

Variabilidade Genética e Suscetibilidade a Danos no DNA: As Micotoxinas

Marta Manata do Outeiro

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre em Análise e Controlo de Riscos Ambientais para a Saúde

Orientadores:

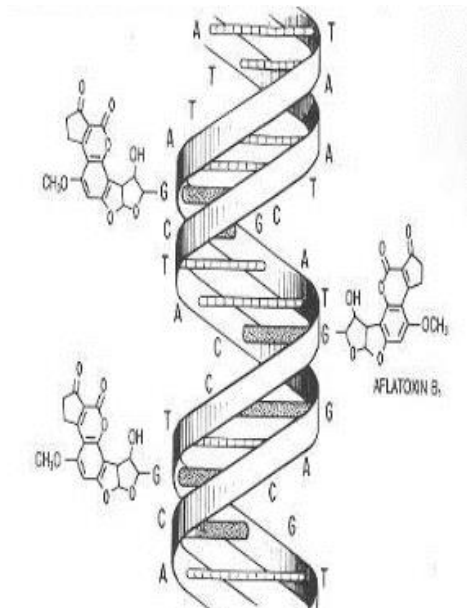
Miguel Brito (ESTeSL)
Luisa Veiga (ESTeSL)

Júri:

Presidente: Doutor Amin M. Sadrudine Vissangi Karmali, ISEL

Vogais: Doutora Ana Cláudia Cavaco de Sousa Coelho, ESTBarreiro/IPS (Arguente)
Doutor Rui Miguel Brito, ESTeSL (Orientador)

Dezembro de 2018



Variabilidade Genética e Suscetibilidade a Danos no DNA: As Micotoxinas

Marta Manata do Outeiro

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre em Análise e Controlo de Riscos Ambientais para a Saúde

Orientadores:

Miguel Brito (ESTeSL)
Luisa Veiga (ESTeSL)

Júri:

Presidente: Doutor Amin M. Sadrudine Vissangi Karmali, ISEL

Vogais: Doutora Ana Cláudia Cavaco de Sousa Coelho, ESTBarreiro/IPS (Arguente)
Doutor Rui Miguel Brito, ESTeSL (Orientador)

Dezembro de 2018

Dedicatória e Agradecimentos

Quero agradecer ao apoio prestado pela Sofia Santos, Ana Matos e D.^a Domingas durante toda a parte experimental necessária para que este trabalho se concretizasse.

Gostaria de fazer um agradecimento especial à minha mãe pela motivação que me deu e pela paciência que teve em aturar-me nos meus momentos mais difíceis.

Agradeço também a todos os meus amigos que, de uma maneira ou de outra, partilhando muitas vezes o mesmo sofrimento, me deram força para continuar e conselhos bastante úteis para chegar até ao fim desta caminhada.

Resumo

A aflatoxina B1 é um potente carcinogénico que existe naturalmente no ambiente, especialmente em terrenos agrícolas, podendo, dessa forma, ser responsável pela contaminação encontrada em determinados produtos alimentares. A nível ocupacional, é possível estar-se exposto a esta aflatoxina, nomeadamente em locais de trabalho como as panificadoras, se as práticas de armazenamento e confeção dos alimentos não forem adequados. Quando esta toxina é transformada, pelo enzima CYP3A4, no seu metabolito ativo, este pode ligar-se ao DNA das células contribuindo para o aparecimento de mutações e outros danos no DNA e, conseqüentemente, aumentar o risco de desenvolvimento de cancro hepático. Este estudo tem como objetivo determinar a quantidade de adutos de aflatoxina ligados ao DNA num grupo de trabalhadores em panificadoras de Portugal. Da população total, da qual foram recolhidas as amostras, apenas 37 dessas amostras foram testadas para a presença de adutos, por apresentarem uma maior quantidade de DNA, após a sua extração. Foram detetados níveis de adutos inferiores a 1µmol de aduto/mol de DNA nas 37 amostras. Estes valores indicam, muito possivelmente, que a exposição destes indivíduos à toxina era baixa. A análise da frequência dos polimorfismos nestes indivíduos demonstrou que alguns deles possuem polimorfismos de risco para o desenvolvimento de cancro hepático na presença de aflatoxina B1. Neste estudo, a associação entre a quantidade de aduto no sangue e os polimorfismos de risco não foi estatisticamente significativa. Contudo, seria pertinente acompanhar os indivíduos que apresentam os polimorfismos de risco, pois estes apresentam maior risco de acumularem mais adutos de DNA de aflatoxina no seu organismo, após a sua exposição, e daí a importância de usar este método de deteção de adutos de DNA em populações de risco expostas à aflatoxina B1.

Palavras-chave: Aflatoxina B1, Adutos de DNA, Polimorfismos, Exposição, Panificadoras

Abstract

Aflatoxin B1 is a potent carcinogen naturally occurring in the environment, especially on agricultural land, and may therefore be responsible for the contamination found in certain food products. At the occupational level, it is possible to be exposed to this aflatoxin, particularly in workplaces such as bakeries, if food storage and confectioning practices are not adequate. When this toxin is transformed into its active metabolite by the enzyme CYP3A4, it can bind to the DNA of the cells contributing to the onset of mutations and other DNA damage and consequently increasing the risk of developing liver cancer. This study aims to determine the amount of DNA-bound aflatoxin adducts in a group of workers in bakeries in Portugal. Of the total population, from which samples were collected, only 37 of these samples were tested for the presence of adducts, because they had a higher amount of DNA, after extraction. Adduct levels below 1 μmol adduct / mole of DNA were detected in the 37 samples. These values quite possibly indicate that the exposure of these individuals to the toxin was low. Analysis of the frequency of polymorphisms in these individuals has shown that some of them have risk polymorphisms for the development of liver cancer in the presence of aflatoxin B1. In this study, the association between the amount of adduct in the blood and the risk polymorphisms was not statistically significant. However, it would be pertinent to follow the individuals presenting the risk polymorphisms, since they are at higher risk of accumulating more aflatoxin DNA adducts in their organism after being exposed, and hence the importance of using this method of detecting DNA adducts in at-risk individuals that are exposed to aflatoxin B1.

Keywords: Aflatoxin B1, DNA adducts, Polymorphisms, Exposure, Bakeries

Índice Geral

1. Introdução.....	1
1.1 Aspergillus	1
1.2 Micotoxinas – Aflatoxina B1	3
1.3 Toxicidade das aflatoxinas no ser humano	4
1.4 Metabolismo da aflatoxina e polimorfismos dos enzimas do metabolismo	6
1.5 Alterações no DNA, Mecanismos de Reparação e os seus polimorfismos.....	8
1.6 Adutos de DNA como biomarcadores de exposição e de risco	13
1.7 Contaminação dos cereais e farinhas em contextos ocupacionais e momentos específicos onde a contaminação pode ocorrer	14
1.8 Técnicas usadas na deteção de adutos de DNA e da aflatoxina	18
2. Objetivos.....	19
3. Material e Métodos	19
3.1 Colheita de amostras de sangue.....	19
3.2 Extração e quantificação de DNA.....	20
3.3 Fenotipagem de GST's por PCR Multiplex.....	21
3.4 Genotipagem do CYP3A4 e XRCC4 por PCR em Tempo Real	22
3.5 Deteção dos adutos AFB1-DNA.....	22
3.6 Análise estatística	23
4. Resultados e Discussão.....	23
4.1. Curva de Calibração do teste de ELISA Competitivo de aduto de DNA de aflatoxina.	23
4.2. Deteção de adutos de DNA de aflatoxina em amostras de sangue total de trabalhadores de panificadoras.	26
4.3. Frequências dos polimorfismos estudados nos genes dos enzimas GST, CYP3A4 e do XRCC4 em cada indivíduo.....	30
4.4 Relação entre os polimorfismos dos enzimas do metabolismo e de reparação e a quantidade de adutos detetadas	35
5. Conclusões	39
6. Limitações do estudo	40
7. Estudos futuros	40
8. Anexos.....	42
9. Referências Bibliográficas.....	43

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Tipos de aflatoxinas produzidas por espécies de <i>Aspergillus</i> . Adaptado de Bbosa <i>et al.</i> , 2013.....	4
Tabela 2- Alertas de micotoxinas por produtos ocorridos na Europa em 2012. Adaptado de Marin <i>et al.</i> , 2013.....	15
Tabela 3 - Concentrações de micotoxinas em amostras de ar nos diferentes contextos ocupacionais. Adaptado de Fromme <i>et al.</i> , 2016.....	17
Tabela 4- Identificação dos primers utilizados no PCR de tempo real. Adaptado de TaqMan® SNP Genotyping, 2005.....	22
Tabela 5 - Resultados de todas as amostras analisadas neste estudo relativamente à quantificação de adutos de aflatoxina no DNA e aos genótipos dos genes CYP3A4 e XRCC4 e à ausência/presença dos alelos dos genes GSTT1 e GSTM1.....	24
Tabela 6 - Quantidade de DNA das amostras selecionadas para se detetarem os adutos.	27
Tabela 7 - Quantidade de adutos de DNA-AFB1 detectados nas amostras dos trabalhadores em panificadoras, em Portugal	29
Tabela 8 - Frequência do polimorfismo GSTT1 presente e ausente.....	32
Tabela 9 - Frequência do polimorfismo GSTM1 presente e ausente.....	32
Tabela10 - Frequência dos polimorfismos GSTT1 e GSTM1 em conjunto.....	32
Tabela 11 - Frequência do polimorfismo CYP3A4 (rs 2740574) em homozigotia e heterozigotia do alelo normal e do alelo mutado.	33
Tabela 12 - Frequência do polimorfismo XRCC4 (rs 28383151) em homozigotia e heterozigotia do alelo normal e do alelo mutado.	34
Tabela 13 - Genótipo de cada indivíduo em relação a cada um dos genes e a sua respetiva quantidade de aduto de aflatoxina.	35

Índice de Figuras

Figura 1 - <i>Aspergillus flavus</i> meios Czapek Yeast Autolysate Extract Agar, Malt Extract Agar e Yeast Extract with supplements. Fonte: Varga <i>et al.</i> , 2011	2
Figura 2 - <i>Aspergillus parasiticus</i> meios Czapek Yeast Autolysate Extract Agar, Malt Extract Agar e Yeast Extract with supplements. Fonte: Varga <i>et al.</i> , 2011.	2
Figura 3 - Estrutura Molecular da Aflatoxina B1. Fonte: Aflatoxin DNA adduct Competitive ELISA kit” (Cell Biolabs, Inc).....	4
Figura 4 - Efeito mutagénico do metabolito da aflatoxina. Adaptado de Ju <i>et al.</i> , 2016.....	5
Figura 5 - Alvos das micotoxinas ao nível da transcrição e tradução do DNA e também ao nível das reações metabólicas. Adaptado de Bbosa <i>et al.</i> , 2013.....	8
Figura 6 - Alteração G--> T no codão 249 do gene p53 devido às alterações epigenéticas provocadas pela aflatoxina. Fonte: Bbosa <i>et al.</i> , 2013.	10
Figura 7 - Quantidade de adutos de DNA formados pela aflotoxina vs os diferentes polimorfismos do codão 939 do XPC. Adaptado de Long <i>et al.</i> , 2015.....	12
Figura 8 - Extração de DNA pelo procedimento “ <i>spin</i> ”. Adaptado de Qiagen & Midi/Maxi, 2012.	21
Figura 9 - Curva de Calibração do aduto AFB1-DNA	26
Figura 10 - Produtos de PCR provenientes da amplificação de GSTT1 (480 pb), GSTM1 (215pb) e do controlo interno CYP1A1 (312pb) num gel de agarose. O poço identificado com a letra B corresponde ao controlo negativo (água destilada ultra pura). As outras identificações correspondem às amostras.....	31
Figura 11 - Relação entre a quantidade de adutos vs CYP3A4 (rs2740574).....	37
Figura 12 - Relação entre a quantidade de adutos vs GSTT1.....	37
Figura 13 - Relação entre a quantidade de adutos vs GSTM1	38
Figura 14 - Relação entre a quantidade de adutos vs XRCC4 (rs28383151)	38

Lista de abreviaturas e siglas

A – Adenina

AFB1-DNA – Aflatoxina B1 – Ácido desoxirribonucleico

AFB1-FAPY –Aflatoxina B1 - Formamidopirimidina

AFM1 – Aflatoxina M1

AFP1 – Aflatoxina P1

AFQ1 – Aflatoxina Q1

Ahr – Aryl Hidrocarbon Receptor

BER – Base Excision Repair

C8 – carbono 8

C - Citosina

CYP1A1 – Citocromo P450 1A1

CYP3A4 – Citocromo P450 3A4

DG18 – Diclorano (18%) Glicerol Agar

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dsDNA – double strand DNA

DO – densidade ótica

EFSA – European Food Safety Authority

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPHX – Epoxide Hydrolase 1

G - Guanina

GST – Glutathione S Transferase

GSTM – Glutathione S Transferase Mu

GSTT – Glutathione S Transferase Theta

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

HR23B – anticorpo homólogo do RAD23

HRP – Horseradish Peroxidase

N - Azoto

NER – Nucleotide Excision Repair

O – Oxigénio

pb - par de base

PCR – Polymerase Chain Reaction

RIA – Radioimmunoassay

RNA – Ácido Ribonucleico

S - Enxofre

SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

T - Timina

TP53 – Tumor Protein p53

UHPLC – Ultra – High Performance Liquid Chromatography

XPC – Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group C

XRCC1 – X-ray Repair Cross Complementing 1

XRCC4 - X-ray Repair Cross Complementing 4

1. Introdução

1.1 Aspergillus

A produção de aflatoxinas é efetuada por fungos do género *Aspergillus*, mais especificamente do *Aspergillus* do grupo *Flavi*. Dentro deste grupo, os fungos que têm sido mais encontrados e identificados como sendo os produtores de aflatoxinas são *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Rodrigues *et al.*, 2009).

A distinção entre estas duas espécies tem sido baseada, essencialmente, no tipo de colónias que produzem. São fungos filamentosos (Lamboni *et al.*, 2016) em que as conídias do *A.flavus* são amarelas-esverdeadas e possuem paredes finas e moderadamente rugosas e podem ter forma esférica ou elíptica, enquanto que as conídias do *A.parasiticus* são verde-escuro e são esféricas e apresentam algumas proeminências à sua volta no meio *Czapek Yeast Autolysate Extract Agar* (meio de referência utilizado na identificação de colónias do género *Aspergillus*), como demonstrado nas figuras 1 e 2 (Katsurayama *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2017; Freitas, 2000). Todas as estirpes do *A. parasiticus* produzem toxinas, nomeadamente as aflatoxinas B e G enquanto que algumas estirpes do *A. flavus* não são produtoras de toxinas B, neste caso, e como tal, podem reduzir os efeitos tóxicos nos terrenos agrícolas contaminados com fungos (Donner *et al.*, 2009; Kachapulula *et al.*, 2017; Marin *et al.*, 2013). O *A.flavus* pode ser dividido em duas estirpes, tendo em conta a sua morfologia, fisiologia e genética: estirpe L e estirpe S, em que a primeira produz menos aflatoxinas B do que a segunda (Donner *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2009). O *A.flavus* é um colonizador das flores e das folhas das plantas, enquanto que o *A.parasiticus*, por norma, é encontrado no solo (Marin *et al.*, 2013) e todas as estirpes desta espécie são produtoras de toxinas (Varga *et al.*, 2011).

A identificação e a deteção destes fungos são feitas através do método tradicional, que recorre aos meios de cultura apropriados para o seu crescimento, como o meio *Czapek Yeast Autolysate Extract Agar*, já referido anteriormente. Também é utilizado o meio de *yeast extract with supplements* juntamente com uma técnica que permite saber se as espécies de fungo isoladas são capazes de produzir toxinas ou não (Katsurayama *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2017). Para além destes dois meios, outros têm sido usados na identificação destes fungos, como o *malt extract agar* e *glucose yeast extract*. Para a deteção de esporos usa-se o meio diclorano com 18% de glicerol (DG18) (Lamboni *et al.*, 2016). Os meios de cultura permitem avaliar os microrganismos quanto à sua morfologia, como por exemplo, o tamanho da colónia, a sua cor e textura, o tamanho e a textura das conídias e a estrutura do conidióforo (Varga *et al.*, 2011). Para auxiliar na identificação da espécie e

da estirpe de *Aspergillus*, utilizam-se técnicas de cromatografia, como o HPLC e UHPLC acoplado à espectroscopia de massa para detetar a presença de aflatoxinas nas amostras e quais são as estirpes produtoras de micotoxinas (Lamboni *et al.*, 2016; Martins *et al.*, 2017; Ruadrew *et al.*, 2013).

