

Ocratoxina A - implicații în patologia umană și animală

RODICA CUCIUREANU¹

*Disciplina Chimia mediului și alimentului, Facultatea de Farmacie,
Universitatea de Medicină și Farmacie "Gr.T.Popa" Iași*

Ochratoxin A - involvement in human and animal pathology

Abstract

The mycotoxin ochratoxin A (OTA) has been linked to the genesis of several disease states in both animals and humans. It has been described as nephrotoxic, carcinogenic, teratogenic, immunotoxic, and hepatotoxic in laboratory and domestic animals, as well as being thought to be the probable causal agent in the development of nephropathies (Balkan Endemic Nephropathy, BEN and Chronic Interstitial Nephropathy, CIN) and urothelial tumours in humans. Ochratoxin has been suggested to mediate its toxic effects via induction of apoptosis, disruption of mitochondrial respiration and/or the cytoskeleton, or, indeed, via the generation of DNA adducts. Thus, it is still unclear if the predominant mechanism is of a genotoxic or an epigenetic nature.

Ochratoxins have been overshadowed by better known mycotoxins, as data regarding their existence and toxicity are less relevant than for the other mycotoxins (ergot alkaloids, aflatoxins). However, in January 2006, the owner of a major Italian grain mill was arrested and charged with importing Canadian wheat contaminated with ochratoxin A. Key questions in the ochratoxin story are still not completely answered, especially in the areas of biosynthesis, contamination of crops, toxicity and epidemiology regarding this mycotoxin. The intention of this review is to collate and discuss the currently available data on OTA-mediated toxicity with particular accent on their relevance for the *in vivo* situation and also to focus upon the importance of data regarding the contamination of foods.

Keywords: *Aspergillus*, mycotoxin, ochratoxin, Balkan Endemic Nephropathy

Rezumat

Ocratoxina A (OTA) este responsabilă de apariția a numeroase stări patologice atât la om cât și la animale. Cercetările efectuate pe animale de laborator au demonstrat că OTA este o micotoxină nefrotoxică, hepatotoxică, imunosupresivă, carcinogenă și teratogenă. La om, OTA este considerată un posibil agent cauzal pentru două boli cronice, nefropatia endemică balcanică (NEB) și nefropatia cronică interstițială (în Africa de Nord) și pentru tumori renale la om. Mecanismele prin care ocratoxina A își exercită efectele toxice se presupun a se realiza prin inducerea apoptozei, întreruperea respirației mitocondriale sau prin generarea de aducți ai AND-ului. Prin urmare, natura mecanismului ce mediază toxicitatea ocratoxinei A nu este complet elucidat. Datele referitoare la existența și toxicitatea ocratoxinelor sunt mai puțin relevante decât pentru ale altor micotoxine (alcaloizi din ergot, aflatoxine). Totuși, în 2006 este semnalat un episod în care populația italiană a fost supusă expunerii la ocratoxine prin consumul de produse de panificație obținute din făină contaminată. Întrebările cheie legate de problematica ocratoxinei A au rămas până în prezent fără răspuns, în special întrebările cu privire la biosinteza acestei micotoxine, contaminarea cerealelor și a altor produse alimentare, date toxicologice și epidemiologice privind ocratoxina A. Prezenta lucrare își propune abordarea unitară și sistematică a problematicii ocratoxinei A, cu referire la toxicitatea micotoxinei și mecanismele prin care aceasta își exercită toxicitatea, punând accent totodată pe riscurile pentru sănătate consecutive consumului de alimente contaminate cu ocratoxină A.

Cuvinte cheie: *Aspergillus*, micotoxină, ocratoxină, nefropatia endemică balcanică

¹ Adresa poștală: Str. Universității, Nr. 16, 700115, Iași, Telefon: 0040 729 103 454, Fax: 0040 232 211 820, E-mail: rcuciur@yahoo.com

Conform definiției recente (1), micotoxinele sunt „metaboliți ai fungilor care, după ingestie inhalare sau absorbție prin piele, alterează capacitatea de reacție a organismului și provoacă îmbolnăviri sau chiar moartea la om, la animale, inclusiv la păsări“.

Cunoștințele despre fungi și efectele nocive ale acestora asupra organismului datează din antichitate. Prima descriere a ceea ce astăzi este cunoscut sub numele de ergotism (micotoxicoză provocată de alcaloizii elaborați de *Claviceps purpurea*) a fost făcută de Plinius, în sec.VII î.e.n. La începutul sec. XX, mușgaiurile erau incriminate numai pentru modificarea proprietăților senzoriale ale alimentelor.

Episodul britanic al ”bolii X“ a curcilor (în 1960 au murit în Marea Britanie peste 100.000 de animale de curte hrănite cu șrot de arahide) a reprezentat momentul abordării științifice sistematice a micotoxinelor și micotoxicozelor. Ca urmare, până în prezent au fost descrise, analizate și chiar sintetizate câteva sute de micotoxine (2).

Astăzi, se consideră că micotoxinele trebuie să fi fost o adevărată calamitate pentru omenire; s-a emis ipoteza că depopularea importantă a Europei occidentale în secolul al XIII-lea s-a datorat înlocuirii secarei cu grâul în alimentație, acesta constituind o sursă importantă de micotoxine produse de *Fusarium* (3). Apoi, concentrarea acestor toxine în cerealele păstrate peste iarnă au fost la originea numeroaselor decese care au avut loc în Siberia în timpul celui de al II-lea război mondial.

Micotoxinele sunt prezente în numeroase produse care stau la baza alimentației omului și animalelor (4). Contactul cu micotoxinele (ingestie, inhalare, absorbție cutanată) poate provoca intoxicații acute sau cronice care se manifestă la nivelul aparatelor digestiv, cardiovascular, respirator, excretor etc. În ultimii ani a fost confirmată acțiunea carcinogenă, mutagenă, teratogenă și imunosupresoare a unora dintre micotoxine. Capacitatea majorității micotoxinelor de a modifica reacțiile imunitare și, prin aceasta de a reduce rezistența la infecții este considerată efectul nociv cel mai important, mai ales în țările în curs de dezvoltare.

Micotoxinele rețin atenția în întreaga lume și prin prisma pierderilor economice legate, în primul rând, de efectele asupra sănătății umane, asupra productivității animale și asupra comerțului național și internațional. În țările aflate în curs de dezvoltare, unde produsele alimentare (porumb,

arahide) sunt mai susceptibile de a fi contaminate, este probabil ca morbiditatea crescută și decesele premature să fie asociate cu prezența micotoxinelor în alimente.

În cadrul acestui proces complex (infecție fungică, toxinogeneză, consum de alimente contaminate, alterarea sănătății) există posibilități de a se interveni, în diferite etape, în scopul reducerii riscurilor pentru consumatori, deci asigurarea securității alimentare a populației.

Natura patologiei provocate de ingestia de micotoxine poate fi foarte diversă, în funcție de toxina prezentă: cancerogenitate, genotoxicitate (atingere cromozomică, care poate conduce la malformații la făt și modificarea metabolismului la adulți), scăderea apetitului, scăderea imunității, alterarea metabolismului hepatic, renal și al sistemului nervos, tulburări de reproducere, necroză la nivelul epidermei și a mucoaselor, hematotoxicitate (modificarea numărului și funcțiilor celulelor sanguine). Studiarea fiecărei micotoxine din punctul de vedere al acțiunii asupra organismului uman sau animal presupune cunoașterea detaliată a administrării, absorbției, transformărilor în organism, farmacocineticii, interacțiunilor moleculare, distribuției, excreției toxinelor și a metaboliților acestora (5).

Miller (3) consideră ca „importante“ micotoxinele cu efectele cele mai sensibile asupra sănătății umane: aflatoxine (AF), toxine T-2 (T2), deoxinivalenol sau nivalenol (DON), zearalenonă (ZEN), fumonizină B1 (FB1), ocratoxină A (OTA).

