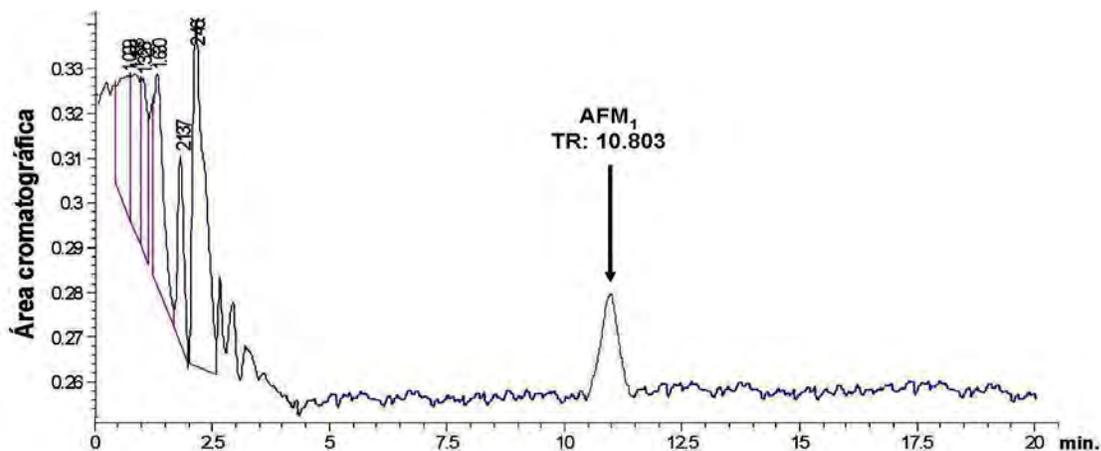


Figura 38: AF del segundo sobrenadante de la muestra de hígado humano control extraídas con la técnica de Koeltzow y Tanner (1990).

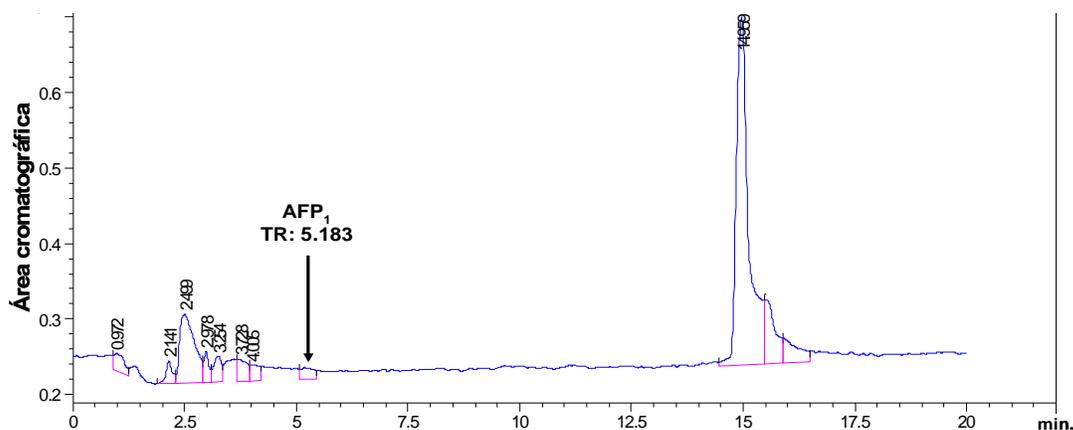


Figura 39: AF del tercer sobrenadante de hígado humano control extraídas con la técnica de Koeltzow y Tanner (1990).

En las muestras de hígado humano con HCC, la cuantificación por muestra se presenta en el **Anexo 12**, mientras la cuantificación total y promedio por sobrenadante se presenta en la **Tabla 24**. Como se puede observar la técnica de Qiagen recuperó más AF libres en la suma de los 3 sobrenadantes $1020.418 \text{ ng g}^{-1}$ con promedio de $102.0415 \text{ ng g}^{-1}$.

Tabla 24: Aflatoxinas libres (ng g^{-1}) de los sobrenadantes de muestras de hígados humanos con HCC.

N° de muestra	Cantidad ng g^{-1} de AF en hígado humano procesado con el Kit de Qiagen.								
	Primer Sobrenadante								
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFM ₂	AFP ₁	AFL	AF totales
Total	0.6	0.12	0.68	31.1	19.5	40.2	171.2	0.90	264.6
Promedio	0.1	0.01	0.07	3.1	2.0	4.0	17.1	0.09	26.5
Segundo Sobrenadante									
Total	0.122	0.108	0.305	12.8	29.2	77.0	71.9	1.52	192.6
Promedio	0.012	0.011	0.030	1.3	2.9	7.7	7.2	0.15	19.3
Tercer Sobrenadante									
Total	0.189	0.117	0.22	3.91	39.8	449.4	66.7	2.9	563.3
Promedio	0.019	0.012	0.02	0.39	4.0	44.9	6.7	0.3	56.3
Suma total	0.911	0.345	1.205	47.81	88.5	566.6	309.8	5.32	1020.418
Prom. total	0.131	0.033	0.12	4.79	8.9	56.6	31	0.54	102.0415

<LOQ=Bajo límite de cuantificación.

IV.4.1.3.2. Modelo de dos criterios de clasificación, interacción y test “de rebanadas” para conocer las diferencias significativas entre la cantidad de AF libres de tres sobrenadantes del kit de Qiagen.

El modelo de dos criterios con el que se analizaron estadísticamente las concentraciones de AF libres de los tres diferentes sobrenadantes del kit de Qiagen,

permitieron conocer las diferencias significativas de la cantidad de AF entre ambos grupos y su interacción.

En la **Tabla 25** se describe el análisis de varianza de la cantidad AFB₁ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC, donde sí hubo diferencias significativas entre las AFB₁ de los tres sobrenadantes. La gráfica de interacción (**Figura 40**) indica que las muestras de hígado control tuvieron mayor cantidad de AFB₁ que las muestras con HCC. Aunque existe poca diferencia entre el primer sobrenadante de las muestras de hígado control y con HCC. Mientras en el segundo y tercer sobrenadante la diferencia es mucho mayor y más significativa estadísticamente. Esto indica que las AFB₁ libres no son un buen criterio para establecer malignidad de un tejido, sólo están de paso. El análisis estadístico completo está en el **Anexo 13**.

Tabla 25: Diferencia significativa de la concentración de AFB₁ de los sobrenadantes de los hígados humanos control y con HCC con el kit de Qiagen.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	1.7105	0.3421	18.7501	<.0001*
Error	54	0.9853	0.0182		
C. Total	59	2.6958			

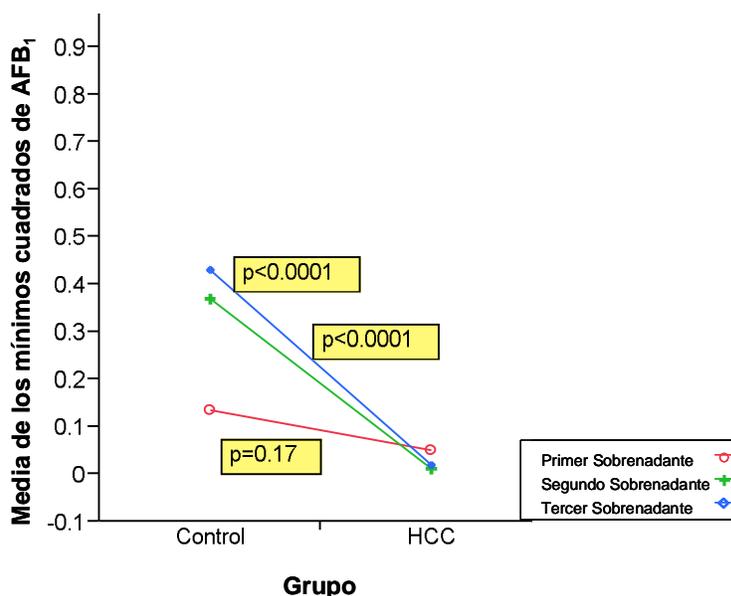


Figura 40: Interacción de la Media de AFB₁ presente en las muestras de hígados humanos control y con HCC.

El análisis de varianza de AFB₂ de los tres sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC, tuvo diferencias significativas, **Tabla 26**. La gráfica de las medias y su desviación estándar (**Figura 41**) indica que las muestras de hígado control tuvieron una mayor cantidad de AFB₂ que las muestras con HCC. El análisis estadístico completo está en el **Anexo 14**.

Tabla 26: Diferencia estadísticamente significativa en el análisis de varianza de la concentración de AFB₂ de los sobrenadantes de las muestras de hígados humanos control y con HCC.

a) Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	17.003355	3.40067	3.0092	0.0181*
Error	54	61.024328	1.13008		
C. Total	59	78.027683			

b) Efectos Probados

Fuente de Variación	Nparm	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	F experimental	Prob > F
Sobrenadante	2	2	5.0514733	2.2350	0.1168
Tratamiento	1	1	6.8993286	6.1052	0.0167*
Sobrenadante/Tratamiento	2	2	5.0525533	2.2355	0.1167

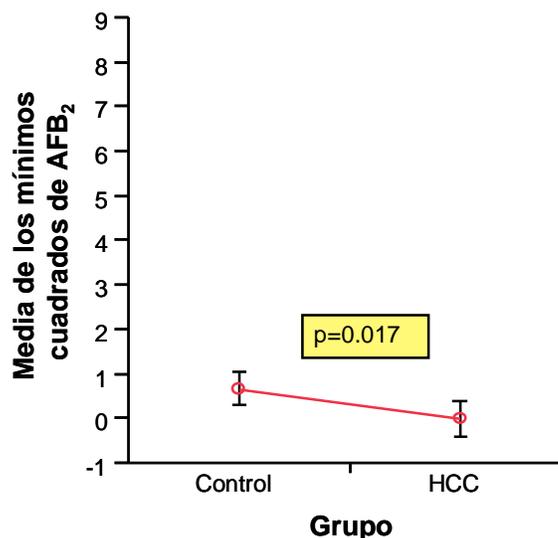


Figura 41: Gráfica de las Medias de AFB₂ de las muestras de hígado humano control y con HCC de los sobrenadantes del kit de Qiagen.

En la **Tabla 27** se describe **a)** el Análisis de Varianza de la cantidad AFG_1 de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC, donde no hubo diferencias significativas entre las AFG_1 de los tres sobrenadantes, sin embargo en el **b)** Análisis de Efectos Probados fue significativa la AFG_1 . La gráfica de las medias y su desviación estándar (**Figura 42**) indican que las muestras de hígado control tuvieron una mayor cantidad de AFG_1 que las muestras con HCC. El análisis estadístico completo está en el **Anexo 15**.

Tabla 27: No hubo diferencia estadísticamente significativa en el análisis de varianza de la concentración de AFG_1 de los sobrenadantes de las muestras de hígados humanos control y con HCC.

a) Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	6.687625	1.33753	1.8049	0.1274
Error	54	40.016590	0.74105		
C. Total	59	46.704216			

b) Efectos Probados

Fuente de Variación	Nparm	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	F experimental	Prob > F
Sobrenadante	2	2	1.7386545	1.1731	0.3172
Tratamiento	1	1	3.5507203	4.7915	0.0329*
Sobrenadante/Tratamiento	2	2	1.3982505	0.9434	0.3956

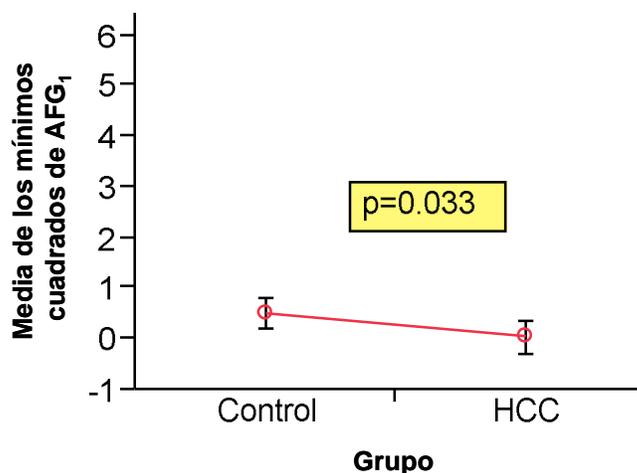


Figura 42: Gráfica de las Medias de AFG_1 presente en las muestras de hígado humano control y con HCC de los sobrenadantes de kit de Qiagen.

En la **Tabla 28** se describe el **a) Análisis de Varianza** de AFG_2 de los sobrenadantes de las muestras de hígados humanos control y con HCC, donde sí hubo diferencia significativa entre las AFG_2 del segundo y tercer sobrenadante, pero no hubo diferencia significativa en el primer sobrenadante. El análisis estadístico de **b) Efectos Probados** compara el tratamiento así como Sobrenadante/ Tratamiento y las diferencias fueron significativas. La gráfica de interacción (**Figura 43**) indica que las muestras de hígado control del segundo y tercer sobrenadante tuvieron más AFG_2 que las muestras con HCC, mientras que en el primer sobrenadante ocurrió lo contrario. El análisis estadístico completo está en el **Anexo 16**.

Tabla 28: Diferencia estadísticamente significativa de la concentración de AFG_2 de los sobrenadantes de los hígados humanos control y con HCC.

a) Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	182.13408	36.4268	4.4515	0.0018*
Error	54	441.88069	8.1830		
C. Total	59	624.01476			

b) Efectos Probados

Fuente de Variación	Nparm	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	F experimental	Prob > F
Sobrenadante	2	2	37.074370	2.2653	0.1136
Tratamiento	1	1	54.893535	6.7083	0.0123*
Sobrenadante/Tratamiento	2	2	90.166170	5.5094	0.0066*

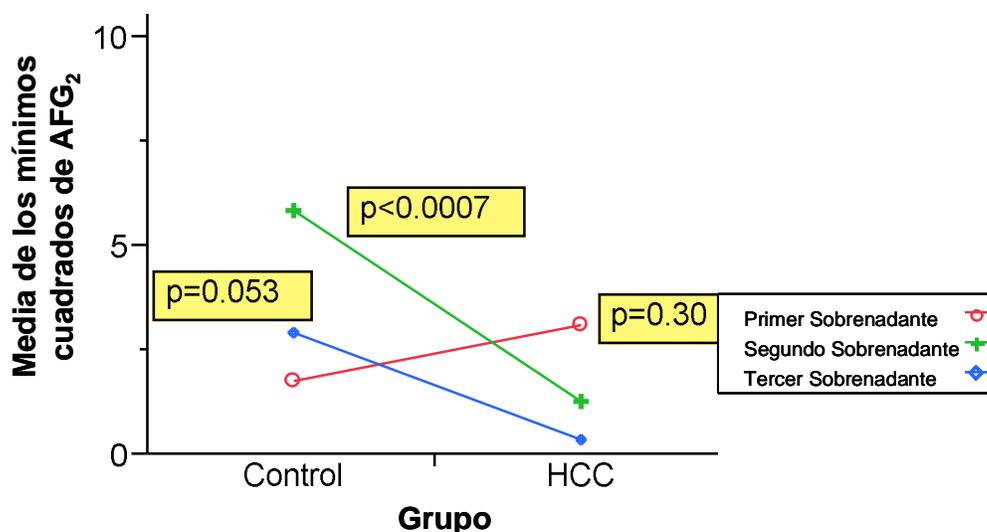


Figura 43: Interacción de la Media de AFG_2 de los hígados humanos control y con HCC.

El análisis de varianza de la AFM₁ de los tres sobrenadantes de los hígados humanos control y con HCC, tuvo diferencias significativas y se describe en la **Tabla 29**. La gráfica de interacción (**Figura 44**) indica que las muestras de hígados control del primer y segundo sobrenadante tuvieron una mayor concentración de AFM₁ que las muestras con HCC. Los hígados control del tercer sobrenadante tuvieron menos AFM₁ que las muestras con HCC. El **Anexo 17** tiene al análisis estadístico. Los hígados control tienen más productos hidroxilados (AFM₁) que baja la toxicidad de la AFB₁.

Tabla 29: Diferencia estadísticamente significativa de la concentración de AFM₁ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC.

a) **Análisis de Varianza**

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	1416.6948	283.339	18.2145	<.0001*
Error	54	840.0070	15.556		
C. Total	59	2256.7018			

b) **Efectos Probados**

Fuente de Variación	Nparm	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	F experimental	Prob > F
Sobrenadante	2	2	412.72633	13.2661	<.0001*
Tratamiento	1	1	309.62817	19.9045	<.0001*
Sobrenadante/Tratamiento	2	2	694.34033	22.3179	<.0001*

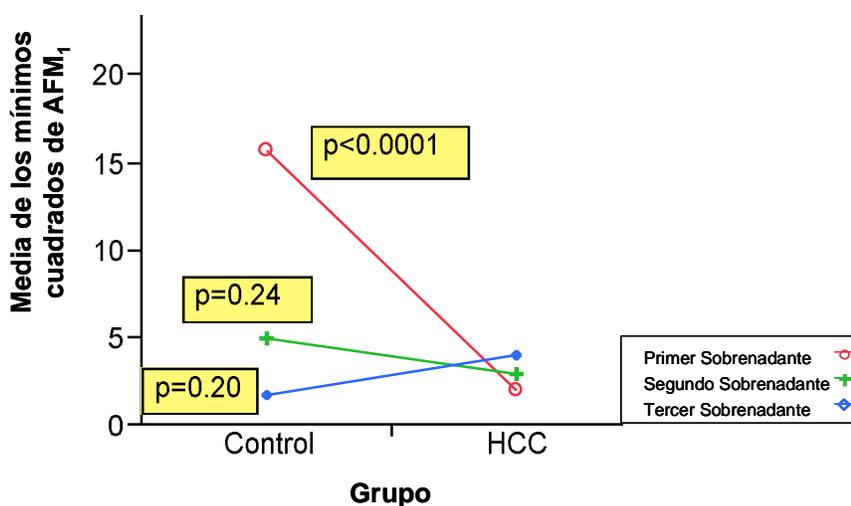


Figura 44: Interacción de la Media de AFM₁ presente en las muestras de hígado humano control y con HCC.

En la **Tabla 30** se describe el análisis de varianza de la AFM₂ de los tres sobrenadantes de los hígados humanos control y con HCC, donde sí hubo diferencias significativas. La gráfica de interacción (**Figura 45**) indica que las muestras de hígado control, con mejor metabolismo, hidroxilaron más las AF hacia AFM₂ con respecto a las muestras con HCC. Existe mucha diferencia entre la cantidad de AFM₂ del primer y segundo sobrenadantes de las muestras de hígado control y con HCC. En el tercer sobrenadante la diferencia es menor y no significativa estadísticamente. El análisis estadístico completo está en el **Anexo 18**.