A identificação das espécies através do meio de cultura, juntamente com as técnicas de biologia molecular, permitirá uma melhor classificação da espécie e da estirpe do fungo existente nas amostras, como já tem sido feito, em estudos mais recentes (Katsurayama *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2017). Devido à variabilidade genética existente dentro da mesma espécie torna-se difícil fazer uma classificação baseada apenas nos métodos tradicionais. Os *Aspergillus* do grupo *Flavi* não podem ser distinguidos apenas por características morfológicas, pois isso não permite uma identificação precisa (Varga *et al.*, 2011).

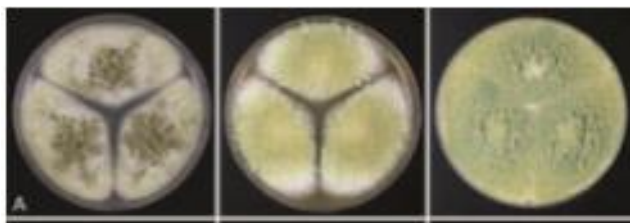


Figura 1 - *Aspergillus flavus* meios Czapek Yeast Autolysate Extract Agar, Malt Extract Agar e Yeast Extract with supplements. Fonte: Varga *et al.*, 2011

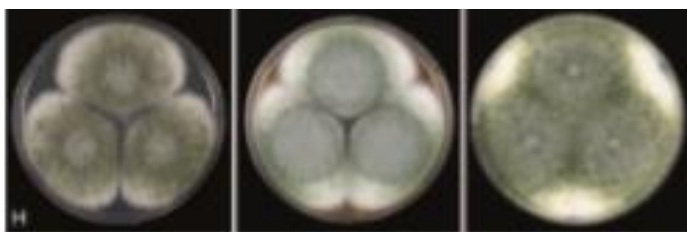


Figura 2 - *Aspergillus parasiticus* meios Czapek Yeast Autolysate Extract Agar, Malt Extract Agar e Yeast Extract with supplements. Fonte: Varga *et al.*, 2011.

Os *Aspergillus* são fungos filamentosos constituídos por hifas que podem ser septadas ou asseptadas. O seu crescimento origina o micélio e no seu interior apresentam os organelos de uma célula eucariótica, tais como mitocôndrias, aparelho de Golgi, núcleo, vesículas citoplasmáticas, membrana celular e muitos outros (Freitas, 2000).

1.2 Micotoxinas – Aflatoxina B1

As micotoxinas são um grupo de toxinas provenientes de fungos do género *Aspergillus* que existem naturalmente no meio ambiente (Ruadrew *et al.*, 2013; Varga *et al.*, 2011; Xue *et al.*, 2016). Estas toxinas são metabolitos secundários destes fungos (Lamboni *et al.*, 2016) e podem provocar doenças nos seres humanos e nos animais (Alborch *et al.*, 2012). A aflatoxina, a ocratoxina A, fumonisina, zearalenona e a deoxinivalenol são as que apresentam maior relevância no que diz respeito ao desenvolvimento de patologias nos indivíduos expostos. Existem valores máximos admissíveis estipulados pela Legislação Europeia (regulamento nº165/2010) para a presença destas toxinas nos alimentos, especialmente em alimentos, como a farinha de milho em que o valor máximo de aflatoxina B1 é 5 µg/kg (Drumond, 2012). As farinhas e os cereais possuem nutrientes favoráveis à reprodução dos fungos e conseqüentemente à produção das suas respectivas toxinas (Alborch *et al.*, 2012). A humidade e a temperatura elevada no momento em que as sementes são cultivadas e após a sua maturação também contribui para o desenvolvimento do *Aspergillus Flavi* e, por conseguinte, para a contaminação dos terrenos de cultivo com a aflatoxina (Kachapulula *et al.*, 2017).

A aflatoxina é uma difuranocoumarina muito tóxica que ocorre naturalmente e é produzida por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Leong *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2007; Quiles *et al.*, 2015). Existem vários tipos de aflatoxinas, tais como a aflatoxina B1, B2, G1 e G2 que estão descritos na tabela 1 (Leong *et al.*, 2012). A aflatoxina B1, figura 3, é aquela que está presente nos alimentos, na maioria dos casos (Komives, 1987). A aflatoxina B1 também pode entrar no organismo e na via metabólica através da inalação de matéria particulada contaminada por esta toxina (Mo *et al.*, 2014). Na verdade, a inalação desta toxina pode causar efeitos tóxicos de maior magnitude do que quando esta é ingerida, como por exemplo fibrose intersticial pulmonar, após uma exposição contínua (Ju *et al.*, 2016). O contacto com a pele e com as mucosas também pode ocorrer (Fromme *et al.*, 2016).

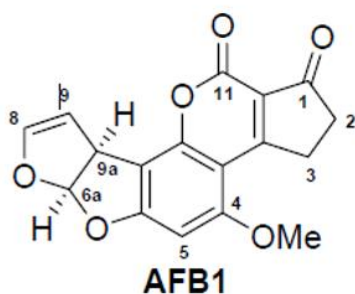


Figura 3 - Estrutura Molecular da Aflatoxina B1. Fonte: Aflatoxin DNA adduct Competitive ELISA kit" (Cell Biolabs, Inc)

Tabela 1 - Tipos de aflatoxinas produzidas por espécies de *Aspergillus*. Adaptado de Bbosa *et al.*, 2013.

Difurocumarinas	Tipo de Aflatoxina	Espécies de <i>Aspergillus</i>
	Aflatoxina B ₁ (AFB ₁)	<i>A.flavus</i> , <i>A.parasiticus</i> , <i>A.arachidicola</i> , <i>A.nomius</i> , <i>A.ochraceoroseus</i>
	Aflatoxina B ₂ (AFB ₂)	<i>A.flavus</i> , <i>A.parasiticus</i> , <i>A.nomius</i> , <i>A.arachidicola</i>
Difurocumarociclopentenonas	Aflatoxina M ₁ (AFM ₁)	<i>A.flavus</i> , <i>A.parasiticus</i> , metabolito da aflatoxina B ₁ nos humanos e animais que é proveniente do leite materno
	Aflatoxina M ₂ (AFM ₂)	Metabolito da aflatoxina B ₂ proveniente do leite de vaca em alimentos contaminados
	Aflatoxicol (AFL)	<i>A.flavus</i> , metabolito da AFB ₁
	Aflatoxina G ₁	<i>A.flavus</i> , <i>A.parasiticus</i> , <i>A.arachidicola</i> , <i>A.nomius</i>
	Aflatoxina G ₂	<i>A.flavus</i> , <i>A.parasiticus</i> , <i>A.arachidicola</i> , <i>A.nomius</i>
Difurocumarolactonas	Aflatoxina GM ₁	<i>A.flavus</i>
	Aflatoxina Q ₁ (AFQ ₁)	Metabolito da AFB ₁ usado em preparações de fígado <i>in vitro</i>

1.3 Toxicidade das aflatoxinas no ser humano

A toxicidade às aflatoxinas tem ocorrido mais predominantemente de forma crónica, ou seja, pequenas quantidades destas toxinas ingeridas várias vezes durante um longo período de tempo parecem afetar a longo prazo o sistema reprodutor, o sistema imunitário, e provocar encefalopatias e cancro do fígado (Marin *et al.*, 2013).

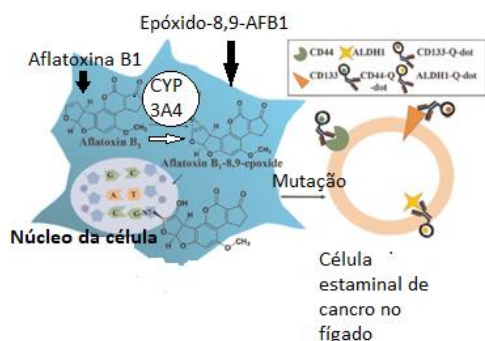


Figura 4 - Efeito mutagênico do metabolito da aflatoxina. Adaptado de Ju *et al.*, 2016

Os efeitos tóxicos da aflatoxina B1 têm vindo a ser estudados mais intensivamente a nível hepático devido à elevada incidência de cancro neste órgão induzidos por exposição prolongada/crónica a esta toxina (Habib *et al.*, 2006; Katsurayama *et al.*, 2018; Xue *et al.*, 2016). No fígado, a aflatoxina B1 é metabolizada pelo citocromo P450, dando origem ao metabolito 8,9-epóxido (Chou & Chen, 1997), que é uma molécula carcinogenicamente ativa (Carvajal, 2008). Este metabolito liga-se ao DNA, intercalando

entre os pares de bases, formando adutos. Estes adutos promovem mutações nos proto-oncogenes e nos genes supressores de tumores induzindo assim cancro hepático, como representado na figura 4 (Ju *et al.*, 2016). Após indução dos danos hepáticos pelos adutos, cuja toxicidade promove o stress oxidativo, este vai levar à progressão da desregulação das células hepáticas (Ingawale *et al.*, 2014). A aflatoxina B1 é classificada como carcinogénica para o ser humano, grupo 1, pela Agência Internacional de Investigação sobre o Cancro (IARC) (Bol *et al.*, 2016; Quiles *et al.*, 2015; Shen & Ong, 1996).

Os metabolitos de aflatoxina são suficientemente estáveis para conseguirem entrar diretamente dentro do núcleo da célula, mesmo antes de serem destoxificados pelos glutathionas transferases. Por vezes, o metabolito não entra logo no núcleo, mas mantém-se por algum tempo no citoplasma provocando danos extranucleares (Wilson *et al.*, 1995).

Os pulmões são outro órgão alvo das aflatoxinas. O epitélio traqueal dos brônquios tem enzimas que metabolizam a aflatoxina no metabolito ativo, que vai dar origem aos dois tipos de adutos de DNA, que são igualmente formados no fígado (Wang & Groopman, 1999). Contudo, o citocromo P450 tem menos importância neste órgão do que no fígado. Mas, por outro lado, a baixa quantidade de GST neste órgão contribui para uma certa suscetibilidade pulmonária à aflatoxina o que pode levar ao desenvolvimento de cancro pulmonar (Carvajal, 2008).

O consumo de álcool e o hábito tabágico podem potenciar o desenvolvimento de cancro após a exposição à aflatoxina e estão associados ao aumento de excreção do metabolito AFB1-N7-guanina, que, por conseguinte, demonstra um aumento da ativação do metabolismo sobre a aflatoxina (Carvajal, 2008; Wang & Groopman, 1999).

1.4 Metabolismo da aflatoxina e polimorfismos dos enzimas do metabolismo

A aflatoxina B1 em si não é tóxica, mas sim o metabolito que é formado durante o seu metabolismo (Bren *et al.*, 2014; Chou & Chen, 1997). O citocromo P450 possui um conjunto de enzimas diferentes que tem um papel importante na metabolização de xenobióticos (Bren *et al.*, 2014). O enzima citocromo P450 3A4 (EC 1.14.14.57) e o 1A2 (Wild *et al.*, 2000; A.S. Wilson *et al.*, 1995; Xue *et al.*, 2016) metabolizam a aflatoxina B1 e transformam-na na molécula genotóxica – exo-8,9-epóxido e na molécula não tóxica 3 α -hidróxido (Bren *et al.*, 2014). Após a primeira fase do metabolismo, outros enzimas atuam para se ligarem ao metabolito tóxico e eliminá-lo do organismo humano. Esses enzimas fazem parte da família dos glutatonas e dos epoxidases hidrolases (McGlynn *et al.*, 1995; Tiemersma *et al.*, 2001). Cada indivíduo possui algumas diferenças genéticas nestes enzimas que podem diminuir a probabilidade de ocorrência de cancro hepático ou promover o seu aparecimento e desenvolvimento.

Estas variações alélicas podem ser devido à troca de uma base na cadeia de DNA o que leva a expressões diferentes do mesmo enzima e, conseqüentemente, à sua perda de função. Estas trocas, de apenas um nucleótido, chamam-se SNPs (*single nucleotide polymorphism*). O polimorfismo mais frequente do enzima citocromo P450 3A4 é a variante proximal de promotor – CYP3A4*1B (-392A>G) – em que a adenina (A) é a base no alelo mais frequente e a guanina (G) é a base no alelo mutado. Esta variante é, por norma, associada ao cancro da próstata em casos mais agressivos da doença, servindo como um marcador de doenças malignas em estado terminal (Zanger & Schwab, 2013). Em relação à metabolização da aflatoxina, não existem ainda estudos feitos que relacionem este polimorfismo com a diminuição ou a estimulação da produção do metabolito tóxico, embora, em outros estudos, realizados em animais, se tenha demonstrado que existe a possibilidade de haver maior risco de desenvolvimento de cancro hepático, promovido pela aflatoxina, se houver uma maior atividade do enzima CYP3A4 (Dohnal *et al.*, 2014).

Na fase II do metabolismo, o enzima epoxidase hidrolase (EPHX) hidrolisa os exo-8,9-epóxidos em 1,2-dihidrodiol de forma a que possam ser excretados pela urina e não se liguem ao DNA das células hepáticas (McGlynn *et al.*, 1995). Vários polimorfismos associados a este enzima estão relacionados com a diminuição da atividade do mesmo. Isto significa que, na presença de um ou dois alelos mutados neste enzima, existe a probabilidade de haver uma maior quantidade de aduto presente em circulação e o risco de desenvolver cancro hepático também é maior (McGlynn *et al.*, 1995).

O mesmo acontece com a diminuição da expressão dos GST, nomeadamente os enzimas GSTT1 e GSTM1, o que permite que o exo-8,9-epóxido esteja livre no fígado e possa fazer danos no mesmo. O enzima glutathione liga-se ao metabolito tornando-o solúvel de maneira a que seja excretado do organismo. Indivíduos que apresentem genótipo nulo para GSTM1, ou seja, possuam uma deleção dos alelos (GSTM1*0), apresentam um maior risco de desenvolver cancro hepático pela redução da sua função de se ligar por conjugação ao metabolito (McGlynn *et al.*, 1995). No estudo de Saad-Hussein *et al.*, 2016, realizado em indivíduos que estavam expostos à farinha e a farripas de madeira, ao longo do dia, no seu local de trabalho, verificou-se que aqueles que tinham o genótipo GSTM1 nulo e GSTT1 nulo eram aqueles que apresentavam maior quantidade de aflatoxina B1 ligada à albumina, no soro. Constatou-se também que a presença do genótipo GSTT1 tanto em indivíduos homocigóticos como heterocigóticos (GSTT1 +/+ e GSTT1+/0, respetivamente) conferia uma capacidade inferior de eliminação do metabolito quando comparada com o genótipo GSTM1, ou seja, os indivíduos que possuíam estes genótipos apresentavam uma predisposição genética para não eliminar os metabolitos de aflatoxina do organismo tão rapidamente. E por isso, o seu risco de desenvolver cancro hepático é mais elevado (Saad-Hussein *et al.*, 2016). Existe ainda uma outra razão para que estas enzimas não sejam tão rápidos na eliminação do metabolito da aflatoxina que é o facto de que este metabolito desencadeia a produção de espécies reativas de oxigénio, às quais as enzimas glutathione também se vão ligar para que sejam eliminados, não havendo assim, GST's disponíveis para se ligar ao metabolito da aflatoxina (Bbosa *et al.*, 2013). Estas espécies reativas de oxigénio são produzidas nos hepatócitos e também nos linfócitos, danificando o DNA induzindo o desenvolvimento de cancro hepático (Peng *et al.*, 2007).

Num outro estudo de Tiemersma *et al.*, 2001, os polimorfismos do enzima epoxidase hidrolase (EPHX) – EPHX 113HH e EPHX139HH – mostraram ter influência no desenvolvimento de cancro hepático após exposição à aflatoxina, sobretudo quando o indivíduo também possui os alelos GSTM1 e GSTT1 nulos. Estes polimorfismos estão relacionados com um aumento elevado de adutos no fígado. Assim, os indivíduos que possuam pelo menos dois destes genótipos – EPHX HH, GSTM1, GSTT1 - são considerados indivíduos que possuem o genótipo de risco elevado, ou seja, apresentam uma maior probabilidade de terem mais adutos de aflatoxina no fígado, e, por conseguinte, maior risco de desenvolver cancro hepático (Tiemersma *et al.*, 2001; Wild *et al.*, 2000). Por outro lado, um estudo *in vitro*, demonstrou que a presença ou ausência do alelo da GSTM1 nos indivíduos resultava na suscetibilidade à toxicidade da aflatoxina B1 (Wilson *et al.*, 1997).