Ocratoxinele sunt micotoxine intens studiate în ultimii ani datorită toxicității deosebite asupra organismului animal și uman; aceste toxine sunt nefrotoxice, imunotoxice și mielotoxice, neurotoxice și cancerigene (grupa 2B, în clasificarea Centrului Internațional pentru Cercetarea Cancerului - CIRC) (6). Interesul pentru aceste toxine este justificat de numeroasele semnalări (7) privind contaminarea produselor alimentare: cereale, cafea, cacao, fructe uscate, mirodenii etc.

Datele referitoare la existența și toxicitatea ocratoxinelor sunt mai puțin relevante decât pentru ale altor micotoxine (alcaloizi din ergot, aflatoxine). Totuși, în 2006 este semnalat un episod în care populația italiană a fost supusă expunerii la ocratoxine prin consumul de produse de panificație obținute din făină contaminată (8). Di Paolo et al. (9) au sugerat că decesul inexplicabil la acea vreme, prin nefropatii acute ale arheologilor care au deschis mormintele egiptene s-ar putea datora

inhalării ocratoxinei prezente în sporii fungici existenți în acele spații.

Structură chimică

Ocratoxinele A, B, C reprezintă un grup de compuși cu structură chimică înrudită, în molecula cărora L-fenilalanina este cuplată printr-o legătură amidică cu un derivat izocumarinic (Figura nr.1).

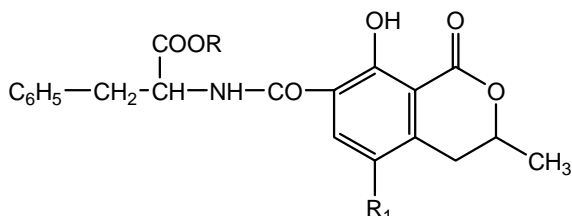


Figura nr. 1. Structura chimică a ocratoxinelor

În funcție de natura radicalilor substituiți se cunosc următoarele tipuri de ocratoxine:

Ocratoxine	R	R ₁
Ocratoxina A	H	Cl
Ocratoxina B	H	H
Ocratoxina C	C ₂ H ₅	H
Metil-esterul ocratoxinei A	CH ₃	Cl
Metil-esterul ocratoxinei B	CH ₃	H
Etil-esterul ocratoxinei B	C ₂ H ₅	H

Ocratoxinele A, B, C sunt metaboliți ai unor fungi din genurile *Aspergillus* și *Penicillium*: Ocratoxina A (OTA) a fost izolată pentru prima dată din culturi de *Aspergillus ochraceus* (10) în Africa de Sud. Ulterior, au fost descrise și alte specii de *Aspergillus* producătoare de ocratoxină: *A. melleus*, *A. sulphureus* (11), *A. alliaceus*, *A. sclerotiorum*, *A. ostianus*, *A. petrakii* (12,13,14), *A. albertensis*, *A. auricomus* (15). Recent, în genul *Aspergillus* au fost incluse alte specii producătoare de ocratoxină: *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. westerdijkiae*, și *A. ochraceus sensu strictu*. (16). Și alți autori au identificat specii de *Aspergillus* producătoare de ocratoxină: *A. niger. var niger* (17), *A. carbonarius* (18), *A. lacticoffeatus* și *A. sclerotioniger* (19).

Speciile de *A. niger* sunt utilizate în tehnologia alimentară (proces de fermentație și producția de enzime; ca și în cazul altor fungi folosiți în producerea alimentelor este necesară aprecierea exactă a a capacității speciilor de *A. niger* de a produce ocratoxina în alimentele în care fungul este înșămânțat (20).

Factori care influențează ocratoxino-geneza

Elaborarea de OTA de către fungi depinde de o serie de factori de mediu: temperatură, umiditate, substrat, grad de aeraj, bicenoza substratului, activitatea apei etc (21).

Temperatura și umiditatea

Ocratoxina A este produsă de specii de *Aspergillus* și *Penicillium*; temperatura optimă de producere a ocratoxinei de către *A. ochraceus* este 28 °C; la temperaturi de 15 sau 37 °C, producția este puternic inhibată (22). *Penicillium viridicatum* crește la o gamă de temperaturi care variază de la 4 la 30 °C, la o umiditate relativă de 18,5 % dacă se folosește ca substrat nutritiv grâul și de 21,6 % dacă fungul se cultivă pe porumb. Deci, în regiunile cu temperaturi mai scăzute, ocratoxina este produsă de *Penicillium*, iar în cele calde, mai ales de *Aspergillus* (15, 23). Ocratoxina se formează preferențial pe alimente acide (24).

Sinteza toxinei poate avea loc și la temperaturi mai mici, dacă acestea nu inhibă dezvoltarea miceliului fungic. Ocratoxina A s-a obținut și prin incubarea tulpinilor toxigene de *A. ochraceus* la 4°C. Deci temperatura scăzută nu blochează procesul de sinteză a toxinei dacă alți factori (umiditatea) nu acționează inhibant sau limitant (2).

Biocenoza substratului

Biocenoza substratului condiționează în mare măsură producția de ocratoxină, deoarece între elementele unui ecosistem pot exista relații de antagonism sau de simbioză. Astfel, *A. ochraceus* nu se poate dezvolta pe cerealele care au fost infestate deja cu *A. glaucus* (2).

Activitatea apei

Mitchell și colab. (25) au studiat, *in vitro*, efectele activității apei și a temperaturii asupra producerii de OTA la două specii de *A. carbonarius* izolate din grapefruit alb, provenit din țări europene și din Israel. Valoarea optimă a activității apei necesară creșterii a variat între 0,93-0,987 în funcție de specia fungică la o temperatură de 25 - 30°C. Cantitatea de OTA produsă variază cu specia fungică. Unele specii fungice au produs ocratoxină A la 15-20 °C la valoarea a activității apei de 0,95-0,98.

Condiții optime de dezvoltare a fungilor și de elaborare ale micotoxinelor sunt create de diferite produse alimentare. Astfel, *A. ochraceus* este prezent în diverse produse alimentare de origine vegetală (fasole uscată, soia, mirodenii, arahide, alune) în cereale (orez, ovăz, porumb);

ocratoxina este prezentă și în produse de origine animală: brânzeturi, conserve, pește, carne deshidratată. *Penicillium verrucosum* se dezvoltă lent la o activitate a apei scăzută ($a_w < 0,80$) și temperaturi de 0 – 31°C; aceste condiții corespund cu cele pe care cerealele le asigură în Europa centrală și de Nord și Canada pentru dezvoltarea fungilor și producerea ocratoxinei.

A. carbonarius este principala sursă de ocratoxină în viile din Franța, Spania și Italia (26) *A. niger* contribuie, în măsură mai redusă la producerea OTA. Speciile de *Penicillium* care se dezvoltă pe struguri în timpul maturării nu influențează producția de ocratoxină. În Europa, cantități importante de ocratoxină se formează în timpul depozitării produselor agricole, în condiții de umiditate (18 – 24%) favorabile dezvoltării fungilor micotoxinogeni (27,28, 29). În cafea, OTA se formează, mai ales în timpul depozitării boabelor. Reducerea producerii OTA poate fi realizată prin uscarea rapidă a produselor agricole după recoltare (16, 19, 30, 31)

Biosinteza ocratoxinei

Descifrarea mecanismului de biosinteză a ocratoxinei a fost posibil prin utilizarea precursorilor cu ^{14}C -marcat în culturi de *A. ochraceus* și *A. steynii* (16). Structura izocumarinică se formează din unități acetat pe calea pentaketidei, urmată de carboxilare și apoi de clorinare prin cloroperoxidare până la ocratoxină α (32). Etapa finală de legare a grupării carboxil de fenilalanină este catalizată de ocratoxin-sintetază. În condițiile unor concentrații scăzute de clor se poate forma ocratoxina B (OTB) direct sau prin declorinarea OTA (32). Inhibarea biosintezei OTA de diferiți compuși de sinteză sau naturali a fost studiată ca posibilitate de reducere a contaminării produselor alimentare. Astfel, alcaloizii din *Piper longum*, inhibă producția de OTA *in vitro* (33). Efectele inhibitoare depind de specia de fungi producătoare de ocratoxină; astfel, piperina scade semnificativ producția de ocratoxină A și ocratoxină B în izolate de *A. sclerotiorum* și *A. alliaceus*, dar nu și în cele de *A. steynii*. La fel, piperina inhibă producerea de ocratoxină A, dar o crește pe cea de ocratoxină B în izolate din culturi de *A. alliaceus*. Aceste diferențe sugerează că biosinteza ocratoxinelor nu se produce identic de către toți fungii.