Tabla 30: Diferencia estadísticamente significativa de la cantidad de AFM₂ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC.

a) Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	63279.67	12655.9	16.7577	<.0001*
Error	54	40782.45	755.2		
C. Total	59	104062.12			

b) Efectos Probados

Fuente de Variación	Nparm	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	F experimental	Prob > F
Sobrenadante	2	2	1256.766	0.8320	0.4407
Tratamiento	1	1	40924.817	54.1885	<.0001*
Sobrenadante/Tratamiento	2	2	21098.084	13.9680	<.0001*

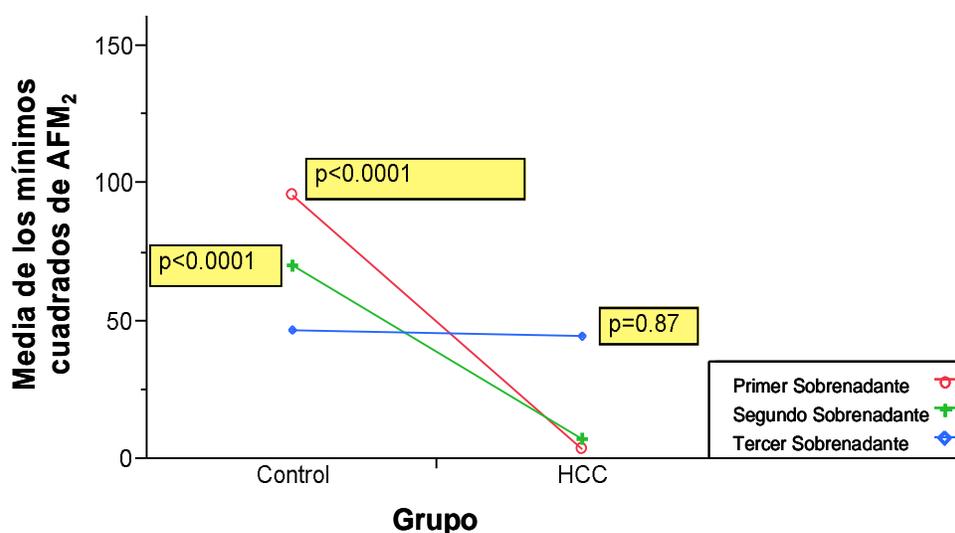


Figura 45: Interacción de la Media de AFM₂ en los hígados humanos control y con HCC.

En la **Tabla 31** se describe el análisis de varianza de la AFP₁ de los tres sobrenadantes de los hígados humanos control y con HCC, donde no hubo diferencias significativas. El análisis estadístico completo está en el **Anexo 19**.

Tabla 31: No hubo diferencia estadísticamente significativa de la AFP₁ de los sobrenadantes de los hígados humanos control y con HCC.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	858863.0	171773	1.4512	0.2211
Error	54	6391727.1	118365		
C. Total	59	7250590.1			

El análisis de varianza del AFL de los tres sobrenadantes de los hígados humanos control y con HCC, tuvo una diferencia significativa marginal **Tabla 32**. La gráfica de interacción (**Figura 46**) indica que las muestras de hígado control tuvieron una mayor cantidad de AFL que las muestras con HCC. Existe mucha diferencia entre la cantidad de toxina del primer sobrenadante de las muestras de hígado control y con HCC. Mientras en el 2° y 3er. sobrenadante la diferencia es menor y no significativa estadísticamente. El análisis estadístico completo está en el **Anexo 20**.

Tabla 32: Diferencia estadísticamente significativa de la cantidad AFL de los sobrenadantes del hígado humano control y con HCC.

a) Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	0.5246350	0.104927	3.4214	0.0093*
Error	54	1.6560500	0.030668		
C. Total	59	2.1806850			

b) Efectos Probados

Fuente de Variación	Nparm	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	F experimental	Prob > F
Sobrenadante	2	2	0.09121000	1.4871	0.2351
Tratamiento	1	1	0.27608167	9.0024	0.0041*
Sobrenadante/Tratamiento	2	2	0.15734333	2.5653	0.0862

f) **Prueba de Rebanadas de la AFL de los sobrenadantes y tratamientos analizados con el kit de Qiagen.**

Prueba de Rebanadas				
Primer sobrenadante				
Suma de Cuadrados	Numerador	Denominador	F experimental	Prob > F
0.361805	1	54	11.7976	0.0011471*
Segundo sobrenadante				
0.06962	1	54	2.2702	0.1377153
Tercer sobrenadante				
0.002	1	54	0.06522	0.7994052
Control				
0.0406666667	2	54	0.6631	0.519435
HCC				
0.2078866667	2	54	3.3894	0.0410523 *

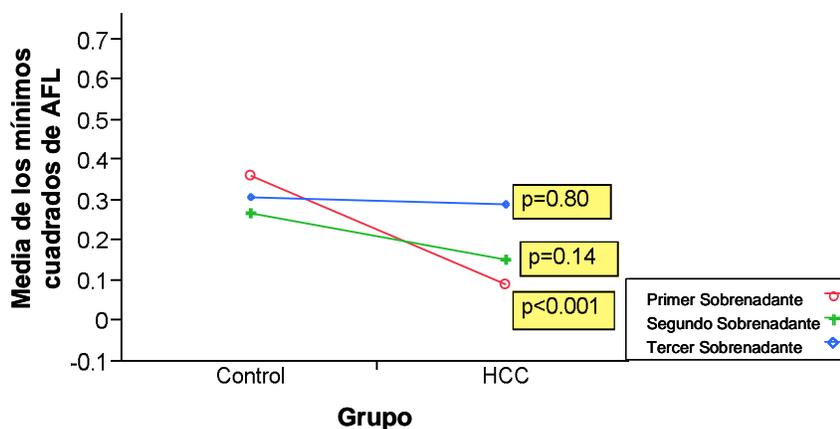


Figura 46: Interacción de la Media de AFL de los hígados humanos control y con HCC.

Los resultados acerca de las AF libres (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL) en las muestras de hígado humano control y con HCC demuestran la exposición que la población de México tiene al consumir alimentos contaminados con AFB₁, por ejemplo, cereales, oleaginosas, especias, cárnicos y derivados de origen animal, como huevo y leche (Park & Pohland, 1986).

Pero no indica que estas AF hayan tenido un efecto etiológico sobre la malignidad del tejido. Si bien estos cancerígenos están presentes en hígados control y con HCC esto sólo refleja la exposición a que todos los individuos estuvieron sujetos por los alimentos, pero no explica un diferente papel o riesgo de las AF en los 2 grupos. Sólo en las extracciones de Qian & Yang (1984) los resultados son estadísticamente significativos y con mayor cantidad de AF en los hígados con HCC respecto a los controles. El método que dio más cantidad de AF libres en los 3

sobrenadantes fue el de del kit de Qiagen, pero generalmente las muestras control tuvieron más AF libres que las que tenían HCC.

Algunos humanos adultos pueden estar consumiendo de 2 a 6 mg de AF en un solo día (Krishnamachari *et al.* 1975). La dosis letal para humanos adultos es de aproximadamente de 10 a 20 mg AF (Pitt, 2000).

Con la técnica de Qian & Yang (1984) se encontró que la cantidad promedio de AFB₁ detectada en las muestras de hígado humano control fue de 0.1 ng g⁻¹ y sólo se encontró en 10 de las 15 muestras analizadas. La cantidad promedio de AFB₁ encontrada en las muestras con HCC fue de 0.2 ng g⁻¹, y se detectó en 8 de las 10 muestras analizadas. Como la AFB₁ se considera el más potente cancerígeno conocido (Squire, 1981), el haber detectado concentraciones de AFB₁ pequeñas no indica que no hay riesgo (Bennett & Klich, 2003), ya que la presencia de metabolitos hidroxilados, productos de la biotransformación de AFB₁ en mamíferos es notoria y la cantidad de AFM₁, AFM₂ y AFP₁ es alta.

De acuerdo a los resultados de las tres técnicas usadas para el estudio de AF libres tanto en los sobrenadantes, como del tejido hepático, el kit de Qiagen recuperó más AF libres en los sobrenadantes que los otros métodos. Sin embargo, con respecto al aducto de AFB₁-ADN esta técnica no fue de utilidad debido a la pequeña cantidad de muestra que se utiliza y a la concentración de ADN que se purifica. Para los aductos, la técnica de Gupta (1984) fue de más utilidad ya que purifica mayor cantidad de ADN a partir de una cantidad de muestra más grande.

Fue importante utilizar varias técnicas, porque a pesar de la economía del kit de Qiagen, la técnica de Qian y Yang (1984) dio un porcentaje de recuperación aceptable con un gramo de muestra, no obstante, esto puede ser un obstáculo cuando se utilizan cantidades de tejido sumamente pequeñas provenientes de biopsias. Si la cantidad de tejido no es un factor determinante, la técnica de Qian y Yang (1984) es una buena alternativa.

En la fase I de la biotransformación, las AF son modificadas por el citocromo P₄₅₀ mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, para convertirlas en productos hidrosolubles de carácter polar (Groopman *et al.*, 1988).

Encontrar AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂ y AFP₁ en el hígado de las muestras de hígado control y con HCC, indica que la biotransformación de AFB₁, por el citocromo P₄₅₀, se presenta en este órgano (Yip & Coulombe, 2006). Las altas concentraciones de AFM₁, AFM₂ y AFP₁ indican que el organismo tiende a inhibir la

AFB₁ al formar estos metabolitos hidroxilados menos tóxicos como un proceso de desintoxicación. Estos metabolitos son más solubles en agua y pueden ser excretados de una forma fácil por la orina según reportes de Lovelace *et al.* (1982), fluidos biliares y por la leche (Hsieh, 1983), con lo que ayudan equilibrar los altos niveles de AFB₁ y disminuir su toxicidad (Eaton & Ramsdell, 1992). Aún así, el organismo puede acumularlos y estar en peligro.

Otra forma que tiene el organismo para desintoxicarse de la AFB₁ corre a cargo de la enzima GST, que permite que los metabolitos exógenos como la AFB₁ se combinen con moléculas endógenas de carácter polar para formar productos de conjugación que son rápidamente excretados.

La presencia de AFL en las muestras de hígado control fue en promedio de 0.8 ng g⁻¹ y en las muestras de hígado con HCC fue de 1.4 ng g⁻¹. La cantidad de AFL detectada en ambos grupos de muestras, es poca, sin embargo, este metabolito tiene una gran importancia al haber una interconversión de AFB₁ a AFL mediada por enzimas intracelulares como lo reportaron Walsh *et al.* (1992) quienes trabajaron con cultivos de células epidermales humanas. Wong and Hsieh (1980) publicaron que el AFL es oxidado para convertirse a AFB₁, y puede actuar como reservorio de AFB₁, la cual volverá a actuar como el potente cancerígeno que es, y prolongar su tiempo de vida en el organismo.

IV.5. Cuantificación de aductos de AFB₁-N⁷-Gua por HPLC.

IV.5.1. Síntesis del aducto de AFB₁-N⁷-Gua.

Del estándar de AFB₁-N⁷-Gua sintetizado en el laboratorio de micotoxinas del Instituto de Biología, UNAM se obtuvieron dos diferentes stocks, uno eluido en columnas de inmunoafinidad y otro en columnas LC₁₈.

Del estándar de AFB₁-N⁷-Gua eluido de columnas de inmunoafinidad se inyectaron 20 µL al HPLC con un flujo de 1.2 mL min⁻¹, con fase móvil de H₂O: MeOH: ACN (65:20:15 v/v/v) en una corrida de 30 minutos.

El pico cromatográfico corresponde al aducto de AFB₁-N⁷-Gua con un tiempo de retención de 22.4 minutos y un área bajo la curva de 2.7 equivalente a 2.1 µg mL⁻¹ de AFB₁-N⁷-Gua (**Figura 47**). En la parte inferior (b) se muestra el cromatograma del aducto de AFB₁-N⁷-Gua reportado por Essigman *et al.* (1977), con un tiempo de retención de 22 min, y detectado a 365 nm que es la misma longitud de onda de fluorescencia usada en el presente análisis. La cantidad de aducto AFB₁-N⁷-Gua

sintetizado en la IBUNAM con ambas columnas (de inmunoafinidad y LC₁₈) es de 4 veces más cantidad en el caso de la columna de inmunoafinidad, y de 3 veces más con la columna LC₁₈, que la obtenida por Essigman *et al.* (1977).

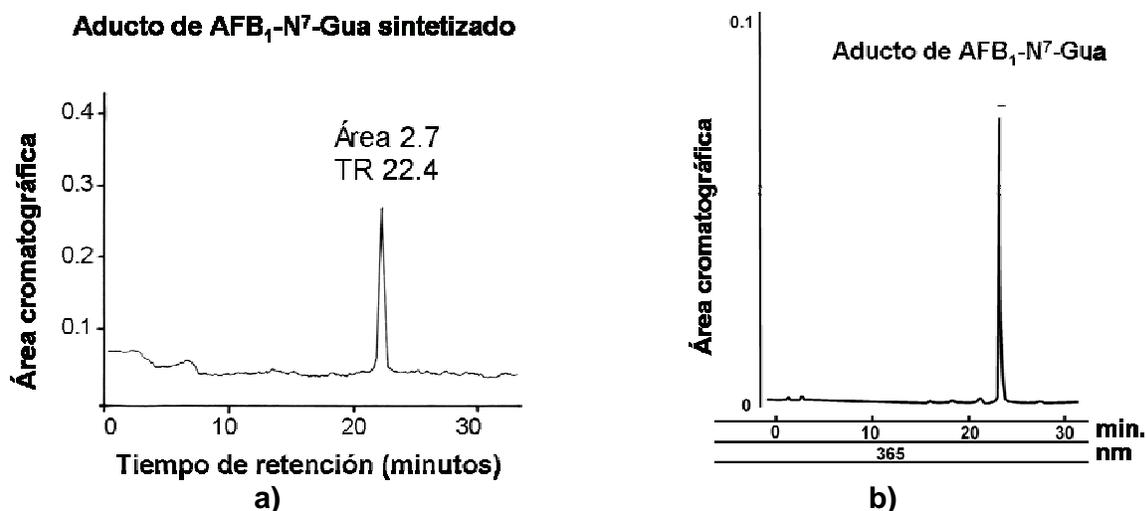


Figura 47: Cromatogramas de HPLC, a) Aducto de AFB₁-N⁷-Gua sintetizado en la IBUNAM, y eluido de columna de inmunoafinidad. El pico cromatográfico tuvo un tiempo de retención (TR) de 22.418 minutos y un área bajo la curva de 2.7 equivalente a 2.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. **b)** Aducto de AFB₁-N⁷-Gua reportado por Essigman *et al.* (1977), con un TR de 22 min, y detectado a 365 nm.

Del estándar de AF-ADN eluido de columnas LC₁₈ se inyectaron 20 μL al HPLC con la misma velocidad de flujo, fase móvil y tiempo de corrida. El pico cromatográfico correspondiente al aducto de AF-ADN tiene un tiempo de retención de 22.396 minutos y un área bajo la curva de 2.0 equivalente a 1.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AF-ADN (**Figura 48**). Aunque ambas columnas purifican al aducto, hubo mejor recuperación con la columna de inmunoafinidad y el pico está mejor definido.

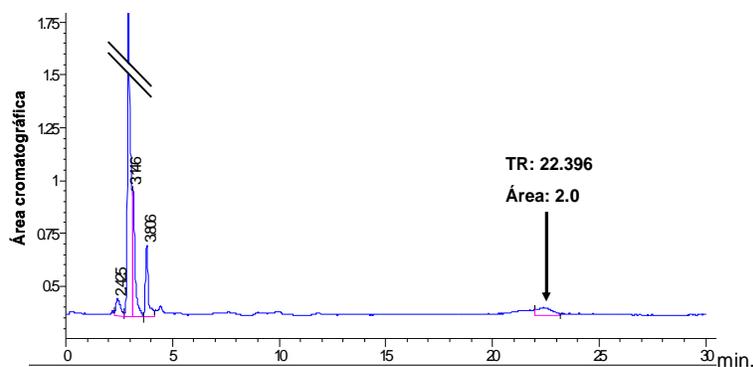


Figura 48: Cromatograma de HPLC del estándar del aducto de AF-ADN eluido de columna LC₁₈. El pico cromatográfico tuvo un tiempo de retención (TR) de 22.396 minutos y un área bajo la curva de 2.0 equivalente a 1.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AF-ADN.

IV.5.2. Curva de calibración de AFB₁-ADN.

No se detectó ningún pico y no se pudieron calcular las curvas de calibración.

V.5.3. Medición de los aductos de AFB₁-ADN de las muestras de hígado control y con HCC humanos por HPLC.

No se obtuvieron resultados de la cuantificación de aductos de AFB₁-ADN de las muestras de hígado control y con HCC individuales. La sensibilidad del HPLC no llega a niveles de detección requeridos, y los cromatogramas salieron limpios (**Figura 49 y 50**).

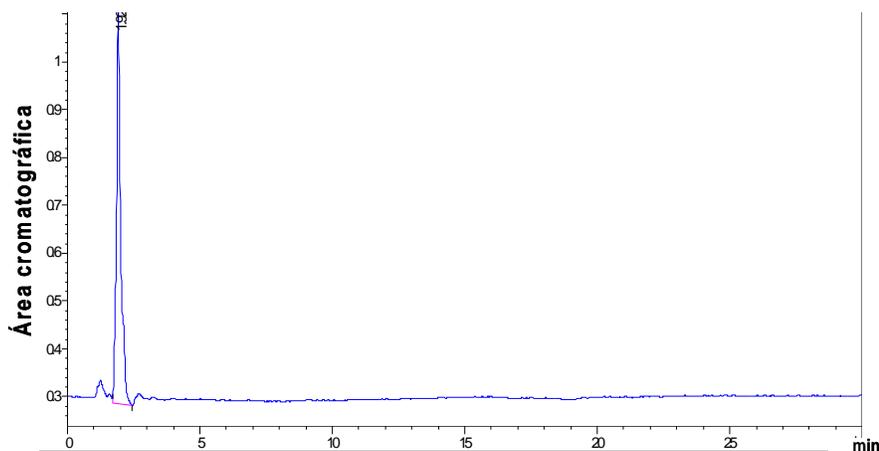


Figura 49: Cromatograma de HPLC para analizar los aductos de AFB₁-ADN de la muestra de hígado control 1.

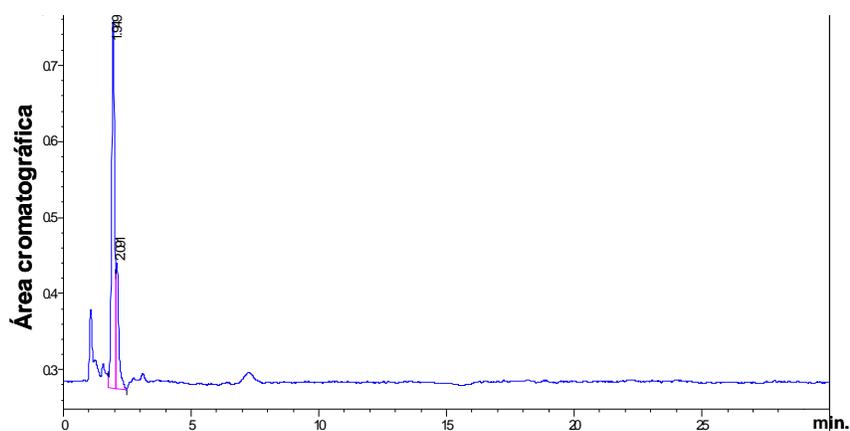


Figura 50: Cromatograma de HPLC para analizar los aductos de AFB₁-ADN de la muestra de hepatocarcinoma 15.

No se pudo cuantificar ni identificar al aducto de AFB₁-ADN de muestras individuales de hígado humano control, ni con hepatocarcinoma. Se analizaron simultáneamente los ADN purificados de la suma de 10 muestras, cada una de 1 g

de hígado control, un total de 10 g; por otro lado la suma de los 10 ADN purificados de 10 muestras, cada una de 1 g de hígado humano con HCC. Sólo así se pudo cuantificar e identificar el aducto de AFB₁-ADN, al aumentar su concentración en ambos grupos de estudio.