1.5 Alterações no DNA, Mecanismos de Reparação e os seus polimorfismos

O metabolito 8,9-epóxido para além de reagir com os enzimas de fase I e de fase II do metabolismo dos xenobióticos também reage com o DNA, RNA, com as proteínas formadas na síntese proteica, inibe o transporte de eletrões e afeta também a capacidade reguladora dos recetores nucleares (figura 5). Os recetores nucleares que são “alertados” quando um xenobiótico entra no organismo são: o hidrato de carbono aril (Ahr), recetor X pregano e o recetor constitutivo da androsterona/androstano. Estes recetores vão regular a expressão e a atividade dos enzimas das fases I e II que fazem parte do metabolismo de xenobióticos (Bbosa *et al.*, 2013; Ratajewski *et al.*, 2011). Na presença de aflatoxina, estes recetores são produzidos em maior quantidade, pois esta toxina aumenta a síntese do RNA mensageiro e, conseqüentemente, as vias metabólicas vão ser ativadas (Bbosa *et al.*, 2013)

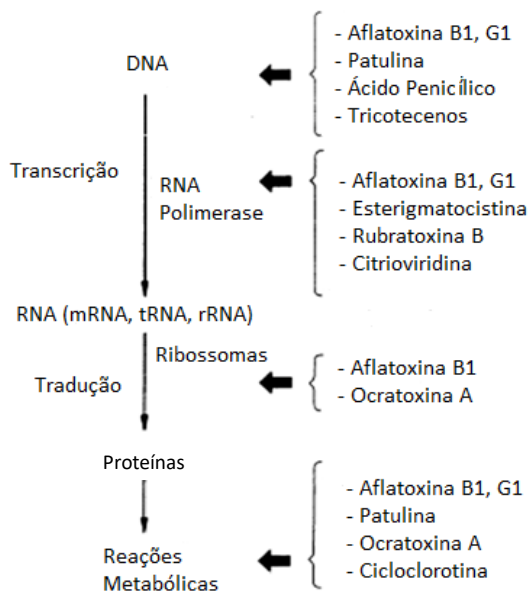


Figura 5 - Alvos das micotoxinas ao nível da transcrição e tradução do DNA e também ao nível das reações metabólicas. Adaptado de Bbosa *et al.*, 2013

A ligação das micotoxinas ao DNA forma os adutos que podem levar à mutação da sequência de DNA e que depois leva à carcinogénese. O metabolito 8,9-epóxido pode ser mais tarde convertido em 8,9-diol, ligando-se especificamente com a lisina da albumina e formando os adutos de lisina que podem permanecer durante muito tempo no sangue periférico. A formação do aduto N7-guanina

provoca maiores danos porque é quimicamente instável, mas é excretado muito rapidamente originando apurinações no DNA (nucleótido sem base). Este aduto também pode ser transformado numa estrutura mais estável: 5-N-(9-hidroxi-aflatoxina)-2,6-diamino-4-hidroxi-formamidopirimidina de anel aberto (AFB1-FAPY) que permanece mais tempo no organismo e parece ser mais resistente aos mecanismos de reparação de DNA (Bbosa *et al.*, 2013; Boysen *et al.*, 2009; Carvajal, 2008; Chou & Chen, 1997; Komives, 1987; Marin *et al.*, 2013; Shen & Ong, 1996). Durante a abertura do anel, que acontece devido aos hidróxidos que reagem com o carbono 8 da cadeia de DNA que contém adutos N7-guanina, a carga negativa na posição N9 é deslocada para um α - β -carbonil insaturado do anel de pirimidina, o que conseqüentemente irá estabilizar a ligação glicosídica do anel (Boysen *et al.*, 2009). Este aduto não faz depurinações espontâneas, nem se remove do DNA como o aduto N7-guanina e, como é mais estável e altera a estrutura secundária do DNA, pensa-se que este metabolito é aquele que será mais responsável pela mutagenicidade (Boysen *et al.*, 2009).

Os adutos do tipo N7-guanina são quimicamente instáveis com tempos de meia-vida entre as 2h e as 150h. A sua instabilidade é devida a mais uma carga positiva que é adicionada ao anel que envolve a guanina, o que promove a depuração do DNA. Após exposição prolongada, a acumulação de adutos atinge um nível de saturação em aproximadamente 7-10 dias, o que significa que, atingida a saturação, a quantidade de adutos formada é igual àquela que é removida. A carga positiva adicional promove outras reações, tais como, a perda do protão C8, depuração, abertura do anel que dá origem à molécula alquilo-Fapy, neste caso é AFB1-FAPY, hidrólise da ligação N7 com o agente alquilante e a reorganização de adutos C8. A AFB1 reage com locais nucleofílicos, tais como S, N e O do DNA e de proteínas (Boysen *et al.*, 2009).

O metabolito 8,9-epóxido tem preferência em se ligar covalentemente a pares de bases que tenham guaninas em sequências duplas de DNA (Habib *et al.*, 2006; Wang & Groopman, 1999). O pico desta ligação ocorre duas horas após a toxina ser absorvida pelo organismo (Wang & Groopman, 1999).

Estes metabolitos alteram também os mecanismos epigenéticos (Hamid *et al.*, 2013) como a metilação, provocam a modificação das histonas, afetam a maturação dos microRNAs e fazem alterações de um único nucleótido como é caso da troca de um par de bases G:C para T:A, na terceira base do codão 249 do TP53 que causa mutações no p53, sendo um gene supressor de tumores (figura 6). Estas alterações vão ter influência sobre o aumento ou a diminuição da proliferação celular, a expressão gênica e a diferenciação celular. Uma mutação neste gene vai alterar a expressão dos genes de reparação, ciclo celular, a diferenciação de células e a apoptose. Sendo assim, a aflatoxina vai promover a proliferação excessiva de células ou a expressão errada de

enzimas celulares, levando ao desenvolvimento de cancro hepático. Se os enzimas de reparação não tiverem tempo de fazer o seu trabalho, ou se elas próprias tiverem alguma alteração nos nucleótidos, os danos no DNA irão, certamente, aumentar (Bbosa *et al.*, 2013).

Os estudos realizados em indivíduos com cancro hepatocelular demonstraram que a exposição à aflatoxina B1 promove a mutação de transversão de G para T no gene p53 (Anitha *et al.*, 2014; Habib *et al.*, 2006; Shen & Ong, 1996). Esta pode ser considerada a “*impressão digital*” molecular desta toxina, relacionando o início da formação de adutos de DNA com a fase final do desenvolvimento de cancro hepatocelular (Shen & Ong, 1996).

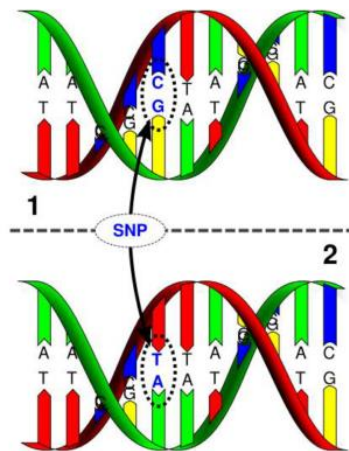


Figura 6 - Alteração G--> T no codão 249 do gene p53 devido às alterações epigenéticas provocadas pela aflatoxina. Fonte: Bbosa *et al.*, 2013.

Existem vários enzimas reparadores do DNA, tais como o XRCC4, XRCC1 e XPC, e cada um tem diferentes mecanismos de reparação. O mecanismo de reparação utilizado por estes enzimas na reparação de adutos é essencialmente o NER (Nucleotide Excision Repair) e o o BER (Base Excision Repair), pois a N7-guanina é removida da cadeia de DNA, deixando esse lugar sem uma purina (Lunn *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2014). A aflatoxina B1, para além de formar adutos de DNA, também o quebra numa das cadeias, ou nas duas, e também o oxida, fazendo com que estes enzimas tenham de recorrer a outros mecanismos, como a reparação por recombinação homóloga ou por *end joining* não homólogo (Long *et al.*, 2008).

Segundo Long *et al.*, 2013, vários estudos têm demonstrado que os polimorfismos existentes no gene do enzima XRCC4 podem alterar a atividade e expressão deste reparador de DNA, aumentando assim a probabilidade do aparecimento de cancro. No estudo deste mesmo autor, pelo menos, 21 SNP's foram avaliados, mas apenas um (polimorfismo rs28383151) mostrou uma relação entre a sua presença e o risco de desenvolver cancro hepático na presença de aflatoxina B1. Essa

relação é elevada, podendo este ser um biomarcador do prognóstico desta doença. Nesse polimorfismo os genótipos GA e AA são considerados os polimorfismos de risco. Os indivíduos que apresentem maior tempo de exposição à aflatoxina e possuam um destes genótipos possuem maior probabilidade de desenvolver a doença. Verificou-se também que o RNA mensageiro nos tecidos cancerígenos produz menos XRCC4 se o indivíduo possuir os alelos de risco (Long *et al.*, 2013).

O enzima XRCC1 é do mesmo tipo de gene de reparação que o anterior, mas pertence a um grupo diferente, isto é, pertence ao grupo complementar 1 e possui mais de 300 SNP's validados, sendo três, os mais comuns – Arg399Gln, Arg280His, Arg194Trp. O polimorfismo Arg399Gln está associado a várias alterações, inclusive com o aumento de níveis de adutos de DNA formados pela aflatoxina (Aydın *et al.*, 2017). No estudo de Lunn *et al.*, 1999, observou-se que este polimorfismo XRCC1 Arg399Gln reparava mal ou pouco os danos provocados na cadeia de DNA. Também se constatou que havia uma maior quantidade de adutos de aflatoxina em indivíduos com o genótipo Arg399Gln, apesar de não se saber o tempo nem a quantidade de exposição dos indivíduos a esta toxina (Lunn *et al.*, 1999), o que dificulta a avaliação da relação direta entre a quantidade de aduto presente e a eficiência de reparação.

O enzima de reparação XPC também está implicado na reparação de DNA removendo os adutos da aflatoxina. O polimorfismo XPC-Lys939Gln parece estar associado ao aumento do desenvolvimento de cancro devido à sua incapacidade de reparar o DNA corretamente. Segundo o estudo de Long *et al.*, 2015, verificou-se que o alelo que continha o aminoácido glicina (Gln), era aquele que tornava a reparação do DNA menos eficiente. Os indivíduos que apresentavam este genótipo tinham maiores quantidades de adutos de aflatoxina no DNA extraído de leucócitos (figura 7) (Long *et al.*, 2015).

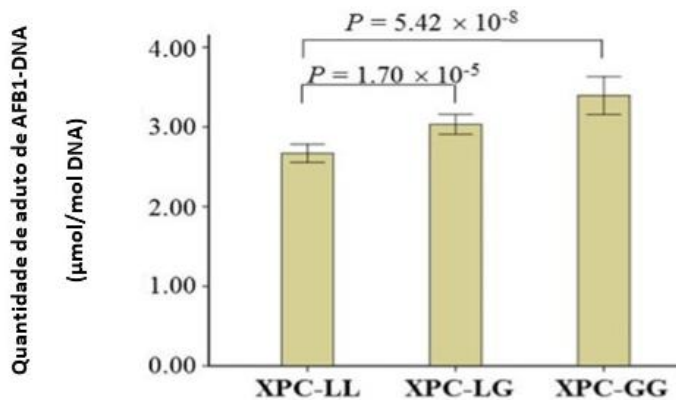


Figura 7 - Quantidade de adutos de DNA formados pela aflatoxina vs os diferentes polimorfismos do codão 939 do XPC. Adaptado de Long *et al.*, 2015.

Este reparador de DNA está envolvido no mecanismo de reparação NER juntamente com outras proteínas como a HR23B, formando um complexo estável que reconhece os primeiros danos existentes no DNA, tais como os adutos. Esta alteração de aminoácidos neste codão específico pode diminuir a capacidade de reparação, por parte desta proteína, em relação aos adutos, aumentando o nível de mutações em genes, tais como, o p53 (supressor de tumores) e, por conseguinte, a genotoxicidade e também o aparecimento e a progressão de cancro. (Yao *et al.*, 2014)

Estas proteínas reparadoras de DNA “trabalham” em conjunto na tentativa de diminuir os danos e os erros durante a replicação da cadeia de DNA, como tal podem afetar de maneira diferente a presença e a quantidade destes adutos de uma forma que ainda não foi estudada com pormenor, mas que pode alterar a relação quantidade de adutos *versus* deficiente capacidade de reparação (Marin *et al.*, 2013).

Yao *et al.*, 2014, demonstra que na presença do metabolito da aflatoxina, a probabilidade e o risco de desenvolver hepatocarcinomas é maior, devido à diminuição da capacidade de reparação da cadeia de DNA pelos genes reparadores do mesmo, que apresentam polimorfismos em regiões que regulam a sua própria expressão (Yao *et al.*, 2014).

Komives, 1987, demonstrou, no seu estudo realizado com linfoblastos de origem humana, que estes ficavam saturados de mutações induzidas pela aflatoxina B1. Também ficou demonstrado que existe um aumento proporcional entre a exposição e a formação de adutos de DNA. O organismo usa mecanismos para diminuir a quantidade destes adutos. O primeiro mecanismo é induzido pela

quantidade de adutos existentes nas células, ou seja, se essa quantidade ultrapassar os 1000 adutos/célula, os mecanismos de reparação são ativados para que os adutos encontrados na cadeia de DNA sejam removidos e a sequência de DNA é corrigida. Quando este valor é inferior, este mecanismo é desativado e, por isso, os adutos de DNA-N7-guanina que permanecem são removidos mais lentamente e a sua perda ocorre devido a depurinações espontâneas, deixando aquela zona específica de DNA sem guaninas, dando origem a mutações, o que significa que nem todas as apurinações são corrigidas. Existe um aspeto, em relação às depurinações, que deve ser realçado, é que estas depurinações podem ocorrer espontaneamente por outras razões, sem ser devido aos adutos AFB1-DNA (Komives, 1987).

1.6 Adutos de DNA como biomarcadores de exposição e de risco

No estudo de Turner *et al.*, 1998, é evidenciada a importância de tentar encontrar biomarcadores que se relacionem com a presença da aflatoxina B1 assim como com as doenças causadas pela toxina e o seu grau de gravidade. Os biomarcadores podem ser metabolitos - adutos de DNA ou de proteína (Turner *et al.*, 1998). Nos estudos de Leong *et al.*, 2012 e Redzwan *et al.*, 2014 é medido o aduto AFB1- albumina em amostras de sangue de indivíduos expostos à toxina (Leong *et al.*, 2012; Redzwan *et al.*, 2014). Mas também existem outros estudos que consideram que o uso de biomarcadores como os adutos de DNA-AFB1 e AFM1 na urina, e AFB1-lisina no sangue, podem ser úteis na avaliação do grau de exposição e do risco biológico da aflatoxina (Leong *et al.*, 2012; Redzwan *et al.*, 2014).

Estudos feitos em várias populações, como no Quénia, em Guangxi (região autónoma da República da China) e Gambia, após recolherem urinas de 24 horas, e em alguns casos monitorizando a quantidade de aflatoxina ingerida, ou à qual estavam expostos, fez-se a correlação entre o nível de exposição e a quantidade de aduto de N7-guanina medido na urina. A correlação foi positiva o que significa que a presença deste aduto na urina revela, mais uma vez, a exposição a esta toxina especificamente (Groopman *et al.*, 1992; Wang & Groopman, 1999).

No estudo de Xue *et al.*, 2016, é mencionado que o aduto que a aflatoxina forma com a lisina permanece mais tempo no organismo do indivíduo e, por isso, é considerado um biomarcador fidedigno para avaliar a exposição crónica à aflatoxina (Leong *et al.*, 2012) O aduto de lisina é libertado pela albumina após digestão enzimática e depois de o subproduto dos epóxidos se ligarem à albumina através da lisina, à qual se liga covalentemente o AFB1-diol (Turner *et al.*, 1998; Xue *et al.*, 2016)

Para além do metabolito da aflatoxina B1 que se liga à albumina e ao DNA, existem outros metabolitos que se formam, como é o caso dos metabolitos AFM1 e AFQ1 que são o resultado da oxidação de AFB1 em metabolitos hidroxilados, e ainda existem outros derivados desta oxidação como o AFP1 e o metabolito redutor – aflatoxicol – que podem ser detetados em indivíduos expostos a esta toxina (Leong *et al.*, 2012)

Os estudos de Groopman *et al.*, 1992, e de Sharma & Farmer, 2004, comprovam que a quantidade do aduto aflatoxina-N7-guanina encontrado na urina é um bom biomarcador de exposição à aflatoxina B1 e também de risco de haver desenvolvimento de cancro hepático (Groopman *et al.*, 1992; Sharma & Farmer, 2004). Este aduto é excretado muito rapidamente e, por isso, apenas pode ser detetado quando a exposição à aflatoxina é recente (Groopman *et al.*, 1992; Leong *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 1998), pois o seu tempo de semivida no nosso organismo é de 8 horas, enquanto que o do aduto de albumina é de 21 dias (Sharma & Farmer, 2004).

