

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CLINICHE E FARMACO-TOSSICOLOGICHE VETERINARIE
XVIII CICLO – TRIENNIO 2002 – 2005**

**STUDIO IN VITRO ED IN VIVO SULLA TOSSICITA'
DELL'OCRATOSSINA A: VALUTAZIONE DI ALCUNI
POTENZIALI MECCANISMI D'AZIONE**

Coordinatore:

Candidata:

Ch.mo Prof. Angelo Persechino

Dott.ssa Marcella Bilancione

Docente guida:

Dott.ssa Maria Carmela Ferrante

Poche parole sono queste per ricordare quelle persone che ogni giorno, con tanta dolcezza ed affetto, mi hanno sostenuto in questo arduo percorso; arduo per la natura stessa della ricerca ma, nonostante tale natura, lineare, sereno, proficuo grazie proprio a coloro che hanno saputo guidare le mie conoscenze in una più pratica applicazione ed il mio intelletto ad una lucida analisi con passo sicuro. Un'esperienza che ha arricchito non solo le mie conoscenze ma, cosa più importante, ha reso più chiaro nella mia mente, quanta positiva energia sia fluita intorno a me in questi anni, energia mai avara nei miei confronti di cui ho potuto nutrirmi senza sentire la stanchezza. L'energia che ancora sento nel pensare alla cara Prof.ssa Antonia Lucisano che mi ha regalato la sua grande esperienza, all'insostituibile e preziosa guida Dott.ssa Mariella Ferrante che mi ha sostenuto costantemente con tanta pazienza durante il percorso formativo e alla Prof.ssa Rosaria Meli per la generosa ospitalità e per la disponibilità mostratami nel chiarire ogni mia perplessità durante l'attività di laboratorio. Desidero inoltre ringraziare la Dott.ssa Giuseppina Mattace Raso per i suoi consigli e suggerimenti e tutti gli amici del Dipartimento di Farmacologia Sperimentale che hanno mostrato un grande interessamento alla mia ricerca, in particolare le dott.sse Anna Iacono ed Emanuela Esposito.

Grazie infine al Prof. Angelo Persechino, coordinatore di questo dottorato, sempre disponibile nel venire incontro a tutte le mie necessità.

Un discorso a parte meritano i miei cari Genitori, che ringrazio con tutto il cuore per il loro impagabile sostegno in tutti i momenti importanti della mia vita. Il saperli vicini mi ha sempre profondamente confortato soprattutto quando il futuro ha rivelato le sue prime incertezze. Sono stati per me un essenziale esempio di comportamento, sempre sorridenti ed aperti al dialogo. Hanno sempre appoggiato le mie scelte permettendomi anche di sbagliare, incoraggiandomi costantemente a seguire la voce del cuore e della passione.

Spero di essere motivo di orgoglio per loro.

*Alla mia Mamma e al mio Papà
con amore e gratitudine*

INDICE

PREMESSA	5
INTRODUZIONE	7
PARTE PRIMA	11
1.1 OCRATOSSINE	12
1.1.1 Funghi produttori di ocratossine	14
1.1.2 Fattori che influenzano lo sviluppo dei funghi tossinogeni e la sintesi di ocratossine	20
1.1.3 Substrati contaminati da OTA	28
1.2 CARATTERISTICHE CHIMICHE DELLE OCRATOSSINE	33
1.3 TOSSICOCINETICA	37
1.3.1 Assorbimento	37
1.3.2 Distribuzione	38
1.3.3 Metabolismo	40
1.3.4 Escrezione	42
1.4 MECCANISMO D'AZIONE	45
1.5 TOSSICITA' INDOTTA DALLE OCRATOSSINE	48
1.5.1 Tossicità negli animali domestici	50
1.5.2 Tossicità negli animali da esperimento	58
1.5.3 Tossicità nell'uomo	62
1.5.4 Tossicità in vitro	66
1.5.5 Mutagenicità, genotossicità, cancerogenicità e teratogenicità	71
PARTE SECONDA	77
2. PIANO DI LAVORO	78
2.1 DESCRIZIONE DELLE METODOLOGIE APPLICATE	89