El grupo control no tuvo el aducto de AFB₁-N⁷-Gua a pesar de aumentar la concentración de 10 g de tejido en una muestra (**Figura 51 A**).

Por otro lado, al aumentar 10 veces la concentración de ADN de los 10 g de hígados con HCC, se pudo observar la presencia del aducto de AFB₁-N⁷-Gua, como un pico cromatográfico al minuto 22.6, y con un área cromatográfica de 5.7 correspondiente a una cantidad de 4.5 µg mL⁻¹ de AFB₁-N⁷-Gua. **Figura 51 B**. Con este análisis cromatográfico se demuestra la importancia del aducto en la etiología del HCC, quien aparece sólo en las muestras con HCC y no en el control.

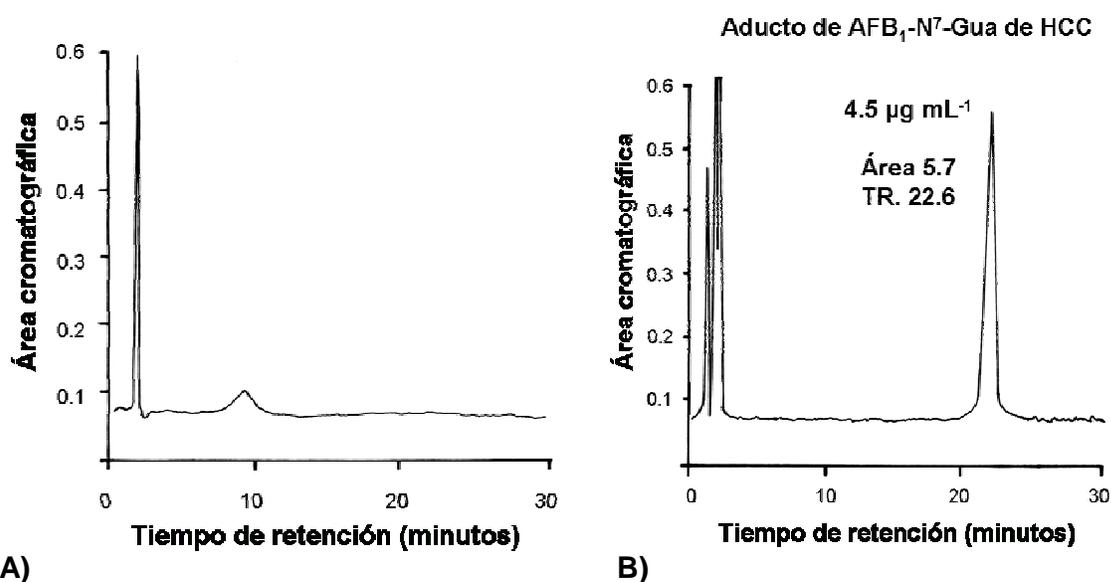


Figura 51: Cromatograma del aducto de AFB₁-N⁷-Gua de: A) grupo de las muestras de hígado control, y B) grupo de las muestras de hígados con HCC.

La cuantificación del aducto en las muestras de hígado control y con HCC tomó como referencia al aducto de AFB₁-N⁷-Gua sintetizado en el laboratorio (**Figura 47 a**), con un área cromatográfica de 2.7 equivalente a 2.1 µg mL⁻¹ de AFB₁-N⁷-Gua, y la cromatografía de líquidos no tiene la sensibilidad suficiente para detectar cantidades tan pequeñas de aducto y hacer una curva de calibración.

La biotransformación de AFB₁ también origina metabolitos electrofílicos, entre ellos los epóxidos como el 8-9 epóxido de AFB₁, que son compuestos químicamente reactivos y tóxicos, su blanco es el ADN y producen mutaciones. Este producto es altamente inestable y se une con alta afinidad a la guanina, reaccionando con el ADN para formar los aductos responsables del efecto cancerígeno y mutágeno de las AF (Eaton & Groopman, 1994; Smela *et al*, 2001). Es conocido que este epóxido se une en la posición del N⁷ de la guanina, para formar aductos de AFB₁-ADN, y causa mutaciones o transversiones de GC a AT (Bennett & Klich, 2003). La actividad cancerígena y mutágena de la AFB₁ están determinados por la formación de la AFB₁-formamidopirimidina, que causa errores en las transcripciones del ADN.

La cantidad de aducto de AFB₁-N⁷-Gua de las muestras de HCC muestreados para este trabajo de investigación fue de 4.5 µg mL⁻¹ de AFB₁-N⁷-Gua, resultantes de una suma total de la concentración de ADN 1 g de 10 de los 15 casos de HCC que fueron recolectados en el Hospital General de la Ciudad de México.

En México, Morón (2003), determinó los niveles del aducto de AFB₁-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. Los pacientes muestreados eran originarios de Matamoros, Tamaulipas, dónde anteriormente Juan-López *et al.* (1995) y Carvajal & Arroyo (1997) habían descrito una alta incidencia de contaminación de maíz con AF. Morón (2003) muestreo 15 individuos sanos y 32 enfermos de diferentes estratos sociales, que consumían maíz en su dieta diaria, eran mujeres y hombres en un rango de edad de 16-65 años. En el 2001, analizó muestras de sangre y encontró niveles de aducto de 0.82-1.35 pg AFB₁-lisina mg⁻¹ de albúmina. En el 2002, analizó 4 casos de cirrosis, donde los niveles de aducto estuvieron entre 0.5-2.4 pg AFB₁-lisina mg⁻¹ de albúmina. Los valores de aductos publicados por Morón (2003) y probablemente los obtenidos en este trabajo de investigación en cuanto a la cantidad de aductos detectados, indican que la población en México está ingiriendo alimentos contaminados con AFB₁.

En Monterrey, Nuevo León, México, Soini *et al.* (1996) trabajaron con células de HCC de humano para cuantificar los aductos de AFB₁-lisina y las mutaciones en el codón 249 del gen *p53*, además de detectar la presencia de antígenos de hepatitis B y/o C en los pacientes. En los 16 pacientes, la concentración de aductos de AFB₁-lisina estuvo en un rango de 0.54-4.64 pmol AFB₁-lisina mg⁻¹ de albúmina, en tres de

los 16 casos se encontró la mutación en el gen *p53*. Los antígenos para virus de la hepatitis B y/o C fueron positivos en 12 de 20 casos. Soini et al. (1996) concluyeron que la población mexicana está expuesta a la AF y a una situación de alto riesgo, debida al alto consumo de maíz en la dieta, aún en concentraciones relativamente bajas de AFB₁, dada la exposición diaria.

La cantidad en picogramos de aductos presentes en cada muestra del estudio de Morón (2003) cuantificados por radioinmunoensayo, y Soini *et al.* (1996), afirman la presencia de aductos encontrados en este estudio, donde se tuvo que analizar el ADN purificado de 10 g de hígado para poder cuantificarlos por HPLC, ya que en las muestras analizadas individualmente no se pudo detectar. En las otras investigaciones, la cuantificación de los aductos es en picogramos y el HPLC cuantifica sólo hasta nanogramos.

Al igual que en la investigación de esta tesis, el estudio de Morón (2003) no se pudo establecer ninguna correlación con las patologías de los pacientes. Pero sí una correlación entre la edad en que el HCC se desarrolla en los pacientes y la acumulación de AF a lo largo de la vida. Las muestras de hígado con HCC analizadas en este estudio pertenecían a pacientes en un rango de edad de 47 a 85 años (**Tabla 3 y 4**). El cáncer de hígado, con AFB₁ como factor etiológico, se presenta en adultos porque se necesitan años de consumo de alimentos contaminados con esta AF y la acumulación de la misma. La presencia de HCC en personas de edad avanzada se da por la susceptibilidad, tiempo de almacenamiento de AF en ADN y la respuesta del organismo a la contaminación por AF, de acuerdo con Cullen & Newberne (1994) y Eaton & Groopman (1994).

Durante los años de 1991-1995, Wang *et al.* (1996) examinaron 56 casos de HCC en Taiwán. Se analizaron muestras de sangre para determinar la concentración del aducto-AFB₁-lisina, AFB₁-ADN en la orina y marcadores para hepatitis B y C. Se encontró que los portadores de antígeno HBsAg tenían más altos niveles de AFM₁ en orina y que el riesgo relativo para desarrollar HCC era de 59%. Los resultados de estos estudios apoyan fuertemente la relación causal entre el virus de la hepatitis B y la exposición a las aflatoxinas en el desarrollo de HCC (Groopman & Kensler, 2005).

En Kenia, en el 2004, hubo 317 pacientes con deficiencia hepática aguda y 125 de ellos murieron, los sueros de algunos pacientes fueron negativos al virus de la hepatitis, concluyendo que se trataba de una aflatoxicosis por consumo de maíz contaminado (casi 4400 ppb). Azziz-Baumgartner *et al.* (2005) cuantificaron

biomarcadores asociados con aflatoxicosis aguda para identificar si el consumo de maíz contaminado con AF se relacionaba directamente con la deficiencia hepática. En el maíz que ingerían los pacientes hubo más AFB₁ (345 ppb) que en maíz control (44.1 ppb). Los pacientes con deficiencia hepática tenían al aducto en suero de 1.2 ng AFB₁-lisina mg⁻¹ de albúmina, al contrario que los controles con 0.15 ng AFB₁-lisina mg de albúmina. Hubo una asociación positiva entre la concentración de AFB₁ en maíz y la concentración del AFB₁-lisina, y por cada aumento de 1 mg en la concentración de AFB₁ en maíz, aumentó 0.5 pg mg⁻¹ el valor logarítmico del aducto AFB₁-lisina. Esta investigación ilustra el riesgo que implica la presencia de la AFB₁ en los alimentos para consumo humano.

VI. CONCLUSIONES

1. Se identificaron y cuantificaron las AF libres (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) y de los metabolitos hidroxilados (AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL) como medida de exposición de una persona a estas micotoxinas contaminantes de alimentos.
2. El coeficiente de correlación (R^2) de todas las curvas de calibración (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL) fue mayor a 0.99.
3. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de AF libres entre muestras de hígado con HCC con respecto a las muestras de hígado humano control.
4. Se estableció que la fijación de las muestras de hígado con formol afecta la calidad de la purificación del ADN y lo degrada, conforme pasa el tiempo la cantidad es menor. Por ello, la utilización del kit de Qiagen para la purificación de ADN no fue útil en esta investigación, y se optó por la técnica de Gupta (1984) como mejor opción.
5. Se logró sintetizar al aducto de AFB₁-N⁷-Gua que sirvió como estándar o referencia para la cuantificación de aductos de las muestras.
6. No se detectó la presencia de los aductos AFB₁-ADN en las muestras de hígado control, mientras que las muestras de hígado con HCC sí tuvieron. Esto indica que el aducto de AFB₁-N⁷-Gua es el verdadero biomarcador de riesgo de cáncer de hígado en casos de humanos con HCC.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abdel -Wahab, M., El-Ghawalby, N., Mostafa, M., Sultan, A., El-Sadany, M., Fathy, O., Salah, T. & Ezzat, F. 2007. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Lower Egypt, Mansoura Gastroenterology Center. **Hepato-Gastroenterology**, 54(73): 157-162.
- Afriyie-Gyawu, E., Mackie, J., Dash, B., Wiles, M., Taylor, J., Huebner, H., Tang, L., Guan, H., Wang, J.S. & Phillips, T. 2005. Chronic toxicological evaluation of dietary Novasil clay in Sprague-Dawley rats. **Food Additives and Contaminants**, 22:259-69.
- Akao, M., Kishikawa, S., Ogihara, K. & Kuroda, K. 2002. Induction of tumor growth and lung metastasis by a cDNA cloned from an aflatoxin B₁-induced rat liver cancer cell line. **Mycotoxins**, 52(1):1-11.
- Ali, N., Hashim, N.H. & Yoshizawa, T. 1999. Evaluation and application of a simple and rapid method for the analysis of aflatoxins in commercial foods from Malaysia and the Philippines. **Food Additives and Contaminants**, 16: 273-280.
- Ali, N., Hashim, N.H., Saad, B., Safan, K., Nakajima, M. & Yoshizawa, T. 2005. Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. **Food and Chemical Toxicology**, 43: 1763-1772.
- Álvarez, M.T., Carvajal, M., Ruisánchez, N. & Rojo, F. 2000. Aductos-ADN-aflatoxina como biomarcadores de exposición en grupos de riesgo de cáncer de hígado. **Instituto Nacional de Oncología y Radiología**, 16 (1):35-39.
- Andersson, C., Mosialou, E., Weinander, R. & Morgenstern, R. 1994. Enzymology of microsomal Glutathione S-Transferase. **Advances in Pharmacology**, 27: 19-33.
- Aoyama, T., Yamano, S., Guzelian, P.S. & Gelboin, H.V. 1990. Five forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B₁. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 87: 4790-4793.
- Apeagyei, F., Lamplugh, S.M., Hendrickse, R.G., Aframy, K. & Lucas, S. 1982. Aflatoxins in the liver of children with kwashiorkor in Ghana. *Tropical and Geographical Medicine Home*. **Medical of Biology Environmental**, Sep-Dec. 9-12.
- Asare, G.A., Bronz, M., Naidoo, V. & Kew, M.C. 2007. Interactions between aflatoxin B-1 and dietary iron overload in hepatic mutagenesis. **Toxicology**, 234(3):157-166.
- Azziz-Baumgartner, E., Lindblade, K., Giesecker, K., Rogers, H.S., Kieszak, S., Njapau, H., Schleicher, R., McCoy, L.F., Misore, A., De Cock, K & Rubin, C. 2005. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. **Environmental Health Perspectives**, 113:1779-1783.
- Bacaloni, A., Cavaliere, C., Cucci, F., Foglia, P., Samperi, R. & Laganá, A. 2008. Determination of aflatoxin in hazelnuts by various sample preparation methods and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1179: 182-189.
- Bailey, G., Selivonchick, D. & Hendricks, J. 1987. Initiation, promotion, and inhibition of carcinogenesis in rainbow trout. **Environmental Health Perspectives**, 71:147-153.
- Barbieri, G., Bergamini, C., Ori, E. & Pesca, P. 1994. Aflatoxin M₁ in parmesan cheese: HPLC determination. **Journal of Food Science**, 59: 1313-1331.
- Bateman, J., Chapman, R.J. & Simpson, D. 1998. Possible toxicity of herbal remedies. **Scottish Medical Journal**, 39: 279-285.
- Beckman, R.A. & Loeb, L.A. 2005. Genetic instability in cancer: Theory and experiment. **Seminars in Cancer Biology**, 15: 423-435.

- Beckwith, A.C., Vesonder, R. F. & Ciegler, A. 1975. Action of weak bases upon aflatoxin B₁ in contact with macromolecular reactants. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 23: 582-587.
- Bedard, L.L., Alessi, M., Davey, S. & Massey, T.E. 2005. Susceptibility to aflatoxin B₁-induced carcinogenesis correlates with tissue-specific differences in DNA repair activity in mouse and in rat. **Cancer Research**. 65(4):1265-1270.
- Bennett, J.W. & Klich, M. 2003. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, 16 (3): 197-516.
- Bhat, R.V. & Krishnamachari, K.A. 1977. Follow-up study of aflatoxic hepatitis in parts of western India. **Indian Journal of Medical Research**, 66: 55-58.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K.C. & Cleveland, T.E. 2003. Molecular genetics analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 61:83-93.
- Breinholt, V., Schimerlik, M., Dashwood, R. & Bailey, G. 1995. Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B₁: complex formation with the carcinogen. **Chemical Research in Toxicology**, 8: 506-514.
- Campbell, T.C. & Salamat, L. 1971. Aflatoxin ingestion and excretion by humans. *In*: Symposium on mycotoxins in human health. Purchase, I.F.H. Ed. Mac Millan Press, London. 271-280.
- Campbell, T.C., Caedo, J.P., Bulatao-Jayme, J., Salamat, L. & Engel, R.W. 1970. Aflatoxin M₁ in human urine. **Nature**, 227: 403-404.
- Carvajal, M. and Arroyo, G. 1997. Management of Aflatoxin contaminated maize in Tamaulipas, Mexico. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45 (4): 1301-1305.
- Chang, M.H., Chen, C.J., Lai, M.S., Hsu, H.M., Wu, T.C., Kong, M.S., Liang, M.H., Shau, W.Y. & Chen, D.S. 1997. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. **The New England Journal of Medicine**, 336: 1855-1859.
- Chang, P.K., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Bennett, J.W., Linz, J.E., Woloshuk, C.P. & Payne, G.A. 1993. Cloning of the *Aspergillus parasiticus* *apa-2* gene associated with the regulation of aflatoxin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, 59: 3273-3279.
- Chapple, C. 1998. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P-450-dependent monooxygenases. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49: 311-343.
- Chauhan, H.V.S., Jha, G.J., Singh, P.N. & Singh, K.K. 1984. Hepatocellular carcinoma associated with aflatoxicosis in pigs. **Indian Veterinary Journal**, 61(12): 1009-1014.
- Chen, H.L., Chang, M.W., Ni, Y.H., Hsu, H.Y., Lee, P.I., Lee, C.Y. & Chen, D.S. 1996. Seroepidemiology of hepatitis B virus infection in children. Ten years of mass vaccination in Taiwan. **The Journal of the American Medical Association**, 276: 906-908.
- Cho, S.H., Lee, C.H., Jang, M.R., Son, Y.W., Lee, S.M., Choi, I.S., Kim, S.H. & Kim, D.B. 2008. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. **Food Chemistry**, 107: 1283-1288.
- Coleman, M., Esteve, J., Damiacki, P. & Renard, H. 1993. Trends in cancer incidence and mortality. Lyon, France: **WHO, IARC**. Scientific Publication N° 121: 68-74.
- CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento. 2006. Avaliação da safra 2005/2006 Setembro/2006. <http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php>
- Conney, A.H. 1986. Induction of microsomal cytochrome P-450 enzymes. **Life Sciences**, 39: 2493-2518.
- Cougot, D., Neuveut, C. & Buendia, M.A. 2005. HBV-induced carcinogenesis. **Journal of Clinical Virology**, 34(1):S75-S78.