A aflatoxina tem como órgão alvo o fígado, como já foi mencionado anteriormente, e, por isso, para estudar a sua carcinogénese o ideal seria estudar as células alteradas pelos adutos AFB1-DNA nesse mesmo órgão. Contudo, na maior parte das vezes isso não é possível. E, por isso, tem de se utilizar outro tipo de amostras. Neste caso, a amostra que faz mais sentido ser utilizada é o sangue que permite estudar a genotoxicidade causada por vários agentes nos glóbulos brancos/leucócitos. Muitas vezes, recorre-se a metodologias como a formação de micronúcleos, aberrações cromossómicas e outros, em leucócitos, para avaliar o risco de desenvolver cancro (Phillips, 2005). Noutras situações, o DNA dos leucócitos pode ser extraído para se detetar a presença dos adutos formados por agentes cancerígenos, ligados ao DNA (Phillips, 2005) e se esta análise for feita antes de a doença se ter manifestado, mas se houver conhecimento de que existe exposição a um agente cancerígeno, é possível determinar o risco de desenvolver cancro, tendo em conta o número de adutos detetados nos leucócitos. Em princípio, os indivíduos que tiverem mais adutos, vão ter maior risco de desenvolver a doença (Phillips, 2005; Santella *et al.*, 2005), por isso, os adutos de DNA podem ser considerados biomarcadores de risco em relação à formação de tumores (Chou & Chen, 1997; Phillips, 2005; Santella *et al.*, 2005).

1.7 Contaminação dos cereais e farinhas em contextos ocupacionais e momentos específicos onde a contaminação pode ocorrer

Estima-se que um quarto dos cereais produzidos mundialmente está contaminado com micotoxinas, para além de outros alimentos como nozes, fruta, legumes e produtos derivados destes

alimentos (Liu *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2013; Turner *et al.*, 1998). Esta contaminação pode ocorrer em diferentes momentos, tais como antes da colheita, durante a colheita e tempo de secagem, armazenamento e transporte (Marin *et al.*, 2013).

As aflatoxinas são as micotoxinas que foram detetadas mais frequentemente em produtos agrícolas e em produtos de padaria (tabela 2) (Marin *et al.*, 2013).

Tabela 2 - Alertas de micotoxinas por produtos ocorridos na Europa em 2012. Adaptado de Marin *et al.*, 2013

Tipo de produto	Aflatoxinas	Deoxinivalenol (DON)	Fumonisin	Ocratoxina A	Zearalenona
Cereais e produtos de padaria	17	4	4	6	3
Frutas e vegetais	137			19	1
Ervas e especiarias	33			4	
Nozes e sementes	204				
Total	470	4	4	29	4

O desenvolvimento destes fungos e a produção das suas toxinas vai depender da temperatura, da humidade, da atividade da água, presença de outros microrganismos durante o armazenamento dos alimentos (Marin *et al.*, 2013), do método de agricultura (Kirincić *et al.*, 2015) e do clima e da região em que são cultivados os produtos alimentares (Alkadri *et al.*, 2014). Se durante o armazenamento a atividade da água aumentar, a probabilidade de desenvolverem fungos e a respetiva produção de micotoxinas é maior, o que pode fazer com que se acumulem as toxinas nos alimentos processados (Marin *et al.*, 2013).

Os métodos de processamento dos cereais e frutos secos podem reduzir a percentagem de aflatoxinas nos produtos alimentares. No caso das farinhas, a moagem redistribui as aflatoxinas em diferentes frações, sendo a farinha o produto que fica menos contaminado. Estas toxinas são bastante estáveis e resistentes ao calor, capazes de resistir às temperaturas dos vários métodos de confeção de alimentos, tais como, a confeção de bolos e a torrefação dos amendoins e dos grãos de café (Kabak, 2012; Liu *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2013; Saladino *et al.*, 2017). Sendo a redução nos alimentos pouco conseguida, estas toxinas facilmente entram na cadeia alimentar do ser humano (Kabak, 2012).

No estudo de Kabak, 2012, sobre a deteção de aflatoxinas e ocratoxina A nos produtos provenientes de cereais, como é o caso de bolachas e biscoitos de diferentes supermercados de uma região da Turquia, chamada Corum, descobriu-se que ambas as toxinas estavam presentes. A ocratoxina foi a toxina detetada em mais amostras e em maiores quantidades, enquanto que aflatoxina B1 foi detetada em menos amostras e em quantidades inferiores. A aflatoxina foi

maioritariamente detetada em produtos provenientes do milho ou da farinha de milho, como era expectável, de acordo com outros estudos científicos. Nenhuma destas toxinas apresentou valores superiores ao valor máximo tolerável de 3µg/kg, estabelecido nos regulamentos da União Europeia (Kabak, 2012).

O estudo de Fromme et al., 2016, foi realizado em diferentes contextos ocupacionais com o intuito de avaliar a presença de micotoxinas. Entre outras, as mais encontradas são as aflatoxinas em contextos de trabalho como quintas, fábricas de processamento de milho e grãos, e fábricas de amendoins e malte. Observa-se que, em certos locais, onde são realizadas atividades específicas, como remover o lixo e alimentar os animais, os níveis de aflatoxina são bastante elevados (tabela 3). Esses valores foram obtidos através de medições da matéria particulada e do ar de cada secção (Fromme *et al.*, 2016).

Tabela 3 - Concentrações de micotoxinas em amostras de ar nos diferentes contextos ocupacionais. Adaptado de Fromme *et al.*, 2016.

Referências	N	N>LDQ	Resultados em ng/m ³	Observações
Aflatoxina B1				
Selim et al. (1998)	24		0,04-92	Colheita de grãos (Estados Unidos)
Lanier et al. (2012)	12	0	<LOQ	Gado (França)
DON				
Lappalainen et al. (1996)	15	2	3 e 20	Quintas na Finlândia
Mayer et al. (2007)	35		0,2-720	Grão armazenado (Alemanha)
Ocratoxina A				
Mayer et al. (2007)	35		0,00007-0,69	Grão armazenado (Alemanha)
Halstensen et al. (2004)	31		0,003-14	Grão seco a ser colocado num camião (Noruega)
Iavicoli et al. (2002)	6	6	0,006-0,09	Indústria de cacão, café e especiarias (Itália)
Zearalenona				
Mayer et al. (2007)	35		0,1-50,1	Gado (França)

N – número de amostras de ar

LDQ – limite de quantificação

A ocratoxina A também está presente em muitos alimentos como trigo, aveia, cevada, milho, farinha de milho e arroz. E ainda existem outras toxinas presentes nestes contextos ocupacionais e nestes alimentos, mas a ocratoxina A e a aflatoxina B1 são os que aparecem com mais frequência, e em algumas vezes em quantidades maiores (Kabak, 2012).

Num estudo realizado por Saladino *et al.*, 2017, detetaram-se aflatoxinas em fatias de pão vendidas em vários supermercados da zona de Valência em Espanha. Considera-se que o pão tem propriedades que promovem o desenvolvimento de fungos, tais como a elevada atividade da água e o pH. As fatias de pão aumentam a área de superfície, o que é propício para a sua deterioração pelos fungos. A percentagem de amostras contaminadas com aflatoxina foi de 20%, sendo que, 5% dessas amostras excediam o valor permitido pela legislação europeia, embora o consumo estimado desta toxina pela população tenha sido inferior ao valor máximo aceitável (Saladino *et al.*, 2017).

Bol *et al.*, 2016 realizou um estudo com produtos de padaria e massas no Brasil foram detetadas micotoxinas, entre elas, a aflatoxina B1 em quantidades que representam um risco para a população. Tendo em conta que são produtos consumidos em larga escala, é necessário tomar precauções para prevenir a exposição de quem consome e quem trabalha nestes ambientes, e, conseqüentemente, o aparecimento de doenças graves, para além do cancro (Bol *et al.*, 2016).

Dependendo da região do mundo, a predominância de algumas micotoxinas varia, como mostra o estudo realizado por Alkadri *et al.*, 2014, devido ao clima característico de cada região. Climas com temperaturas altas e muita humidade são propícios para o desenvolvimento natural das micotoxinas (Anitha *et al.*, 2014). Em cereais cultivados na Síria foram detetadas mais aflatoxinas e ocratoxinas enquanto que em Itália as micotoxinas predominantes são a zearalenona e os tricotecenos (Alkadri *et al.*, 2014). A contaminação na maior parte dos casos não está acima do valor máximo admissível pela Legislação Europeia, mas ainda assim é preocupante, tendo em conta o elevado consumo destes produtos e os efeitos que, mesmo consumidos em baixas quantidades, estas micotoxinas irão ter a longo prazo. Para além disso, a contaminação não é de apenas um tipo de toxina, mas sim de vários ao mesmo tempo num único produto.

1.8 Técnicas usadas na deteção de adutos de DNA e da aflatoxina

O HPLC é uma técnica muito utilizada na deteção de adutos, como é o caso de um estudo realizado na população da Malásia, que detetou o aduto AFB1-lisina em amostras de soro de todos os indivíduos que fizeram parte do estudo (Redzwan *et al.*, 2014).

Para além do HPLC, outros métodos como, ensaios imunológicos (RIA, ELISA), cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa, eletroforeses, ensaios eletroquímicos e absorção atómica são usados na deteção das aflatoxinas e do seus metabolitos (Leong *et al.*, 2012; Phillips, 2005). Os métodos RIA e ELISA são bastante sensíveis, mas, por outro lado, a sua especificidade depende da qualidade do anticorpo, podendo haver reações cruzadas o que origina falsos positivos. As outras técnicas também são sensíveis e por vezes até revelam alta especificidade, mas são equipamentos mais dispendiosos que só conseguem detetar alguns tipos de adutos (Poirier, 1997; Sharma & Farmer, 2004). Os ensaios como os do ELISA podem ter uma sensibilidade de deteção de 1 aduto por 10^8 nucleótidos não modificados com amostras entre 10-50 μ g (Poirier, 1997; Santella *et al.*, 2005), enquanto que a técnica de cromatografia acoplada à espectroscopia de massa necessita de, pelo menos, 100 μ g. O ELISA é uma técnica que consegue detetar quantidades muito baixas de adutos (Carvajal, 2008), sendo o ELISA competitivo, com anticorpos monoclonais, usado para detetar

este aduto em vários fluidos biológicos, como a urina e o sangue, por prevenir a ocorrência de reações cruzadas (Carvajal, 2008; Santella *et al.*, 2005).

Uma das técnicas mais utilizadas em vários estudos é a purificação numa coluna de imunoafinidade antes de se realizar o HPLC com deteção por fluorescência. Tem a vantagem de possuir a seletividade da utilização de um anticorpo e da separação da cromatografia, tornando a deteção bastante específica (Leong *et al.*, 2012).

2. Objetivos

Os objetivos deste estudo são:

- Analisar a associação entre a exposição profissional à aflatoxina e polimorfismos genéticos na formação de adutos de DNA
- Determinação de adutos de aflatoxina B1 ligados ao DNA de células linfocitárias com recurso a um *kit* comercializado para a deteção do aduto AFB1-DNA
- Avaliar se diferentes polimorfismos nos genes dos enzimas que fazem parte do metabolismo e dos de reparação de DNA podem ter um efeito promotor ou preventivo na prevalência de adutos de DNA.

3. Materiais e Métodos

3.1 Colheita de amostras de sangue

Foram colhidas 77 amostras de sangue de indivíduos que trabalhavam em panificadoras com idades compreendidas entre os 23 e os 64 anos de ambos os géneros. Todos os indivíduos que participaram neste estudo preencheram um termo de consentimento informado (anexo 1). Foi colhido sangue total em tubos de EDTA com um volume de 2 mL que foram armazenados a -20°C durante 10 meses no laboratório de genética da Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa.

Tendo em conta vários estudos mencionados anteriormente neste trabalho, em relação à contaminação dos produtos alimentares confeccionados nas panificadoras, colocou-se a hipótese de que estes indivíduos poderiam estar expostos à aflatoxina B1 no seu local de trabalho. As vias de entrada da aflatoxina, se ela estiver presente neste contexto ocupacional, são maioritariamente a via inalatória e a via dérmica, podendo ainda eventualmente ser por via oral.

3.2 Extração e quantificação de DNA

O DNA foi extraído de acordo com o protocolo do kit QIAamp DNA Blood Midi Kit (100) seguindo o procedimento “*spin*”, esquematizado na figura 8. Para este tipo de extração utilizou-se 2 ml de sangue total de cada amostra. As células foram lisadas pela QIAGEN protéase (Proteinase K). A amostra de sangue total é adicionada à proteinase K. O tampão AL é adicionado de seguida para assegurar que a amostra e o lisado estão bem homogeneizados. Após a primeira incubação, adicionou-se etanol a 96% para purificar a amostra. De seguida coloca-se a amostra em contato com a coluna de purificação que está dentro dos tubos fornecidos pelo kit. Depois centrifuga-se e adiciona-se o tampão AW1, volta-se a centrifugar e adiciona-se o tampão seguinte, AW2. O soluto que se obtém após cada centrifugação é descartado. Por fim, adiciona-se o tampão AE, centrifuga-se mais uma vez e obtém-se o DNA que estava retido na coluna, no fim do tubo. O DNA obtido de cada amostra foi depois misturado com a solução de trabalho fornecida pelo kit Qubit dsDNA HS Assay para depois proceder-se à sua quantificação pelo fluorómetro Qubit 3 Invitrogen (Thermo Fisher Scientific).

Método de extração por "spin"

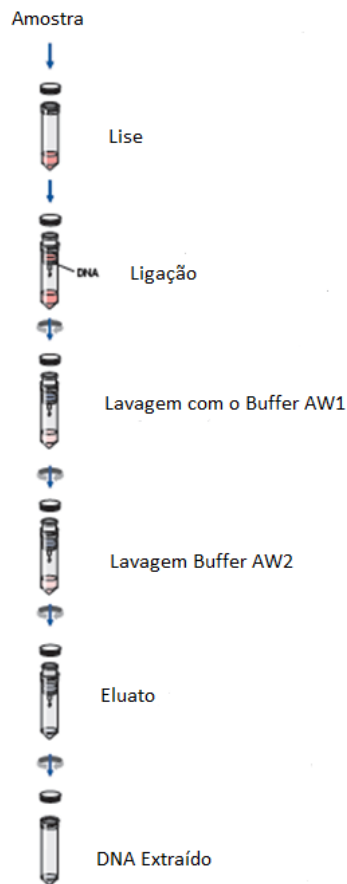


Figura 8 - Extração de DNA pelo procedimento "spin". Adaptado de Qiagen & Midi/Maxi, 2012.

3.3 Fenotipagem de GST's por PCR Multiplex

Amplificou-se 1 µl de DNA em 25 µl de uma reação de mistura multiplex contendo 25 pmol de cada um dos primers – GSTT1, GSTM1 e CYP1A1 e 12,5µl do MyTaq Mix (2x). O PCR Multiplex permite detetar simultaneamente diferentes genes na mesma amostra. Neste caso, foi utilizado para detetar os genes GSTT1 e GSTM1, sendo que o CYP1A1 foi o controlo positivo e o branco o controlo negativo. A reação inicial de desnaturação foi feita a 94°C durante 10 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 58 segundos, 59°C por 58 segundos e 72°C em 58 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C em 10 min, utilizando o termociclador *CFX connect* da *Biorad*. Os produtos amplificados foram separados num gel com 2% de agarose corado com *RedSafe*. O tamanho dos produtos de PCR do GSTM1, no gel de agarose, corresponde à banda de 215 pb e o do GSTT1 corresponde à banda 480

pb. O controlo interno positivo (CYP1A1) corresponde à banda de 312 pb. Esta metodologia foi realizada tendo por base o estudo de Mir & Hamadi, 2016. Quando as bandas correspondentes ao GSTT1 e ao GSTM1 não estão presentes significa que houve deleção dos dois alelos, quando estão presentes não se consegue saber se são homozigótos ou heterozigóticos.

3.4 Genotipagem do CYP3A4 e XRCC4 por PCR em Tempo Real

Amplificou-se 1 µl de DNA em 20 µl de uma reação de mistura contendo 10 µl de taqman (2x), 1 µl de sonda com os primers (tabela 4), correspondentes a cada um dos polimorfismos, e 8 µl de H₂O. A reação inicial de desnaturação foi feita a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos, de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 minutos. A genotipagem foi feita com base na observação das duas curvas de amplificação do PCR que representavam cada alelo, utilizando também o termociclador *CFX connect* da *Biorad*. Uma das curvas representava o alelo mais comum que, no caso do gene CYP3A4 (rs2740574), era o que possuía a base T, que era representado pela sonda FAM, enquanto que a outra curva representava o alelo mais raro com a base C através da sonda VIC. No caso do gene XRCC4 (rs28383151), a sonda FAM também representava o alelo, mais comum, que era continha a base G e o VIC o alelo, mais raro, que era possui a base A.

Tabela 4 – Identificação da região dos primers utilizados no PCR de tempo real. Adapatado de TaqMan® SNP Genotyping, 2005

Sondas	Sequências da região estudada
VIC – G / FAM – A (rs2740574)	TTCCACAAGTTCTCAAAGCAACTAT[G/A]TTCATAACTTAATCTCTCTT TTTTT
VIC – T/ FAM – C (rs28383151)	GATACTGCTTTTCCTATTAACCCAT[T/C]AGTGATGGGGTCAGAAGGCT GAGGC

3.5 Deteção dos adutos AFB1-DNA

Para detetar os adutos seguiram-se as intruções do kit “Aflatoxin DNA adduct Competitive ELISA kit” (Cell Biolabs, Inc) que deteta a quantidade de adutos de DNA de aflatoxina B1 formados em ambas as formas: anel aberto e anel fechado, usando um anticorpo que tem mais afinidade com o aduto AFB1-DNA em solução, proveniente da amostra ou padrões, do que para o aduto adsorvido no poço, visto que a placa onde ocorre a reação tem 96 poços revestidos com o aduto da aflatoxina. No primeiro passo, adicionam-se os padrões, fornecidos pelo kit, ou/e as amostras e de seguida adiciona-se o primeiro anticorpo contra os adutos de AFB1-DNA, incuba-se e posteriormente lava-se.