Gena poliketid-sintază implicată în biosinteza OTA în culturi de *A. ochraceus* a fost clonată de O, Callaghan (34). Poliketid sintaza a fost exprimată numai pe medii pe care s-a produs OTA; mutații

cu inserții în această genă n-au produs ocratoxină. Prin analogie cu genele poliketide producătoare de aflatoxine care sunt asociate în cluster (35), și cele pentru OTA pot fi la fel. Referitor la rolul micotoxinei pentru fungul care a elaborat-o ca metabolit secundar, acesta rămâne necunoscut și pentru ocratoxină ca și pentru mulți alți fungi (36) chiar dacă s-a demonstrat că toxinele sunt cauza mortalității și scăderii în greutate a larvelor insectelor la concentrații de 2,5 – 25 ppm.

Toxicocinetica ocratoxinei

Absorbție, transport și distribuție

După ingestie, ocratoxina este parțial absorbită prin difuzie pasivă, în formă neionizată, la nivelul pereților stomacului (37). Locul principal de absorbție este situat la nivelul intestinului și anume, a jejunului proximal.(38) Procentul de absorbție a OTA la nivelul intestinului este diferit în funcție de specia animală astfel: 66% la porcine, 56% la șobolan, 56% la iepure și 40% la pui (37). OTA absorbită este apoi distribuită la nivelul diferitelor organe urmărind circuitul enterohepatic. Studii recente au arătat că absorbția se poate realiza și cu ajutorul transportorilor; OTA este absorbită de celulele intestinale umane Caco-2, probabil prin difuziune pasivă. Această absorbție este limitată de pompa de eflux activ localizată pe fața apicală a celulelor. Această pompă este un transportor multispecific de anioni organici numită proteina MRP2 (39, 40).

La nivelul celulelor tubulare proximale a rinichiului (celule OK) schimburile la nivelul membranei apicale sunt diferite de cele care se produc în zona bazolaterală (41). La nivelul peretelui luminal al celulelor tubulare transportul activ al OTA are loc prin intermediul a trei tipuri de transportori: transportori de fenilalanină, transportori de ioni de hidrogen/dipeptide și transportori de anioni organici (42, 43). Studiile experimentale au demonstrat că, la nivel bazolateral numai transportorii de anioni organici pot duce OTA în celulele renale (44). Transportorii de acizi grași situați în membrana peri-tubulară ar putea juca un rol important în acumularea ocratoxinei la nivelul tubilor proximali renali.

Una din proprietățile importante ale OTA este afinitatea pentru proteinele plasmatică pe care se fixează în proporție de 90%. OTA se fixează pe albumina serică și pe o macromoleculă serică neidentificată cu greutatea moleculară de 20 kDa.

Mecanismul prin care OTA se leagă de proteinele plasmatică nu este complet elucidat. Ilichev și colab. (45, 46) au demonstrat că

ochratoxina A sub formă de di-anion se leagă de albumina serică prin intermediul a două situri de legare. Legăturile formate pot fi deplasate de diferiți liganzi anionici ca fenilalanina, aspartatul și antiinflamatoarele nesteroidiene (46). Deplasarea OTA determină întârzierea transportului acesteia către diferitele organe și creșterea timpului de înjumătățire seric, contribuind astfel la dezvoltarea efectelor toxice cronice ale acestei micotoxine (47, 48). Distribuția tisulară a OTA la porcine, pui, ovine scade în ordinea: rinichi > ficat și mușchi > țesut adipos (49, 50).

Metabolizarea ocratoxinei

Datele din literatură privind metabolizarea ocratoxinelor sunt numeroase și conduc la concluzii, uneori controversate.

Ocratoxina este hidrolizată *in vitro*, de către α chimotripsină și carboxi-peptidaze în ocratoxină α . Studii experimentale *in vitro*, prin incubarea OTA în prezența microzomilor hepatici de la diferite animale și de la om au pus în evidență diferiți produși de metabolizare a ocratoxinei: 4R-hidroxi-ocratoxina A, 4S-hidroxi-ocratoxina XX, 10-hidroxi-ocratoxina (compuși de detoxifiere parțială). Unii autori (51) au sugerat formarea unor compuși de conjugare OTA-acil hexoze și OTA-acil pentoze în hepatocitul primar uman.

Aceste transformări sunt dependente de sistemul microzomal de mono-oxigenaze al citocromului P450 (52). În paralel, alte studii sugerează că OTA este puțin metabolizată de citocromul P450 (53) și că toxicitatea depinde mai mult de un stress oxidativ decât de metabolizarea sa. Metabolismul OTA ar putea fi explicat ca unul de tip oxidativ, cu formarea unor aducți - ADN implicați în acțiunea genotoxică demonstrată pentru această micotoxină.

Metabolizarea ochratoxinei A *in vivo* este considerată specifică pentru diferite specii de animale. La ruminante, principalele toxine ingerate sunt modificate la nivelul tubului digestiv, înainte de a fi excretate pe cale biliară. Aceste procese limitează absorbția în tubul digestiv și, în același timp, favorizează eliminarea toxinelor sau a metabolizatorilor în urină și în lapte.

La ruminante OTA este metabolizată în rumen la fenilalanină și ochratoxină α care nu este toxică. OTA poate fi, de asemenea, esterificată la ochratoxină C care prezintă o toxicitate echivalentă. Transformarea ochratoxinei A este dependentă de cantitatea de hrană din rumen - o cantitate mare de hrană poate scădea metabolizarea cu până la 20 %.

La nivelul epiteliului intestinal, ficatului și rinichiului, ochratoxina A este bioconvertită de citocromul P450 din microzomii hepatici la hidroxi-ochratoxină A, compus cu proprietăți imunosupresive asemănătoare cu ale ochratoxinei A.

Eliminare

OTA este eliminată din organism la nivelul rinichilor, prin fecale sau biliar. O parte din micotoxină ce se găsește în bilă poate fi reabsorbită la nivel intestinal. (54). În rinichi, OTA este filtrată la nivelul glomerulului, apoi este secretată la nivelul tubului contort proximal în lumenul tubular. Procente de 30-40% sunt eliminate pe cale urinară (55) la nivel tubular 25% din OTA, provine din filtrarea glomerulară, iar restul din secreția activă spre lumenul tubular prin intermediul transportorilor de anioni organici. (56, 57).

OTA secretată în urină este reabsorbită în parte la nivelul tubilor renali, ceea ce conduce la acumularea în celulele renale și eventuala reintrare în circuitul sanguin. Excreția biliară și filtrarea glomerulară (urmată de o excreție și reabsorbție la nivelul tubului contort proximal) au un rol important în clearance-ul total al OTA. Cantitatea de OTA eliminată prin fiecare dintre căile de eliminare depinde de doza ingerată, de distribuția tisulară, de metabolismul toxinei și de capacitatea de legare a macromoleculilor serice (58).

Eliminarea în lapte a toxinelor și metabolizatorilor acestora la unele specii animale (ruminante) reprezintă o cale de excreție și, în același timp de detoxifiere a organismului animal; mecanismele acestui proces sunt complexe: filtrare, difuzie pasivă transmembranară sau transport activ prin intermediul veziculelor de secreție (59).