- Coursaget, P., Depril, N., Chabaud, M., Nandi, R., Mayelo, V., LeCann, P. & Yvonnet, B. 1993. High prevalence of mutations at codon 249 of the *p53* gene in hepatocellular carcinomas from Senegal. **British Journal of Cancer**, 67: 1395-1397.
- Croy, R.G., Essigmann, J.M., Reinhold, V.N. & Wogan, G.N. 1978. Identification of the principal aflatoxin B₁-DNA adduct formed *in vivo* in rat liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 75:1745-1749.
- Cullen, J.M. & Newberne, P.N. 1994. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. Capítulo 1: 3-26 pp. In: Eaton, D.L. & Groopman, J.J. (Ed). 1994. The toxicology of aflatoxins. Human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press, Inc. San Diego. 544 pp.
- Czauderna, P. & Perilongo, G. 2004. Hepatocellular carcinoma. **Orphanet Encyclopedia**, 1-4 pp. <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-Hepatocellularcarcinoma.pdf>
- Dash, B., Afriyie-Gyawu, E., Huebner, H.J., Porter, W., Wang, J.S., Jolly, P.E. & Phillips, T.D. 2007. Determinants of the variability of aflatoxin-albumin adduct levels in Ghanaians. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A**. 70(1): 58-66.
- Davie, J.R., Delcuve, G.P., Nickel, B.E., Moirier, R. & Bailey, G. 1987. Reduced levels of histones H1 degrees and H1b, and unaltered content of methylated DNA in rainbow trout hepatocellular carcinoma chromatin. **Cancer Research**, 47 (20): 5407-5410.
- Dayaram, T. & Marriott, S.J. 2008. Effect on transforming viruses on molecular mechanisms associated with cancer. **Journal of Cell Physiology**, 216:309-314.
- De longh, H., Beerthuis, R. K., Vles, R. O., Barret, C. B. & Ord, W. O. 1962. Investigation of the factor in groundnut meal responsible for turkey X disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, 65: 548-551.
- De Vries, H.R. & Lamplugh, S.M. 1989. Aflatoxins in liver biopsies from Kenya. **Tropical and Geographical Medicine**. Vol. 41:26-30.
- Dean, J.H., Luster, M.I., Munson, A.E. & Kimber, I. 1994. Immunotoxicology and Immunopharmacology. Raven Press, New York, pp. 163-182.
- Denning, D.W. 1987. Aflatoxin and human disease. Adverse Drug Reaction. **Acute Poisoning**, 6: 175-209.
- Díaz-Zaragoza, M. 2007. Cuantificación e identificación de aflatoxinas en hígado, molleja y pechuga de gallina de postura. Tesis de Licenciatura en Biología, UNAM. 154 pp.
- Ding, X. & Kaminsky, L.S. 2003. Human extrahepatic cytochromes P-450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 43: 149-173.
- Domínguez-Malagón, H. & Gaytan-Graham, S. 2001. Hepatocellular carcinoma: an update. **Ultrastructural Pathology**, 25:497-516.
- Duarte, I. 1995. Anatomía Patológica del Aparato Digestivo. Patología del Hígado. Cap 4. http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/anatomiapatologica/04digestivo/4higado_2.html
- Duesberg, P. & Li, R. 2003. Multistep carcinogenesis. A chain reaction of aneuploidizations. **Cell Cycle**, 2(3): 202-210.
- Dunaif, G.E. & Campbell, T.C. 1987. Dietary protein level and aflatoxin B₁-induced preneoplastic hepatic lesions in the rat. **The Journal of Nutrition**, 117(7):1298-1302.
- Eaton, D.I., Ramsdell, H.S. & Neal, G.E. 1994. Biotransformación de Aflatoxinas. Capítulo 3: 45-72 pp. In: Eaton, D.L. & Groopman, J.J (Ed). 1994. The toxicology of aflatoxins. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. Academic Press, Inc. San Diego, USA. 544 pp.

- Eaton, D.L. & Groopman, J.J. 1994. The toxicology of aflatoxins. Human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press, Inc. San Diego. 544 pp
- Eaton, D.L. & Ramsdell, H.S. 1992. Species and diet-related differences in aflatoxin biotransformation. *In: Bhatnagar, D., Lillehoj, E.B. & Arora, D.K., ed. Handbook of Applied Mycology: Mycotoxins in Ecological Systems.* New York Marcel Dekker. 157-182.
- Edmonson, H.A. 1985. Tumors of the liver and intrahepatic bile ducts. *In: Atlas of tumor Pathology.* Sect VII.AFIP, 25:37-80.
- Egner, P.A., Gange, S.J., Dolan, P.M., Groopman, J.D., Muñoz, A. & Kensler, T.W. 1995. Levels of aflatoxin–albumin biomarkers in rat plasma are modulated by both long-term and transient interventions with oltipraz. **Carcinogenesis**, 16: 1769–1773.
- El-Mofty, M.M., Sakr, S.A., Essawy, A. & Gawad, H.S.A. 1994. Preventive action of garlic on aflatoxin B1-induced carcinogenesis in the toad *Buffo regularis*. **Nutrition and Cancer**, 1(1):95-100.
- El-Serag, H.B. & Mason, A.C. 1999. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. **The New England Journal of Medicine**, 340: 3745-750.
- Enzan, H., Himeno, H., Iwamura, S., Onishi, S., Saibara, T., Yamamoto, Y. & Hara, H. 1994. Alpha-smooth muscle actin-positive perisinusoidal stromal cells in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, 19: 895-903.
- Essigmann, J.M., Croy, R.G., Nadzan, A.M., Busby, W.F., Reinhold, V.N., Buchi, G. & Wogan, G.N. 1977. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B1 *in vitro*. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, 74:1870-1874.
- FAO, 2004. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Nutrition Paper, No. 81. **FAO**, Rome.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P. & Parkin, D.M. 2004. GLOBOCAN 2002. Cancer incidence, mortality and prevalence Worldwide, IARC Cancer Base No. 5, Version 2.0. Lyon: IARC Press.
- Frank, T.S. 2001. Hereditary cancer syndromes. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, 125: 85-90.
- García, S. & Heredia, N. 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management and control strategies. **Mycopathologia**, 162:255-264.
- Gertsch, J. 2008. Glutathione S-Transferase. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, pp. 1-17.
- Gong, Y., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P.C., Sutcliffe, A.E., Hall, A.J., Cardwell, K. & Wild, C.P. 2004. Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. **Environmental Health Perspectives**, 112:1334-1338.
- Gordon, R.F. & Jordan, F.T.W. 1985. Enfermedades de las aves. 2ª Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F. 383 pp.
- Gotoh, O. 1992. Substrate recognition sites in cytochrome P-450 family 2 (CYP2) proteins from comparative analysis of amino acid and coding nucleotide sequences. **The Journal of Biological Chemistry**, 267: 83-90.
- Groopman, J. D. & Abbioni, G. 1991. Detection of aflatoxin and its metabolites in human biological fluids. **Pennington Center Nutrition Series**, 1:18-31.
- Groopman, J.D & Kensler, T.W. 2005. Role of metabolism and viruses in aflatoxin-induced liver cancer. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 206: 131-137.

- Groopman, J.D., Cain, L.G. & Kensler, T.W. 1988. Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. **Critical Reviews in Toxicology**, 19(2):113-145.
- Groopman, J.D., Donahue, P.R., Zhue, J.Q., Chen, J.S. & Wogan, G.N. 1985. Aflatoxin metabolism in humans: detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography. **Proceeding of the National Academy of Sciences, USA**, 82:6492-6496.
- Groopman, J.D., Kensler, T.W. & Wlud, C.P. 2007. Protective interventions to prevent aflatoxin-induced carcinogenesis in developing countries. **Annual Review of Public Health**, 29:2.1-2.17.
- Guengerich, F.P. & Shimada, T. 1991. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. **Chemical Research in Toxicology**, 4: 391-407.
- Gupta, R.C. 1984. Nonrandom binding of the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 81: 6943-6947.
- Gürses, M. 2006. Mycoflora and aflatoxin content of hazelnuts, walnuts, peanuts, almond and roasted chickpeas (leblebi) sold in Turkey. **International Journal of Food Properties**, 9: 395-399.
- Guzmán, D. 2007. La exposición a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. **Salud Pública de México**, 49(3): 227-235.
- Habib, S.L., Said, B., Awad, A.T., Mostafa, H.M. & Shank, R.C. 2006. Novel adenine adducts, N-7-guanine-AFB (1) adducts, and p53 mutations in patients with schistosomiasis and aflatoxin exposure. **Cancer Detection and Prevention**, 30(6): 491-498.
- Hahn, W.C. & Weinberg, R.A. 2002. Rules for making human tumor cells. **The New England Journal of Medicine**, 347: 1593-1603.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2000. The Hallmarks of cancer. **Cell**, 100: 57-70.
- Harrison, J.C., Carvajal, M. and Garner, R.C. 1991. Immunological detection of AFB₁-DNA and AFB₁-serum albumin adducts in rat and human tissues. In: Human Carcinogen Exposure: Biomonitoring and Risk Assessment. Oxford University Press, Oxford, UK. 255-265.
- Hayashi, M., Matsui, O., Ueda, K., Kawamori, Y., Kadoya, M., Yoshikawa, J., Gabata, T., Takashima, T., Nonomura, A. & Nakanuma, Y. 1999. Correlation between the blood supply and grade of malignancy of hepatocellular nodules associated with liver cirrhosis: evaluation by CT during intraarterial injection of contrast medium. **American Journal of Roentgenology**, 172: 969-976.
- Hertzog, P.J., Smith, J.R. & Garner, R.C. 1982. Characterization of the imidazole ring-opened forms of trans-8, 9-dihydro-8, 9-dihydro-8- (7-guanyl) 9-hydroxy aflatoxin B₁. **Carcinogenesis**, 3:723-725.
- Herzallah, S.M. 2009. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. **Food Chemistry**, 114: 1141-1146.
- Hoeijmakers, J.H.J. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, 411: 366-374.
- Hofseth, L.J., Hussain, S.P., Wang, X.W., Harris, C.C. 2002. Hepatocellular cancer: molecular biology and genetics. In: Kelsen, D.P., Daly, J.M., Kern, S.E., Levin, B., Tepper, J.E., Editors. Gastrointestinal Oncology: Principles and practice. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 539-558.
- Hsieh, D.P.H. 1983. Metabolism and transmission of mycotoxins. **Proceedings of the International Symposium on Mycotoxins** (Cairo, Egypt), pp. 151-165.

Hsu, I.C., Metcalf, R.A., Sun, T., Welsh, J.A., Wang, N.J. & Harris, C.C. 1991. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. **Nature**, 350: 427–428.
http://escuela.med.puc.cl/paginas/Cursos/tercero/AnatomiaPatologica/Imagenes_AP/patologia588-596.html

Hulla, J.E, Chen, Z.Y. & Eaton, D.L. 1993. Aflatoxin B1-induced rat hepatic hyperplastic nodules do not exhibit a site-specific mutation within the p53 gene. **Cancer Research**, 53 (1):9-11.

Hussain, S.P. & Harris, C.C. 1998. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. **Cancer Research**, 58: 4023–4037.

Hussain, S.P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X.W. & Harris, C.C. 2007. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. **Oncogene**, 26(15): 2166-2176.

IARC, 1982. IARC/IPCS Working Group. Development and possible use of immunological techniques to detect individual exposure to carcinogenesis. **IARC Internal Technical Report N° 82/001**, 25.

IARC. 1993. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC, Science Publication**, 56, Lyon, France.

IARC. 1994. Hepatitis viruses, monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. **IARC Science Publication**, 59, Lyon, France.

IUPAC. 1997. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. The Gold Book. Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1048 pp.

Jacobsen, J.S.; Refolo, L.M.; Conley, M.P.; Sambamurti, K.; Humayun, M.Z. 1987. DNA replication-blocking properties of adducts formed by aflatoxin B1-2,3-dichloride and aflatoxin B1-2,3-oxide. **Mutation Research**, 179, 89-101.

JECFA, 1998. Forty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives. In: Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: Aflatoxins WHO Food Additives Series 40. WHO, Geneva, pp. 359-469.

JECFA, 2008. Forty-ninth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. In: Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: Aflatoxins WHO Food Additives Series 40. WHO, Geneva, pp. 359-469.

Jennings, G.S., Oesch, F., Steinberg, P. 1992. *In vivo* formation of Aflatoxin B₁-DNA adducts in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver. **Carcinogenesis**, 13, 831-835.

John, M.D. 1996. Tumores de hígado. Oncología clínica. Manual de la American Cancer Society. **Organización Panamericana de la Salud**, 303-316.

Jordan, F.T. & Pattison, M. 1996. Poultry Diseases. 4a Edición. **Editorial Saunders Company**. Gran Bretaña. 546 pp.

Joshi, B.S. & Kaul, P.N. 2001. Alternative medicine: Herbal drugs and their critical appraisal part 1. **Progress in Drug Research**, 56: 1-76.

Juan-López, M., Carvajal, M. and Ituarte, B. 1995. Supervising Program of Aflatoxins in Mexican corn. **Journal of Food Additives and Contaminants**, 12 (3): 297-312.

Juge, N., Mithen, R.F. & Traka, M. 2007. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. **Cellular and Molecular Life Science**, 64: 1105–1127.

Kamdem, L.K., Meineke, I., Goedel-Armbrust, U., Brockmoeller, J. & Wojnowski, L. 2006. Dominant contribution of P450 3A4 to the hepatic carcinogenic activation of aflatoxin B-1. **Chemical Research in Toxicology**, 19(4): 577-586.

- Kensler, T.W., Egner, P.A., Davidson, N.E., Roebuck, B.D., Pikul, A. & Groopman, J.D. 1986. Modulation of aflatoxin metabolism, aflatoxin-N⁷-guanine formation, and hepatic tumorigenesis in rats fed ethoxyquin: Role of induction of glutathione S-transferases. **Cancer Research**, 46: 3924-3931.
- Kensler, T.W., Egner, P.A., Dolan, P.M., Groopman, J.D. & Roebuck, B.D. 1987. Mechanism of protection against aflatoxin tumorigenicity in rats fed 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione (oltipraz) and related 1,2-dithiol-3-thiones and 1,2-dithiol-3-ones. **Cancer Research**, 47:4271-4277.
- Kensler, T.W., Egner, P.A., Wang, J., Zhu, Y., Zhang, B., Lu, P., Chen, J., Qian, G., Kuang, S., Jackson, P.E., Gange, S.J., Jacobson, L.P., Muñoz, A. & Groopman, J.D. 2004. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in aflatoxin endemic areas. **Gastroenterology**, 127: S310-S318.
- Kensler, T.W., Groopman, J.D., Sutter, T.R., Curphey, T.J. & Roebuck, B.D. 1999. Development of cancer chemopreventive agents: oltipraz as a paradigm. **Chemical Research in Toxicology**, 12:113-126.
- Kensler, T.W., Qian, G.S., Chen, J.G. & Groopman, J.D. 2003. Translational strategies for cancer prevention in liver. **Nature Reviews**, 3: 321-329.
- Kimura, M., Lehmann, K., Golapan, P. & Lotlikar, P.D. 2004. Effect of diet on aflatoxin B1-ADN binding and aflatoxin B1-induced glutathione S-transferase placental form positive hepatic foci in rat. **Experimental and Molecular Medicine**, 36 (4): 351-357.
- Kirk, G., Camus-Randon, A.M., Goedert, J., Hainaut, P. & Montesano, R. 1999. p53 mutation in sera of patients with hepatocellular carcinoma and cirrhosis in The Gambia (West Africa). [Abstract], AACR 90th Annual Meeting, Vol. 40, p. 41.
- Kirk, G.D., Bah, E. & Montesano, R. 2006. Molecular epidemiology of human liver cancer: insights into etiology, pathogenesis and prevention from The Gambia, West Africa. **Carcinogenesis**, 27(10): 2070-2082.
- Koeltzow, D. E. & Tanner, S. N. 1990. Comparative evaluation of commercially available test methods. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, 73: 584-589.
- Krishnamachari, K.A., Bhat, R.V., Naragajan, V. & Tilak, T.B. 1975. Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in Western India. **Lancet**, 1: 1061-1063.
- Laurent-Puig, P., Legoix, P., Bluteau, O., Belghiti, J., Franco, D., Binot, F., Monges, G., Thomas, G., Bioulac-Sage, P. & Zucman-Rossi J. 2001. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathway of hepatocarcinogenesis. **Gastroenterology**, 1(120): 1763-1773.
- Leichtfried, D., Krist, S., Puchinger, L., Messner, K. & Buchbauer, G. 2004. Investigations of the natural microflora of poppy seeds (*Papaver somniferum*) and hazelnut kernels (*Corylus avellana*) including microbiological decomposition. **European Food Research and Technology**, 219 (3): 282-285.
- Liaw, Y.F. & Sollano, J.D. 2006. Factors influencing liver disease progression in chronic hepatitis B. **Liver International**, 26(2):23-29.
- Llewelyn, G.S., Stepheson, G.A. & Hoffman, J.W. 1977. AFB₁ toxicity and teratogenicity in Japanese Medaka eggs (*Oryzias latipes*). **Toxicol.** 15: 582-587.
- Long, X.D., Ma, Y., Wei, Y.P. & Deng, Z.L. 2006. The polymorphisms of GSTM1, GSTT1, HYL1*2, and XRCC1, and aflatoxin B1-related hepatocellular carcinoma in Guangxi population, China. **Hepatology Research**, 36(1): 48-55.
- Lovelace, C.E.A., Njapau, H., Sater, L.F. & Bayley, A.C.1982. Screening method for the detection of aflatoxin and metabolites in human urine: aflatoxins B1, G1, M1 B2a, G2a, aflatoxicols I and II. **Journal of Chromatography**, 227: 256-261.

- Lumjuan, N., Stevenson, B.J., Prapanthadara, L., Somboon, P., Brophy, P.M., Loftus, B.J., Severson, D.W. & Ranson, H. 2007. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 37: 1026-1035.
- Lye, M.S., Ghazali, A.A., Mohan, J., Alwin, N. & Nair, R.C. 1995. An outbreak of acute hepatic encephalopathy due to severe aflatoxicosis in Malaysia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 53:68-72.
- MacDonald, K. & Beclard, Y.C. 1990. Cytologic, ultrastructural and immunologic features of intracytoplasmic hyaline bodies in fine needle aspirates of hepatocellular carcinoma. **Acta Cytologica**, 34: 197-200.
- Makino, M., Sugimoto, H., Shiro, Y., Asamizu, S., Onaka, H. & Nagano, S. 2007. Crystal structures and catalytic mechanism of cytochrome P450 StaP that produces the indolocarbazole skeleton. **Proceeding of the National Academy of Sciences, USA**, 104: 11591-11596.
- Mannervik, B., Board, P.G., Hayes, J.D., Listowsky, I. & Pearson, W.R. 2005. Nomenclature for mammalian soluble glutathione Transferases. **Methods in Enzymology**, 401: 1-8.
- Marrero, J.A., Fontana, R.J., Fu, S., Conjeevaram, H.S., Su, G.L. & Lok, A.S. 2005. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, 42: 218-224.
- McKillop, I.H., Moran, D.M., Jin, X. & Koniaris, L.G. 2006. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. **Journal of Surgical Research**, 136(1): 125-135.
- McMahon, G., Davis, E.F., Huber, L.J., Kim, Y. & Wogan, G.N. 1990. Characterization of c-K-ras and N-ras oncogenes in aflatoxin B₁ induced rat liver tumors. **Procedures of Natural Academy of Sciences, USA**, 87:1104-1108.
- McMahon, G., Hanson, L., Lee, J.J. & Wogan, G.N. 1986. Identification of an activated c-Ki-ras oncogene in rat liver tumors induced by aflatoxin B₁. **Procedures of Natural Academy of Sciences, USA**, 83: 9418-9422.
- Meyers, D.M., Obrian, G., Du, W.L., Bhatnagar, D. & Payne, G.A. 1998. Characterization of *afII*, a gene required for conversion of pathway intermediates to aflatoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, 64: 3713-3717.
- Ming, L., Thorgeirsson, S.S., Gail, M.H., Lu, P., Harris, C.C., Wang, N., Shao, Y., Wu, Z., Liu, G., Wang, X. & Sun, Z. 2002. Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. **Hepatology**, 36(5):1214-1220.
- Moctezuma-Zárate, M.G. 2002. Mutagénesis por AFB₁ presente en maíz y tortillas, y la nixtamalización como posible control. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología). Universidad Nacional Autónoma de México. 99 pp.
- Mohanamba, T., Habibi, S.M.M., Sastry, P.R., Rajeswari, K.R. & Rao, M.R.K. 2002. *Aspergillus flavus* contamination of feeds and its potential to produce aflatoxin. **Indian Veterinary Journal**, 79(12):1302-1303.
- Mondragón-Sánchez, R., Garduño-López, A.L., Hernández-Castillo, E., Gómez-Gómez, E. & Ruiz-Molina, J.M. 2005. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in Mexico. **Hepatogastroenterology**, 52: 1159-1162.
- Mondragón-Sánchez, R., Gómez-Gómez, E. & Martínez-González, N. 2004. Hepatocarcinoma: Algoritmo de conducta terapéutica. **Revista de Gastroenterología de México**, 69(3): 155-159.
- Morón, G.A. 2003. Detección de aductos de aflatoxina B₁-albúmina sérica por radioinmunoanálisis en pacientes con patologías asociadas con su presencia en Matamoros, Tamaulipas, México. Tesis de Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León.