Com esta lavagem eliminam-se todos os complexos de anticorpo-aduto não retidos no poço. Posteriormente adiciona-se o segundo anticorpo conjugado com a enzima HRP e após uma hora adiciona-se o substrato. Por fim adiciona-se a solução stop e passado 10 minutos faz-se a leitura a 450 nm no equipamento *Ivymen system* modelo 2100 C, sabendo que quanto menor for o valor da absorvância maior é a quantidade de adutos de DNA.

As amostras escolhidas para a determinação dos adutos foram, previamente, liofilizadas de forma a concentrar o DNA e assim se obter quantidade de DNA suficiente para realizar o teste de ELISA de acordo com as normas do kit.

3.6 Análise estatística

Para realizar a análise estatística entre as diferenças dos polimorfismos e a quantidade de aduto recorreu-se a um software de estatística, nomeadamente, o SPSS (*“Statistical Package for the Social Sciences”*). Foi realizado um teste-t com o *p-value* de 5% e o teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis*.

4. Resultados e Discussão

Neste estudo foram recolhidas 77 amostras de sangue total de indivíduos que trabalhavam em panificadoras para analisar a quantidade de adutos de DNA e a existência de polimorfismos nos genes CYP3A4, GSTT1, GSTM1 e XRCC4. Para todas as amostras realizou-se o PCR Multiplex e posterior separação dos produtos amplificados no gel de agarose para os genes GSTT1 e GSTM1 e também se realizou PCR em tempo real para analisar os alelos do gene CYP3A4 (rs2740574). Em relação ao gene XRCC4 (rs28383151), só se realizou o PCR em tempo-real com 37 amostras, pois esta análise foi feita após a análise dos resultados da quantificação de adutos de DNA que tinham sido obtidos dessas 37 amostras. Na tabela 5, apresentam-se todas as amostras e respetivos resultados obtidos de cada método.

4.1. Curva de Calibração do teste de ELISA Competitivo de aduto de DNA de aflatoxina.

Neste estudo foi utilizado a técnica de ELISA competitivo para detetar os adutos de aflatoxina ligados ao DNA das células linfocitárias, sendo esta deteção feita através de um leitor de absorvâncias, tanto dos padrões que constituem a curva como das amostras de cada indivíduo, num comprimento de onda de 450 nm.

Após a medição dos valores das absorvâncias de cada amostra padrão, foi possível construir a curva de calibração, apresentada na figura 9, que é representada pela seguinte equação:

$$y = -2,4267x + 2,2731,$$

em que o coeficiente de correlação (r^2) é 0,9955, o que significa que 99% dos valores medidos devem-se às próprias medições. Para elaborar a curva de calibração consideraram-se as seguintes concentrações padrão de adutos 0; 0,25 e 0,49 μmol , pois são estes três pontos da reta que têm relevância para as quantidades de adutos de DNA encontrados nas amostras, ou seja, a quantidade de adutos encontrada nas amostras estava entre 0 e 0,49 μmol . A escolha destes padrões permitiu que se obtivesse um coeficiente de correlação aceitável.

Tabela 5 - Resultados de todas as amostras analisadas neste estudo relativamente à quantificação de adutos de aflatoxina no DNA e aos genótipos dos genes CYP3A4 e XRCC4 e à ausência/presença dos alelos dos genes GSTT1 e GSTM1.

Amostra	Genótipo rs2740574 CYP3A4	Genótipo rs28383151 XRCC4	GSTT1	GSTM1	Quantidade de adutos de AFB1/ DNA ($\mu\text{mol/mol}$)
APPA7	CC		+	-	
ACR7	TC	GG	+	-	$1,37 \times 10^{-2}$
APPA8	TC	GG	+	-	$5,43 \times 10^{-3}$
LV23	TC	GG	+	+	$4,58 \times 10^{-3}$
LV8	TC	GG	+	-	$9,86 \times 10^{-3}$
M1	TC	GG	+	+	$3,26 \times 10^{-4}$
OV6	TC	GG	+	+	$2,79 \times 10^{-3}$
ST3	TC		+	-	
PNN4	TC		+	+	
ACR6	TC	GG	+	-	$3,95 \times 10^{-2}$
OV5	TC		+	+	
PNN2	TC		+	-	
NI2	TC		+	-	
APPA11	TC	GG	+	+	$1,39 \times 10^{-2}$
ACR11	TC	GG	+	+	$2,76 \times 10^{-3}$
NI3	TC		+	-	
LV2	TC	GG	+	+	$4,20 \times 10^{-3}$
LV14	TC	GG	+	-	$7,47 \times 10^{-3}$
LV21	TC	GG	+	-	$4,70 \times 10^{-3}$
ST2	TT		+	+	
ST4	TT		+	+	
ST6	TT		+	+	
ST7	TT		+	-	
ST8	TT		ND	ND	
ST1	TT	GG	+	+	$3,66 \times 10^{-2}$

Continuação **Tabela 5** - Resultados de todas as amostras analisadas neste estudo relativamente à quantificação de adutos de aflatoxina no DNA e aos genótipos dos genes CYP3A4 e XRCC4 e à ausência/presença dos alelos dos genes GSTT1 e GSTM1.

Amostra	Genótipo rs2740574 CYP3A4	Genótipo rs28383151 XRCC4	GSTT1	GSTM1	Quantidade de adutos de AFB1/ DNA ($\mu\text{mol/mol}$)
ST5	TT		+	+	
M3	TT		+	-	
M9	TT		+	-	
M5	TT		+	+	
NI1	TT		+	-	
M10	TT	GG	+	-	$2,47 \times 10^{-4}$
ACR5	TT		+	+	
PNO1	TT		+	+	
M4	TT		+	+	
ST9	TT	GG	+	+	$8,54 \times 10^{-3}$
LV15	TT		+	+	
M6	TT		+	+	
LV16	TT		+	+	
OV3	TT	GG	+	+	$3,98 \times 10^{-3}$
ACR1	TT		+	-	
ACR3	TT	GG	+	-	$3,46 \times 10^{-3}$
ACR9	TT		+	+	
M2	TT	GG	+	-	$2,77 \times 10^{-3}$
ACR12	TT		+	+	
ACR2	TT		+	+	
OV4	TT	GG	-	+	$5,05 \times 10^{-3}$
APPA12	TT	GG	+	-	$1,93 \times 10^{-6}$
LV9	TT	GG	+	+	$2,58 \times 10^{-3}$
LV4	TT		+	+	
LV6	TT		+	-	
ACR4	TT	GA	-	-	$1,08 \times 10^{-2}$
LV3	TT	GG	-	-	$1,58 \times 10^{-3}$
NI4	TT		+	+	
OV2	TT	GG	+	-	$2,15 \times 10^{-3}$
ACR10	TT		+	-	
LV5	TT		+	-	
APPA2	TT		+	+	
LV10	TT	GG	ND	ND	$1,06 \times 10^{-2}$
M8	TT		+	+	
LV12	TT	GG	+	+	$8,96 \times 10^{-3}$
APPA10	TT	GG	+	-	< LD
LV20	TT		-	-	
LV11	TT	GG	+	+	$7,26 \times 10^{-3}$
M7	TT	GG	+	-	$3,90 \times 10^{-5}$
LV7	TT		+	+	

Continuação **Tabela 5** - Resultados de todas as amostras analisadas neste estudo relativamente à quantificação de adutos de aflatoxina no DNA e aos genótipos dos genes CYP3A4 e XRCC4 e à ausência/presença dos alelos dos genes GSTT1 e GSTM1.

Amostra	Genótipo rs2740574 CYP3A4	Genótipo rs28383151 XRCC4	GSTT1	GSTM1	Quantidade de adutos de AFB1/DNA ($\mu\text{mol/mol}$)
LV19	TT	GG	+	-	$4,21 \times 10^{-3}$
APPA9	TT	GG	+	-	$1,46 \times 10^{-3}$
APPA3	TT		+	+	
APPA6	TT		+	+	
APPA4	TT	GG	+	+	$2,97 \times 10^{-3}$
APPA5	TT		+	-	
PNN6	TT	GG	+	+	$7,38 \times 10^{-3}$
APPA1	TT	GG	+	-	<LD
LV1	TT		+	+	
PNN5	TT	GG	+	+	$2,71 \times 10^{-3}$
OV1	TT	GG	+	-	<LD
LV22	TT	GG	+	-	$6,87 \times 10^{-3}$

ND – Não detectado
LD – Limite de deteção

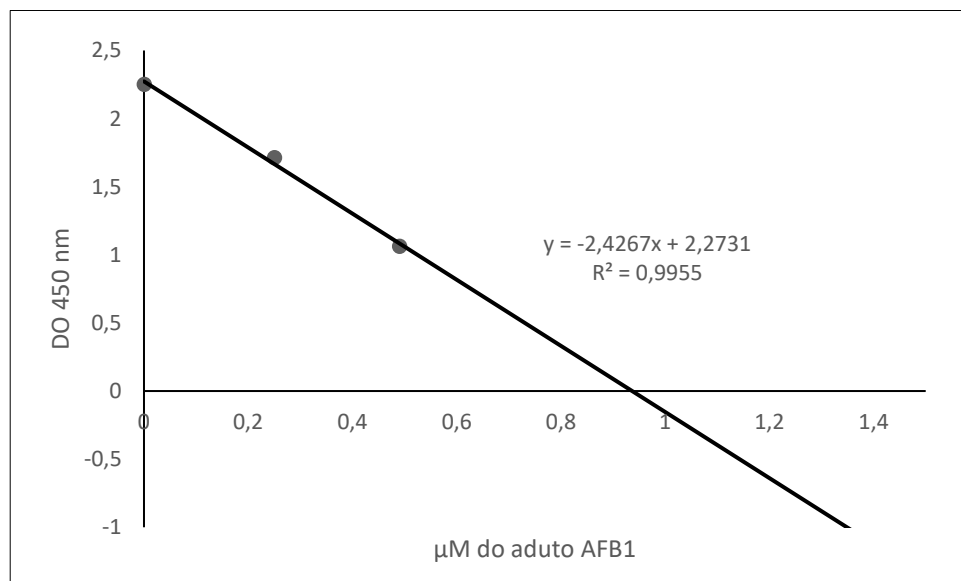


Figura 9 - Curva de Calibração do aduto AFB1-DNA

4.2. Deteção de adutos de DNA de aflatoxina em amostras de sangue total de trabalhadoras de panificadoras.

Depois da extração de DNA, o mesmo foi quantificado em microgramas, e as amostras com maior quantidade de DNA (tabela 6) foram as escolhidas para serem detetados os adutos, sendo posteriormente liofilizadas para que se obtivesse o máximo de DNA concentrado. Esta medida foi

tomada devido à necessidade de garantir uma quantidade de DNA suficiente para a análise, evitando assim a repetição, que não seria possível realizar, caso houvesse necessidade de o fazer, pela impossibilidade de aquisição de reagentes, como tal das 77 amostras de DNA extraído, 37 delas foram escolhidas para este efeito. Considerou-se que a quantidade suficiente seria idealmente 50µg de DNA, embora, em alguns casos, a quantidade obtida, tenha sido inferior à idealizada. Esta quantidade de DNA foi considerada a ideal tendo por base os estudos de Lunn *et al.*, 1999, e de Long *et al.*, 2008, que realizaram uma investigação com indivíduos que tinham cancro hepatocelular diagnosticado. Cada indivíduo doou 4 mL de sangue, enquanto que neste trabalho apenas foi possível recolher 2 mL de sangue. A deteção de adutos foi feita extraíndo o DNA dos leucócitos, tal como neste presente estudo. Os adutos de DNA de aflatoxina destas células foram medidos através da técnica de ELISA competitivo, utilizando um anticorpo monoclonal e 50 µg de DNA de cada amostra.

Tabela 6 - Quantidade de DNA das amostras seleccionadas para se detetarem os adutos.

Amostras	Quantidade de DNA (µg)
APPA 12	18,99
APPA 11	6,46
APPA 10	4,65
APPA 9	43,83
APPA 8	5,89
APPA 4	8,1
APPA1	9,96
ACR 11	4,5
LV 23	6,51
LV 22	8,75
LV 21	7,22
LV 19	5,47
M 10	19,62
M 7	19,73
M 2	22,01
M 1	74,15
LV 14	9,29
LV 12	7,32
LV 11	10,26
LV 10	8,92
LV 9	19,21
LV 8	9,92
LV 2	12,45
LV 3	55,29
ACR 7	7
ACR 6	7,2
ACR 4	6,99
ACR 3	19,71
PN 5	28,09
PN 6	16,09
OV 6	24,14
OV 4	13,14

Amostras	Quantidade de DNA (μg)
OV3	15,27
OV 2	20,36
ST 9	7,71
ST 1	5,28
OV1	111,98

As amostras utilizadas para a detecção de adutos estão apresentadas na tabela 6, com identificações anónimas, para manter a confidencialidade dos indivíduos que participaram no estudo. Para cada amostra, foi medida a absorvância, após se colocar a solução stop em cada poço do kit. Com o valor da absorvância e através da equação da curva de calibração:

$$y = -2,4267x + 2,2731,$$

obteve-se a concentração dos adutos de DNA em μM . Verifica-se o princípio do método de um ELISA competitivo, pois quanto maior é a absorvância, menor é a concentração do aduto de aflatoxina de DNA (tabela 7).

Em relação à concentração de adutos encontrada, os valores foram muito baixos, todos são inferiores a $0,49 \mu\text{M}$, o que indica que muito provavelmente, a exposição à aflatoxina seria baixa, ou que os mecanismos de destoxificação estão a remover os metabolitos ativos da toxina e os seus adutos adequadamente. Em relação às amostras de urina, dos mesmos indivíduos, que foram analisadas para outro projeto, não lhes foi detetado a presença de aflatoxina e, por isso, também seria de esperar não serem encontrados adutos em grande quantidade no sangue (Viegas *et al.*, 2018). Remetendo novamente para o estudo de Long *et al.*, 2008, a quantidade, em média, de aductos detetada nos pacientes foi $1,93 \pm 0,48 \mu\text{mol}$ de aduto/mol de DNA, ou seja, está entre o valor baixo ($1 \mu\text{mol/mol}$ DNA) e o valor alto ($2 \mu\text{mol/mol}$ DNA) de quantidade de adutos de DNA para o ser humano considerado pelos autores. Na verdade, este valor está muito perto do valor alto, pois a exposição à aflatoxina foi bastante longa e, como consequência, os indivíduos desenvolveram cancro hepático. Em relação aos valores de aduto encontrados neste trabalho, que estão apresentados na tabela 7, constata-se que são todos inferiores a $1 \mu\text{mol}$ de aduto/mol DNA, o que significa que o estudo de Long *et al.*, 2008 corrobora com o facto de que os valores de aduto encontrados na amostra selecionada são baixos.

O anticorpo anti-aflatoxina B1, utilizado por este kit, liga-se tanto a adutos de DNA de anel aberto como de anel fechado. Os adutos de anel aberto por norma são mais estáveis e formam-se com o passar do tempo, enquanto que os de anel fechado são facilmente removidos e detetados quando a exposição do indivíduo à aflatoxina é recente. Sendo este teste uma vantagem para detetar

se o indivíduo apresenta adutos em qualquer estadió da exposição, apesar de ser frequentemente referido pelos autores que, quando a exposição é longa ou demasiado longa (muitos anos), o indivíduo apresentará sinais de alguma patologia relacionada com esta exposição. No entanto, é necessário ainda compreender melhor se, de facto, a presença de adutos reflete ser uma consequência a uma exposição específica, neste caso de aflatoxina B1, pois muitas vezes há adutos semelhantes que se formam por outras razões (Sharma & Farmer, 2004).

Tabela 7 - Quantidade de adutos de DNA-AFB1 detetados nas amostras dos trabalhadores em panificadoras, em Portugal.