2.1.1 Studio in vivo della tossicità dell'ocratossina A	89
2.1.1.a Trattamento acuto degli animali e determinazione di parametri ematochimici ed urinari	89
2.1.1.b Saggio della malondialdeide (MDA)	90
2.1.1.c Saggio della mieloperossidasi (MPO)	92
2.1.1.d Valutazione dell'induzione enzimatica della COX-2 e della <i>hsp72</i> nei macrofagi peritoneali mediante analisi western blot	93
2.1.1.e Valutazione dell'induzione enzimatica della COX-2 e della <i>hsp72</i> nei tessuti mediante analisi western blot	95
2.1.2 Studio in vitro della tossicità dell'ocratossina A	96
2.1.2.a Colture cellulari	96
2.1.2.b Valutazione della vitalità cellulare con il test dell'MTT	96
2.1.2.c Trattamento dei macrofagi murini J774 A.1 con ocratossina A ed allestimento dei lisati cellulari	97
2.1.2.d Valutazione dell'induzione dell'espressione dell'iNOS e della COX-2 mediante analisi western blot	98
2.1.2.e Valutazione dell'induzione dell'espressione dell' <i>hsp72</i> e di IkBa mediante analisi western blot	99
2.1.2.f Determinazione del rilascio di monossido d'azoto mediante dosaggio dei nitriti	100
2.1.2.g Analisi statistica	101
PARTE TERZA	102
3. RISULTATI	103
4. DISCUSSIONE	126
5. CONCLUSIONI	138
6. BIBLIOGRAFIA	140

PREMESSA

La presente tesi, frutto del lavoro svolto nei tre anni di dottorato, ha lo scopo di dare un contributo alla conoscenza dei meccanismi d'azione a livello molecolare alla base degli effetti tossici indotti, sia in vivo che in vitro, dalla micotossina ocratossina A (OTA).

Nella prima parte del lavoro viene presa in esame la letteratura relativa alla classificazione dei funghi produttori di ocratossine, ai fattori che influenzano lo sviluppo di tali funghi tossinogeni e ai substrati da essi contaminati; inoltre vengono approfonditi gli aspetti chimici e tossicocinetici, i meccanismi d'azione, fin'ora conosciuti, e la tossicità in vitro ed in vivo dell'OTA.

Nella seconda parte, sperimentale, sono descritte le metodiche prescelte per l'esecuzione degli esperimenti condotti in vivo ed in vitro. Sono state eseguite, inizialmente, alcune analisi ematochimiche allo scopo di valutare eventuali alterazioni di parametri funzionali indotte dalle dosi della micotossina prescelta nella fase sperimentale in vivo. Successivamente sono stati condotti saggi mirati alla valutazione del grado di perossidazione lipidica (saggio della malondialdeide) e del grado di infiltrazione tissutale dei polimorfonucleati neutrofilici in corso di flogosi (saggio della mieloperossidasi). Infine sono state eseguite analisi western blot sia per valutare la capacità da parte dell'OTA di modulare l'espressione di alcuni enzimi coinvolti nel processo infiammatorio quali l'iNOS e la COX-2 e per evidenziare un eventuale correlazione con l'induzione del fattore di trascrizione nucleare kB (NF-kB); sia per valutare la capacità da parte della micotossina di

attivare meccanismi di protezione cellulare quali quelli regolati dalle heat shock protein 70 (*hsp70*).

Nella terza parte, dopo aver riportato i risultati ottenuti, elaborati statisticamente, viene dato ampio spazio alla discussione cui seguono le conclusioni.

Infine è stata elencata una ben nutrita bibliografia accuratamente riportata nel testo.

INTRODUZIONE

Il termine micotossine comprende numerosi metaboliti secondari con attività tossica prodotti in opportune condizioni microclimatiche da funghi microscopici e filamentosi, meglio noti come “muffe”; solo un ridotto sottoinsieme di questi microrganismi produttori può attivare le vie metaboliche secondarie che conducono alla sintesi di micotossine.

Le derrate alimentari, le granaglie ed i mangimi rappresentano i substrati ideali per l'accrescimento dei funghi produttori delle micotossine (Smith et al., 1991). Esse possono giungere alla nostra tavola sia direttamente attraverso prodotti derivati da derrate vegetali contaminate (cereali, prodotti del forno, legumi, caffè, frutta tropicale, frutta secca, frutta a guscio, spezie, piante infusionali, ecc.) che indirettamente attraverso prodotti di origine animale derivati da bestiame alimentato con mangimi contaminati, qualora non sussistano casi acuti di micotossicosi tali da indurre l'allevatore a sopprimere l'animale.

