

Aflatoxinas

Pilar Bogantes- Ledezma¹, Diego Bogantes- Ledezma², Sixto Bogantes- Ledezma³.

Resumen

Las aflatoxinas pertenecen a la familia de las micotoxinas, que son sustancias químicas producidas por cepas toxigénicas de hongos, principalmente *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Estas sustancias pueden causar enfermedad y muerte, tanto en animales como en seres humanos.

Las aflatoxinas son frecuentemente aisladas de alimentos como maíz, arroz, maní y otros, que han tenido un mal manejo postcosecha.

La ingestión de aflatoxinas puede producir una enfermedad conocida como aflatoxicosis. La aflatoxina B1 es el factor que más obstaculiza el desarrollo fetal, con mayor capacidad de provocar o acelerar el cáncer, y es además el tipo de aflatoxina que provoca mayores cambios repentinos y permanentes en los genes, entre estos, puede inducir una mutación específica en el codón 249 del gen supresor P53, relacionado con la génesis de tumores.

Descriptores: Aflatoxinas, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, carcinoma hepatocelular, aflatoxicosis, teratógenos, virus de la hepatitis B.

Recibido: 30 de mayo de 2004

Aceptado: 8 de junio de 2004

A nivel mundial la prevalencia del cáncer, alcanza cifras alarmantes. Los sistemas de salud están obligados a indagar las posibles causas y factores de riesgo asociados con la oncogénesis.

Las micotoxinas son consideradas el carcinógeno natural más potente conocido hasta el momento.

A pesar de que el virus de la hepatitis B continúa siendo la principal causa del hepatocarcinoma (CHC), la sola presencia de aflatoxinas incrementa el riesgo relativo de CHC en 3.3 veces, sobre un hígado por lo demás sano. Sin embargo, cuando ambos factores están presentes, ejercen un efecto sinérgico que aumenta el riesgo relativo hasta en 59 veces^{22,23}.

Debido a las características climatológicas del país, la aparición de hongos en las cosechas de granos es cada vez mayor.

El Ministerio de Agricultura y Ganadería se encarga de realizar muestreos con el fin de determinar las concentraciones de aflatoxinas presentes en los alimentos susceptibles, mediante un convenio con la Universidad de Costa Rica, institución que efectúa los análisis respectivos en laboratorios especializados.

Esta medida se aplica exclusivamente para los granos importados y la producción nacional se exime de dicho examen, pues la legislación vigente no la contempla. Este trabajo pretende hacer conciencia en todo el personal médico nacional sobre la importancia de las Aflatoxinas y el control deficiente de sus niveles en los granos que ingerimos de la cosecha nacional. No existe ningún control interno en la legislación vigente sobre los niveles máximos de Aflatoxinas permitidos para consumo humano tanto en el maíz, el arroz, los frijoles y otros granos producidos aquí, sólo son para los productos importados.

¹. Médico General

². Ingeniero agrónomo con énfasis en Fitotecnia, CIGRAS Universidad de Costa Rica

³. Estudiante de medicina Universidad de Costa Rica.

Correspondencia:

Pilar Bogantes Ledezma

E-mail:

pbogantes@costarricense.cr

Abreviaturas: CHC, carcinoma hepatocelular; AFB1, aflatoxina b1; FDA, Food and Drug Administration; ADN, ácido desoxirribonucleico; ARN, ácido ribonucleico.

Micotoxinas

Las micotoxinas son sustancias químicas producidas por hongos, que pueden causar enfermedades y muerte, tanto a hombres como a animales. Las micotoxinas son metabolitos fúngicos secundarios, formados por una serie de reacciones consecutivas, catalizadas a partir de intermediarios bioquímicamente simples del metabolismo primario; por ejemplo: acetato, mebolato, malonato y ciertos aminoácidos ^{1,2}. La producción de micotoxinas está asociada al proceso de esporulación del hongo, estrechamente relacionado con las condiciones ambientales y la concentración de nutrientes en el medio ³.