Amostras	DO 450 nm	μM	Quantidade de adutos (μmol de aduto/mol de DNA)
APPA 12	1,87	0,0512	$1,93 \times 10^{-6}$
APPA 11	1,9	0,0464	$1,39 \times 10^{-2}$
APPA 9	1,628	0,0893	$1,46 \times 10^{-3}$
APPA 8	1,912	0,0445	$5,43 \times 10^{-3}$
APPA 4	1,982	0,0335	$2,97 \times 10^{-3}$
ACR 11	2,085	0,0172	$2,76 \times 10^{-3}$
LV 23	1,931	0,0416	$4,58 \times 10^{-3}$
LV 22	1,663	0,0838	$6,87 \times 10^{-3}$
LV 21	1,895	0,0472	$4,70 \times 10^{-3}$
LV 19	1,991	0,0321	$4,21 \times 10^{-3}$
M 10	2,152	0,0067	$2,47 \times 10^{-4}$
M 7	2,188	0,0011	$3,90 \times 10^{-5}$
M 2	1,655	0,0850	$2,77 \times 10^{-3}$
M 1	1,981	0,0337	$3,26 \times 10^{-4}$
LV 14	1,581	0,0967	$7,47 \times 10^{-3}$
LV 12	1,615	0,0913	$8,96 \times 10^{-3}$
LV 11	1,536	0,1038	$7,26 \times 10^{-3}$
LV 10	1,358	0,1318	$1,06 \times 10^{-2}$
LV 9	1,757	0,0690	$2,58 \times 10^{-3}$

Continuação **Tabela 7**- Quantidade de adutos de DNA-AFB1 detetados nas amostras dos trabalhadores em panificadoras, em Portugal.

Amostras	DO 450 nm	μM	Quantidade de adutos (μmol de aduto/mol de DNA)
LV8	1,33	0,1362	$9,86 \times 10^{-3}$
LV 3	1,423	0,1216	$1,58 \times 10^{-3}$
LV 2	1,733	0,0727	$4,20 \times 10^{-3}$
ACR 7	1,346	0,1337	$1,37 \times 10^{-2}$
ACR 6	1,312	0,1391	$3,95 \times 10^{-2}$
ACR 4	1,527	0,1052	$1,08 \times 10^{-2}$
ACR 3	1,592	0,0950	$3,46 \times 10^{-3}$
PN 5	1,521	0,1061	$2,71 \times 10^{-3}$
PN 6	1,145	0,1654	$7,38 \times 10^{-3}$
OV 6	1,599	0,0939	$2,79 \times 10^{-3}$
OV 4	1,608	0,0924	$5,05 \times 10^{-3}$
OV 3	1,657	0,0847	$3,98 \times 10^{-3}$
OV 2	1,807	0,0611	$2,15 \times 10^{-3}$
ST 9	1,613	0,0917	$8,54 \times 10^{-3}$
ST 1	0,485	0,2693	$3,66 \times 10^{-2}$

4.3. Frequências dos polimorfismos estudados nos genes dos enzimas GST, CYP3A4 e do XRCC4 em cada indivíduo.

Em relação ao polimorfismo do enzima GST, que pode ter as variantes GSTT, GSTM, ambos homozigóticos ou heterozigóticos, e GSTT e GSTM nulos, pode observar-se na figura 10, as amostras identificadas em cada poço. As amostras que apresentam três bandas correspondem aos indivíduos que têm o fenótipo/genótipo GSTT e GSTM. A terceira banda, que está no meio, corresponde ao controlo positivo e é o CYP1A1, como foi mencionado anteriormente na secção 3.3. A banda que está acima do controlo positivo corresponde ao GSTT1, e a banda inferior ao controlo positivo corresponde ao GSTM1. Tendo em conta que o controlo positivo interno (CYP1A1) se encontra presente em todos os poços, significa que a migração dos fragmentos de DNA foi realizada corretamente. Como controlo negativo, usou-se um branco, ou seja, colocou-se apenas, água

distilada ultrapura juntamente com a solução de amplificação, tendo em conta que não existem bandas no poço respetivo, significa que não houve contaminações de DNA, pois a banda visível no fundo do poço corresponde aos primers não usados. Nos poços com as amostras ST8 e LV10, não houve migração de qualquer fragmento de DNA, como acontece no poço do controlo negativo (B). Uma das razões para que isso possa ter acontecido pode ser por na replicação, durante o PCR, não ter ocorrido devido ao facto de já não existir DNA suficiente nas amostras e isso pode ter sido consequência de uma má extração. Contudo, o equipamento de medição da quantidade de DNA, detetou a presença do mesmo. Outra razão poderia ser a degradação do próprio DNA com o tempo, apesar de este ter sido conservado a -8 °C. Foram realizadas algumas diluições, partindo do princípio, que todas as amostras continham elevado conteúdo de DNA, provavelmente fez-se uma diluição demasiado elevada e, talvez por isso, não foi possível replicar o DNA durante o PCR. Outra explicação que pode ser apresentada é a existência de haver algum composto ligado ao DNA que não permitiu a sua replicação, inibida no PCR, ou a sua migração no gel de agarose.

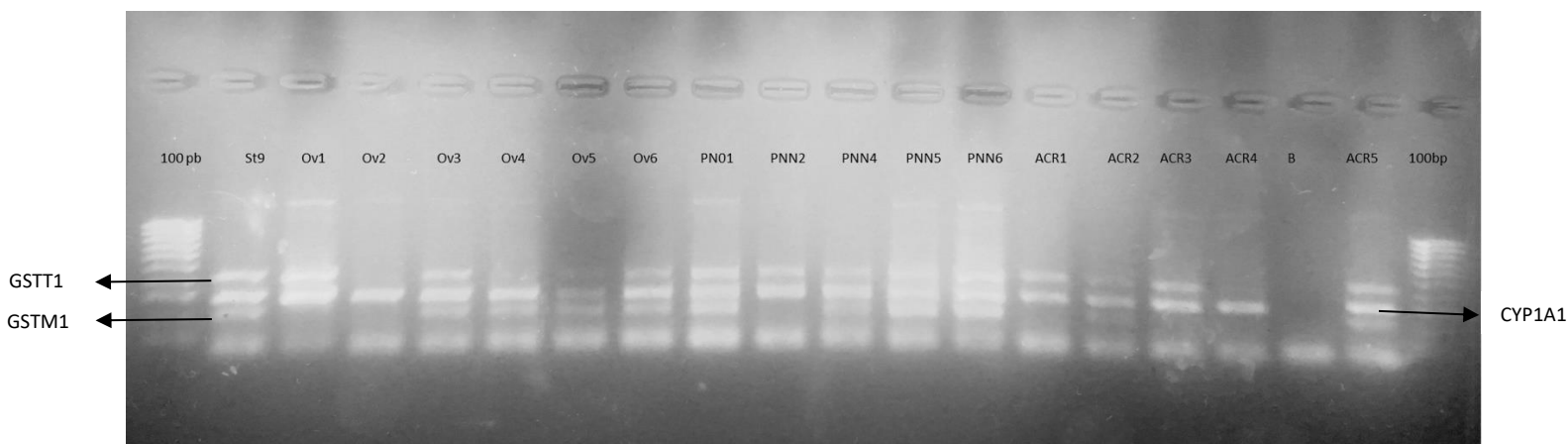


Figura 10 – Produtos de PCR provenientes da amplificação de GSTT1 (480 pb), GSTM1 (215pb) e do controlo interno CYP1A1 (312pb) num gel de agarose. O poço identificado com a letra B corresponde ao controlo negativo (água destilada ultra pura). As outras identificações correspondem às amostras.

Ao remover as amostras ST8 e LV10 fica-se apenas com 75 amostras para analisar as suas diferenças genéticas. De acordo com a tabela 8, setenta e uma amostras possuem o polimorfismo GSTT1 e 4 não o possuem. O polimorfismo GSTM1 está presente em 40 indivíduos e ausente nos 35 restantes, tal como demonstra a tabela 9, o que significa que este polimorfismo é menos frequente nesta população amostral do que o polimorfismo GSTT1, apesar de no estudo de Oliveira *et al.*, 2007, o polimorfismo nulo GSTM1 estar presente em 77,9% numa amostra de 135 indivíduos saudáveis (Oliveira *et al.*, 2007). Os indivíduos com ambos os genes correspondem a 50,6% da população total e 3,9% dos indivíduos não possuem nenhum dos genes, como demonstrado na tabela 10, e por

comparação a uma população do Bangladesh, 50% dos indivíduos apresenta o genótipo GSTT1 e GSTM1 positivos enquanto que só 6,4% da população não possui os dois genes (Akther *et al.*, 2016).

Tabela 8 - Frequência do polimorfismo GSTT1 presente e ausente

GSTT1	Frequência	Porcentagem
-	4	5,2
+	71	92,2
Total	75	97,4
Ausente do sistema	2	2,6
Total	77	100,0

Tabela 9 - Frequência do polimorfismo GSTM1 presente e ausente

GSTM1	Frequência	Porcentagem
-	35	45,5
+	40	51,9
Total	75	97,4
Ausente do sistema	2	2,6
Total	77	100,0

Tabela 10 – Frequência dos dois polimorfismos GSTT1 e GSTM1

GSTT1	GSTM1	Frequência	Porcentagem
-	-	3	3,9
+	+	39	50,6
+	-	32	41,6
-	+	1	1,3
Total		75	97,4
Ausente do sistema		2	2,6
Total		77	100

O polimorfismo rs2740574 do gene CYP3A4 possui dois alelos com duas bases diferentes – A e G – em que o A é o alelo com a base mais frequente e o G é o alelo com a base mutada. O alelo mutado impede que a metabolização dos xenobióticos, nomeadamente, da aflatoxina, aconteça e, assim, a transformação da aflatoxina no seu metabolito ativo vai ocorrer em menor escala, o que

significa que a hipótese de causar danos no organismo, nomeadamente ao DNA, será inferior ao normal, isto é, quando o alelo mais frequente está presente em homozigotia.

De acordo com a tabela 11, a maioria dos indivíduos apresenta o alelo não mutado e são homozigóticos (TT). Os indivíduos heterozigóticos, em que um dos alelos é o mutado, constituem 23,4% da população estudada. Apenas 1 indivíduo apresenta em homozigotia o alelo mutado (CC). Estes resultados são semelhantes ao de um estudo realizado com brasileiros nativos da cidade do Maranhão no que diz respeito à frequência destes alelos, ou seja, o genótipo TT foi aquele que foi encontrado em 75,1% da população e o genótipo a seguir mais frequente foi o TC encontrado em 21,9% dos indivíduos em estudo (Monteiro *et al.*, 2016). O genótipo menos frequente foi o CC, tal como na população dos trabalhadores em panificadoras deste presente trabalho. Referente à população portuguesa, no geral, de acordo com o estudo de Oliveira *et al.*, 2007, 7% da população possui o polimorfismo CYP3A4*1B (Oliveira *et al.*, 2007)

Num estudo realizado na população russa, tatars e baskhirs o genótipo CC foi encontrado em 4% dos indivíduos representantes da população russa, 0,5 % da população tatar e 0,9% da população baskhir, o que significa que a presença destes polimorfismos pode variar bastante dependendo da região do país e provavelmente também da zona do globo (Mustafina *et al.*, 2015), mas ao mesmo tempo, com o estudo já mencionado anteriormente e que foi feito no Brasil, pode-se ver algumas semelhanças nas frequências destes alelos em zonas diferentes do planeta, provavelmente por cada vez mais diferentes etnias se misturarem e se concentrarem numa determinada zona em vez de ser apenas no seu país de origem.

Tabela 11 - Frequência do polimorfismo CYP3A4 (rs 2740574) em homozigotia e heterozigotia do alelo normal e do alelo mutado.

CYP3A4	Frequência	Porcentagem
TT	58	75,3
TC	18	23,4
CC	1	1,3
Total	77	100,0

O polimorfismo do gene XRCC4, que é o rs28383151, foi originado por uma mutação do tipo “*missense*”, isto é, em que em vez de estar a base G passou a estar a base A (Yao *et al.*, 2014).

Dos 77 indivíduos, apenas 37 indivíduos foram testados para este polimorfismo, pois para este polimorfismo apenas se testou com os indivíduos que tinham sido selecionados previamente para se fazer a detecção de adutos. Trinta seis deles apresentam o genótipo que é considerado “normal” ou ancestral – GG. Dos 37 indivíduos, só houve um indivíduo que apresentou um alelo com a base “normal” e o outro alelo com a base mutada, GA, como apresentado na tabela 12. Tendo em conta os vários estudos realizados com este polimorfismo, nenhum deles apresenta a frequência da presença destes genótipos em nenhuma população, eventualmente por ser extremamente raro.

Tabela 12 - Frequência do polimorfismo XRCC4 (rs 28383151) em homozigotia e heterozigotia do alelo normal e do alelo mutado.

XRCC4	Frequência	Porcentagem
GG	36	97,3
GA	1	2,7
AA	0	0,0
Total	37	100,0

Os genótipos de risco são: GSTT1 e GSTM1 nulos e XRCC4 alelos com a base mutada - GA e AA -, pois aumentam a quantidade de adutos acumulados no DNA, e, como consequência, o risco de desenvolver doenças malignas, como o cancro, é maior. No caso do CYP3A4, a mutação que leva a passagem do alelo com a base mais frequente (A) para o alelo com a base mutada (G), corresponde a um fator de proteção, pois, como já foi mencionado anteriormente, diminui a capacidade deste enzima transformar a aflatoxina B1 no seu metabolito tóxico. No entanto, como a maioria dos indivíduos possui o alelo não mutado, significa que a maioria está em risco de metabolizar esta toxina e transformá-la nos seus compostos que conferem toxicidade para o ser humano. Por outro lado, em relação ao enzima GST, que faz parte da segunda fase do metabolismo, e que tem como função eliminar os compostos tóxicos do organismo, e ao enzima de reparação de erros no DNA, XRCC4, mais de metade dos indivíduos apresenta os genótipos que não são de risco. Este factor pode ser importante para avaliar a capacidade de eliminação e remoção dos efeitos tóxicos da aflatoxina, a uma exposição recente e/ou prolongada.

4.4 Relação entre os polimorfismos dos enzimas do metabolismo e de reparação e a quantidade de adutos detetadas

Um dos objetivos do estudo é relacionar as diferenças ao nível genotípico dos polimorfismos dos genes GSTT1, GSTM1, CYP3A4 e XRCC4 com a quantidade detetada de adutos de aflatoxina ligados ao DNA. Na tabela 13 pode-se verificar que aquelas amostras que possuem os polimorfismos de risco, como é o caso da amostra ACR 4, que não tem os genes GSTT1, GSTM1, possui os alelos não mutados do CYP3A4 e possui um dos alelos mutados do gene XRCC4, tem $1,08 \times 10^{-2}$ μmol de aduto por mole de DNA, enquanto que na amostra ST1 o valor de adutos por mole de DNA é superior ($3,66 \times 10^{-2}$ μmol de aduto/mol de DNA), mas não possui polimorfismos de risco. A relação entre os valores de aduto encontrados e os eventuais polimorfismos de risco não é muito expressiva e isto pode acontecer devido ao tamanho da amostra ser pequena (37 indivíduos).

Tabela 13 - Genótipo de cada indivíduo em relação a cada um dos genes e a sua respetiva quantidade de aduto de aflatoxina.

Amostras	GSTT1	GSTM1	CYP3A4	XRCC4	Quantidade de adutos (μmol de aduto/mol de DNA)
APPA 12	+	-	TT	GG	$1,93 \times 10^{-6}$
APPA 11	+	+	TC	GG	$1,39 \times 10^{-2}$
APPA 9	+	-	TT	GG	$1,46 \times 10^{-3}$
APPA 8	+	-	TC	GG	$5,43 \times 10^{-3}$
APPA 4	+	+	TT	GG	$2,97 \times 10^{-3}$
ACR 11	+	+	TC	GG	$2,76 \times 10^{-3}$
LV 23	+	+	TC	GG	$4,58 \times 10^{-3}$
LV 22	+	-	TT	GG	$6,87 \times 10^{-3}$
LV 21	+	-	TC	GG	$4,70 \times 10^{-3}$
LV 19	+	-	TT	GG	$4,21 \times 10^{-3}$
M 10	+	-	TT	GG	$2,47 \times 10^{-4}$
M 7	+	-	TT	GG	$3,90 \times 10^{-5}$
M 2	+	-	TT	GG	$2,77 \times 10^{-3}$
M 1	+	+	TC	GG	$3,26 \times 10^{-4}$
LV 14	+	-	TC	GG	$7,47 \times 10^{-3}$
LV 12	+	+	TT	GG	$8,96 \times 10^{-3}$
LV 11	+	+	TT	GG	$7,26 \times 10^{-3}$

Continuação da Tabela 13 - Genótipo de cada indivíduo em relação a cada um dos genes e a sua respetiva quantidade de aduto de aflatoxina.