- Moyers, S.B. & Kumar, N.B. 2004. Green tea polyphenols and cancer chemoprevention: multiple mechanisms and endpoints for phase II trials. **Nutrition Reviews**, 62: 204–11
- Nakai, V.N., Rocha, L.O., Gonçalves, E., Fonseca, H., Ortega, E.M.M. & Corrêa, B. 2008. Distribution of fungi and aflatoxin in a stored peanut variety. **Food Chemistry**, 106: 285-290.
- Nakamoto, Y., Guidotti, L.G., Kuhlen, C.V., Fowler, P. & Chisari, F.V. 1998. Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma. **The Journal of Experimental Medicine**, 188: 341-350.
- Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, J.C., Johnson, E.F., Kemper, B. Levin W, Philips, J.R., Sato, R. & Waterman, M.R. 1987. The P-450 gene superfamily: recommended nomenclature. **DNA**, 6: 1-11.
- Newberne, P.M. & Butler, W.H. 1969. Acute and chronic effects of aflatoxins on the liver of domestic and laboratory animals: a review. **Cancer Research**, 29:236-244.
- Newberne, P.M., Suphiphat, V., Locniskar, M. & Camargo, J.L. 1990. Inhibition of hepatocarcinogenesis in mice by dietary methyl donors methionine and choline. **Nutrition and Cancer**, 14(3/4):175-181.
- Ngindu, A., Johnson, B.K., Kenya, P.R., Ngira, J.A, Ocheng, D.M., Nandwa, H., Omondi, T.N., Jansen, A.J., Ngare, W., Kaviti, J.N., Gatei, D. & Siongok, T.A. 1982. Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. **Lancet**, 1:1346-1348.
- Nhieu, J.T., Renard, C.A., Wei, Y., Cherqui, D., Zafrani, E.S., Buendía, M.A. 1999. Nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. **American Journal of Pathology**, 155:703–710.
- Oakley, A.J., Lo-Bello, M., Nuccetelli, M., Mazzetti, A.P. & Parker, M.W. 1997. The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site). **Journal of Molecular Biology**, 291: 913-926.
- Oğuz H., Kurtoğlu, V. & Coskun, B. 2000. Preventive efficacy of clinoptilolite in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 µg/kg) exposure. **Research in Veterinary Science**, 69:197-201.
- Okey, A.B. 1990. Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. **Pharmacology and Therapeutics**, 45: 241-298.
- Olsen, J.H., Dragsted, I. & Autrup, H. 1988. Cancer risk and occupational exposure to aflatoxins in Denmark. *British Journal of Cancer*, 58: 236-250.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. 2005. Cifras destacables: el impacto del cáncer. <http://www.who.int/research/es/>
- Omura, T. & Sato, R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. **The Journal of Biological Chemistry**, 239: 2370-2378.
- Omura, T. 1999. Forty years of cytochrome P-450. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 266: 690-698.
- OPS. Organización Panamericana de la Salud. 1983. Micotoxinas. Criterios de la salud ambiental 11. 131 pp.
- OPS. Organización Panamericana de la Salud. 2002. La salud de las Américas. Vol. II. Publicación Científica Técnica N° 587. Organización Mundial de la Salud, Washington, USA. 627 pp.
- Ordoñez, N.G. & McKay, B. 1983. Ultrastructure of liver cell and bile duct carcinomas. **Hepatology**, 5: 201-241.
- Ortiz de Montellano, P.R. & De Voss J.J. 2002. Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P-450. **Natural Product Reports Articles**, 19: 477-493.

- Park, D.L. & Pohland, A.E. 1986. A rationale for the control of aflatoxin in animal feeds. *Mycotoxins and Phycotoxins*, Edited by Steyn, P.S. & Vleggaar, R. Amsterdam: Elsevier. 473-482.
- Park, Y., Yang, C., Fernández, G., Cubucku, O., Thung, S. & Theise, N. 1998. Neoangiogenesis and sinusoidal capillarization in dysplastic nodules of the liver. **The American Journal of Surgical Pathology**, 22: 656-662.
- Peers, F.G. & Linsell, C.A. 1977. Dietary aflatoxins and human primary liver cancer. **Annales de la Nutrition et de L'alimentation**, 31 (4-6):1005-1017.
- Pelkonen, O. & Raunio, H. 1997. Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. **Environmental Health Perspectives**, 4: 767-774.
- Peraica, M., Ana-Marija, Domijan, Jurjevic, Z., & Cvjetkovic, B. 2002. Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. **Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju**, 53: 229–237.
- Pestka, J.J. & Bondy, G.S. 1994. Mycotoxin-induced immune modulation, In: Dean, J.H., Luster, M.I., Munson, A.E. & Kimber, I. (Eds). *Immunotoxicology and Immunopharmacology*. Raven Press, New York, pp. 163-182.
- Pier, A.C. & McLoughlin, M.E. 1985. Mycotoxin suppression of immunity. In: *Trichothecenes and other mycotoxins*. Edited by J. Lacey. John Wiley and Sons Ltd. 507-519.
- Pihan, G. & Doxsey, S.J. 2003. Mutations and aneuploidy: Co-conspirators in cancer? **Cancer cell**, 4: 89-94.
- Pisani, P., Parkin, D.M., Muñoz, N. & Ferlay, J. 1997. Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, 6: 387-400.
- Pitt, J.L. 2000. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, 38(1): 17-22.
- Pittet, A. 1998. Natural occurrence of mycotoxins in food and feeds-an updated review. **Revue de Médecine Vétérinaire**, 149: 479-492.
- Qian, G.S. & Yang, G. C. 1984. Rapid extraction and detection of aflatoxins B₁ and M₁ in beef liver. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 32:1071-1073.
- Qian, G.S., Ross, R.K., Yu, M.C., Yuan, J.M., Gao, Y.T., Henderson, B.E., Wogan, G.N. & Groopman, J.D. 1994. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, 3: 3-10.
- Qin, L.R., Lei, J.B. & Sun, X.B. 1983. Pathological observation on aflatoxin poisoning of Beijing ducks in Wuhan Municipality. **Chinese Journal of Veterinary Medicine**, 9(1):7-9.
- Ramsdell, H.S., Parkinson, A., Eddy, A.C. & Eaton, D.L. 1991. Bioactivation of aflatoxin by human liver microsomes: Role of Cytochrome P450 IIIA Enzymes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 108: 436-447.
- Reye, R.D.K., Morgan, G. & Baral, J. 1963. Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera: A disease entity in childhood. **Lancet**, 2: 749-752.
- Riley, J., Mandel, H.G., Sinha, S., Judah, D.J. & Neal, G.E. 1997. *In vitro* activation of the human Harvey-ras protooncogene by aflatoxin B₁. **Carcinogenesis**, 18: 5825-5829.
- Roebuck, B.D., Liu, Y.L., Rogers, A.E., Groopman, J.D. & Kensler, T.W. 1991. Protection against aflatoxin B₁-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats by 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiole-3-thione (Oltipraz): predictive role for short-term molecular dosimetry. **Cancer Research**, 51:5501–5506.

Ross, R.K., Yuan, J.-M., Yu, M.C., Wogan, G.N., Qian, G.S., Tu, J.T., Groopman, J.D., Gao, Y.T. & Henderson, B.E. 1992. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. **Lancet**, 339:943-946.

Sabbioni G., Ambs, S., Wogan, G.N. & Groopman, J.D. 1990. The aflatoxin-lysine adduct quantified by high-performance liquid chromatography from human serum albumin samples. **Carcinogenesis**, 11: 2063-2066.

Sabbioni, G., Skipper, P.L., Buchi, G. & Tannenbaum, S.R. 1987. Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B₁ *in vivo* in rats. **Carcinogenesis**, 8: 819-824.

Santos, R. C. 2000. BRS 151 L-7: Nova cultivar de amendoim para as condições do nordeste brasileiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35(3): 665-670.

Santuário, J.M., Mallmann, C.A., Rosa, A.P, Appel, G., Heer, A., Dageförde, S. & Böttcher, M. 1999. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broilers chickens intoxicated with aflatoxins. **British Poultry Science**, 40:115-119.

Schottenfeld, D. & Beebe-Dimmer, J. 2005. Advances in Cancer Epidemiology: Understanding causal mechanisms and the evidence for implementing interventions. **Annual Review of Public Health**, 26:37-60.

Scott, P. 1995. Natural Toxins. Chapter 49:1-49 pp. Ed. Official Methods of Analysis Ed. Patricia Cunniff . 16 th Edition. AOAC International Virginia, USA.

Secretaría de Salud. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA 1-2002. Productos y servicios: Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal, especificaciones sanitarias. **Diario Oficial de la Federación**, 2002: 11 de marzo de 1999.

Shank, R.C., Bourgeois, C.H., Keschamras, N. & Chandavimol, P. 1971. Aflatoxin in autopsy specimens from Thai children with an acute disease of unknown aetiology. **Food and Cosmetics Toxicology**, 9: 501-507.

Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P. & Sutter, T.R. 1996. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. **Cancer Research**, 56: 2979-2984.

Shimada, T., Oda, Y., Gillam, E.M. J., Guengerich, F.P. & Inoue, K. 2001. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009. **Drug Metabolism and Disposition**, 29: 1176-1182.

Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. & Guengerich, F.P. 1994. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 japaneses and 30 caucasians. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 270(4): 14-423.

Sinha, S., Webber, C., Marshall, C.J., Knowles, M.A., Procter, A., Barrass, N.C. & Neal, G.E. 1988. Activation of *ras* oncogenes in aflatoxin-induced rat liver carcinogenesis. **Procedures of Natural Academy of Sciences, USA**, 85: 3673-3677.

Smela, M.E., Currier, S.S., Bailey, E.A. & Essigmann, J. 2001. The chemistry and biology of aflatoxin B₁: from mutational spectrometry to carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 22:535-545.

Sodhi, S., Brar, A.P.S., Ghai, J.K. & Brar, R.S. 2005. Biochemical and immunological effects of dietary exposure to aflatoxin B₁ in broiler chicks. **Indian Journal of Poultry Science**, 40(2):155-157.

Soini, Y., Chia, S.C., Bennett, W.P., Groopman, J.D., Wang, J.S., DeBenedetti, V.M.G., Cawley, H., Welsh, J.A., Hansen, C., Bergasa, N.V., Jones, E.A., DiBisceglie, A.M., Trivers, G.E., Sandoval, C.A., Calderon, I.E., Munoz Espinosa, L.E. & Harris, C.C. 1996. An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in hepatocellular carcinomas from Mexico. **Carcinogenesis**, 17: 1007-1012.

Sornmayura, P., Boonsakan, P., Sobhonslidsuk, A., Sriphojanart, S., Euanorasetr, C. & Bunyaratvej, S. 2007. Dysplastic nodules and small primary carcinoma of the liver: A study detecting the early morphological changes during hepatocarcinogenesis. **Journal of the Medical Association of Thailand**, 90(2): 352-362.

Sotomayor, R.E., Washington, M., Nguyen, L., Nyang'anyi, R., Hinton, D. M. & Chou, M. 2003. Effects of intermittent exposure to aflatoxin B1 on DNA and RNA adduct formation in rat liver: dose-response and temporal patterns. **Toxicological Sciences**. 73:329-338.

Squire, R.A. 1981. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. *Science*, 214:877-880.

Staib, F., Hussain, P., Hofseth, L.J., Wang, X. W & Harris, C. 2003. TP53 and liver carcinogenesis. **Human Mutation**, 21: 201-216.

Stroka, J., Anklam, E., Jörissen, U. & Gilbert, J. 2000. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. **Journal of AOAC International**, 83(2): 320-40.

Stromeyer, F.W., Ishak, K.G., Gerber, M.A. & Mathew, T. 1980. Ground glass cells in hepatocellular carcinoma. **American Journal of Clinical Pathology**, 74: 254-258.

Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R.V., Breiman, R., Brune, M.N., DeCock, K., Dilley, A., Groopman, J., Hell, K., Henry, S.H., Jeffers, D., Jolly, C., Jolly, P., Kibata, G.N., Lewis, L., Liu, X., Lubber, G., McCoy, L., Mensah, P., Miraglia, M., Misore, A., Njapau, H., Ong, C.N., Onsongo, M.T.K., Page, S.W., Park, D., Patel, M., Phillips, T., Pineiro, M., Pronczuk, J., Rogers, H.S., Rubin, C., Sabino, M., Schaafsma, A., Shephard, G., Stroka, J., Wild, C., Williams, J.T. & Wilson, D. 2006. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. **Environmental Health Perspectives**, 114:1898–1903.

Stuver, S.O. 1998. Towards global control of liver cancer? **Cancer Biology**, 8:299-306.

Sugiyama, A., Ishikura, N., Habano, W., Nemoto, K., Ueno, Y. & Tashiro, F. 2000. Overexpression of 14-3-3 beta gene and its role in aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma cells. **Mycotoxins**, 50(2):83-91.

Sun, C.A., Wu, D.M., Lin, C.C., Lu, S.N., You, S.L., Wang, L.Y., Wu, M.H. & Chen, C.J. 2003. Incidence and cofactors of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study of 12008 men in Taiwan. **American Journal of Epidemiology**, 157: 674-682.

Sweeney, M.J. & Dobson, A.D.W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, 175:149-163.

Swenson, D.H., Lin, J.K., Miller, E.C. & Miller, J.A. 1977. Aflatoxin B1-2 3 oxide: as a probable intermediate in the covalent binding of aflatoxins B1 and B2 to rat liver DNA and ribosomal RNA "in vivo". **Cancer Research**, 37: 172-181.

Tabarin, A., Bioulac-Sage, P., Boussaire, L., Balakand, C., de Mascard, A. & Grimaud, J.A. 1987. Hepatocellular carcinoma developed in noncirrhotic livers: sinusoids in hepatocarcinoma. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, 111: 174-180.

Tabor E. 1994. Tumor suppressor genes, growth factor genes, and oncogenes in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. **Journal of Medical Virology**, 42:357–365.

- Talamini, R., Polesel, J., Montella, M., Dal-Maso, L., Crispo, A., Tommasi, L.G., Izzo, F., Crovatto, M., La-Vecchia, C. & Franceschi, S. 2006. Food groups and risk of hepatocellular carcinoma: A multicenter case-control study in Italy. **International Journal of Cancer**, 119(12):2916-2921.
- Tashiro, F., Morimura, S., Hayashi, K., Makino, R., Kawamura, H., Horikoshi, N., Nemoto, K., Ohtsubo, K., Sugimura, T. & Ueno, Y. 1986. Expression of the *c-Ha-ras* and *c-myc* genes in aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinomas. **Biochem Biophys Res Commun**, 138; 858-864.
- Thuvander, A., Moller, T., Barbieri, H.E., Jansson, A., Salomonsson, A.C. & Olsen, M. 2001. Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. **Food Additives and Contaminants**, 18: 696-706.
- Tovar-Guzmán, V., Hernández-Girón, C., Barquera, S., Rodríguez-Salgado, N. & López-Carrillo, L. 2001. Epidemiologic panorama of stomach cancer mortality in Mexico. **Archives of Medical Research**, 32: 312-317.
- Trichopoulos, D., Day, N.E., Kaklamani, E., Tzonou, A., Munoz, N., Zavitsanos, X., Koumantaki, Y. & Trichopoulou, A. 1987. Hepatitis B, tobacco smoking and ethanol consumption in the etiology of hepatocellular carcinoma. **International Journal of Cancer**, 39: 45-49.
- Turner, P.C., Collison, A.C., Cheung, Y.B., Gong, Y.Y., Hall, A.J., Prentice, A.M., & Wild, C.P. 2007. Aflatoxin exposure *in utero* causes growth faltering in Gambian infants. **International Journal of Epidemiology**, 36:1119-1125.
- Uchida, T., Suzuki, K., Esumi, M., Arii, M. & Shikata, T. 1988. Influence of aflatoxin B1 intoxication on duck livers with duck hepatitis B virus infection. **Cancer Research**, 48(6):1559-1565.
- Vergeres, G. & Waskell, L. 1995. Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. **Biochimie**, 77: 604-620.
- Villa, E., Moles, A., Ferretti, I., Buttafoco, P., Grotola, A., Del Buono, M., De Santis, M. & Manenti, F. 2000. Natural history of inoperable hepatocellular carcinoma: estrogen receptors status in the tumor is the strongest prognostic factor for survival. **Hepatology**, 32: 233-238.
- Walsh, A.A., Hsieh, D.P.H. & Rice, R.H. 1992. Aflatoxin toxicity in cultured human epidermal cells: stimulation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. **Carcinogenesis**, 13: 2029-2033.
- Wang, J.S. & Groopman, J.D. 1999. DNA damage by mycotoxins. **Mutation Research**, 424: 167-181.
- Wang, L., Hatch, M., Chen, C., Levin, B., You, S., Lu, S., Wu, M., Wu, W., Wang, L., Wang, Q., Huang, G., Yang, P., Lee, H. & Santella, R. 1996. Aflatoxin exposure and risk of hepatocellular carcinoma in Taiwan. **International Journal of Cancer**, 6.7: 620-625.
- Warholm, M., Guthenberg, C., Bahr, C.V & Mannervik, B. 1985. Glutathione transferases from human liver. **Methods in Enzymology**, 113: 499-504.
- Werck-Reichhart, D. & Feyereisen R. 2001. Cytochromes P-450: a success story. **Genome Biology**, 1: 1-8.
- WHO, 2000. World Health Organization. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicines, WHO/EDM/TRM/2000.1, WHO, Geneva.
- Wild, C.P & Hall, A.J. 2000. Primary prevention of hepatocellular cancer in developing countries. **Mutation Research**, 462: 381-393.
- Wild, C.P. 2007. Aflatoxin exposure in low and middle income countries: the critical interface of agriculture and health. **Food and Nutrition Bulletin**, 28: S372-S380.
- Wild, C.P., Garner, R.C., Montesano, R. & Tursi, F. 1986a. Aflatoxin B1 binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats. **Carcinogenesis**, 7:853-858.