Las enfermedades que causan las micotoxinas son conocidas con el nombre de micotoxicosis ⁴. En altas concentraciones, las micotoxinas pueden producir síndromes agudos de enfermedad, en tanto que a niveles bajos son carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos producen alteraciones mitóticas, interfieren con el desarrollo fetal y pueden reducir la tasa de crecimiento en animales jóvenes. Además alteran la respuesta inmunológica, haciendo a los animales más susceptibles a infecciones ⁵. Afectan, entre otros órganos y sistemas blanco: al hígado, el riñón, el sistema nervioso, endocrino e inmune ⁶.

Las micotoxinas fueron estudiadas más a fondo a partir de 1960, cuando se reportaron varios casos de micotoxicosis en animales. El primero involucró la muerte de pavos alimentados con harina de maní contaminada con hongos. Debido a que la causa era desconocida en ese momento, los investigadores del Tropical Products Institute de Inglaterra la llamaron "Turkey X Disease" ^{7,8}. Poco después, una enfermedad similar causó pérdidas severas en patos de Kenya ⁹. Al mismo tiempo se reportaron casos de carcinoma hepatocelular (CHC), en truchas arcoiris de criaderos en Estados Unidos y en Europa. Los análisis del alimento revelaron que el hongo *Aspergillus flavus* producía la toxina ¹⁰.

Los alimentos pueden contaminarse cuando los hongos se desarrollan durante la cosecha, el almacenamiento o el procesamiento de los alimentos. Los cultivos que se contaminan frecuentemente son: maíz, sorgo, cebada, trigo, centeno, mijo, arroz, maní, nueces y semillas de algodón. La contaminación con micotoxinas en los granos generalmente es un proceso aditivo; puede iniciarse en el campo, aumentar durante la cosecha y operaciones de secado y continuar acumulándose durante el almacenamiento. El contenido de agua y la temperatura del grano son factores críticos que afectan la producción de micotoxinas.

Las micotoxinas pueden entrar a la cadena alimenticia de humanos y animales, por contaminación directa o indirecta.

En la contaminación directa, el hongo toxicógeno crece sobre el material alimenticio. La contaminación indirecta se presenta cuando un alimento es contaminado por una micotoxina ¹¹.

Muchos hongos son capaces de producir más de una micotoxina y bastantes micotoxinas son producidas por más de una especie de hongos. Con frecuencia, más de una micotoxina se encuentra dentro de un mismo sustrato ¹².

Aflatoxinas

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por cepas toxigénicas de los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* ^{4,13}. Estas sustancias son altamente cancerígenas, producen toxicidad y cáncer de hígado. Se han detectado en diferentes cultivos en el campo, cosecha, transporte y almacenamiento en el hogar. El maní y el maíz son productos que se contaminan con facilidad. Las aflatoxinas suelen designarse con letras, que se refieren a una característica física o de otro tipo del compuesto, por ejemplo, las B1 y B2 presentan fluorescencia azul y las G1 y G2, fluorescencia verde cuando se exponen a radiación ultravioleta de onda larga.

Las cepas toxicógenas de *Aspergillus flavus* generalmente producen solo aflatoxina B1 y B2, mientras que las cepas toxicógenas de *Aspergillus parasiticus*, producen aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 ¹⁴.

Las aflatoxinas son las micotoxinas más estudiadas y controladas. Toxicológicamente se consideran toxinas potentes, relacionadas con la génesis del cáncer, mutaciones puntuales y múltiples alteraciones en el desarrollo fetal. Experimentos realizados en animales han demostrado que las aflatoxinas pueden producir toxicidad aguda y crónica. Los efectos agudos incluyen necrosis hepática, nefritis, y congestión pulmonar. Los efectos crónicos incluyen daño celular, carcinogenicidad, teratogenicidad y mutagenicidad en modelos animales ^{11,15}.

Inicialmente, el crecimiento del hongo y el metabolismo primario forman poca o ninguna aflatoxina. Con el tiempo, el fósforo, el nitrógeno y algunos elementos traza son limitados y el crecimiento primario se reduce. Se acumulan varios metabolitos primarios, entre ellos, piruvato, malato, acetato y aminoácidos que provocan el desarrollo y estimulan e inducen la actividad de las enzimas del metabolismo secundario, por la ruta de la biosíntesis de los poliketidos, que a su vez provoca la biosíntesis de las aflatoxinas sobre la biosíntesis de los ácidos grasos en las cepas toxigénicas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* ¹⁶.