Amostras	GSTT1	GSTM1	CYP3A4	XRCC4	Quantidade de adutos (μmol de aduto/mol de DNA)
LV10	ND	ND	TT	GG	$1,06 \times 10^{-2}$
LV 9	+	+	TT	GG	$2,58 \times 10^{-3}$
LV 3	-	-	TT	GG	$1,58 \times 10^{-3}$
LV 2	+	+	TC	GG	$4,20 \times 10^{-3}$
ACR 7	+	-	TC	GG	$1,37 \times 10^{-2}$
ACR 6	+	-	TC	GG	$3,95 \times 10^{-2}$
ACR 4	-	-	TT	AG	$1,08 \times 10^{-2}$
ACR 3	+	-	TT	GG	$3,46 \times 10^{-3}$
PN 5	+	+	TT	GG	$2,71 \times 10^{-3}$
PN 6	+	+	TT	GG	$7,38 \times 10^{-3}$
OV 6	+	+	TC	GG	$2,79 \times 10^{-3}$
OV 4	-	+	TT	GG	$5,05 \times 10^{-3}$
OV 3	+	+	TT	GG	$3,98 \times 10^{-3}$
OV 2	+	-	TT	GG	$2,15 \times 10^{-3}$
ST 9	+	+	TT	GG	$8,54 \times 10^{-3}$
ST 1	+	+	TT	GG	$3,66 \times 10^{-2}$

ND – não detetado

Após a análise dos resultados com o teste estatístico *t* de *student* e o teste de *Kruskal Wallis*, foi possível demonstrar que as diferenças entre os polimorfismos de cada gene e a quantidade de adutos eram mínimas ou inexistentes, pois a hipótese nula não foi rejeitada – $\alpha > p\text{-value}$. A hipótese nula era que as médias/medianas dos adutos eram iguais entre as categorias - presença/ausência, alelo frequente/ alelo mutado de GSTT1, GSTM1, CYP3A4 e XRCC4. Nos gráficos 11 a 14, verificasse que existe uma dispersão dos dados muito grande, ou seja, os desvios padrão são muito elevados, o que significa que existe diferenças muito díspares em termos de valores de adutos, apesar de nenhum deles ser muito elevado.

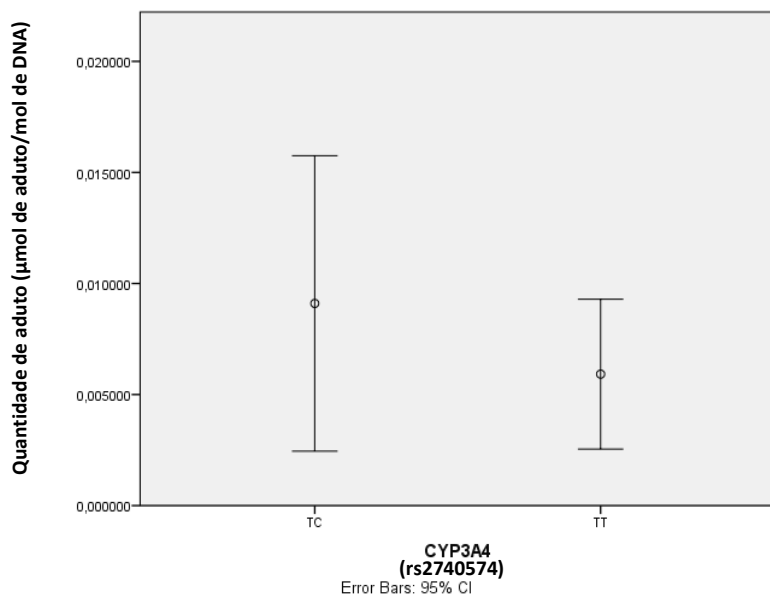


Figura 11 - Relação entre a quantidade de adutos vs CYP3A4 (rs2740574)

Na figura 11 pode-se observar que foram detetados mais adutos nos indivíduos com o polimorfismo TC do que com o polimorfismo TT.

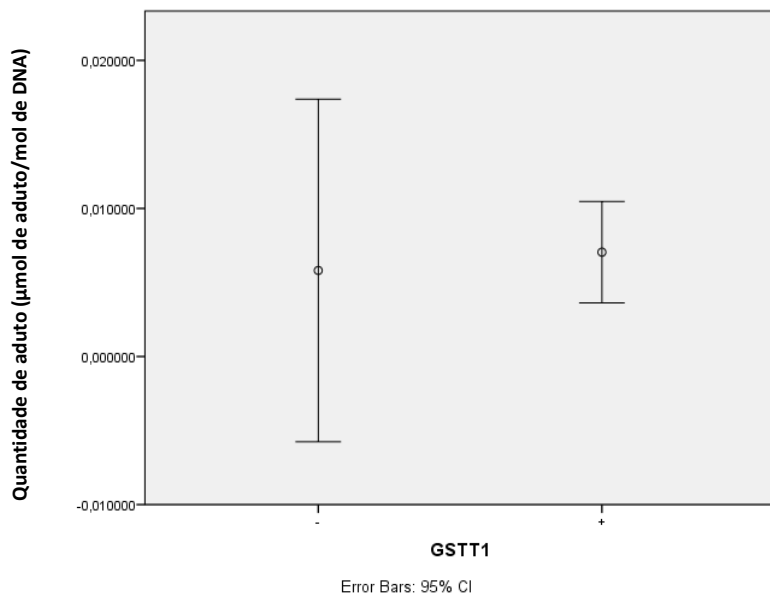


Figura 12 - Relação entre a quantidade de adutos vs GSTT1

Em relação ao enzima GSTT1, na figura 12, a quantidade de adutos é mais elevada quando o alelo está presente e não quando é nulo, contradizendo o que já foi reportado por outros estudos e o mesmo acontece em relação à quantidade de aduto e o polimorfismo de risco GSTM1 nulo, como está demonstrado na figura 13, apesar de se poder ver claramente que as diferenças da quantidade de aduto na presença e na ausência do alelo são mínimas.

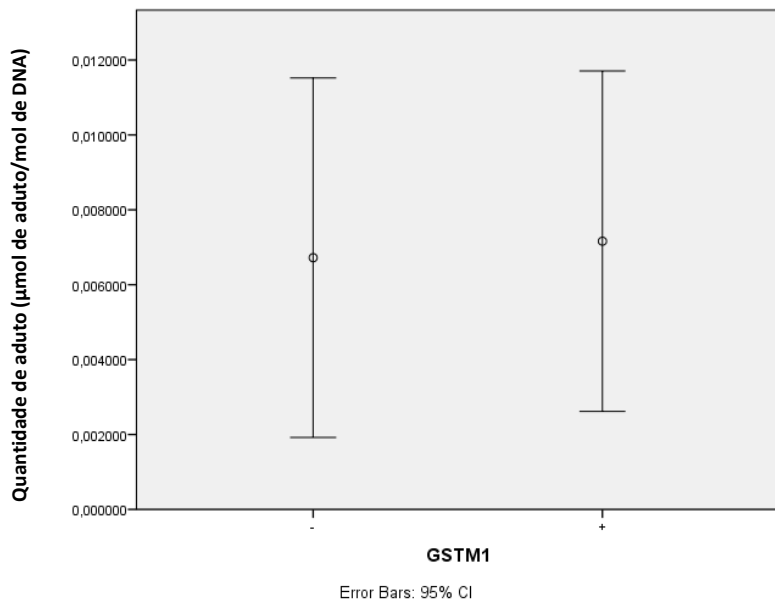


Figura 13 - Relação entre a quantidade de adutos vs GSTM1

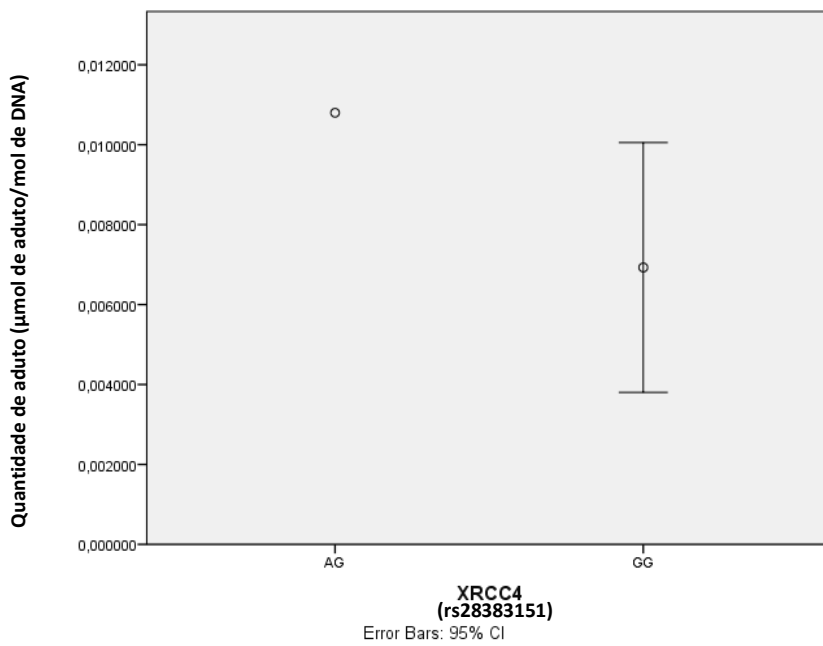


Figura 14 - Relação entre a quantidade de adutos vs XRCC4 (rs28383151)

Em relação ao gene XRCC4, as diferenças entre todos os que tinham os alelos ancestrais e o único indivíduo que possui um dos alelos mutados, em termos de quantidades de adutos, também não foi significativa, apesar de no gráfico 14 se observar que o único indivíduo que possui um dos

alelos mutados apresenta maior quantidade de adutos do que os indivíduos com ambos os alelos não mutados, como seria expectável.

Tendo em conta que, segundo o teste *t* de *student* e o teste não paramétrico *Kruskal Wallis* não existem diferenças significativas entre a quantidade de adutos e as diferenças alélicas entre cada polimorfismo, não foi possível avaliar se essas diferenças influenciam a quantidade e permanência do aduto de aflatoxina no DNA. Mais ainda, como já foi referido, estes indivíduos não tinham aflatoxina na urina, logo as quantidades a que estavam expostos parecem ser mínimas.

Em comparação com o estudo de Kapahtia *et al.*, 2018, o GSTM1 nulo existia com mais frequência na população que tinha algum tipo de patologia do fígado, tal como, hepatite B crónica, cirrose, do que na população usada como controlo, contudo a frequência do alelo GSTT1 nulo na população controlo e na população diagnosticada com alguma patologia do fígado não apresentou qualquer diferença significativa no seu desenvolvimento (Kapahtia *et al.*, 2018), tal como neste estudo não foi possível demonstrar uma correlação entre a presença de adutos e a alteração nos genes deste enzima. No estudo de Long *et al.*, 2013 é demonstrado que estes polimorfismos estão implicados no desenvolvimento de cancro na presença de um agente tóxico, como é o caso da aflatoxina B1, especialmente se o indivíduo tiver mais do que um destes polimorfismos de risco (Long *et al.*, 2013) e para além disso a quantidade de adutos de aflatoxina ligados a proteínas e ao DNA aumenta em indivíduos que possuam os genótipos GSTT1 e GSTM1 nulos e XRCC4 GA e AA (Tiemersma *et al.*, 2001).

5. Conclusões

Os objetivos iniciais foram todos cumpridos. O primeiro objetivo foi cumprido, pois avaliou-se a associação entre a exposição à aflatoxina dos indivíduos que trabalham nas panificadoras e os seus polimorfismos na formação de adutos de DNA, apesar de as diferenças entre os polimorfismos de risco e os que não são de risco não terem sido significativas, muito provavelmente devido ao número reduzido de indivíduos, aos quais se fez esta avaliação. O segundo objetivo também foi cumprido, pois foi possível detetar o metabolito de aflatoxina ligado ao DNA de células sanguíneas, apesar de a quantidade de adutos encontrada nesta população ser relativamente baixa, o que pode indicar que estes indivíduos estão pouco expostos a esta toxina e que esta exposição pode ocorrer fora do local de trabalho através da ingestão alimentar. O último objetivo foi testado, mas tendo em conta que os valores de adutos eram baixos, não deu para concluir se as diferenças alélicas dos polimorfismos têm influência ou não na prevalência de adutos de DNA no organismo. Contudo, temos indivíduos que apresentam polimorfismos de risco, nomeadamente, o ACR 4 e o LV3, que na presença desta toxina,

a probabilidade de os adutos se formarem e permanecerem no organismo é maior, no entanto, mais estudos neste sentido devem ser realizados para que haja uma maior compreensão entre a exposição de indivíduos à aflatoxina B1 com estes polimorfismos de risco e outros que não foram testados neste trabalho.

6. Limitações do estudo

Este estudo teve algumas limitações, tais como o facto de não ter sido possível fazer uma avaliação a nível ambiental sobre a existência dos fungos que produzem a aflatoxina B1 e a efetiva existência desta toxina no local de trabalho especificado. Isto teria ajudado a compreender qual era o nível de exposição à aflatoxina por estes trabalhadores no seu contexto ocupacional, ao invés de assumir que toda a população estava exposta. Outra limitação prende-se com o facto de não ter sido possível dosear a quantidade de aflatoxina no sangue de cada indivíduo e comparar com a presença de adutos de DNA. Em relação aos polimorfismos, não foi possível averiguar o seu efeito na presença dos adutos, em primeiro lugar porque a sua quantidade era baixa, e em segundo lugar porque o tamanho da amostra não foi o ideal para poder fazer esta avaliação. Por último, não foi realizado nenhum inquérito sobre os seus hábitos, como o tabagismo, e/ou patologias que cada indivíduo pudesse eventualmente ter e que pudessem estar relacionadas com a aflatoxina.

7. Estudos futuros

Apesar dos resultados obtidos neste estudo não serem muito significativos, o uso desta técnica na deteção de adutos, enquanto a exposição é recente, tem a sua pertinência. Esta toxina pode causar doenças bastante graves se a exposição se prolongar e por isso é necessário pensar em formas de prevenir esta exposição. O mundo é uma aldeia global, e os alimentos são importados de países onde esta toxina é produzida naturalmente e onde muitas vezes as condições de processamento e armazenamento não são as mais corretas. A EFSA estabelece valores máximos de aflatoxina que eventualmente, se forem consumidas, não provoca dano. No entanto se a exposição continuar, mesmo que seja, em doses pequenas, a sua presença vai - se acumulando e isso vai danificar o DNA e pode até mesmo desencadear o aparecimento de outras doenças.

É necessário fazer-se mais estudos com a técnica ELISA competitivo, para que possa ser otimizada e utilizada num laboratório de rotina permitindo, assim, que indivíduos que trabalham em locais onde potencialmente possam estar em contacto com a aflatoxina façam análises para assegurar que não estão expostos a esta toxina, e se estiverem, que se tomem medidas necessárias

para que a exposição seja reduzida no seu local de trabalho. Neste estudo o objetivo foi avaliar os adutos de DNA em leucócitos, mas este método também pode ser usado para detetar o DNA ligado a uma purina que é eliminada na urina. É necessário compreender que tipo de amostra seria mais adequada utilizar. Esta última é excelente para exposições recentes, enquanto que a análise ao DNA do sangue é mais adequada para exposições crónicas.

Em relação à análise de polimorfismos, faz cada vez mais sentido ter esse fator em conta, especialmente quando se tenta encontrar um tratamento que seja eficaz na cura de uma patologia como o cancro do fígado originado pela aflatoxina. Transformar esta análise numa análise de rotina seria uma mais valia, mas pode ser complicado, pois são metodologias que têm um elevado custo para os laboratórios.

8. Anexos

Anexo 1



Termo de Consentimento Informado

A Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa encontra-se a desenvolver um projeto de investigação sobre o tema “Estudo da exposição profissional a micotoxinas”.

Este projeto tem como objetivos primordiais disponibilizar informação acerca da exposição a estes agentes químicos de modo a permitir realizar um diagnóstico da situação e a definição de medidas preventivas e de controlo da exposição caso se considere necessário.

Para alcançar estes objetivos será realizada colheita de material biológico para posterior tratamento e doseamento dos agentes em estudo.

Acresce-se que a privacidade assim como a completa confidencialidade dos dados obtidos serão sempre asseguradas.

Se tiver alguma dúvida poderá esclarecê-la com as responsáveis pelo projeto*.

Obrigada pela atenção e disponibilidade.

Eu, _____

(preencha com o seu nome completo), dou o meu consentimento livre e informado para participar na realização da colheita de produtos biológicos, autorizando o uso e posterior utilização dos dados obtidos.