- Wild, C.P., Jansen, L.A.M., Cova, J. & Montesano, R. 1993. Molecular dosimetry of aflatoxin exposure: contribution to understanding the multifactorial etiopathogenesis of primary hepatocellular carcinoma with particular reference to hepatitis B virus. **Environmental Health Perspectives**, 99:115-122.
- Wild, C.P., Jiang, Y.Z., Allen, S.J., Jansen, L.A.M., Hall, A.J. & Montesano, R. 1990 a. Aflatoxin-albumin adducts in human sera from different regions of the world. **Carcinogenesis**, 11: 2271–2274.
- Wild, C.P., Jiang, Y.Z., Sabbioni, G., Chapot, B. & Montesano, R. 1990 b. Evaluation of methods for quantitation of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. **Cancer Research**, 50: 245–251.
- Wild, P.C., Umbenhauer, D., Chapot, R. & Montesano, R. 1986b. Monitoring of individual human exposure to aflatoxin (AF) and *N*-Nitrosamines (NNO) by immunoassays. **Journal of Cellular Biochemistry**, 30: 171- 179.
- Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, Y., Johnson, E.F. & McRee, D.E. 2000. Mammalian microsomal cytochrome P-450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. **Molecular Cell**, 5: 121-131.
- Wogan, G.N. 1973. Aflatoxin carcinogenesis. **Methods Cancer Research**. 7:309-344.
- Wogan, G.N. 1991. Aflatoxins as risk factors for primary hepatocellular carcinoma in humans. **Pennington Center Nutrition Series**, 1:3-17.
- Wogan, G.N. 1992. Aflatoxins as risk factors for primary hepatocellular carcinoma in humans. **Cancer Research Supplement**, 52: 2114s-2118s.
- Wogan, G.N., Hecht, S.S., Felton, J.S., Conney, A. H. & Loeb, L.A. 2004. Environmental and chemical carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, 14:473-486.
- Wong, C.M., Fan, S.T., Ng, I.O. 2001. Beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. **Cancer**, 92:136–145.
- Wong, Z.A. & Hsieh, D.P.H. 1980. Aflatoxicol: major aflatoxina B₁ metabolite in rat plasma. **Science**, 200: 325-327.
- Wyllie, T.D. & Morehouse, L.G. Eds. 1978. Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook. Vol. 3. Marcel Dekker, Inc New York, USA. 202 pp.
- Yip, S.S.M. & Coulombe, R.A. 2006. Molecular cloning and expression of a novel cytochrome P₄₅₀ from turkey liver with aflatoxin oxidizing activity. **Chemical Research in Toxicology**, 19(1):30-37.
- Yu, J., Cleveland, T.E., Nierman, W.C. & Bennett, J.W. 2005. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micología**, 22:194–202.
- Yu, J., Woloshuk, C.P., Bhatnagar, D. & Cleveland, T.E. 2000. Cloning and characterization of *avfA* and *omtB* genes involved in aflatoxin biosynthesis in three *Aspergillus* species. **Gene**, 248:157-167.
- Yu, S.Z. 1995. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 10: 674-682.
- Zhu, J.Q., Zhang, L.S., Hu, X., Xiao, Y., Chen, J.S., Xu, Y.C., Fremy, J. & Chu, F.S. 1987. Correlation of dietary aflatoxin B₁ levels with excretion of aflatoxin M₁ in human urine. **Cancer Research**, 47: 1848–1852.
- Ziglari, T., Allameh, A., Razzaghi-Abyaneh, M., Khosravi, A.R. & Yadegari, M.H. 2008. Comparison of Glutathione S-transferase activity and concentration in aflatoxin-producing and their non-toxinogenic counterpart isolates. **Mycopathologia**, 166:219-226.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Ocho muestras con antecedentes de hepatopatías o carcinomas que no pueden ser controles y no se analizaron.

Muestra	Fecha de muerte	Diagnostico de Autopsia	Diagnóstico de Hígado	Sexo H/M	Edad (años)	Marcadores de hepatitis viral negativos	Pruebas de función hepática	Pruebas serológicas normales	Úlcera gástrica, sin enfermedad hepática	Origen	Trabajo
A08-611	12/10/08	Carcinoma de células grandes de pulmón	Esteatosis macrovesicular	H	70	No tiene	No realizadas	No tiene	No	Estado de México	Recolector papel y plástico
A08-597	02/10/08	Carcinoma epidermoide de lengua	Sin alteraciones histológicas	H	67	No tiene	Anemia.	No tiene	No	D.F.	Desempleado
A08-605	08/10/08	Alcoholismo crónico	Cirrosis hepática macro y micronodular	H	43	No tiene	Insuficiencia hepática crónica	No tiene	No	D.F.	Vendedor ambulante
A08-616	14/10/08	Infección por virus de hepatitis C	Cirrosis hepática macro y micronodular	H	49	No tiene	Insuficiencia hepática crónica	No tiene	Agudas	D.F.	Desempleado
A08-624	16/10/08	Alcoholismo crónico	Cirrosis hepática macro y micronodular	H	43	No tiene	Insuficiencia hepática crónica	No tiene	No	San Luis Potosí	Desempleado
A08-629	20/10/08	Linfoma Hodgkin variedad celularidad mixta	Normal	H	33	No tiene	No tiene	No tiene	No	D.F.	Desempleado
A08-637	23/10/08	Adenocarcinoma gástrico tipo intestinal	Metástasis de carcinoma gástrico	H	78	No tiene	Hipoalbuminemia , resto parámetros normales	No tiene	No	Coahuila	Desempleado
A08-640	25/10/08	Granulomatosis de Wegener	Esteatohepatitis alcohólica con fibrosis leve	H	46	No tiene	No tiene	No tiene	No	D.F.	Empleado de servicios

Anexo 2: Siete muestras de hígado humano con carcinoma o hepatopatía, no analizadas, sin marcadores de hepatitis viral ni pruebas serológicas normales.

Muestra	Fecha de muerte	Diagnóstico de Autopsia	Diagnóstico de Hígado	Sexo	Edad (años)	Pruebas de función hepática	Con úlcera gástrica y sin enfermedades hepáticas	Lugar de Nacimiento	Trabajo
A08-697	28/11/08	Glomerulosclerosis global, extenso daño túbulo intersticial, riñones terminales, quizá glomerulopatía crónica.	S. A. H.	M	38	Anemia, hipoalbuminemia.	No	D.F.	Sin trabajo
A08-703	01/12/08	Historia de adenocarcinoma moderadamente diferenciado del colón derecho.	Metástasis e insuficiencia hepática.	H	68	Albúmina 2.17 g/dL, TP12.2", BT 1.31 mg/dL, BI 1.19, TGO 25 U/L, TGP 28	Gastritis aguda erosiva, 3L de sangre en estómago, esofagitis aguda ulcerada, <i>Candida sp.</i> +	Hidalgo	Empleado
A08-706	03/12/08	Úlceras pépticas gástricas crónicas activas, 3L de sangre en tubo digestivo, adenocarcinoma prostático poco diferenciado	S.A.M.	H	67	Normales	Gastritis crónica inactiva, metaplasia intestinal incompleta y esofagitis aguda ulcerada.	D.F.	Artesano
A08-732	29/12/08	Diabetes mellitus tipo 2 de 10 años de diagnóstico, nefropatía diabética.	S.A.M.	H	70	Normales	Gastritis crónica	D.F.	Desempleado
A08-734	31/12/08	Diabetes mellitus tipo 2 de 25 años de diagnóstico, nefropatía diabética.	S.A.M.	M	65	Normales	Gastritis crónica antral no atrófica	Se desconoce	Desempleada
A08-736	31/12/08	Adherencia fibrosa interasa (yeyuno-cecal), vólvulo de intestino delgado con enteritis isquémica aguda	S.A.M.	H	72	Normales	Sin alteraciones	Se desconoce	Se desconoce
A09-044	09/02/09	Diabetes mellitus tipo 2 de 30 años de diagnóstico.	S. A. H.	H	63	Anemia leve, pruebas de función hepática no reportadas	No	Guanajuato	Desempleado

Neg. = negativos; Rpn= resto de parámetros normales; + = positiva; S.A.M.= Sin alteraciones macroscópicas; S.A.H.= Sin alteraciones histológicas.

Anexo 3: Muestra de HCC que llegó después del análisis, ya no se incluyó.

Muestra	Fecha de muerte	Diagnostico de	Autopsia	Sexo	Edad (años)	Marcadores de hepatitis viral negativos	Pruebas de función hepática	Pruebas serológicas normales	Origen	Trabajo	Observaciones
16-HCC A07-687	15/12/07	Alcoholismo crónico, cirrosis hepática macro y micro nodular con HCC con patrón trabecular y sólido con trombo neoplásico en la vena porta y en la mesentérica superior.		H	47	No tiene	Insuficiencia hepática crónica	No	D.F.	Se desconoce	Laparotomía exploradora y resección intestinal (10 cm) por accidente de auto y transfusión sanguínea 25 años previos a su muerte. Hernioplastía inguinal derecha y hepatopatía alcohólica diagnosticada 1 año antes de morir, tratamiento con furosemide y espironolactona con apego irregular al mismo. Internamiento en el Hospital Gea González 4 meses previos a morir por síndrome de hipertensión portal y hemorragia de tubo digestivo alto. Se le ligaron las varices esofágicas (3 paquetes). Pérdió 15 kg de peso en 4 meses.

Anexo 4: Quince muestras control de hígado humano, sin marcadores de hepatitis viral y pruebas serológicas.

Muestra	Fecha de muerte	Diagnóstico de Autopsia	Diagnóstico de Hígado	Sexo	Edad (años)	Pruebas de función hepática	Con úlcera gástrica y sin enfermedades hepáticas	Lugar de Nacimiento	Trabajo
1.A08-278	06/05/08	Tromboembolias pulmonares bilaterales	Normal	M	46	No tiene	No	Chiapas	Ama de casa
2.A08-289	10/05/08	Pénfigo seborreico generalizado	Normal	M	25	Hipoalbuminemia, Rpn.	No	Edo. Méx.	Ama de casa
3.A08-379	16/06/08	Diabetes mellitus tipo 2	Esteatosis macrovesicular	H	57	Hipoalbuminemia y transaminasas altas	Sí (esófago-gástrica)	D.F.	Chofer
4.A08-591	26/09/08	Glomerulopatía crónica	S.A.M.	M	33	Hipoalbuminemia, Rpn.	No	Edo.México	Ama de casa
5.A08-592	29/09/08	Choque hipovolémico por embarazo tubario izquierdo roto	S.A.H.	M	26	No realizadas	No	Guadalajara	Ama de casa
6.A08-601	06/10/08	Desnutrición calórico proteica/ Tiflitis infecciosa	S.A.M.	M	55	Hipoalbuminemia, Rpn.	No	Puebla	Ama de casa
7.A08-609	11/08/08	Persistencia del conducto arterioso	Normal	M	51	Normales	No	D.F.	
8.A08-614	13/10/08	Gastritis crónica folicular, choque hipovolémico	Normal	H	55	Normales	Sí	D.F.	Desempleado
9.A08-633	21/10/08	Obesidad mórbida	Normal	M	35	Insuficiencia hepática	No	D.F.	Ama de casa
10.A08-642	28/10/08	Cardiopatía isquémica crónica		M	60		No	D.F.	Ama de casa
11.A08-646	30/10/08	Diabetes mellitus tipo 2	S.A.M.	H	52	Hipoalbuminemia y largos tiempos de coagulación	No	Edo.México	Desempleado
12.A08-651	04/11/08	Lupus eritematoso sistémico	S.A.M.	M	45	Insuficiencia hepática crónica	No	D.F.	Desempleada
13.A08-653	05/11/08	Lupus eritematoso sistémico	Normal	H	34	Hipoalbuminemia y transaminasas altas	No	D.F.	Inactivo
14.A08-682	20/11/08	Diabetes mellitus tipo 2, diagnóstico de 23 años	S.A.H.	H	44	Anemia.	No	D.F.	Estudiante
15.A08-692	26/11/08	Leptomeningitis piógena.	Cirrosis hepática y esteato hepatitis quizá alcohólica	H	24	Insuficiencia hepática crónica	Adenocarcinoma gástrico úlcero – infiltrante intestinal T3Nx M0	D.F.	Sin trabajo

S.A.M.= Sin alteraciones macroscópicas. S.A.H.= Sin alteraciones histológicas.

Anexo 5: Diez muestras de hepatocarcinomas humanos con insuficiencia hepática crónica, marcadores de VH- y pruebas serológicas normales fijadas con formol al 10%.

Muestra	Fecha de muerte	Diagnóstico de autopsia y del hígado.	Sexo	Edad (años)	Úlcera gástrica, enfermedad no hepática	Lugar de Origen	Trabajo	Antecedentes de importancia
1-HCC A07-552	27/09/07	Carcinoma hepatocelular localizado en hígado (t2 n0 m0) con cirrosis idiopática.	M	57	No	Estado de México	Ama de casa	Diabetes mellitus con 14 años de evolución, hernioplastia y cesárea 15 años antes, alcoholismo ocasional, cirrosis hepática de 8 años de evolución, esplenectomía por esplenomegalia de 1 año de evolución con transfusión sanguínea.
2-HCC A08-136	10/03/08	Cirrosis hepática macro y micronodular viral con HCC multinodular poco diferenciado (con patrones acinar, células claras y de células gigantes multinucleadas), trombotosis neoplásica de vena porta y n metástasis pulmonares bilaterales (t4, n0. M1; estadio clínico IVB)	M	64	No	Estado de México	Ama de casa	Historia de transfusión sanguínea única 30 años previos en el puerperio.
3-HCC A07-689	16/12/07	Alcoholismo crónico. Cirrosis hepática macro y micronodular con HCC con patrones sólido, trabecular y acinar, trombotosis de la vena porta con metástasis en el bazo y de la glándula suprarrenal derecha y con invasión linfática del páncreas.	H	58	No	No se sabe	Abogado	35 años de alcoholismo que suspendió 2 años antes de ingresar, embriaguez semanal. Diabetes mellitus tipo 2 de 10 años de diagnóstico tratada con glibenclamida. Hipertensión arterial sistémica de 15 años de diagnóstico sin manejo. Con insuficiencia hepática 2 años previos a su ingreso, 2 internamientos en clínicas del IMSS y hemorragia de tubo digestivo; hace 25 años se le realizó descompresión radicular.
4-HCC A07-590	18/10/07	Cirrosis hepática predominantemente macronodular asociado a HCC en el lóbulo derecho.	H	77	Úlcera péptica crónica en antro, activa, sellada con cabeza del páncreas	D.F.	Desconocido	Alcoholismo crónico de 10 años de duración. Cirugía renal por nefrolitiasis, no determinó hace cuanto. Hipertensión arterial sistémica de 3 años de diagnóstico, tratada.
5-HCC A07-403	12/07/07	HCC multicéntrico originado en hígado cirrótico, afecta ambos lóbulos hepáticos e invade la vena porta, con metástasis pulmonar subpleurales y en ganglios linfáticos mediastinales (T4 N1 M1)	M	56	No	Veracruz	Ama de casa	Transfusión sanguínea 20 años previos, no se menciona contexto en protocolo de autopsia. Insuficiencia hepática Child-Pugh C.
6-HCC A08-481	04/08/08	Alcoholismo crónico, cirrosis hepática macro y micronodular, con HC multinodular con patrones sólidos y de células claras, con metástasis pulmonar bilateral, e invasión del plexo venoso submucoso del esófago (T4, N0, M1; estadio clínico IVB).	H	48	No	D.F.	Hojalatero	Padre finado por CA pulmonar no especificado. 30 años de alcoholismo y de tabaquismo dejó de consumirlos 3 meses previos a morir. Consumo de marihuana y cocaína, intensidad del consumo desconocida. HCC diagnosticado por biopsia el 28/07/08 fuera de este hospital.
7-HCC A08-224	15/04/08	Alcoholismo crónico, cirrosis hepática macro y micronodular con HCC poco diferenciado con patrones sólido, trabecular y acinar con trombotosis de la vena porta y metástasis pulmonares.	H	73	No	D.F.	Desempleado	Alcoholismo por 30 años (>100g/día). Diagnóstico de cirrosis hepática alcohólica y várices esofágicas sangrantes grado IV de 3 meses en el Hospital General Balbuena, sin especificar tratamiento endoscópico y egresado con propranolol 20mg/24h y espironolactona 50 mg/24h.
8-HCC A07-527	13/09/07	Alcoholismo crónico intenso (20 años). HCC bien diferenciado (G1) asociado a cirrosis hepática macro y micronodular (pT1, pN0, pM0).	H	71	Úlcera péptica duodenal perforada y sellada	D.F.	Desconocida	Alcoholismo intenso de 20 años, tabaquismo intenso de 20 años, diabetes mellitus tipo 2 de 2 años.
9-HCC A07-598	22/10/07	Cirrosis hepática micro y macronodular asociada a HCC	H	47	No	D.F.	Jornalero	Alcoholismo en una ocasión cada dos meses, una copa. Hepatitis de etiología a determinar 27 años previos a su ingreso. Septumplastía a los 30 años de edad sin complicaciones. Diabetes mellitus tipo 2 de 5 años de diagnóstico, se trato con dieta. Salmonelosis 25 años previos a su internamiento. Inmunología 17/oct/07, Alfa fetoproteína 3µg/mL, Antígeno carcinoembrionario 1.26 ngmL ⁻¹ , HBs Ag (-), anti HBs (-), anti HA IgM (-), anti HC (-)
10-HCC A08-712	08/12/08	Fibrosis hepática con carcinoma hepatocelular bien diferenciado y trombotosis neoplásica pulmonar bilateral.	H	79	Várices esofágicas, sangrado de tubo digestivo alto.	Oaxaca	Desempleado	Alcoholismo crónico intenso. Enfermedad de Parkinson de reciente diagnóstico. Pruebas de función hepática: BT 1.93, BI 0.97, Alb2.6, TGO 296, TGP 63 GGT 402, DHL 405

HV - =Marcadores de Hepatitis viral negativa; HCC = Hepatocarcinoma celular

Anexo 6: Cinco muestras con hepatocarcinoma fijadas con formol al 10% y embebidas en parafina.