La aflatoxina B1 (AFB1) es la que tiene mayor potencia y actividad carcinogénica a nivel hepático, fetal teratogénica y de ciclo celular mutagénica. La aflatoxina B2 es similar a la B1, excepto por la saturación del primer anillo de furano; es carcinogénica, pero menos tóxica y menos frecuente que la B1. Las propiedades carcinogénicas de ambas se han demostrado en truchas arcoiris, ratas, ratones, cerdos, vacas, caballos, ovejas, patos, pavos, faisanes y pollos¹⁷.

El *Aspergillus flavus* y el *Aspergillus parasiticus* están considerados como hongos termotolerantes y microtermo-filicos. Aunque los niveles y frecuencias máximas se presentan en las regiones tropicales y semitropicales, en donde el clima favorece el crecimiento de los hongos productores de aflatoxinas, puede haber contaminación de los alimentos provenientes de zonas templadas, ya que el *Aspergillus flavus* está distribuido universalmente y su contaminación con aflatoxinas a los alimentos ha sido detectada en todo el mundo.

Las temperaturas de crecimiento para *Aspergillus flavus* son: mínima de 6-8°C, óptima de 36-38°C, y 44-46°C como máxima. Para que produzcan las aflatoxinas, se requieren las siguientes condiciones térmicas: 12°C temperatura mínima, 27-30°C la óptima, y 40-42°C la máxima.

La presencia de aflatoxinas en los cereales está asociada, tanto a las condiciones de almacenamiento inadecuadas, como a la contaminación del producto en el campo. Los factores que afectan la contaminación de los granos incluyen la cantidad de esporas inoculadas, la tensión durante el crecimiento de las plantas, las poblaciones de insectos y ácaros, los daños causados por otros hongos, las variedades susceptibles o resistentes de las plantas, el daño mecánico, el daño por tormenta, el daño por aves, la nutrición mineral de la planta y la temperatura ambiente¹⁸.

Los límites obligatorios para el contenido de aflatoxinas en los alimentos vulnerables a ellas se han fijado muy cerca del límite de detección de la metodología analítica, con base en el principio de que no existe ningún nivel inocuo conocido para el ser humano; la norma dictada por la "Food and Drug Administration" (FDA) de los EEUU para los alimentos agrícolas primarios y sus derivados, es de 20 µg/kg de aflatoxinas totales.

En Costa Rica, se decretó que el nivel máximo de aflatoxinas, en el maní (*Arachis hypogaea*) que se suministre al consumidor final y a las industrias productoras o fabricantes de alimentos, no podrá superar los 15 µg/kg¹⁹. A su vez, el nivel máximo de aflatoxinas en el maíz (*Zea mays*), el arroz (*Oriza sativa*), el frijol (*Phaseolus vulgaris*), el trigo (*Triticum aestivum*) y otros cereales, oleaginosas y leguminosas en general, que se suministren al consumidor final y a las industrias productoras o fabricantes de alimentos, no podrá superar los 20 µg/kg²⁰. Sin embargo, hay muchas limitaciones para poder cumplir con estas disposiciones, ya que

los métodos de muestreo utilizados son deficientes e inapropiados; las micotoxinas no se distribuyen de manera idéntica en un mismo lote de granos, y en muchas ocasiones, existe un impedimento físico para hacer un muestreo uniforme²¹. Por otro lado, en la actualidad solo se tiene control sobre algunos alimentos importados, no así sobre muchos alimentos y productos agrícolas cosechados en el país.

Patogenia

Las aflatoxinas ingeridas, que se absorben por el tracto gastrointestinal, son metabólicamente activadas o detoxificadas en las células de la mucosa intestinal y en el hígado, donde sufren una biotransformación por medio DE procesos de epoxidación, hidroxilación, o-des-metilación, conjugación y procesos espontáneos^{23, 24}.

La AFB1 se metaboliza a través de los citocromos p450 microsomales hepáticos 3A3, 1A2, 3A7²² y extrahepáticos 3A4²². Uno de los productos, el B1 8-9 epóxido se le conoce los siguientes efectos biológicos:

Se liga al ADN, interfiriendo con la capacidad de la ADN polimerasa, hecho que favorece la aparición de mutaciones por replicación incompleta.