Data ____/____/____

Assinatura

9. Referências Bibliográficas

- Akther, J., Ebihara, A., Nakagawa, T., Islam, L. N., Suzuki, F., Hosen, M. I., ... Nabi, A. H. M. N. (2016). Analyses of genetic variations of glutathione S-transferase Mu1 and theta1 genes in Bangladeshi tannery workers and healthy controls. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6973057>
- Alborch, L., Bragulat, M. R., Castellá, G., Abarca, M. L., & Cabañes, F. J. (2012). Mycobiota and mycotoxin contamination of maize flours and popcorn kernels for human consumption commercialized in Spain. *Food Microbiology*, 32(1), 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.014>
- Alkadri, D., Rubert, J., Prodi, A., Pisi, A., Mañes, J., & Soler, C. (2014). Natural co-occurrence of mycotoxins in wheat grains from Italy and Syria. *Food Chemistry*, 157, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.052>
- Anitha, S., Raghunadharao, D., Waliyar, F., Sudini, H., Parveen, M., Rao, R., & Kumar, P. L. (2014). The association between exposure to aflatoxin, mutation in TP53, infection with hepatitis B virus, and occurrence of liver disease in a selected population in Hyderabad, India. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 766, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.12.011>
- Aydın, M., Arslan, M., Rencüzoğulları, E., Gözaydın, C., Genç, A., & Bayram, S. (2017). Investigation of XRCC1 Arg399Gln, Arg280His, and Arg194Trp polymorphisms effects on the induction of micronucleus by Aflatoxin B1 in in vitro. *Gene Reports*, 9(June), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2017.08.002>
- Bbosa, G. S., Kitya, D., Odda, J., & Ogwal-Okeng, J. (2013). Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. *Health*, 05(10), 14–34. <https://doi.org/10.4236/health.2013.510A1003>
- Bol, E. K., Araujo, L., Veras, F. F., & Welke, J. E. (2016). Estimated exposure to zearalenone, ochratoxin A and aflatoxin B1 through the consume of bakery products and pasta considering effects of food processing. *Food and Chemical Toxicology*, 89, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.01.013>
- Boysen, G., Pachkowski, B. F., Nakamura, J., & Swenberg, J. A. (2009). The formation and biological significance of N7-guanine adducts. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 678(2), 76–94. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.05.006>
- Bren, U., Fuchs, J. E., & Oostenbrink, C. (2014). Cooperative Binding of Aflatoxin B₁ by Cytochrome P450 3A4: A Computational Study. *Chemical Research in Toxicology*, 27(12), 2136–2147. <https://doi.org/10.1021/tx5004062>
- Carvajal, M. (2008). Aflatoxin-DNA adducts as biomarkers of cancer: Nature, formation, kinds of AF-DNA adducts, methodology, effects, and control. *ACS Symposium Series*, 1001, 13–55. <https://doi.org/10.1021/bk-2008-1001.ch002>
- Chou, M. W., & Chen, W. (1997). Biochemical and Molecular Roles of Nutrients Food Restriction Reduces Aflatoxin B₁ (AFB₁) -DNA Adduct Formation , AFB₁ -Glutathione Conjugation , and DNA Damage in AFB₁ -Treated. *In Vitro*, 1(January 1996), 210–217.
- Dohnal, V., Wu, Q., & Kuča, K. (2014). Metabolism of aflatoxins: Key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Archives of Toxicology*, 88(9), 1635–1644. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1312-9>
- Donner, M., Atehnkeng, J., Sikora, R. A., Bandyopadhyay, R., & Cotty, P. J. (2009). Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in soils of maize fields in three agroecological zones of Nigeria. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.013>
- Drumond, V. L. M. M. (2012). Dissertação de mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar: Presença de aflatoxinas em arroz e cereais Importados na União Europeia - Revisão

- bibliográfica e análise de dados RASFF, 57–60.
- Freitas, G. (2000) Micologia geral, micoses cutâneas e mucocutâneas, micoses subcutâneas e sistêmicas. In FERREIRA, V. ; SOUSA, J., ed. lit. – Microbiologia. Lisboa : Lidel, 290-337.
- Fromme, H., Gareis, M., Völkel, W., & Gottschalk, C. (2016). Overall internal exposure to mycotoxins and their occurrence in occupational and residential settings - An overview. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(2), 143–165.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.11.004>
- Groopman, J. D., Hall, A. J., Montesano, R., Wild, C. P., Whittle, H., Hudson, G. J., & Wogan, G. N. (1992). Molecular Dosimetry of Aflatoxin-N7-guanine In Human Urine Obtained in The Gambia, West Africa. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 1(3), 221–227.
- Groopman, J. D., Jiaqi, Z., Donahue, P. R., Wogan, G. N., Pikul, A., Lisheng, Z., & Jun-shi, C. (1992). Molecular Dosimetry of Urinary Aflatoxin-DNA Adducts in People Living in Guangxi Autonomous Region , People ' s Republic of China Molecular Dosimetry of Urinary Aflatoxin-DNA Adducts in People Living in Guangxi Autonomous Region , People ' s Republic of C, 45–52.
- Habib, S. L., Said, B., Awad, A. T., Mostafa, M. H., & Shank, R. C. (2006). Novel adenine adducts, N7-guanine-AFB1 adducts, and p53 mutations in patients with schistosomiasis and aflatoxin exposure. *Cancer Detection and Prevention*, 30(6), 491–498.
<https://doi.org/10.1016/j.cdp.2006.10.006>
- Hamid, A. S., Tesfamariam, S. G., Zhang, Y., & Zhang, Z. G. (2013). Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention (Review). *Oncology Letters*, 5(4), 1087–1092.
<https://doi.org/10.3892/ol.2013.1169>
- Ingawale, D. K., Mandlik, S. K., & Naik, S. R. (2014). Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): A critical discussion. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(1), 118–133. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.08.015>
- Ju, H., Shim, Y., Arumugam, P., & Joon Myong, S. (2016). Crosstalk-eliminated quantitative determination of aflatoxin B1-induced hepatocellular cancer stem cells based on concurrent monitoring of CD133, CD44, and aldehyde dehydrogenase1. *Toxicology Letters*, 243, 31–39.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.12.006>
- Kabak, B. (2012). Determination of aflatoxins and ochratoxin A in retail cereal products from Turkey by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Control*, 28(1), 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.043>
- Kachapulula, P. W., Akello, J., Bandyopadhyay, R., & Cotty, P. J. (2017). Aspergillus section Flavi community structure in Zambia influences aflatoxin contamination of maize and groundnut. *International Journal of Food Microbiology*, 261(August), 49–56.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.014>
- Kapahtia, S., Hazam, R. K., Asim, M., Karra, V. K., Chowdhury, S. J., Das, B. C., & Kar, P. (2018). Role of Glutathione S Transferase M1 and T1 Gene Polymorphism in Hepatitis B Related Liver Diseases and Cryptogenic Cirrhosis. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 8(2), 169–172. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2017.05.208>
- Katsurayama, A. M., Martins, L. M., Iamanaka, B. T., Fungaro, M. H. P., Silva, J. J., Frisvad, J. C., ... Taniwaki, M. H. (2018). Occurrence of Aspergillus section Flavi and aflatoxins in Brazilian rice: From field to market. *International Journal of Food Microbiology*, 266(August 2017), 213–221.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.008>
- Kirinc̃ic̃, S., S̃krjanc, B., Kos, N., Kozolc, B., Pirnat, N., & Tavc̃ar-Kalcher, G. (2015). Mycotoxins in cereals and cereal products in Slovenia - Official control of foods in the years 2008-2012. *Food Control*, 50, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.034>
- Komives, E. A. (1987). Killing and Mutation of Human Lymphoblast Cells by Aflatoxin B1: Evidence for an Inducible Repair Response. *Cancer Research*, 47(8), 1993–2001.
- Lamboni, Y., Frisvad, J. C., Hell, K., Linnemann, A. R., Nout, R. M. J., Tamo, M., ... Smid, E. J. (2016). Occurrence of Aspergillus section Flavi and section Nigri and aflatoxins in raw cashew

- kernels (*Anacardium occidentale* L.) from Benin. *LWT - Food Science and Technology*, 70, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.017>
- Leong, Y. H., Latiff, A. A., Ahmad, N. I., & Rosma, A. (2012). Exposure measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites in human body fluids. A short review. *Mycotoxin Research*. <https://doi.org/10.1007/s12550-012-0129-8>
- Liu, Y., Qin, Z., Wu, X., & Jiang, H. (2006). Immune-biosensor for aflatoxin B1 based bio-electrocatalytic reaction on micro-comb electrode. *Biochemical Engineering Journal*, 32(3), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.10.003>
- Long, X. D., Huang, H. D., Huang, X. Y., Yao, J. G., & Xia, Q. (2015). XPC codon 939 polymorphism is associated with susceptibility to DNA damage induced by aflatoxin B1 exposure. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(1), 1197–1204.
- Long, X. D., Ma, Y., Qu, D. Y., Liu, Y. G., Huang, Z. Q., Huang, Y. Z., ... Zhou, S. C. (2008). The Polymorphism of XRCC3 Codon 241 and AFB1-Related Hepatocellular Carcinoma in Guangxi Population, China. *Annals of Epidemiology*, 18(7), 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2008.03.003>
- Long, X. D., Yao, J. G., Zeng, Z., Ma, Y., Huang, X. Y., Wei, Z. H., ... Xia, Q. (2013). Polymorphisms in the coding region of X-ray repair complementing group 4 and aflatoxin B1-related hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 58(1), 171–181. <https://doi.org/10.1002/hep.26311>
- Lunn, R. M., Langlois, R. G., Hsieh, L. L., Thompson, C. L., & Bell, D. A. (1999). XRCC1 polymorphisms: Effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycoporphin A variant frequency. *Cancer Research*, 59(11), 2557–2561.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- Martins, L. M., Sant'Ana, A. S., Fungaro, M. H. P., Silva, J. J., Nascimento, M. da S. do, Frisvad, J. C., & Taniwaki, M. H. (2017). The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in the Brazilian peanut production chain. *Food Research International*, 94, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.006>
- McGlynn, K. A., Rosvold, E. A., Lustbader, E. D., Hu, Y., Clapper, M. L., Zhou, T., ... Ofori-Adjei, D. (1995). Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(6), 2384–2387. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42488&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mir, R., & Hamadi, A.Y. (2016). Frequency of Null Phenotypes of Glutathione S-Transferase M1 and T1 among the Populations of Tabuk (Northwestern Part of Saudi Arabia), (March), 9-18.
- Mo, X., Lai, H., Yang, Y., Xiao, J., He, K., Liu, C., ... Lin, Y. (2014). How does airway exposure of aflatoxin B1 affect serum albumin adduct concentrations? Evidence based on epidemiological study and animal experimentation. *The Journal of Toxicological Sciences*, 39(4), 645–653. <https://doi.org/10.2131/jts.39.645>
- Monteiro, S. C., de Sousa, I. H., Belfort, I. K., Nunes, J. D., Penha, B. A., dos Santos, M., ... Silva, I. D. C. (2016). Genetic variability of CYP3A4 in a heterogeneous Brazilian population from Maranhão. *Genetics and Molecular Research*, 15(1), 3–8. <https://doi.org/10.4238/gmr.15017275>
- Mustafina, O., Tuktarova, I., Karimov, D., Somova, R., & Nasibullin, T. (2015). [CYP2D6, CYP3A5, and CYP3A4 gene polymorphism in Russian, Tatar, and Bashkir populations]. *Genetika*.
- Oliveira, E., Marsh, S., van Booven, D. J., Amorim, A., Prata, M. J., & McLeod, H. L. (2007). Pharmacogenetically relevant polymorphisms in Portugal. *Pharmacogenomics*, 8(7), 703–712. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.7.703>
- Peng, T., Li, L. Q., Peng, M. H., Liu, Z. M., Liu, T. W., Guo, Y., ... Santella, R. M. (2007). Evaluation of oxidative stress in a group of adolescents exposed to a high level of aflatoxin B1 - A multi-center and multi-biomarker study. *Carcinogenesis*, 28(11), 2347–2354.

- <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm193>
- Phillips, D. H. (2005). DNA adducts as markers of exposure and risk. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 577(1–2 SPEC. ISS.), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.008>
- Poirier, M. C. (1997). DNA adducts as exposure biomarkers and indicators of cancer risk. *Environmental Health Perspectives*, 105(SUPPL. 4), 907–912. <https://doi.org/10.2307/3433302>
- Qiagen, & Midi/Maxi. (2012). For large-scale genomic and viral DNA purification Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies, (June).
- Quiles, J. M., Manyes, L., Luciano, F., Mañes, J., & Meca, G. (2015). Influence of the antimicrobial compound allyl isothiocyanate against the *Aspergillus parasiticus* growth and its aflatoxins production in pizza crust. *Food and Chemical Toxicology*, 83, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.06.017>
- Ratajewski, M., Walczak-Drzewiecka, A., Sałkowska, A., & Dastyk, J. (2011). Aflatoxins upregulate CYP3A4 mRNA expression in a process that involves the PXR transcription factor. *Toxicology Letters*, 205(2), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.05.1034>
- Redzwan, S., Rosita, J., Sokhini, A. M., Nurul 'Aqilah, A. R., Wang, J. S., Kang, M. S., & Zuraini, A. (2014). Detection of serum AFB1-lysine adduct in Malaysia and its association with liver and kidney functions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217(4–5), 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.08.007>
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z., & Lima, N. (2009). A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology*, 129(2), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.023>
- Ruadrew, S., Craft, J., & Aidoo, K. (2013). Occurrence of toxigenic *Aspergillus* spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.001>
- Saad-Hussein, A., Shahy, E. M., Shaheen, W., Taha, M. M., Mahdy-Abdallah, H., Ibrahim, K. S., ... El-Shamy, K. A. (2016). Comparative hepatotoxicity of aflatoxin B1 among workers exposed to different organic dust with emphasis on polymorphism role of glutathione S-transferase gene. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 4(2), 312–318. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2016.051>
- Saladino, F., Quiles, J. M., Mañes, J., Fernández-Franzón, M., Luciano, F. B., & Meca, G. (2017). Dietary exposure to mycotoxins through the consumption of commercial bread loaf in Valencia, Spain. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 697–701. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.029>
- Santella, R. M., Gammon, M., Terry, M., Senie, R., Shen, J., Kennedy, D., ... Zhang, F. (2005). DNA adducts, DNA repair genotype/phenotype and cancer risk. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 592(1–2), 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.06.001>
- Sharma, R. A., & Farmer, P. B. (2004). Biological relevance of adduct detection to the chemoprevention of cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(15), 4901–4912. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0098>
- Shen, H. M., & Ong, C. N. (1996). Mutations of the p53 tumor suppressor gene and ras oncogenes in aflatoxin hepatocarcinogenesis. *Mutation Research - Reviews in Genetic Toxicology*, 366(1), 23–44. [https://doi.org/10.1016/S0165-1110\(96\)90005-6](https://doi.org/10.1016/S0165-1110(96)90005-6)
- TaqMan® SNP Genotyping. (2005). TaqMan® Predesigned SNP Genotyping Assays, TaqMan® Custom SNP Genotyping Assays, and TaqMan® Drug Metabolism Enzyme Genotyping Assays. *TaqMan Life*, (May), 4351379.
- Tiemersma, E. W., Omer, R. E., & Bunschoten, A. (2001). Role of Genetic Polymorphism of Glutathione- S -Transferase T1 and Microsomal Epoxide Hydrolase in Aflatoxin-associated Hepatocellular Carcinoma, 10(July), 785–791.

- Turner, P. C., Dingley, K. H., Coxhead, J., Russell, S., & Garner, C. R. (1998). Detectable Levels of Serum Aflatoxin -Albumin Adducts in the United Kingdom Population: Implications for Exposure in the United Kingdom', 7(May), 441–447.
- Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, 69, 57–80. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.05>
- Viegas, S., Assunção, R., Nunes, C., Osteresch, B., Twarużek, M., Kosicki, R., ... Viegas, C. (2018). Exposure Assessment to Mycotoxins in a Portuguese Fresh Bread Dough Company by Using a Multi-Biomarker Approach. *Toxins*, 10(9), 342. <https://doi.org/10.3390/toxins10090342>
- Wang, J. S., & Groopman, J. D. (1999). DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1–2), 167–181. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00017-2)
- Wild, C., Yin, F., Turner, P. C., Chemin, I., Chapot, B., MEndy, M., ... Hall, A. J. (2000). Environmental and Genetic Determinants of Aflatoxin-Albumin Adducts in the Gambia. *Int.J. Cancer*, 86, 1–7.
- Wilson, A. S., Tingle, M. D., Kelly, M. D., & Park, B. K. (1995). Evaluation of the generation of genotoxic and cytotoxic metabolites of benzo[a]pyrene, anatoxin B1 naphthalene and tamoxifen using human liver microsomes and human lymphocytes. *Human and Experimental Toxicology*, 14(6), 507–515. <https://doi.org/10.1177/096032719501400608>
- Wilson, A. S., Williams, D. P., Davis, C. D., Tingle, M. D., & Park, B. K. (1997). Bioactivation and inactivation of aflatoxin B1 by human, mouse and rat liver preparations: Effect on SCE in human mononuclear leucocytes. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 373(2), 257–264. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(96\)00205-9](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(96)00205-9)
- Xue, K. S., Cai, W., Tang, L., & Wang, J. S. (2016). Aflatoxin B1-lysine adduct in dried blood spot samples of animals and humans. *Food and Chemical Toxicology*, 98, 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.002>
- Yao, J.-G., Huang, X.-Y., & Long, X.-D. (2014). Interaction of DNA repair gene polymorphisms and aflatoxin B1 in the risk of hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(9), 6231–6244. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2014.066>
- Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(1), 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>