Muestra	Fecha de muerte	Diagnóstico de autopsia y del hígado.	Sexo	Edad (años)	Marcador de HV. Prueba serológica normal	Pruebas de función hepática	Úlcera gástrica, enfermedad no hepática	Lugar de Origen	Trabajo	Antecedentes de importancia
11-HCC 03-138 A/B	05/03/03	HCC multicéntrico asociado con cirrosis hepática macronodular	M	65	No tiene	Albúmina 1.23, BT 9, BD 7.2, TGO 1787, TGP 1438, leucocitos 19,300, Hemoglobina 7.7, TP 25"	Várices esofágicas rotas con 2 L de sangre en tubo digestivo, ascitis.	D.F.	Hogar	Diagnóstico de hepatitis inespecífica (postransfusional, es probable que haya sido hepatitis C
12-HCC 03-226 E/D	13/04/03	Cirrosis micronodular con HCC y colangiocarcinoma (tumor de colisión); trombosis neoplásica de la vena porta y tronco celiaco, metástasis pulmonares, en glándulas suprarrenales y ganglios linfáticos regionales	M	86	No tiene	Leucocitos 23,100, Hemoglobina 7.6, Plaquetas 172,000, TP 48.7"	Úlcera péptica crónica activa gástrica, con 2000 mL de sangre en tubo digestivo	Michoacán	Hogar	Alcoholismo crónico intenso, consumo crónico de AINES
13-HCC 03-296 A/D	19/05/03	CA hepatocelular multicéntrico más adenocarcinoma de vesícula biliar (tumor de colisión), metástasis ováricas derechas y carcinomatosis peritoneal extensa.	M	78	No tiene	Albúmina 1.02, BT 1.10, BD 0.73, BI 0.37, TGO 32, TGP 20, ALP 465, TP 15".	Sin alteraciones	Oaxaca	Se desconoce	Ninguno
14-HCC 03-415 A/E	05/07/03	CA hepatocelular multicéntrico con afección de la vena porta	H	57	No tiene	Hemoglobina 10.5, Albúmina 4.26, BT 3.44, BD 2.41, TGO 85, TGP 80, TP 13.2"	Várices esofágicas rotas y 4 L de sangre en tubo digestivo; diagnóstico endoscópico: gastropatía inflamatoria intensa en cuerpo y antro.	Michoacán	Sin empleo	Diagnóstico de probable hepatitis viral 20 años previos (no tiene serología)
15-HCC 03-458 C/E	01/08/03	CA hepatocelular multicéntrico poco diferenciado que infiltra vesícula biliar, con trombos neoplásicos en pulmones, páncreas, vena cava inferior y vena porta. Cirrosis hepática macro y micronodular.	M	65	No tiene	Hemoglobina 16.8, TP 16.8", Na 130 mmol/L, K 6.75mmol/L, TGO 142, TGP 44, BT 1.63, BD 1.04, BI 0.59, ALP 536.	Várices esofágicas rotas con 1L de sangre en tubo digestivo, gastritis crónica aguda y, esofagitis aguda ulcerada.	Edo. de México	Hogar	Alcoholismo crónico intenso

Anexo 7: Curvas de calibración de AF.

Tabla A: Resultados de la curva de calibración de AFB₁.

Concentración de AF en la curva de calibración (ng mL ⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
2	7.319	6.10
5	7.311	5.60
10	7.313	12.10
15	7.307	18.53
20	7.313	23.50
30	7.314	33.73
50	7.313	52.27
100	7.318	116.50
200	7.320	240.20

Tabla B: Resultados de la curva de calibración de AFB₂.

Concentración de AF en la curva de calibración (ng mL ⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
2	16.655	4.53
5	16.676	10.87
10	16.656	20.00
15	16.646	30.13
20	16.650	44.37
30	16.690	62.67
50	16.683	106.27
100	16.698	205.50
200	16.853	390.50

Tabla C: Resultados de la curva de calibración de AFG₁.

Concentración de AF en la curva de calibración (ng mL ⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
2	5.836	4.77
5	5.818	12.27
10	5.846	27.47
15	5.776	39.27
20	5.733	54.80
30	5.735	74.70
50	5.728	125.63
100	5.719	250.03
200	5.706	507.83

Tabla D: Resultados de la curva de calibración de AFG₂.

Concentración de AF en la curva de calibración (ng mL⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
2	11.636	0.95
5	11.482	2.80
10	11.427	5.97
15	11.098	8.90
20	11.001	11.90
30	10.925	17.89
50	11.251	29.90
100	11.187	60.37
200	11.159	103.57

Tabla E: Resultados de la curva de calibración de AFM₁.

Concentración de AF en la curva de calibración (ng mL⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
2	10.194	0.87
5	10.815	2.43
10	10.543	4.30
15	10.409	6.20
20	10.307	7.90
30	10.249	11.43
50	10.146	18.90
100	10.094	35.77
200	10.079	71.23

Tabla F: Resultados de la curva de calibración de AFM₂.

Concentración de AFM₂ en la curva de calibración (ng mL⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
7.8	19.100	0.13
15.63	19.065	0.21
31.25	18.941	0.93
62.5	18.883	2.37
125	18.791	7.60
250	19.406	13.30
500	19.079	40.90
1000	18.965	88.46

Tabla G: Resultados de la curva de calibración de AFP₁.

Concentración de AFP₁ en la curva de calibración (ng mL⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
7.8	5.178	0.101
15.63	5.128	0.243
31.25	5.128	0.420
62.5	5.433	0.440
125	5.560	1.970
500	5.403	6.900
1000	5.376	17.900

Tabla H: Resultados de la curva de calibración de AFL.

Concentración de AFL en la curva de calibración (µg/kg)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
2	8.835	5.37
5	8.719	6.80
10	8.608	11.77
15	8.571	28.90
20	8.559	37.50
30	8.596	55.10
50	8.517	76.50
100	8.489	137.50
200	8.421	236.43

Anexo 8: Prueba de t y transformación de Box-Cox de las concentración de ADN del grupo de hígados humanos control y con HCC purificado con la técnica de Gupta, 1984.

a) Transformación de Box-Cox.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	1	14.18	14.18	0.0217	0.8838
Error	28	18261.16	652.18		
Total	29	18275.34			

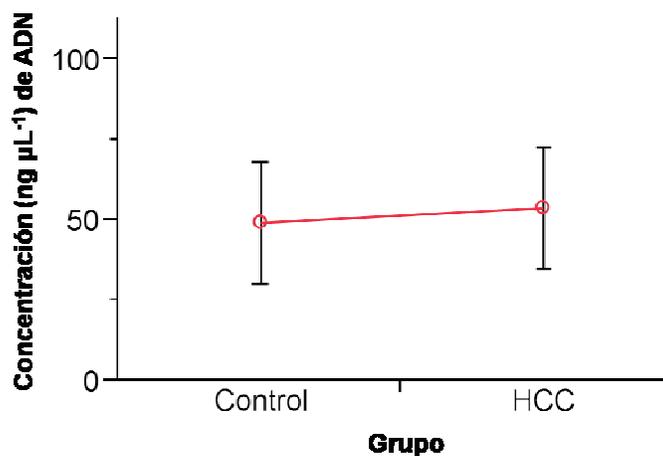


Figura 34: Gráfica de las Medias y desviación estándar de la concentración de ADN de los grupos de hígado humano Control y con HCC purificado con el método de Gupta, 1984.

Tabla 20: Medias y desviación estándar de las concentración de ADN del grupo de hígados humanos control y con HCC purificado con la técnica de Gupta, 1984.

Nivel	Media de los Mínimos Cuadrados	Error estándar	Media
Control	49.27	9.14	49.27
HCC	53.67	9.14	53.67

Anexo 9: Análisis de varianza de las AF libres extraídas de las muestras de hígado humano control y con HCC con el método de Qian y Yang, 1984.

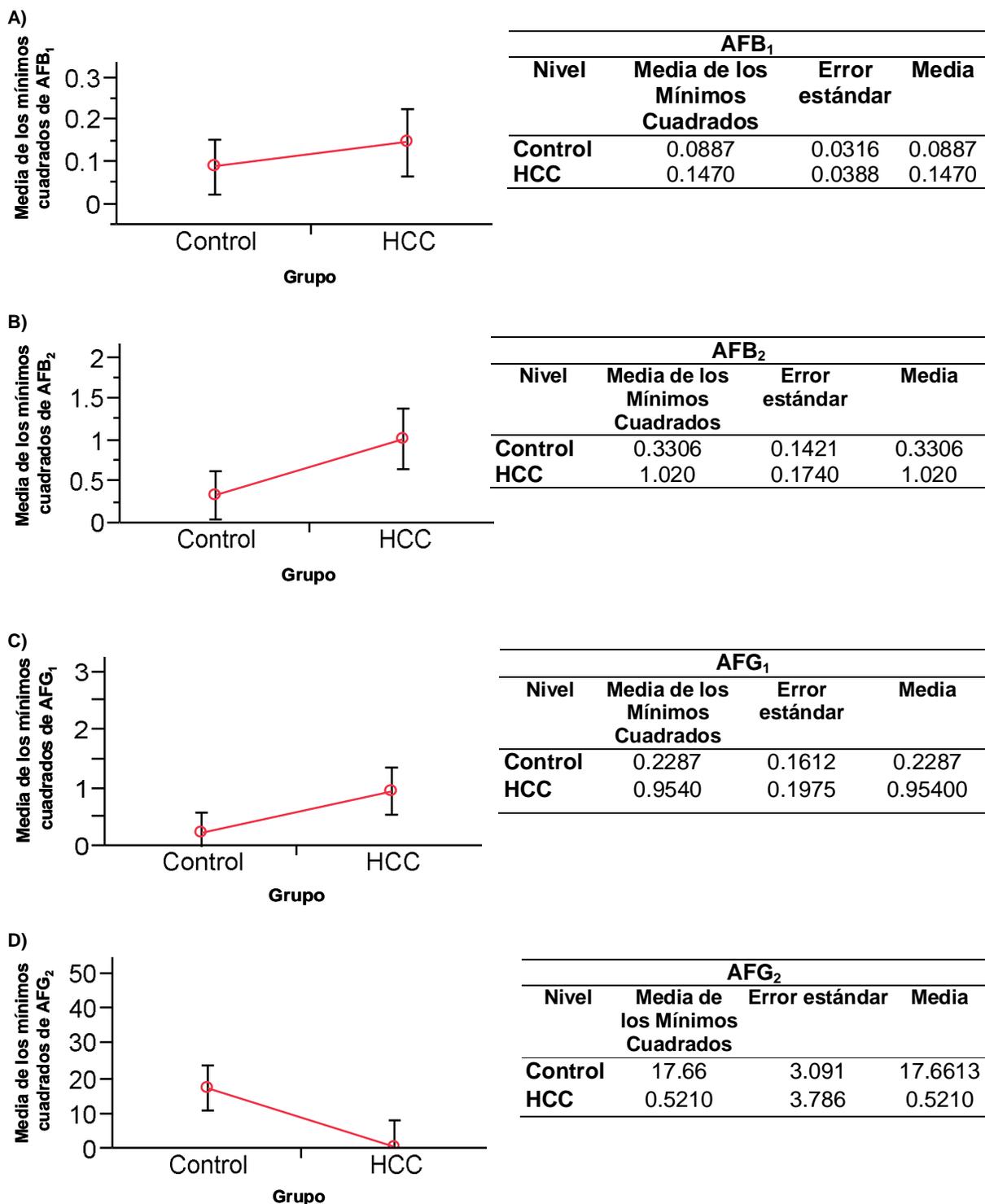


Figura 37: Medias y desviación estándar de las AF libres cuantificadas por el método de Qian y Yang, 1984, en las muestras de hígado humano control y HCC. A) AFB₁. B) AFB₂. C) AFG₁. D) AFG₂. E) AFM₁. F) AFM₂. G) AFP₁. H) AFL.

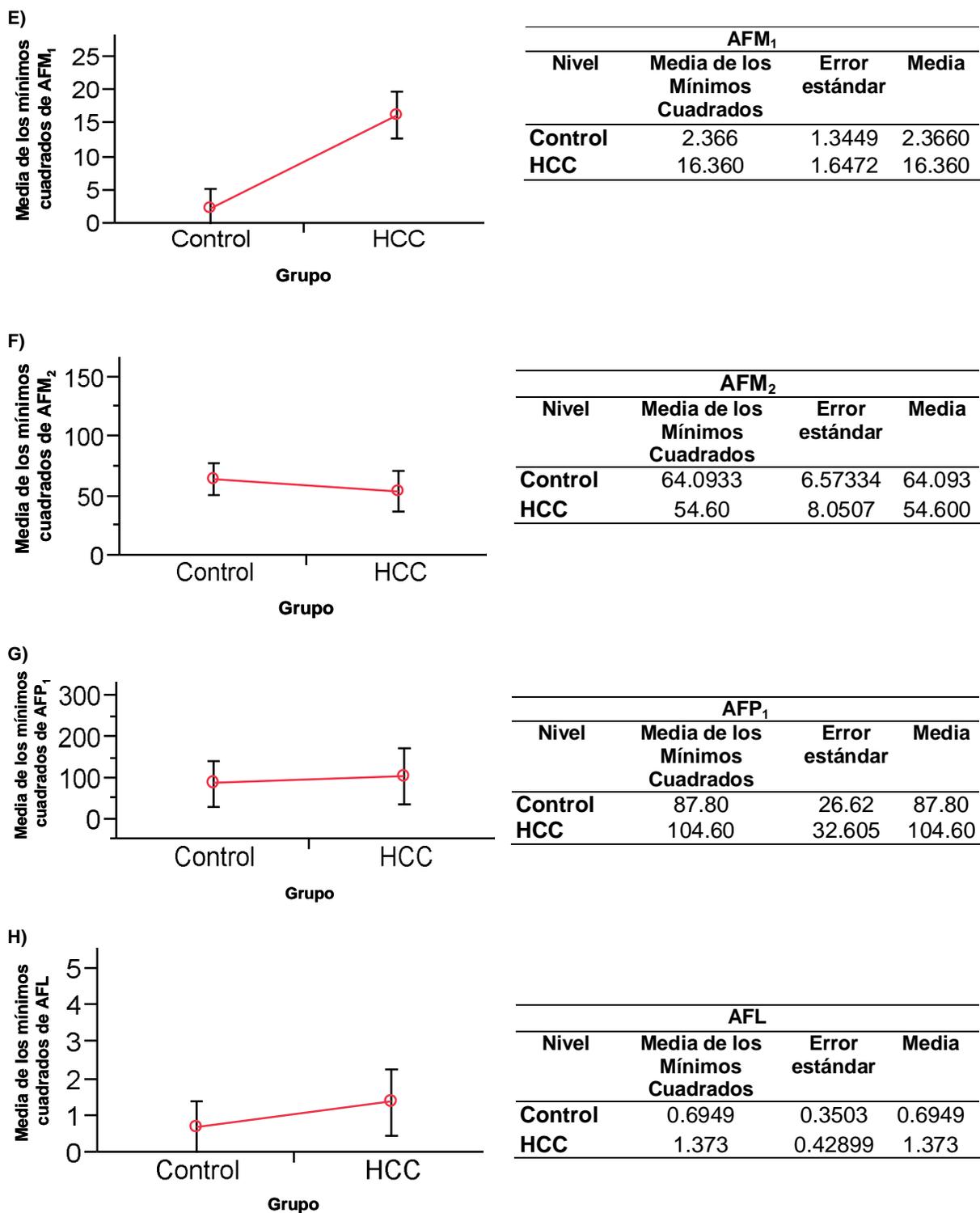


Figura 37 (Continuación): Medias y desviación estándar de las AF libres cuantificadas por el método de Qian y Yang, 1984, en las muestras de hígado humano control y HCC. A) AFB₁. B) AFB₂. C) AFG₁. D) AFG₂. E) AFM₁. F) AFM₂. G) AFP₁. H) AFL.

Anexo 10: Prueba de Wilcoxon de las AF libres extraídas de las muestras de hígado humano control y con HCC con el método de Koeltzow & Tanner, 1990.

Tipo de AF	Nivel	Cantidad	Prueba de Wilcoxon					
			Suma de resultados	Media de resultado	Desviación estándar	Chi Cuadrada	Grados de libertad	Prob > Chi Cuadrada
AFB ₁	Control	15	220.0	14.67	-0.512	0.2846	1	0.5937
	HCC	15	245.0	16.33	0.512			
AFB ₂	Control	15	208.0	13.87	-1.037	1.1196	1	0.2900
	HCC	15	257.0	17.13	1.037			
AFG ₁	Control	15	198.0	13.20	-1.440	2.1337	1	0.1441
	HCC	15	267.0	17.80	1.440			
AFG ₂	Control	15	261.5	17.43	1.216	1.5307	1	0.2160
	HCC	15	203.5	13.57	-1.216			
AFM ₂	Control	15	255.0	17.00	0.915	0.8762	1	0.3492
	HCC	15	210.0	14.00	-0.915			
AFP ₁	Control	15	203.5	13.57	-1.182	1.4475	1	0.2289
	HCC	15	261.5	17.43	1.182			
AFL	Control	15	204.0	13.60	-1.294	1.7338	1	0.1879
	HCC	15	261.0	17.40	1.294			

Anexo 11: Aflatoxinas libres (ng g⁻¹) en los sobrenadantes de muestras de hígado control humano procesadas con el Kit de Qiagen.

N° de muestra	Cantidad ng g ⁻¹ de AF en hígado humano procesado con el Kit de Qiagen.								
	Primer Sobrenadante								
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFM ₂	AFP ₁	AFL	AF totales
1	0.2	0.1	0.2	1.6	12.8	44.8	27.2	0.2	87.1
2	0.1	0.1	0.3	1.9	14.4	89.6	28.8	0.4	135.6
3	0.1	0.2	6.9	1.4	17.9	88	43.2	0.4	158.1
4	<LOQ 0.04	0.2	0.2	2.1	17.9	112.5	19.2	0.2	152.34
5	0.1	0.1	0.2	2.1	30.4	70.4	48.2	0.3	151.8
6	0.3	0.1	0.6	1.2	12.8	80	65.6	0.3	160.9
7	0.2	0.2	0.3	1.6	17.3	177.6	48.2	0.6	246
8	0.2	1.8	0.4	2.4	8	92.8	43.2	0.5	149.3
9	0.1	0.2	0.3	1.4	9.6	64.6	22.4	0.3	98.9
10	0	0.1	0.3	1.9	16.8	140.8	19.2	0.4	179.5
Total	1.3	3.1	9.6	17.7	157.9	961.1	365.1	3.6	1519.5
Promedio	0.1	0.3	1.0	1.8	15.8	96.1	36.5	0.4	151.9
	Segundo Sobrenadante								
1	0.2	0.4	0.3	1.7	0.6	36.8	24.6	0.2	64.8
2	0.9	1.1	0.3	4	1.7	52.8	46.9	0.9	108.6
3	0.3	0.1	0.3	17.0	1.8	24	68.8	0.3	112.6
4	0.4	0.1	0.2	2.2	1.0	121.6	70.4	0.3	196.2
5	0.2	0.3	0.3	19.8	0.6	120	41.6	0.3	183.1
6	0.2	0.1	0.2	3.1	0.3	121.6	28.5	0.2	154.2
7	0.6	0.1	0.2	1.1	17.6	92.8	36.8	0.1	149.3
8	0.1	0.1	0.1	3.4	19.2	31.8	29.6	0.1	84.4
9	0.5	0.1	0.1	3.1	2.7	48.6	16	0.2	71.3
10	0.3	0.1	0.1	3.1	4.4	52.8	20.8	0.1	81.7
Total	3.7	2.6	2.1	58.3	49.9	702.9	384.0	2.7	1206.2
Promedio	0.4	0.3	0.2	5.8	5.0	70.3	38.4	0.3	120.6
	Tercer Sobrenadante								
1	0.3	0.5	1.1	6.2	1.9	30.4	2718.4	0.1	2758.9
2	0.8	0.8	0.6	3.0	3.7	35.2	370.7	0.9	415.7
3	0.6	0.6	0.5	3.5	1.4	36.8	75.4	0.2	119
4	0.2	0.8	0.2	1.9	1.8	52.8	13.6	0.3	71.6
5	0.5	0.8	0.3	1.6	1.0	22.4	28.5	0.3	55.4
6	0.2	1.0	0.2	1.7	1.4	54.4	24.6	0.1	83.6
7	0.6	0.7	0.4	3.7	1.8	48.6	62.9	0.4	119.1
8	0.3	0.6	0.2	2.4	1.3	54.4	57.9	0.2	117.3
9	0.3	0.6	0.2	2.3	1.1	56	35.8	0.3	96.6
10	0.5	8.7	0.31	2.9	1.6	78.4	16.5	0.3	109.21
Total	4.2	14.9	4.0	29.1	17.0	469.4	3404.3	3.1	3946.4
Promedio	0.4	1.5	0.4	2.91	1.70	46.9	340.4	0.3	394.6
Suma total	9.2	20.5	15.7	105.1	224.9	2133.4	4153.4	9.4	6671.6
Prom. total	0.9	2.1	1.6	10.5	22.5	213.3	415.3	0.9	667.2

Anexo 12: Aflatoxinas libres (ng g⁻¹) en los sobrenadantes de muestras de hígado humano con HCC procesadas con el Kit de Qiagen.