Le micotossine, oltre ad essere molto diverse tra loro dal punto di vista chimico, mostrano una notevole gamma di effetti biologici dovuti alla loro capacità di interagire con diversi organi e/o sistemi bersaglio degli organismi viventi (Hsieh et al., 1987). In particolare le micotossine e/o i loro metaboliti sono capaci di indurre tali effetti biologici perché in grado di interagire con il DNA, l'RNA, le proteine funzionali, i cofattori enzimatici ed i costituenti di membrana.

Le manifestazioni cliniche causate dall'ingestione sia di modeste che di consistenti concentrazioni di micotossine sono ormai ben note per molte di esse e possono essere caratterizzate da

effetti entero-, neuro-, nefro-, epato-, osteotossici, rallentamento dell'accrescimento ponderale, ridotta attività riproduttiva e morte.

Gli effetti tossici osservati, raramente possono dare origine a fenomeni patologici di tipo acuto ed il rischio maggiore risiede nel loro accumulo che può originare sintomatologie a decorso cronico (Berry et al., 1988).

L'esposizione prolungata a basse concentrazioni di micotossine induce, inoltre, abbassamento delle difese immunitarie e minore resistenza alle malattie infettive che si traduce in una minore resa produttiva nelle specie d'interesse zoeconomico.

Poiché, di norma, gli effetti immunotossici si manifestano a concentrazioni inferiori rispetto a quelle che inducono la sintomatologia clinica tipica della micotossicosi, questi vengono spesso sottovalutati.

Evidenze sempre crescenti dimostrano come le micotossine, causando ingenti perdite nel settore zootecnico per un'aumentata mortalità animale e per una riduzione delle produzioni, abbiano un rilevante impatto sull'economia. Spesso, peraltro, i prodotti d'origine animale contaminati non possono essere commercializzati a livello né nazionale né internazionale perché contenenti livelli residuali della micotossina e/o dei suoi metaboliti non conformi ai requisiti imposti dalla normativa comunitaria.

L'azione immunodepressante delle micotossine sugli animali da reddito ha gravi conseguenze anche per la salute del consumatore di derrate di origine animale; infatti, l'aumentata incidenza di patologie infettive negli animali comporta un'aumentata trasmissione animale-uomo di agenti patogeni oltre che ad una maggiore presenza di residui di antibiotici nelle carni e nel latte come conseguenza del trattamento terapeutico adottato.

L'ingestione o l'inalazione di micotossine da parte dell'uomo può, inoltre, determinare l'insorgenza di numerose patologie legate a disfunzioni del sistema immunitario e/o incrementare la suscettibilità diretta agli agenti infettivi ed alle neoplasie.

Il problema delle micotossine è molto antico, anche se in prima analisi può sembrare legato allo sviluppo di sistemi di agricoltura intensiva. Basti pensare che si parla di ergotismo già nel Vecchio Testamento, infatti, gli storici ipotizzano che micotossine del *Fusarium* (T-2 e zearalenone) siano state la causa del declino degli Etruschi. Più recentemente, la misteriosa morte di archeologi dopo l'apertura di tombe egiziane è stata attribuita all'inalazione di ocratossina A (Di Paolo et al., 1993).

Le micotossine sono state scientificamente oggetto di studio, specie in campo medico-veterinario, solo a partire dal 1850 quando si dimostrò l'associazione tra l'ingestione di segale contaminata con sclerozi di *Claviceps purpurea* e la comparsa di casi di ergotismo.

Uno degli esempi meglio documentati di micotossicosi umana risale agli anni '40, quando tra il 1942 e il 1947, nel distretto di Oremberg in Russia, fu descritta una tossicosi alimentare correlata all'ingestione di cereali colonizzati da *Fusarium sporotrichioides* e da *Fusarium poae*, produttori di tricoteceni. Tale epidemia fu siglata ATA o aleucosi tossica alimentare (Sarkisov et al., 1954).

Nelle stesse regioni si osservò anche una tossicosi nota come stachibotriotossicosi causata dall'ingestione di pane contaminato da *Fusarium graminearum*.