Interfiere con la actividad de la ARN polimerasa dependiente del ADN (por su gran capacidad de ligarse al ADN), produciendo como consecuencia, la disminución en el ARN mensajero y la síntesis proteica.

Tiene la capacidad de ligarse a proteínas estructurales y funcionales, alterando su estabilidad. Este efecto es, en gran parte, el responsable de la toxicidad aguda.

El B1 8-9 epóxido es metabolizado por la glutatión-5-transferasa, que inactiva el compuesto.

Otra vía metabólicamente conocida es la reducción de la AFB1 por las enzimas citosólicas dependientes de NADPH, cuyo producto es el aflatoxicol, con propiedades tóxicas muy similares a la aflatoxina B1 propiamente dicha, de las cuales se conocen:

- Inhibición de la incorporación de nucleótidos de uracilo y timina durante la elongación de la cadena, en la síntesis de ácidos nucleicos.
- Alquilación del ADN con la molécula de aflatoxina, proceso que resulta en la delección de una base nitrogenada.
- Ligamen con la membrana del retículo endoplasmático, lo que produce su degranulación, hecho que afecta la estabilidad del ARN mensajero, y se cree que favorece la transformación maligna.

Los cuadros hemorrágicos asociados con las aflatoxinas se explican por la estructura de la molécula de AFB1 (un dihidrofurano con una estructura cumarínica), que inhibe los factores de coagulación dependientes de la vitamina K, además, está implicada en la disminución en la síntesis de fibrinógeno y otros aspectos de la coagulación a nivel hepático^{23, 24}.

La contaminación de alimentos con aflatoxinas es un problema de salud pública mundial.

Impacto de las aflatoxinas en carcinoma hepatocelular:

El CHC es el tumor maligno más frecuente del hígado (75% de todas las neoplasias hepáticas)^{25, 26}. Es la quinta neoplasia maligna más frecuente en hombres y la octava en mujeres a nivel mundial²⁶.

Aproximadamente se presentan 530.000 casos nuevos de CHC, por año en el mundo; más del 85% ocurre en ciudades con alta seroprevalencia de hepatitis crónica por virus de hepatitis B. Este presenta un patrón de prevalencia con distribuciones geográficas: mientras en Europa y Estados Unidos, la prevalencia es baja (2.7/100.000 habitantes), en regiones de África y Asia es un problema de salud pública, con una prevalencia que oscila entre 30/100.000 y más de 100/100.000.

En el norte de China, Taiwán, Japón y el sur de África, el C.H.C. representa el 5% - 15% de todas las muertes por cáncer, en mayores de 50 años. En Mozambique y provincias del Sur de China, el CHC explica el 65% - 70% de todas las muertes por cáncer en hombres y el 30% - 55% en mujeres²⁹.

En Costa Rica reportes de 1993 mencionan una prevalencia de 2/100.000 en la población masculina y 1.2/100.000 en la femenina. La tasa de mortalidad es del 4.3% en hombres y del 4% en mujeres²⁵.

La marcada variación mundial en cuanto a incidencia sugiere factores ambientales involucrados en su etiología.

Bioanálisis en varias especies, peces, aves, roedores y primates subhumanos, muestran que AFB1 es un carcinogénico en todos los animales^{30, 31, 32}. Fue designado como un carcinogénico humano en 1993 y asignado al grupo I, por la Agencia Internacional para el estudio del Cáncer. Experimentos con la toxina química pura mostraron que el carcinoma hepatocelular es inducido en especies susceptibles cuando la AFB1 se encuentra en concentraciones de 15 µg/kg en la dieta suministrada³³.

Otras micotoxinas, sterigmatocistinas y fumonisinas, son también potentes carcinogénicos hepáticos en animales, pero el conocimiento es poco en cuanto a exposición en humanos³⁴.

Las aflatoxinas y el virus de hepatitis B son factores de riesgo mayores para el CHC en áreas de alta incidencia, como el sureste de Asia y algunas regiones de África. El mecanismo celular y molecular entre estos 2 factores no se ha identificado claramente^{29, 30}. La AFB1 parece inducir una mutación muy específica en el codón 249 del gen supresor de tumores p53. La pérdida, la inactivación o la mutación del gen p53 se ha involucrado en la génesis de tumores y constituye la alteración genética presente en los cánceres humanos más frecuentes^{32, 39}.