Toxicitate

Administrarea de doze crescute și unice de OTA poate duce la o intoxicație acută care se manifestă printr-o serie de simptome ca anorexie, poliurie, polidipsie, hemoragie digestivă, deshidratare, care pot provoca moartea la câteva săptămâni după administrare (37). DL₅₀ și timpul de înjumătățire au valori relativ scăzute, prezentând diferențe semnificative între specii (tabelul 1).

Tabelul 1
DL₅₀ și T_{1/2} a OTA pentru diferite specii

Specie	DL ₅₀ (per os) (mg/kg corp)	T _{1/2} (per os)
Om	-	35,5 zile
Maimuță	-	21 zile
Porc	1,0-6,0	72-120 ore
Șobolan	20-30	55-120 ore
Șoarece	48-58	40 ore

Mecanisme de acțiune

Conform datelor incluse în monografia elaborată de Centrul Internațional pentru Cercetarea Cancerului (6), ocratoxina A este o micotoxină nefrotică, imunotoxică și mielotoxică, eurotoxică și cancerigenă.

Mecanismele prin care OTA își manifestă acțiunea toxică sunt complexe: efecte la nivelul transcripției și traducției, efecte asupra metabolismelor glucidic și lipidic, asupra respirației mitochondriale.

Efectele la nivelul transcripției și traducției

Efectele la nivelul transcripției și traducției au fost puse în evidență prin studii *in vitro*: ocratoxina inhibă specific sinteza proteinelor prin competiția cu fenilalanina, în reacții de aminoacilare a ARN, reacții catalizate de fenilalanil-ARN sintetază (60).

Are loc stoparea reacției de aminoacilare și elongația peptidică. Alți autori (61) au demonstrat că, *in vitro* OTA poate inhiba sinteza de ARN-mesager. Efectele de inhibare a sintezei de proteine n-au fost confirmate prin studii *in vivo*.

Efecte asupra metabolismului glucidic

Efectele asupra metabolismului glucidic se manifestă prin reducerea neoglucogenezei renale, datorită inhibării fosfo-enol-piruvat carboxikinazei (62). Mai recent, a fost semnalată acțiunea hiperglicemiantă pe seama stimulării glicogenolizei și sintezei glucozei din aminoacizi glucoformatori.

Efecte asupra metabolismului lipidic

Intensificarea peroxidării lipidice demonstrată pentru OTA atât *in vitro* cât și *in vivo* ar putea fi explicația pentru efectul necrozant la nivelul rinichilor. De altfel, peroxidarea acizilor polienici incluși în membranele fosfolipidice a fost propusă ca mecanism de acțiune pentru xenobioticele responsabile de alterări ale structurii tisulare (63). Acest mecanism de acțiune este confirmat de cercetări (64) care au demonstrat reducerea stress-ului oxidativ la nivel renal și hepatic generat de OTA la șobolani masculi

Sprague-Dawley, prin administrare de melatonină ca antioxidant. În plus, peroxidarea lipidică poate modifica homeostazia calciului hepatic, cu creșterea nivelului calciului citosolic (65)

Efecte asupra respirației mitochondriale

Ocratoxina inhibă competitiv activitatea succinat-dehidrogenazei, a citocrom-C oxidazei și a altor enzime indispensabile în ciclul Krebs, care au drept consecință scăderea producerii de ATP. Prin acest mecanism, respirația mitocondrială este inhibată (66).

Acțiunea cancerigenă, genotoxică și mutagenă

Ocratoxina este cancerigenă la rozătoare cu dezvoltarea tumorilor renale, hepatice, mamare și testiculare (6). Pe această bază a fost făcută o corelație pozitivă între expunerea la OTA, incidența nefropatiei endemice balcanice și incidența ridicată a cancerului de epiteliu urotelial. În sprijinul acestei corelații vine nivelul crescut al concentrației serice a ocratoxinei la pacienții cu nefropatie balcanică sau cancer de endoteliu. OTA a fost detectată în toate probele de sânge (maximum 0,04μg/L) și în 58% din probele de lapte (maximum 0,9μg/L) analizate în Norvegia (67). Probele de plasmă analizate în Suedia conțin între 0,09 și 0,9μg/L (67). Pentru probele de lapte, concentrațiile în OTA sunt de 10 ori mai mari decât în plasma sanguină. Conținutul crescut de OTA în lapte este asociat cu consumul crescut de pateu de ficat, sucuri și prăjituri (68). Concentrațiile ocratoxinei în sângele pacienților cu patologie renală este mult mai ridicată decât a populației generale (69); la aceștia concentrațiile de OTA determinate au variat între 1136 și 46 000 μg/kg (70).

Comparativ cu Europa, unde expunerea la OTA prin consum de cereale este crescută, în Brazilia majoritatea probelor de lapte analizate sunt negative, iar concentrația maximă determinată a fost de 0,02μg/L (71). Ocratoxina A, la concentrații cuprinse între 1 și 3 mg/kg este corelată cu dezvoltarea unei nefropatii și a cancerului renal la om și la porc prin degenerescență tubulară și are rolul imunosupresor pe celulele "natural killer", care ar putea juca un rol în dezvoltarea tumorilor (6, 72,73). Unele studii privind acțiunea genotoxică a ocratoxinei (testul Ames, pe sușe clasice de *Salmonella typhimurium* au condus la rezultate negative (74, 75). Alți autori (76) au demonstrat, prin același test, dar după metabolizarea prealabilă a OTA de către hepatocitul de șobolan că OTA manifestă o acțiune mutagenă. Aceeași autori au constatat inducerea schimburilor de cromatide

surori în limfocite umane cultivate în medii conținând OTA metabolizată de hepatocitul de șobolan. Genotoxicitatea OTA a fost demonstrată și prin utilizarea altor tipuri de celule de mamifere: dezorganizarea sintezei de ADN în hepatocitul de șobolan și de șoarece, în cultură. Ca o concluzie, OTA este mutagenă (în testul Ames) numai în prezența microzomilor hepatici sau renali. Teste de reparare a ADN la *Escherichia coli* au demonstrat acțiunea genotoxică prin creșterea nivelului schimburilor de cromatide surori și inducerii formării de micronuclei în culturile de celule de vezicule seminale ovine (36).

Acțiune teratogenă

Ocratoxina A este embriotoxică și teratogenă; la șoarecii tratați cu OTA timp de trei zile (zilele 7,8,9 după gestație) s-a înregistrat o mortalitate prenatală de peste 20 %. La fetus s-au observat anomalii la nivelul sistemului nervos central, ochilor și a scheletului axial, mai ales malformații cranio-faciale. Experimentele pe șobolani la care s-a administrat OTA (ingestie) în zilele 8 și 9 de gestație au evidențiat creșterea numărului de gestații fetale, diminuarea numărului de feteși/femelă, scăderea în greutate a puilor și a placentei (6, 36,77).

Acțiune imunotoxică

Efectele, expunerii diferitelor specii animale asupra măduvei osoase și asupra răspunsului imunitar sunt variabile și pot fi la originea limfopeniei, regresiei timusului și supresiei răspunsului imunitar (78). La șoarecii au fost evidențiate neutrofilia și euzinofilia. La păsări a fost semnalată scăderea nivelului iminoglobulinelor și a capacității fagocitare a monocitelor și a nucleofililor polinucleare. Mai mult, OTA inhibă producerea de anticorpi în prezența antigenilor timus-dependenți (79).

Ingestia de OTA de către porcine scade semnificativ rezistența la infecții (80).

Acțiune neurotoxică

Cercetări experimentale *in vitro* au demonstrat că OTA se acumulează la nivelul encefalului, având ca receptori anumite structuri din mezencefalul, hipocamp, cerebel (81); markerii de diferențiere și creștere neuronală a celulelor neuronale din cultura de țesut erau afectați de doze de OTA mai mici decât cele necesare pentru markerii funcțiilor celulare bază (82). Mecanismul de acțiune nu este elucidat; deoarece adăugarea de fenilalanină nu exercită acțiune inhibitoare, sugerează că ar fi exclusă inhibarea sintezei

proteice. În plus, intensificarea peroxidării lipidice nu poate fi incriminată, deoarece aceasta se produce la doze care depășesc 3 M (Rathimula, 1998). Bruininc (82) a demonstrat că celulele neuronale sunt afectate în culturi în care concentrațiile în OTA sunt mult mai mici.