N° de muestra	Cantidad ng g ⁻¹ de AF en hígado humano procesado con el Kit de Qiagen.								
	Primer Sobrenadante								AF totales
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFM ₂	AFP ₁	AFL	
1-HCC	0.1	<LOQ 0.03	0.20	1.0	1.9	21.9	55.9	0.34	81.4
2-HCC	0.1	<LOQ 0.01	0.10	2.9	1.2	2.0	22.7	0.20	29.2
3-HCC	0.1	0.00	0.10	2.7	1.8	1.6	17.8	<LOQ 0.08	24.2
4-HCC	0.1	<LOQ 0.02	<LOQ 0.05	2.5	1.3	1.9	16.5	<LOQ 0.03	22.4
5-HCC	0.0	<LOQ 0.01	<LOQ 0.07	2.0	1.1	2.3	12.9	<LOQ 0.04	18.4
6-HCC	0.0	<LOQ 0.02	<LOQ 0.02	3.7	3.3	2.3	3.5	<LOQ 0.03	12.9
7-HCC	0.0	<LOQ 0.01	<LOQ 0.03	4.1	2.3	1.9	12.1	<LOQ 0.04	20.5
8-HCC	0.1	<LOQ 0.01	<LOQ 0.04	4.1	1.7	2.4	12.4	<LOQ 0.04	20.8
9-HCC	0.0	<LOQ 0.01	<LOQ 0.03	4.1	2.1	2.1	8.5	<LOQ 0.06	16.9
10-HCC	0.0	<LOQ 0.01	<LOQ 0.03	4.0	2.9	1.8	9.2	<LOQ 0.05	18.0
Total	0.6	0.12	0.68	31.1	19.5	40.2	171.2	0.90	264.6
Promedio	0.1	0.01	0.07	3.1	2.0	4.0	17.1	0.09	26.5
Segundo Sobrenadante									
1-HCC	<LOQ 0.002	<LOQ 0.005	<LOQ 0.008	0.2	2.4	19.7	2.0	0.37	24.7
2-HCC	<LOQ 0.024	<LOQ 0.005	<LOQ 0.027	2.4	2.5	2.4	6.8	<LOQ 0.04	14.2
3-HCC	<LOQ 0.033	<LOQ 0.008	<LOQ 0.034	2.3	2.4	2.0	8.6	<LOQ 0.03	15.4
4-HCC	<LOQ 0.009	<LOQ 0.008	<LOQ 0.034	2.1	2.8	1.7	7.5	<LOQ 0.03	14.2
5-HCC	0.000	<LOQ 0.007	<LOQ 0.034	0.6	3.8	1.3	8.1	<LOQ 0.06	13.9
6-HCC	<LOQ 0.014	<LOQ 0.010	<LOQ 0.033	0.3	1.4	19.5	7.0	0.32	28.6
7-HCC	<LOQ 0.008	<LOQ 0.030	<LOQ 0.029	2.6	3.5	1.0	10.3	<LOQ 0.03	17.5
8-HCC	<LOQ 0.016	<LOQ 0.012	<LOQ 0.034	1.6	2.7	1.4	8.5	<LOQ 0.05	14.3
9-HCC	<LOQ 0.001	<LOQ 0.013	<LOQ 0.032	0.5	4.4	16.4	5.3	0.36	27.0
10-HCC	<LOQ 0.015	<LOQ 0.009	<LOQ 0.039	0.3	3.2	11.3	7.7	0.23	22.8
Total	0.122	0.108	0.305	12.8	29.2	77.0	71.9	1.52	192.6
Promedio	0.012	0.011	0.030	1.3	2.9	7.7	7.2	0.15	19.3
Tercer Sobrenadante									
1-HCC	<LOQ 0.080	<LOQ 0.008	<LOQ 0.03	0.84	3.6	30.3	10.3	0.3	45.5
2-HCC	<LOQ 0.041	<LOQ 0.014	<LOQ 0.03	0.28	2.6	20.5	5.3	0.4	29.2
3-HCC	<LOQ 0.006	<LOQ 0.011	<LOQ 0.03	0.39	2.9	13.3	9.1	0.3	26.0
4-HCC	<LOQ 0.007	<LOQ 0.002	<LOQ 0.04	0.26	3.9	64.5	8.2	0.1	77.0
5-HCC	<LOQ 0.005	<LOQ 0.010	<LOQ 0.02	0.80	4.4	25.2	3.8	0.0	34.2
6-HCC	<LOQ 0.013	<LOQ 0.014	<LOQ 0.02	0.27	3.8	72.3	8.4	0.2	85.0
7-HCC	<LOQ 0.002	<LOQ 0.022	<LOQ 0.02	0.31	7.2	11.5	5.9	0.6	25.6
8-HCC	<LOQ 0.009	<LOQ 0.009	<LOQ 0.02	0.28	4.1	91.9	7.4	0.3	104.0
9-HCC	<LOQ 0.012	<LOQ 0.013	<LOQ 0.02	0.23	2.9	22.9	5.6	0.3	32.0
10-HCC	<LOQ 0.013	<LOQ 0.014	<LOQ 0.01	0.25	4.4	97.0	2.7	0.4	104.8
Total	0.189	0.117	0.22	3.91	39.8	449.4	66.7	2.9	563.3
Promedio	0.019	0.012	0.02	0.39	4.0	44.9	6.7	0.3	56.3
Suma total	0.911	0.345	1.205	47.81	88.5	566.6	309.8	5.32	1020.418
Prom. total	0.131	0.033	0.12	4.79	8.9	56.6	31	0.54	102.0415

<LOQ=Bajo límite de cuantificación.

Anexo 13: Análisis estadístico de la cantidad AFB₁ de los sobrenadantes de los hígados humanos control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.

c) Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	1.7105	0.3421	18.7501	<.0001*
Error	54	0.9853	0.0182		
C. Total	59	2.6958			

d) Efectos Probados

Fuente de Variación	N	Grados de libertad	Σ de Cuadrados	F experimental	Prob > F
Sobrenadante	2	2	0.1897	5.199	0.0086*
Tratamiento	1	1	1.2127	66.464	<.0001*
Sobrenadante/Tratamiento	2	2	0.3082	8.444	0.0006*

e) Medias y Desviación estándar de los sobrenadantes.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante	0.0920	0.0302
Segundo sobrenadante	0.1911	0.0302
Tercer sobrenadante	0.2244	0.0302

f) Medias y Desviación estándar de los tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Control	0.3113	0.02467
HCC	0.0270	0.02467

e) Medias y Desviación estándar de Sobrenadantes contra Tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante-Control	0.1340	0.0427
Primer sobrenadante-HCC	0.0500	0.0427
Segundo sobrenadante-Control	0.3700	0.0427
Segundo sobrenadante-HCC	0.0122	0.0427
Tercer sobrenadante-Control	0.4300	0.0427
Tercer sobrenadante-HCC	0.0188	0.0427

f) Prueba de Rebanadas de la AFB₁ de los sobrenadantes y tratamiento analizados con el kit de Qiagen.

Prueba de Rebanadas				
Primer sobrenadante				
Suma de Cuadrados	Numerador	Denominador	F experimental	Prob > F
0.03528	1	54	1.9336	0.17007
Segundo sobrenadante				
0.6401042	1	54	35.0825	2.2651 e-7*
Tercer sobrenadante				
0.8454272	1	54	46.3357	8.4763 e-9*
Control				
0.4897066667	2	54	13.4198	0.000019*
HCC				
0.0081528	2	54	0.22342	0.8005

Anexo 14: Análisis estadístico de la cantidad AFB₂ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.

a) Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	17.003355	3.40067	3.0092	0.0181*
Error	54	61.024328	1.13008		
C. Total	59	78.027683			

b) Efectos Probados

Fuente de Variación	Nparm	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	F experimental	Prob > F
Sobrenadante	2	2	5.0514733	2.2350	0.1168
Tratamiento	1	1	6.8993286	6.1052	0.0167*
Sobrenadante/Tratamiento	2	2	5.0525533	2.2355	0.1167

c) Medias y Desviación estándar de los sobrenadantes.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante	0.16150000	0.23770572
Segundo sobrenadante	0.13035000	0.23770572
Tercer sobrenadante	0.76085000	0.23770572

d) Medias y Desviación estándar de los tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Control	0.69000000	0.19408590
HCC	0.01180000	0.9408590

e) Medias y Desviación estándar de Sobrenadantes contra Tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante-Control	0.3100000	0.33616665
Primer sobrenadante-HCC	0.0130000	0.33616665
Segundo sobrenadante-Control	0.2500000	0.33616665
Segundo sobrenadante-HCC	0.0107000	0.33616665
Tercer sobrenadante-Control	1.5100000	0.33616665
Tercer sobrenadante-HCC	0.0117000	0.33616665

Anexo 15: Análisis estadístico de la cantidad AFG₁ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.

a) Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	6.687625	1.33753	1.8049	0.1274
Error	54	40.016590	0.74105		
C. Total	59	46.704216			

b) Efectos Probados

Fuente de Variación	Nparm	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	F experimental	Prob > F
Sobrenadante	2	2	1.7386545	1.1731	0.3172
Tratamiento	1	1	3.5507203	4.7915	0.0329*
Sobrenadante/Tratamiento	2	2	1.3982505	0.9434	0.3956

c) Medias y Desviación estándar de los sobrenadantes.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante	0.51850000	0.19249000
Segundo Sobrenadante	0.12020000	0.19249000
Tercer Sobrenadante	0.21250000	0.19249000

d) Medias y Desviación estándar de los tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Control	0.52700000	0.15716742
HCC	0.04046667	0.15716742

e) Medias y Desviación estándar de Sobrenadantes contra Tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante-Control	0.97000000	0.27222196
Primer sobrenadante-HCC	0.06700000	0.27222196
Segundo sobrenadante-Control	0.21000000	0.27222196
Segundo sobrenadante-HCC	0.03040000	0.27222196
Tercer sobrenadante-Control	0.40100000	0.27222196
Tercer sobrenadante-HCC	0.02400000	0.27222196

Anexo 16: Análisis estadístico de la cantidad AFG₂ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.

a) Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	182.13408	36.4268	4.4515	0.0018*
Error	54	441.88069	8.1830		
C. Total	59	624.01476			

b) Efectos Probados

Fuente de Variación	Nparm	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	F experimental	Prob > F
Sobrenadante	2	2	37.074370	2.2653	0.1136
Tratamiento	1	1	54.893535	6.7083	0.0123*
Sobrenadante/Tratamiento	2	2	90.166170	5.5094	0.0066*

g) Medias y Desviación estándar de los sobrenadantes.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante	2.4350000	0.63964739
Segundo Sobrenadante	3.5700000	0.63964739
Tercer Sobrenadante	1.6555000	0.63964739

d) Medias y Desviación estándar de los tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Control	3.5100000	0.52226991
HCC	1.5970000	0.52226991

e) Medias y Desviación estándar de Sobrenadantes contra Tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante-Control	1.7600000	0.90459802
Primer sobrenadante-HCC	3.1100000	0.90459802
Segundo sobrenadante-Control	5.8500000	0.90459802
Segundo sobrenadante-HCC	1.2900000	0.90459802
Tercer sobrenadante-Control	2.9200000	0.90459802
Tercer sobrenadante-HCC	0.3910000	0.90459802

f) Prueba de Rebanadas de la AFG₂ de los sobrenadantes y tratamientos analizados con el kit de Qiagen.

Prueba de Rebanadas				
Primer sobrenadante				
Suma de Cuadrados	Numerador	Denominador	F experimental	Prob > F
9.1125	1	54	1.1135924496	0.2960009702
Segundo sobrenadante				
103.968	1	54	12.705402447	0.0007721526
Tercer sobrenadante				
31.979205	1	54	3.9080165961	0.0531719345
Control				
88.862	2	54	5.4296873665	0.0071017775
HCC				
38.37854	2	54	2.3450234497	0.1055337057

Anexo 17: Análisis estadístico de la cantidad AFM₁ de los sobrenadantes de las muestras de hígados humanos control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.

a) Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	1416.6948	283.339	18.2145	<.0001*
Error	54	840.0070	15.556		
C. Total	59	2256.7018			

c) Efectos Probados

Fuente de Variación	Nparm	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	F experimental	Prob > F
Sobrenadante	2	2	412.72633	13.2661	<.0001*
Tratamiento	1	1	309.62817	19.9045	<.0001*
Sobrenadante/Tratamiento	2	2	694.34033	22.3179	<.0001*

d) Medias y Desviación estándar de los sobrenadantes.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante	8.8750000	0.88192078
Segundo sobrenadante	3.9500000	0.88192078
Tercer sobrenadante	2.8400000	0.88192078

e) Medias y Desviación estándar de los tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Control	7.4933333	0.72008530
HCC	2.9500000	0.72008530

e) Medias y Desviación estándar de Sobrenadantes contra Tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante-Control	15.790000	1.2472243
Primer sobrenadante-HCC	1.960000	1.2472243
Segundo sobrenadante-Control	4.990000	1.2472243
Segundo sobrenadante-HCC	2.910000	1.2472243
Tercer sobrenadante-Control	1.700000	1.2472243
Tercer sobrenadante-HCC	3.980000	1.2472243

f) Prueba de Rebanadas de la AFM₁ de los sobrenadantes y tratamientos analizados con el kit de Qiagen.

Prueba de Rebanadas				
Primer sobrenadante				
Suma de Cuadrados	Numerador	Denominador	F experimental	Prob > F
956.3445	1	54	61.478776963	1.782877e-10
Segundo sobrenadante				
21.632	1	54	1.390616983	0.2434705752
Tercer sobrenadante				
25.992	1	54	1.6709003615	0.2016416956
Control				
1086.6406667	2	54	34.927444652	1.844915e-10
HCC				
20.426	2	54	0.6565445288	0.5227305252

Anexo 18: Análisis estadístico de la cantidad AFM₂ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.

c) Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	63279.67	12655.9	16.7577	<.0001*
Error	54	40782.45	755.2		
C. Total	59	104062.12			

d) Efectos Probados

Fuente de Variación	Nparm	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	F experimental	Prob > F
Sobrenadante	2	2	1256.766	0.8320	0.4407
Tratamiento	1	1	40924.817	54.1885	<.0001*
Sobrenadante/Tratamiento	2	2	21098.084	13.9680	<.0001*

e) Medias y Desviación estándar de los sobrenadantes.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante	50.065000	6.1450409
Segundo sobrenadante	38.975000	6.1450409
Tercer sobrenadante	45.940000	6.1450409

f) Medias y Desviación estándar de los tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Control	71.110000	5.0174049
HCC	18.876667	5.0174049

g) Medias y Desviación estándar de Sobrenadantes contra Tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante-Control	96.110000	8.6904002
Primer sobrenadante-HCC	4.020000	8.6904002
Segundo sobrenadante-Control	70.280000	8.6904002
Segundo sobrenadante-HCC	7.670000	8.6904002
Tercer sobrenadante- Control	46.940000	8.6904002
Tercer sobrenadante-HCC	44.940000	8.6904002

f) Prueba de Rebanadas de la AFM₂ de los sobrenadantes y tratamientos analizados con el kit de Qiagen.

Prueba de Rebanadas				
Primer sobrenadante				
Suma de Cuadrados	Numerador	Denominador	F experimental	Prob > F
42402.8405	1	54	56.14555739	6.522405e-10
Segundo sobrenadante				
19600.0605	1	54	25.952419901	4.5849969e-6
Tercer sobrenadante				
20	1	54	0.0264819794	0.871336239
Control				
12098.778	2	54	8.0099897382	0.0008987483
HCC				
10256.072667	2	54	6.7900276222	0.0023416979

Anexo 19: Análisis estadístico de la cantidad AFP₁ de los sobrenadantes de las muestras de hígado humano control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.

a) Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	858863.0	171773	1.4512	0.2211
Error	54	6391727.1	118365		
C. Total	59	7250590.1			

b) Efectos Probados

Fuente de Variación	Nparm	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	F experimental	Prob > F
Sobrenadante	2	2	295134.87	1.2467	0.2956
Tratamiento	1	1	246208.20	2.0801	0.1550
Sobrenadante/Tratamiento	2	2	317519.91	1.3413	0.2701

c) Medias y Desviación estándar de los sobrenadantes.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante	26.83500	76.930266
Segundo sobrenadante	22.79000	76.930266
Tercer sobrenadante	173.55000	76.930266

d) Medias y Desviación estándar de los tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Control	138.45000	62.813299
HCC	10.33333	62.813299

e) Medias y Desviación estándar de Sobrenadantes contra Tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante-Control	36.52000	108.79583
Primer sobrenadante-HCC	17.15000	108.79583
Segundo sobrenadante-Control	38.40000	108.79583
Segundo sobrenadante-HCC	7.18000	108.79583
Tercer sobrenadante-Control	340.43000	108.79583
Tercer sobrenadante-HCC	6.67000	108.79583

Anexo 20: Análisis estadístico de la cantidad AFL de los sobrenadantes del hígado humano control y con HCC extraídas con el kit de Qiagen.

c) Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Prob > F
Modelo	5	0.5246350	0.104927	3.4214	0.0093*
Error	54	1.6560500	0.030668		
C. Total	59	2.1806850			

d) Efectos Probados

Fuente de Variación	Nparm	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	F experimental	Prob > F
Sobrenadante	2	2	0.09121000	1.4871	0.2351
Tratamiento	1	1	0.27608167	9.0024	0.0041*
Sobrenadante/Tratamiento	2	2	0.15734333	2.5653	0.0862

e) Medias y Desviación estándar de los sobrenadantes.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante	0.22550000	0.03915839
Segundo sobrenadante	0.21100000	0.03915839
Tercer sobrenadante	0.30000000	0.03915839

f) Medias y Desviación estándar de los tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Control	0.31333333	0.03197269
HCC	0.17766667	0.03197269

g) Medias y Desviación estándar de Sobrenadantes contra Tratamientos.

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados	Error estándar
Primer sobrenadante-Control	0.36000000	0.05537833
Primer sobrenadante-HCC	0.09100000	0.05537833
Segundo sobrenadante-Control	0.27000000	0.05537833
Segundo sobrenadante-HCC	0.15200000	0.05537833
Tercer sobrenadante-Control	0.31000000	0.05537833
Tercer sobrenadante-HCC	0.29000000	0.05537833

f) Prueba de Rebanadas de la AFL de los sobrenadantes y tratamientos analizados con el kit de Qiagen.

Prueba de Rebanadas				
Primer sobrenadante				
Suma de Cuadrados	Numerador	Denominador	F experimental	Prob > F
0.361805	1	54	11.7976	0.0011471*
Segundo sobrenadante				
0.06962	1	54	2.2702	0.1377153
Tercer sobrenadante				
0.002	1	54	0.06522	0.7994052
Control				
0.040666667	2	54	0.6631	0.519435
HCC				
0.207886667	2	54	3.3894	0.0410523 *