L'inizio della moderna micotossicologia risale al 1960, anno in cui vennero identificate le aflatossine, prodotte da *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, ritenute responsabili dell'insorgenza della cosiddetta "malattia X" che aveva prodotto la

morte di oltre 100.000 tacchini in Inghilterra e di migliaia di anatrocchi in Uganda in seguito all'assunzione di farina di arachidi contaminata.

Più di recente è stato scoperto un nuovo gruppo di micotossine, le fumonisine, prodotte da *Fusarium moniliforme*, ritenute responsabili di patologie osservate in cavalli e maiali dopo l'ingestione di mais contaminato e considerate pericolose per la salute umana (Sydenham et al., 1991; Dutton et al., 1996).

A tutt'oggi si conoscono oltre 300 micotossine; fortunatamente però, solo il 7% di quelle identificate si ritrova negli alimenti a livelli significativamente elevati e tali da costituire un pericolo per la salute umana. Tuttavia, non sono ancora del tutto noti gli effetti di questi contaminanti sugli organismi e rimangono ignoti molti dei meccanismi d'azione a livello molecolare alla base dei molteplici sintomi riscontrati sia a livello sperimentale sia in osservazioni sul campo.

Tra le micotossine meglio conosciute e studiate, che creano maggiori preoccupazioni per la salute dell'uomo e degli animali di interesse zootecnico, si riportano la famiglia delle aflatossine (prodotte soprattutto da funghi del genere *Aspergillus*), della patulina (prodotta dal genere *Penicillium*) degli zearalenoni, fumonisine, e tricoteceni (prodotti dal genere *Fusarium*) e delle ocratossine (prodotte da funghi del genere *Aspergillus* e *Penicillium*).

PARTE PRIMA

1.1 OCRATOSSINE

Le ocratossine sono micotossine prodotte, in particolari condizioni ambientali, da funghi microscopici (micromiceti) eterotrofici (attributo proprio degli organismi viventi incapaci di sintetizzare tutti i propri costituenti organici).

Le specie fungine, in generale, possono essere o saprofiti (microrganismi che vivono a spese di organismi morti o di sostanze organiche in decomposizione e sono la maggior parte) o fitotossiche ed isolate su vegetali o su derrate alimentari che risultano visibilmente danneggiate.

Esistono alcune teorie sull'origine delle micotossine: secondo alcuni sarebbero i prodotti del metabolismo vegetale bioattivato tramite specifici enzimi fungini; altri le considerano come fitotossine sintetizzate dalla pianta in risposta all'aggressione fungina (fitopatogena); altri ancora come prodotti del metabolismo fungino secondario (ipotesi più accreditata). E' noto, infatti, che il metabolismo primario è comune a tutte le specie fungine ed è molto simile all'insieme delle vie metaboliche presenti nei vertebrati (consentendo la sintesi glucidica, lipidica e proteica); il metabolismo secondario, invece, può essere specifico per una data specie o ceppo fungino ed è implicato nella sintesi di composti specifici per ciascuna muffa.

Le ocratossine sono prodotte raramente dal tallo nella sua fase di crescita, lo sono più frequentemente nella fase di biosintesi, quando l'ambiente tende ad essere sprovvisto in nutrienti che forniscono azoto e fosforo (probabile reazione di difesa o di malessere).

La formazione delle ocratossine è strettamente connessa allo sviluppo e alla crescita fungina, anche se la presenza dei funghi

tossinogeni in un alimento non indica automaticamente la presenza delle relative tossine in quanto, come vedremo, le condizioni ambientali e di substrati ottimali per la produzione delle micotossine sono differenti da quelle che comportano lo sviluppo dei miceti. Contestualmente, tali metaboliti possono persistere per lungo tempo dopo la crescita vegetativa e la morte o l'eliminazione del fungo, quindi l'assenza di ceppi fungini negli alimenti non indica necessariamente l'assenza anche di micotossine.

1.1.1 Funghi produttori di ocratossine.

Le ocratossine sono micotossine prodotte da numerose specie del genere *Aspergillus* e *Penicillium* ampiamente presenti nel mondo raggiungendo in alcuni Paesi alti livelli di diffusione (Nord Europa, Nord e Sud America) (Devegowda et al., 1998).