Acțiune nefrotoxică

Efectele ingestiei ochratoxinelor asupra sănătății animale sunt diferite în funcție de specia animală, doză, cantitatea de alimente prezentă simultan în tubul digestiv etc.

În numeroase țări, leziunile observate în abatoarele de porcine sunt asociate cu consumul de hrană contaminată cu OTA; aceste leziuni au fost reproduse prin introducerea micotoxinei purificate în regimul alimentar al animalelor (83, 84, 85, 86, 87, 88).

Clinic, ingestia de OTA produce polidipsie și poliurie; momentul instalării simptomelor și durata lor depind de doza de micotoxină. Capacitatea de reabsorbție tubulară este redusă și animalele prezintă glicozurie și proteiurie. Excreția urinară de sodiu, potasiu, nitriți, bilirubină este crescută, crește pH-ul acesteia pe măsură ce osmolaritatea și densitatea se micșorează. De asemenea, crește excreția urinară de leucin-amino-peptidază și de gama-glutamyl-transpeptidază, enzime localizate în bordura în perie a tubilor proximali. În urină sunt prezente depozite granulare și celule epiteliale necrotice de la nivelul tubilor renali. Indicatorul sensibil și precoce al afectării renale este reprezentat de creșterea uremiei și nivelului creatininei. La concentrații de OTA mai mari de 1 mg/kg în hrană, se instalează leucocitoza, crește raportul neutrofile/limfocite, scad eritrocitele și hemoglobina. În paralel, este afectată funcția imunitară cu dezvoltarea limfocitelor și producerea interleukinelor IL-2.

La necropsie se observă decolorarea și hipertrofierea rinichilor, atrofia și degenerescența tubilor contorți proximali, fibroza interstițială și, mai rar, hialinizarea glomerulilor. La animalele masculi OTA este prezentă în lichidul seminal și micșorează performanțele reproductive; la femele, aceste nu par a fi modificate.

Păsările și porcii prezintă o sensibilitate foarte mare la doze mici și repetate de ochratoxina A. La 20 mg/kg/zi, pe o perioadă de 4 luni, se instalează insuficiența renală cu fibroză corticală și alterarea funcției glomerulare; au fost observate similitudini între leziunile umane și cele din modelele experimentale.

Aceste îmbolnăviri au fost observate foarte rar la animalele rumegetoare, deoarece la acestea, microorganismele din rumen hidrolizează ochratoxina A la alfa-ochratoxina A, mult mai puțin toxică, și la fenilalanină. La doze mari de micotoxină, capacitatea de detoxifiere a rumenului poate fi depășită.

Ochratoxicozele acute au fost evidențiate experimental la păsări, șobolani și porcine. Semnele clinice ale maladiei sunt afectare renală, anorexie cu scăderi în greutate, vomismente, creșterea temperaturii rectale, conjunctivite, deshidratare, slăbire accentuată și moartea animalelor la două săptămâni după administrarea toxinei.

Intoxicația cronică se manifestă printr-o reducere a ingestiei de alimente, polidipsie și leziuni renale. Porcul este animalul cel mai sensibil la acțiunea ochratoxinei A. Această intoxicație se manifestă semnificativ pentru concentrații de toxină superioară la 1,4 mg/kg în rația zilnică.

Ochratoxina A poate inhiba metabolismul glucozei și insulinei, ceea ce conduce la acumularea glicogenului în ficat.

Ca mecanism, are loc o scădere a activității fosfo-enol-piruvat-carboxi-chinazei care provoacă o reducere a neoglucogenezei renale.

În prezent, nefrotoxicitatea ochratoxinei A este perfect identificată la animale. Nefropatia porcină, recunoscută inițial în Danemarca, a fost raportată de numeroase țări europene. La porcii intoxicați apar leziuni biochimice: proteinurie, glicozurie, enzimurie, reducerea concentrației urinei și, treptat, se instalează insuficiența renală (87, 88).

Histologic, se observă fibroza interstițială și leziuni tubulare proximale; n-au fost observate leziuni histochimice la nivelul altor țesuturi sau organe.

Nefropatia aviară se manifestă prin același tip de leziuni histochimice. Aceeași afectare renală a fost reprodusă experimental la pui de găină prin administrare de ochratoxină A. De asemenea, nefropatia a fost reprodusă la diferite rase de șobolan. În toate cazurile, s-au constatat aceleași anomalii funcționale tubulare; în plus, a fost constatată o cariomegalie a tubilor proximali (89).

Mecanismul acțiunii nefrotice a ochratoxinei A a făcut obiectul a numeroase studii. S-a confirmat rolul ochratoxinei A în reducerea specifică a activității fosfo-enol-piruvat carboxi-chinazei, în diminuarea neoglucogenezei renale, inducerea unei activări a peroxidării lipidice și alterarea funcției mitocondriale.

Ochratoxicozele au fost confirmate la om, în regiunea balcanică. Acțiunea nefrotică a ochratoxinei la om a fost asociată cu dezvoltarea nefropatiei balcanice (NEB).

Prima descriere clinică a acestei boli a fost făcută de Tanchev și col. (90) în anul 1956. Aceasta s-a bazat pe urmărirea a 664 bolnavi spitalizați pentru afecțiuni renale în spitalul districtului Vrața, Bulgaria. NEB este diagnosticată în România, Bulgaria și Iugoslavia. În România au fost evidențiate ca arie de răspândire cinci focare în Oltenia și unul în Banat (91).

Expunerea la ochratoxină A a fost corelată cu incidența nefropatiei interstițiale cronice în regiunea Maghreb (92). La necropsie s-a constatat că rinichii aveau o talie mult redusă, tubuli proximali necrozați; este prezentă fibroza corticală și hialinizarea glomerulară. Nefropatia endemică balcanică este asociată cu carcinomul renal, cel ureteral și, mai puțin frecvent, cu carcinomul vezical. Formațiuni tumorale similare celor obținute experimental în rinichiul de șoarece au fost observate în tumorile renale și vezicale ale pacienților din Bulgaria suferind de NEB și de cancer al căilor urinare. Recent, un studiu efectuat pentru pacienți din regiunea Midi-Pyrenees a indicat o legătură între incidența cancerului renal și vezical și expunerea la ochratoxină prin intermediul alimentelor.

Implicarea ochratoxinei A în etiologia nefropatiei endemice balcanice (93, 94, 95, 96) Numeroase studii au evidențiat că, intensitatea contaminării fungice în regiunea respectivă era foarte intensă (96).

Acțiunea toxică asupra organismului uman – perspectivă globală

Ochratoxina este clasificată (6) ca „posibil carcinogen uman” (grupa 2B), cu toate că nu toate concluziile cercetărilor pe animale pot fie extrapolate la om (15, 69). Datele epidemiologice sunt, uneori greu de interpretat și datorită fenomenelor de sinergism care se pot manifesta între micotoxine (97). OTA a fost confirmată, prin experimente pe animale (14, 36) ca micotoxină nefrotică, imunosupresivă, carcinogenă și teratogenă. Doza letală (DL50) este de 20 mg/kg la șobolan și 3,6 mg/kg la pui (98). Concentrațiile OTA eliminate de organismul uman sunt mai reduse decât la alte specii animale (99). La om, OTA este considerată cauza pentru două boli cronice, nefropatia endemică balcanică (NEB) și nefropatia cronică interstițială (în Africa de Nord) și pentru tumori renale la om (36). Prezența aducților ADN la

pacienții cu NEB confirmă implicarea OTA în apariția și dezvoltarea maladiei. De asemenea, se poate face o asociere între expunerea umană la OTA și incidența cancerului testicular; astfel, în Danemarca expunerea prin consumul crescut de carne de porc și de secară explică frecvența ridicată a acestui tip de cancer.