Uno de los mecanismos por medio de los cuales las aflatoxinas pueden relacionarse con el CHC es su gran capacidad de inducir mutaciones. La mutación del gen p53 se ha identificado en la forma endémica de CHC asociada fuertemente a la alta ingesta de aflatoxinas en la dieta. Sugiere que la pérdida de la función normal del gen (supresor tumoral) podría ser un paso clave durante la transformación maligna de los hepatocitos^{33, 37}. La poca capacidad para analizar la exposición a aflatoxinas en el ser humano es una seria limitación en las investigaciones; la medición de metabolitos de aflatoxinas, en orina solo refleja exposición dietética reciente a las aflatoxinas. Actualmente se cuenta con el análisis sérico de complejos de unión albúmino-aflatoxinas, que reflejan una exposición en un tiempo de mayor rango. Sin embargo, se requieren de otros métodos de medición para evaluar, en forma más objetiva, el riesgo de estos contaminantes químicos³⁹.

La exposición a aflatoxinas, particularmente cuando se asocia con la presencia de hepatitis viral crónica por virus B, es un factor importante que contribuye en gran medida al desarrollo del carcinoma hepatocelular, en áreas donde se le considera una enfermedad endémica.

Pese a los esfuerzos por establecer normas para el control de la exposición humana a alimentos contaminados con aflatoxinas, la lucha se hace insuficiente y poco práctica, ya que se requiere necesariamente un abordaje interdisciplinario del problema, el cual hasta el momento no se ha podido gestar.

El impacto económico de las aflatoxinas incluye la pérdida de vidas humanas y animales, el incremento en los costos de salud y veterinaria, reducción en la producción animal y otros problemas económicos y comerciales.

Solo mediante una concienciación de los principales sectores socioeconómicos y políticos, implementando estrategias de promoción de la salud, se podrá hacer frente al riesgo que representa la contaminación de alimentos de consumo humano con sustancias carcinogénicas.

Abstract

Micotoxins are chemical substances from toxin-producing fungal species, mainly *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. They can cause diseases and death of animals and human beings.

Aflatoxins are micotoxins often isolated from peanuts, rice, corn or other edible seeds improperly handled after harvest.

They can also be found in secretions or depositions of animals that commonly eat contaminated food.

Aflatoxin ingestion causes aflatoxicosis. B1 aflatoxin is known to alter fetal development and is capable of inducing mutations of genes and cancer. It can specifically induce a mutation of codon 249 of suppressor gene P53 facilitating oncogenesis.