In particolare, l'ocratossina A (OTA), che tra le ocratossine è il metabolita principale e anche quello dotato di maggiore tossicità, è stata isolata per la prima volta nel 1965 in Sud Africa da un ceppo di *Aspergillus ochraceus* (Figura 1) (Van der Merwe et al., 1965).

Negli anni successivi alla sua scoperta, la sintesi di questa micotossina è stata associata a sette specie di *Aspergillus* della classe *Circumdati* (*Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus petraki*, *Aspergillus sclerotiorum*, *Aspergillus sulphureus*) (Hesseltine et al., 1972). Più di recente è stato dimostrato come anche *Aspergillus albertensis* e *Aspergillus auricomus* siano specie capaci di produrla (Varga et al., 1996).

Nell'ambito del genere *Aspergillus* altre specie, a parte la classe *Circumdati*, sono state identificate come produttrici di OTA, tra queste la classe *Nigri* ha ricevuto particolare attenzione negli ultimi anni.

La classe *Nigri* comprende la specie *A. carbonarius* (Heenan et al., 1998; Horie et al., 1995) e la sottoclasse *A. niger* costituita a sua volta dalle specie *A. foetidus* ed *A. niger* (Abarca et al., 1994; Heenan et al., 1998; Terén et al., 1996; Abarca et al., 2001; Abarca et al., 2004) (Tabella 1).

Recentemente è stato messo in evidenza come la contaminazione da parte di OTA di uva, uva secca, vino e derivati del vino sia dovuta principalmente ad *A. nigri* e ad *A. carbonarius* (Abarca et al., 2003; Esteban et al., 2004). L'*A. niger* è stato anche

studiato per il possibile impiego quale agente di biocontrollo (Lee e Magan, 1999).

Dato che la Food and Drug Administration (FDA) non ha attribuito alle specie della sottoclasse Nigri proprietà nocive per l'uomo (GRAS, Generally Recognised As Safe) (Bigelis e Lasure, 1987), esse vengono abitualmente utilizzate nell'industria alimentare, in quanto buone produttrici di acidi organici ed enzimi idrolitici, e nella elaborazione di alimenti tradizionali (soprattutto in Oriente). Tuttavia, alcuni autori pensano che l'uso di tali specie fungine possa costituire un potenziale rischio per la salute umana (Beuchat et al., 1987; Pitt et al. 1997).

L'*A. carbonarius* invece non presenta una distribuzione grande quanto quella delle specie della sottoclasse *A. niger*, ma risulta ugualmente pericoloso in quanto la maggior parte dei suoi ceppi sono potenziali produttori di ocratossina A (Cabanès et al., 2002; Terén et al., 1996; Heenan et al., 1998; Horie et al., 1995).

E' stato inoltre dimostrato che l'OTA viene sintetizzata anche da *Aspergillus fumigatus*, appartenente alla classe *Fumigati*, da *Aspergillus versicolor* e da *Aspergillus sydowii*, appartenenti alla classe *Versicolor* (Abarca et al., 1997); da *Eurotium amstelodami* e da *Eurotium herbariorum*, appartenenti alla classe *Aspergillus* (Abarca et al., 1997; Chelkowski et al., 1987) e da *A. wentii*, *A. ustus* e *A. terreus* appartenenti rispettivamente alle classi *Wentii*, *Usti* e *Terrei* (Ueno et al., 1991; Varga et al., 1996) (Tabella 1).

Nel 1969 si osservò per la prima volta che l'OTA veniva sintetizzata anche da miceti del genere *Penicillium*, in particolare dal *Penicillium viridicatum* (Van Walbeek et al., 1969). In seguito Ciegler e collaboratori (1973) e Pitt e collaboratori (1987) dimostrarono che la produzione di OTA da parte del genere *Penicillium* si restringeva solo a *P. verrucosum* (Figura 2).

Tuttavia, numerosi autori hanno continuato a considerare *P. viridicatum* una specie produttrice di OTA (D'Mello e Macdonald 1997; Hohler, 1998; Scott, 1996; Vazquez-Belda et al., 1995).