Pentru a reduce la maximum riscurile expunerii populației la concentrații crescute de ocratoxină, Comitetul Științific pentru Alimente al Uniunii Europene recomandă ca aportul maxim prin consumul de alimente să nu depășească 5ng/kg corp/zi (100).

Nivelul contaminării fungice și conținutul în OTA al alimentelor

Fungii responsabili de prezența OTA în alimente sunt diferiți de la o cultură agricolă la alta și de la o zonă la alta; conform afirmației lui John Pitt (98), ocratoxina A este produsă de *Penicillium verrucosum* în cereale în zonele reci, de *A. carbonarius* în struguri, vin și în vinul din fructe, și de *A. ochraceus* în boabele de cafea. Cu toate acestea, și în zonele calde din Italia, Spania, Franța și Portugalia cerealele sunt contaminate cu *Penicillium verrucosum* producătoare de ocratoxină (26).

Odată cu identificarea produselor agricole contaminate cu fungi capabili să producă ocratoxină a crescut numărul alimentelor în care OTA este prezentă. Astfel, OTA a fost găsită în orz, făină, secară, porumb, orez etc (101) începând cu anii '60 (Tabel 2). Mai târziu ocratoxina a fost determinată în legume, struguri, stafide, vin nuci, bere, cacao și

mirodenii (94,102). Mai mult, OTA este prezentă în produse animale: carne de vită și de porc (mai ales rinichi), ficat și mezeluri, și chiar în laptele matern (103, 104, 105, 106). Este foarte probabil ca numărul produselor în care este prezentă ocratoxina să fie mult mai mare în viitor. Nivelurile de contaminare fungică sunt diferite, iar concentrațiile de OTA, deși prezentă sunt mici și dificil de determinat cu exactitate (104).

Se estimează că aportul zilnic de OTA prin alimente în Europa, unde în jur de 50% din alimente sunt reprezentate de cereale și derivate este de 0,7 – 4,6 ng/kg corp (104).

Referitor la contaminarea fungică a cafelei, datele din literatură raportează prezența OTA atât în produsul verde cât și în cel procesat. Dintre fungi, *A. carbonarius*, *A. niger* și, mai ales, *A. ochraceus* au fost izolați din probe de cafea (107). Alți autori (16), au publicat date conform cărora *A. steynii* și *A. westerdijkiae* sunt speciile cele mai productive pentru ocratoxină, în cafea. Nivelul de contaminare fungică variază de la o regiune la alta; probele din Africa au, în general, un conținut mai crescut în toxină decât cele din America Latină și Asia. În ceea ce privește conținutul de OTA al cafelei comercializate (preambalată), toxina este prezentă în 80% din probele de cafea instant (uneori, mai mult de 8 μg/kg și în 85 % din cafeaua măcinată (mai mult de 0,1 μg/kg) (30, 108, 109, 110), deși în jur de jumătate din toxină se distruge în timpul prăjirii.

Tabelul 2

Conținutul ocratoxinei în produse alimentare (103, 104)

Produse alimentare	Număr probe	Număr probe pozitive	Procent probe pozitive	Ocratoxina A (μg/kg) Media pentru probele pozitive
Cereale	5180	2825	55	0,484
Grâu	979	273	28	0,700
Porumb	267	35	13	0,719
Ovăz	164	49	30	0,465
Secară	444	236	53	1,095
Orz	142	34	24	1,061
Orez	63	4	6	0,725
Cafea verde	1704	620	36	3,641
Cafea prăjită	1184	549	46	1,092
Bere	496	192	39	0,032
Vin	1470	872	59	0,591
Cacao și derivați	547	445	81	0,277
Fructe uscate	800	582	73	3,078
Carne	1860	328	18	0,830
Condimente	361	188	52	5,061
Altele	4927	2472	50	0,551

Legislație

Legislația Comunității Europene fixează limitele maxime admise pentru ocratoxina A.

Limitele maxime pentru ocratoxina A - Uniunea Europeană

Produsul alimentară	Concentrația maximă admisă
Cereale neprelucrate	5 µg/kg
Cereale procesate	3 µg/kg
Stafide	10 µg/kg
Cafea prăjită	5 µg/kg
Cafea verde* (numai în Italia)	8 µg/kg
Cafea solubilă	2 µg/kg
Vin, bere, sucuri de fructe	10 µg/kg
Carne și organe de porc	10 µg/kg
Produse pentru copiii sub 3 ani	5 µg/kg

* Federația Europeană a Cafelei consideră că o limită de 5 µg/kg ar duce la eliminarea de pe piață a 7-18% din loturile de cafea comercializate, având repercusiuni importante asupra economiei țărilor exportatoare (47). În Statele Unite însă, FDA nu a introdus limite pentru conținutul în OTA în alimente.

Bibliografie

- Pitt JI - What are mycotoxins?; *Australian Mycotoxin Newsletter* 1996; 7(4):1;
- Coman I, Popescu O. *Micotoxine și micotoxicoze*; București: Editura Ceres; 1985;
- Miller JD. *Significance of grain mycotoxins for health and nutrition*. In: Champ BR, Highley E, Hocking AD, Pitt JI (eds). *Fungi and Mycotoxins in Stored Products, ACIAR Proceedings*; Canberra, Australia 1991; 36: 126-135;
- Coker RD - Mycotoxins and their control: constraints and opportunities. *NRI Bulletin*; 73; Chatham; UK: *Natural Resources Institute* 1997;
- JEFCA - Evaluation of certain mycotoxins (fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives); *WHO*, Geneva; 2002: 906;
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 56: Some Naturally Occurring Substances: Some Food Items and Constituents, *Heterocyclic Aromatic Amines And Mycotoxins*. IARC, Lyon; 1993
- Bayman P, Baker J - Ochratoxins: A global perspective; *Mycopathologia* 2006; 162: 215-223;
- Hooper J - Polluted pasta causes toxin alarm in Italy; *Guardian Unlimited* 1/12/2006; http://www.guardian.co.uk/food/story/0,1684524,0_0.html ;
- Di Paolo N, Guarnieri A, Loi F - Acute renal failure from inhalation of mycotoxins; *Nephron* 1993; 64: 621-625;
- van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L - Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*; *Willh. Nature* 1965; 205: 1112-1113;
- Lai M, Semeniuk G, Hesseltine CW - Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in synthetic medium; *Applied Microbiology* 1970; 19: 542-544;
- Ciegler A, Fennell DI, Sansing GA - Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: Classification into subgroups; *Applied Microbiology* 1973; 26: 271-278;
- Hesseltine CW, Vandegrift EE, Fennell DI - *Aspergilli* as ochratoxin producers; *Mycologia* 1972; 64: 539-550;
- Tsubouchi H, Terada H, Yamamoto K - Caffeine degradation and increased ochratoxin production by toxigenic strains of *Aspergillus ochraceus* isolated from green coffee beans; *Mycopathologia* 1995; 90: 181-186;
- Varga J, Kevei E, Rinyu E - Ochratoxin production by *Aspergillus* species; *Applied Environmental Microbiology* 1996; 62: 4461-4464;
- Frisvad JC, Frank JM, Houbraken J - New ochratoxin producing species *Aspergillus* section *Circumdati*; *Studies in Mycology* 2004; 50: 23-43;
- Abarca ML, Bragulat MR, Sastella G - Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*; *Applied Environmental Microbiology* 1994; 60: 2650-2652;
- Teren J, Varga J, Hamari Z - Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains; *Mycopathologia* 1996; 134: 171-176;
- Samson RA, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA - New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*; *Studies in Mycology* 2004; 50: 45-61;
- Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad J - On the safety of *Aspergillus niger* - a review; *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002; 59: 426-435;
- Pitt J I - *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A; *Applied And Environmental Microbiology* 1987; 53: 266-269;
- Trenk HL, Butz ME, Chu FS - Production of ochratoxin A in different cereal products by