Referencias

1. Stein P, Vleggar R, Weassels P. The biosynthesis of aflatoxin and its congeners. En P. S. Steyn, The biosynthesis of mycotoxins. New York: Academic Press 1980: 105-155.
2. Turner, W. Fungal metabolites. London: Academic Press, 1971; 446.
3. Guzmán de Peña D, Aguirre J, Ruiz-Herrera J. Regulation of mycotoxins biosynthesis during sporulation of *Aspergilli*. En: Miraglia M, Van Equmond H, Berna C, Gilbert J, ed. Mycotoxins and phycotoxin Development in chemistry, toxicology and food safety. USA, 1998; 321-26.
4. Ciegler, A. Mycotoxins: occurrence, chemistry, biological activity. *Lloydia* 1975; 38: 21-35.
5. Pier A, Cysewski S, Richard J. Implications of micotoxins in animal disease. *J Am Vet Med Assoc* 1980; 176: 719-24.
6. Kuiper T. Micotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicol Lett* 1995;83: 853-59.
7. Ayres J, mundt J, Sandine W. Microbiology of foods. San Francisco: Freeman, 1980: 708pp.
8. Blount W. Turkey X disease. *J Br Turkey Fed* 1961;9: 52-77.
9. Carnaghan R, Sargeant K. The toxicity of certain groundnut meal to poultry. *Veterinary Record* 1961; 73: 726-27.
10. Sargeant K, Sheridan A, Okelly J, Carnaghan R. Toxicology associated with certain samples of groundnut. *Nature* 1961;192: 1096- 97.
11. Smith J, Hacking A. Fungal toxicity. The filamentous fungi. London: Arnold EV, 1983: 238-64.
12. Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 2001;167: 101- 34.
13. Mirocha C, Pathre S, Christensen, C. Micotoxins: Economic microbiology. London: Academic Press, 1979: 468-83.
14. Hesseltine C, Sorrenson W, Smith M. Taxonomic studies of the aflatoxin producing strains in the *Aspergillus flavus* group. *Micología* 1970: 123-32.
15. Massey TE, Smith GB, Tam AS. Mechanisms of aflatoxin B1 lung tumorigenesis. *Exp Lung Res* 2000 ; 26: 673-83.
16. Maggon KK, Gupta SK, Venkatasubramanian TA. Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriol Rev* 1977; 41: 822-55.
17. Wogan GN, Edwards GS, Newberne PM. Structure activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. *Cancer Res* 1971;31: 1936-42.
18. Rodríguez J, Patterson C, Potts M, Poneleit C, Beine R. Role of selected arthropods in the contamination of corn by *Aspergillus flavus* measured by aflatoxin production. Alabama: Craftmaster Printers, 1993: 23-26.
19. La Gaceta. Número 133. Alcance N0 49. Costa Rica 1999: 4.
20. La Gaceta. Número 140. Costa Rica 1999: 1.
21. Molina R. Evaluación de cuatro métodos de muestreo para determinar aflatoxinas en maíz almacenado en silos. *Boletín Técnico Estación Experimental Fabio Baudrit M.* 1995; 28: 68-75.
22. Araya C. Normas y Procedimientos del Cáncer en Costa Rica. San José: Ediciones Sanabria, 2001; 88-92.
23. Sherlock, S. Diseases of the liver and biliary system. Oxford: Black well Scientific Publications, 1985; 456-75.
24. Monto A, Wright TL. The epidemiology and prevention of hepatocellular carcinoma. *Seminars in Oncology* 2001; 28: 441-449.
25. Sun Z, Lu P, Gail MH, Pee D, Zhang Q, Ming L, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in male hepatitis B surface antigen carriers with chronic hepatitis that have detectable urinary aflatoxin metabolite M1. *Hepatology* 1999; 30: 379-83.
26. Ozturk M, Bressac B, Puisieux A, Kew M, Volkmonn M, Bozcail S, et al. P53 Mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 1991;338: 1356-59.
27. Balanchandran P. Nut milk extract in aflatoxin B1 induced hepatocellular carcinoma. *J Clin Bioch Nut* 1998; 25: 63-70.
28. Barraud L. Enhanced duck hepatitis B virus gene expression following aflatoxin B1 exposure. *Hepatology* 1999;29: 1317-23.
29. Jackson PE, Groopman JD, Johnson PJ. Aflatoxin and liver cancer. *Liver tumors. Bailliere's-Clinical-Gastroenterology* 1999;13: 545-55.
30. Wogan GN. Aflatoxin as human carcinogen (editorial). *Hepatology* 1999; 30: 573-74.
31. Wogan G. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Res.* 1992;52 : 2114s-2118s.
32. Sylla A, Diallo MS, Castegnaro J, Wild C. Interactions between hepatitis B virus infection and exposure to aflatoxins in the development of hepatocellular carcinoma: a molecular epidemiological approach. *Mutat Res* 1999;428: 187-96.
33. Smela ME, Currier SS, Bailey EA, Essigmann JM. The chemistry and biology of aflatoxin B1: from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2001; 22: 535-45.
34. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational Hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991; 350: 427-28.
35. Ross R, Yuan JM, Yu MC, Wogan G, Qian GS, Tu JT, et al. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 1992; 338: 943-46.
36. Fauci A, Braunwald E, Isselbacher K, Wilson J, Martin J, Kasper D, Longo D. Harrison. Principios de Medicina interna. 14ª. Edición. Mc Graw Hill. 1998:660-62.
37. Betina V: "Mycotoxins- chemical, biological and environmental aspects" Bioactive molecules; Elsevier Science Publishers; 1989; 34-39, 151-169, 175-187, 325-331, 355-361, 393-403, 417-421.
38. Heathcole, JG; Mibbet, JR; "Aflatoxins: chemical and biological aspects", Elsevier, 1978; 121-129.
39. Flórez J, Armijo J Mediavilla Á. Farmacología Humana 3a Edición. MASSON. 1997: 76