- Aspergillus ochraceus*; **Applied Microbiology** 1991; 21: 1032-1035;
23. Pohland AE, Nesheim S, Friedman L - Ochratoxin A: a review; **Pure and Applied Chemistry** 1992; 64: 1029-1046;
 24. Cuero RG, Smith JE, Lacey J - Stimulation by *Hyphopichia burtonii* and *Bacillus amyloliquefaciens* of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in irradiated maize and rice grains; **Applied And Environmental Microbiology** 1987; 53: 1142-1146;
 25. Mitchell D, Parra R, Aldred D - Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel; **Journal of Applied Microbiology** 2004; 97: 439-445;
 26. Olsen M, Jonsson N, Magan N - Prevention of ochratoxin A in cereals; <http://www.slv.se/upload/dokument/fou/MIB>;
 27. Shotwell LL, Hesseltine CW, Goulden ML - Ochratoxin A occurrence as natural contaminant of a corn sample; **Applied Microbiology** 1969; 17: 765-766;
 28. Campbell BC, Molyneux RJ, Schatzki TF - Current research on reducing pre- and post-harvest aflatoxin contamination of U.S. tree nuts; **Journal of Toxicology and Toxin Review** 2003; 22: 225-226;
 29. Zimmerli B, Dick R - Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment; **Food Additives and Contaminants** 1996; 13: 655-668;
 30. Levi CP, Trenk HL, Mohr HK - Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans; **J Assoc Off Anal Chem** 1974; 57: 866-870;
 31. Urbano GR, Taniwaki MH, Leitão MFF - Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee; **J Food Prot** 2001; 64: 1226-1230;
 32. Harris JP, Mantle PG - Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*; **Phytochemistry** 2001; 58: 709-716;
 33. Lee SE, Bayman P, Baker JL - Inhibition of ochratoxin biosynthesis by naturally occurring alkaloids.[in preparation];
 34. O'Callaghan J, Caddick MX, Dobson ADW - A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*; **Microbiology** 2003; 149: 3485-3491;
 35. Yu J, Chang P, Ehrlich K - The clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis; **Applied Environmental Microbiology** 2004; 70 (53): 1253-1262;
 36. O'Brien E, Dietrich DR - Ochratoxin A: The continuing enigma; **Critical Reviews of Toxicology** 2005; 35(1): 33-60;
 37. Galtier P, Alvinerie M, Charpentreau JL - The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens; **Food and Cosmetics Toxicology** 1981; 19: 735-738;
 38. Kanisawa M, Suzuki H - The mode of action of ochratoxin A in acute enteritis in rats; **JEPTO** 1990; 10: 56-63;
 39. Sergent T, Garsou S, Schaut A *et al.* - Differential modulation of ochratoxin A absorption across Caco-2 cells by dietary polyphenols, used at realistic intestinal concentrations; **Toxicology Letters** 2005; 159: 60-70;
 40. Berger V, Gabriel AF, Sergent T *et al.* - Interaction of ochratoxin A with human intestinal Caco-2 cells: possible implication of a multidrug resistance-associated protein (MRP2); **Toxicology Letters** 2003; 140-141: 465-476;
 41. Gekle M., Mildenerberger S, Freudinger R - The mycotoxin ochratoxin A impairs protein uptake in cells derived from the proximal tubule of the kidney (opossum kidney cells); **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics** 1994; 271: 1-6;
 42. Sokol PP, Ripich G, Holohan PD - Mechanism of ochratoxin A transport in kidney; **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics** 1988; 246: 460-465;
 43. Babu E, Takeda M, Narikawa S *et al.* - Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A; **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research** 2002; 1590: 64-75;
 44. Jung KY, Takeda M, Kim *et al.* - Characterization of ochratoxin A transport by human organic anion transporters; **Life Sciences** 2001; 69: 2123-2135;
 45. Il'ichev YV, Perry JL, Simon JD - Interaction of ochratoxin A with human serum albumin. Preferential binding of the dianion and the pH effects; **Phys Chem B** 2002; 106: 452-459;
 46. Il'ichev YV, Perry JL, Ruker F *et al.* - Interaction of ochratoxin A with human serum albumin. Binding sites localized by competitive interactions with the native protein and its recombinant fragments; **Chemico-Biological Interactions**
 47. Størmer F. C - Ochratoxin A: a mycotoxin of concern; **In Handbook of Applied Mycology** 1992; Bhatnagar D., Lillehoj E.B., Arora D.K.eds, Dekker, N.Y. 403-432.
 48. Zepnik H, Volkel W, Dekant W - Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F 344 rats after oral administration; **Toxicology and Applied Pharmacology** 2003; 192: 36-44;
 49. Madsen A, Mortensen GK, Hald B - Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. I: influence on pig performance and residues; **Acta Agri Scand** 1982; 32: 225-239;
 50. Mortensen GK, Hald B, Madsen A - Ochratoxin A contaminated barleys for sow and piglets: pig

- performances and residues in milk and pigs; *Acta Agriculturae Scandinavica* **1983**; 33: 352-359;
51. Grosse Y, Monje MC, Macé *et al.* - Use of bronchial epithelial cells expressing human cytochrome P450 for study on metabolism and genotoxicity of ochratoxin A; *In vitro toxicology* **1997**; 10: 97-106;
 52. Størmer FC - Ochratoxin A: a mycotoxin of concern. In **Handbook of Applied Mycology**. Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK (eds) Dekker N.Y. **1993**: 403-432;
 53. Gautier JC, Holzhaeuser D, Markovic J - Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats; *Free Radical Biology and Medicine* **2001**; 30: 1089-1098;
 54. Fuchs R, Radic B, Ceovic S *et al.* - Enterohepatic circulation of ochratoxin A in rats; *Period Biol* **1988**; 90: 39-42;
 55. Støren O, Holm H, Stormer FC - Metabolism of ochratoxin A by rats; *Applied And Environmental Microbiology* **1982**; 44: 785-789;
 56. Schwerdt G, Freudinger R, Silbernagl S - Ochratoxin A-binding proteins in rat organs and plasma and in different cell lines of the kidney; *Toxicology* **1999**; 135:1-10;
 57. Schwerdt G, Gekle M, Freudinger R *et al.* - Apical-to-basolateral transepithelial transport of Ochratoxin A by two subtypes of Madin-Darby canine kidney cells; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1324**; 191-199;
 58. Li S, Marquardt RR, Frohlich AA, Vitti TG *et al.* - Pharmacokinetics of Ochratoxin A and Its Metabolites in Rats; *Toxicology and Applied Pharmacology* **1997**; 145: 82-90;
 59. Skaug MA *et al.* - Ochratoxin A: a naturally occurring mycotoxin found in human milk samples from Norway; *Acta Paediatrica* **1998**; 87: 1275 - 1282;
 60. Creppy EE, Kern D, Steyn PS - Comparative study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl tRNA synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells; *Toxicology Letters* **1983**; 19: 217-224;
 61. Meisner H, Cimbala M - Effect of ochratoxin A on gene expression in rat kidneys; *Developments In Toxicology And Environmental Science* **1986**; 12: 261-271;
 62. Meisner H, Cimbala MA, Hanson RW - Decrease of renal Phosphoenol-pyruvate carboxykinase RNA and poly(A) + RNA level by ochratoxin A; *Archives Of Biochemistry And Biophysics* **1983**; 223: 264-270;
 63. Halliwell B, Gutteridge JMC - Free radicals and antioxidant protection, mechanisms and significance in toxicology and disease; *Hum.Toxicol* **1988**; 7: 7-13;
 64. Meki AR, Hussein AAA - Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney; *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **2001**; 130: 305-313;
 65. Chong X, Rahimtula AD - Alterations in ATP-dependent calcium uptake by rat renal cortex microsomes following ochratoxin A administration in vivo or addition in vitro; *Biochemical Pharmacology* **1992**; 44: 1401-1409;
 66. Wei YH, Lu CY, Lin TN, Wei RD - Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation; *Toxicology* **1985**; 36: 119-130;
 67. Olsen M, Oskarsson A, Breitholtz-Emanuelsson A *et al.* - Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples; *J Assoc Off Anal Chem* **1993**; 76: 842 - 846;
 68. Simon P - Ochratoxin and kidney disease in the human; *J Toxicol Tox Rev* **1996**; 15: 239- 249;
 69. Codex Alimentarius Commission Position paper on ochratoxin A. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome, Italy **1998**; http://www.who.int/fsf/chemicalcontaminants/ochratoxinpp99_14.pdf.
 70. Hsieh MF, Chiu HY, Lin-Tan DT - Does human ochratoxin A aggravate proteinuria in patients with chronic renal disease?; *Ren Fail* **2004**; 26: 311-316;
 71. Navas SA, Sabino M, Rodriguez-Amaya DB - Aflatoxin M1 and ochratoxin A in human milk bank in the city of Sao Paulo, Brazil; *Food Additives and Contaminants* **2005**; 22: 457- 462;
 72. Pfohl-Leszkowicz A, Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN - Balkan endemic nephropathy and the associated urinary tract tumours: review on etiological causes, potential role of mycotoxins; *Food Additive and Contaminants* **2002**; 19: 282-302;
 73. Pfohl-Leszkowicz A, Grosse Y, Kane A, Creppy EE - Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A; *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **1993**; 289: 265-273;
 74. Pfohl-Leszkowicz A, Pinelli E, Bartsch H - Detection of mycotoxins activated with a set of *Salmonella typhimurium* histidine autotrophs; *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber* **1976**; 28: 359-365;
 75. Wurgler FE, Friederich U, Schlatter J - Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, citrinin, patulin and cneistine in *Salmonella typhimurium* TA102; *Mutation Research/Genetic Toxicology* **1991**; 261: 209-216;
 76. Hennig A, Fink-Gremmels J, Leistner L - Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation; *IARC Scientific Publications* **1991**; 115: 255-260;

77. Wei X, Sulik KK - Pathogenesis of craniofacial and body wall malformation induced by ochratoxin A; *American Journal of Medical Genetics* **1993**; 47: 862-871;
78. Hult K, Rutqvist L, Holmberg T, Thafvelin B, Gatenbeck S - Ochratoxin A in blood of slaughter pigs; *Nordisk Veterinaermedicin* **1984**; 36: 314-316;
79. Thuvander A, Breitholtz-Emmanuelson A, Brbencova D - Prenatal exposure of Balbc/C mice to ochratoxin A: Effects on the immune system in the offspring; *Food Chemistry and Toxicology* **1996**; 34: 547-554;
80. Stoev SD, Goundasheva D, Mirtcheva T - Susceptibility to secondary bacterial infections in growing pigs as an early response in ochratoxicosis; *Experimental and Toxicological Pathology* **2000**; 52: 287-296;
81. Belmadani A, Tramu G, Betbeder AM - Regional selectivity to ochratoxin A, distribution and cytotoxicity in rat brain; *Archives of Toxicology* **1998**; 72: 656-662;
82. Bruinink A, Rasonyi T, Sidler C - Reduction of ochratoxin A toxicity by heatinduced epimerization. In vitro effects of ochratoxins on embryonic chick meningeal and other cell cultures; *Toxicology* **1997**; 118: 205-210;
83. Krogh P, Hald B, Pedersen EJ - Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy; *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology And Immunology* **1973**; 81: 689-695;
84. Krogh P, Axelsen NH, Elling F - Experimental porcine nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A- contaminated feed; *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section A, Pathology* **1974**; 0: 1-21;
85. Radonic M, Radosevic Z - Clinical features of Balkan endemic nephropathy; *Food and Chemical Toxicology* **1992**; 30: 189-192.
86. Vukelic M, Sostaric B, Belicza M - Pathomorphology of Balkan endemic nephropathy; *Food and Chemical Toxicology* **1992**; 30: 193-200;
87. Petkova-Bocharova T, Castegnaro M 1991 - Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria; *Mycotoxins Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours IARC Scientific Publications*; edited by Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H, (Lyon: IARC); **1991**; 115: 135-137.
88. Pfohl-Leszkowicz A, Bartsch H, Azemar B - MESNA protects rats against nephrotoxicity but not carcinogenicity induced by ochratoxin A, implicating two separate pathways; *Facta Universitatis* **2002**; 9: 57;
89. Pfohl-Leszkowicz A, Pinelli E, Bartsch H - Sex- and strain-specific expression of cytochrome P450s in ochratoxin A-induced genotoxicity and carcinogenicity in rats; *Molecular Carcinogenesis* **1998**; 23: 76-85;
90. Tanchev Y, Dorossiev D - The first clinical description of Balkan endemic nephropathy (1956) and its validity 35 years later; *IARC Scientific Publications* **1991**; 115: 21-8.
91. Gluhovschi G, Stefanovic V, Dimitrov T *et al.* - *Nefropatia endemică balcanică*, Editura S. C. "Helicon" Banat S.A., Timișoara, **1994**;
92. Gluhovschi G, Mărgineanu F, Trandafirescu V - Balkan endemic nephropathy in România; *Facta Universitatis, Series Medicine and Biology* **2002**; 9(1): 15-25;
93. Pfohl-Leszkowicz A, Castegnaro M - L'ochratoxine A. In : Pfohl-Leszkowicz, A. (Ed) Les mycotoxines dans l'alimentation, Evaluation et gestion du risque, Tec & Doc, Lavoisier, Londres, Paris, New York, **1999**; 249-277.
94. Abarca ML - Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus spp*; *Journal of Food Protection* **2001**; 64: 903-907;
95. Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN, Castegnaro M - Ochratoxin A in human serum in relation to Balkan Endemic Nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria, *Food Additives and Contaminants* **1988**; 299-301;
96. Pfohl-Leszkowicz A - Balkan Endemic Nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins; *Food Additives and Contaminants* **2002**; 19: 282-289;
97. Henry SH, Bosch FX, Troxell TC - Reducing liver cancer-global control of aflatoxin; *Science* **1999**; 286: 2453-245435;
98. Pitt JI - Toxicogenic fungi: Which are important?; *Medical Mycology* **2000**; 38S:17-22;
99. Stormer FC- Ochratoxin A - a mycotoxin of concern. In: Bhatnagar D, Lillehoj EB Arora DK (eds). *Handbook of Applied Mycology*, Vol.5, Marcel Dekker, Inc. New York, **1992**; 403-432;
100. FAO worldwide regulation for mycotoxins in food and feed in 2003; <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>;
101. Shotwell LL, Hesseltine CW, Goulden ML - Ochratoxin A occurrence as natural contaminant of a corn sample; *Applied Microbiology* **1969**; 17: 765-766;
102. Zimmerli B, Dick R - Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment; *Food Additives and Contaminants* **1996**; 13: 655-668;

103. European Commission. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States, (1997) SCOOP. Task 3.2.2. *Reports on tasks for scientific cooperation. Report EUR 17523.*
104. European Commission. Reports on tasks for scientific cooperation. (2002) Reports of experts participating in Task 3.2.7. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States, SCOOP Task 3.2.7, January, 2002.
105. JECFA. Ochratoxin A (JECFA 47, 2001) Available from: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>
106. JECFA (2002) Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. (56th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). *Technical Reports Series* No. 906, 2002.
107. Blanc M, Pittet A, Munoz-Box R – Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture; *Journal of Agriculture Food Chemistry* **1998**; 46: 673-675;
108. Urban GR, Taniwaki MH, Leitão MFF – Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee; *Journal of Food Protection* **2001**; 64: 1226-1230;
109. International Coffee Organization (2005). OTA risk management: guidelines for green coffee buying. <http://www.ico.org/documents/ed1939e.pdf> ;
110. Patel S, Hazel CM, Winterton AGM – Survey of ochratoxin A in UK retail coffees; *Food Additives and Contaminants* **1997**; 14: 217-222.