Numerosi studi hanno messo in evidenza come anche altre specie del genere *Penicillium* appartenenti alla classe *Penicillium* siano capaci di sintetizzare la tossina. In particolare a tale classe appartengono le specie: *P. brevicompactum* (Kozakiewicz et al., 1993), *P. chrysogenum* (Vazquez-Belda et al., 1995; Mills et al., 1982; Mills et al., 1989) *P. expansum* (Kozakiewicz et al., 1993; Mills et al., 1989), *P. aurantiogriseum* (Mantle et al., 1993; Mills et al., 1989) e *P. cyclopium* (Vazquez-Belda et al., 1995; Mills et al., 1982).

E' stato inoltre dimostrato che l'OTA viene sintetizzata anche da specie morfologicamente molto diverse da *P. verrucosum*; tali specie sono comprese nelle classi *Aspergilloides* (Vazquez-Belda et al., 1995; Ueno et al., 1991; El-Banna et al., 1987), *Biverticillium* (Ueno et al., 1991; Sanchis et al., 1982; Jiménez et al., 1986), *Furcatum* (Ueno et al., 1991) ed *Eupenicillium* (Ueno et al., 1991). Attualmente a causa dei frequenti cambiamenti nella tassonomia dei *Penicillium* e dei conseguenti frequenti errori di identificazione, è stato da molti studiosi accettato che il *Penicillium verrucosum* ed il *Penicillium nordicum* sono le più frequenti se non le uniche specie capaci di produrre OTA (Larsen et al., 2001).

E' opinione comune che la contaminazione da ocratossina A nelle regioni a clima freddo sia dovuta principalmente a *Penicillium verrucosum* (Frisvad e Lund, 1993; Holmberg et al., 1991; Mills et al., 1995; Pitt e Hocking, 1997; Scudamore et al., 1993; Sweeney e Dobson, 1998) infatti, tale specie cresce anche a 0°C (Bullerman, 1985; Northolt e Bullerman, 1982; Northolt et al., 1979) e sintetizza la micotossina a partire da 4°C (Bullerman, 1985; Haggblom, 1982;

Northolt e Bullerman, 1982; Northolt et al., 1979); anche se la temperatura ottimale per la produzione di OTA da parte di *P. verrucosum* è di 25°C (Hagglom, 1982; Northolt et al., 1979).

Invece nelle regioni a clima caldo o temperato, la presenza di OTA sembra sia dovuta principalmente ad *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus nigri* e ad *Aspergillus ochraceus* (Accensi et al., 2001; Heenan et al., 1998; Urbano et al., 2001).

Genere	Classe	Sottoclasse	Specie
Aspergillus	<i>Circumdati</i>	<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
			<i>Aspergillus alliaceus</i>
			<i>Aspergillus melleus</i>
			<i>Aspergillus ostianus</i>
			<i>Aspergillus petrakii</i>
			<i>Aspergillus sclerotiorum</i>
			<i>Aspergillus sulphureus</i>
			<i>Aspergillus albertensis</i>
			<i>Aspergillus auricomus</i>
			<i>Aspergillus carbonarius</i>
			<i>Aspergillus niger</i>
			<i>Aspergillus foetidus</i>
			<i>Eurotium amstelodami</i>
			<i>Eurotium herbariorum</i>
			<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Aspergillus versicolor</i>			
<i>Aspergillus sydowii</i>			
<i>Aspergillus ustus</i>			
<i>Aspergillus terreus</i>			
<i>Aspergillus wentii</i>			
Penicillium	<i>Penicillium</i>		<i>Penicillium verrucosum</i>
			<i>Penicillium nordicum</i>
			<i>Penicillium brevicompactum</i>
			<i>Penicillium chrysogenum</i>
			<i>Penicillium expansum</i>
			<i>Penicillium aurantiogriseum</i>
			<i>Penicillium cyclopium</i>
			<i>Penicillium purpurescens</i>
			<i>Penicillium implicatum</i>
			<i>Penicillium montanense</i>
			<i>Penicillium sclerotiorum</i>
			<i>Penicillium glabrum</i>
			<i>Penicillium variabile</i>
			<i>Penicillium purpurogenum</i>
			<i>Penicillium verruculosum</i>
<i>Penicillium canescens</i>			
<i>Penicillium janczewskii</i>			
<i>Penicillium melinii</i>			
<i>Penicillium miczynskii</i>			
<i>Penicillium raistrickii</i>			
<i>Penicillium corylophilum</i>			

Tabella 1 - Funghi produttori di ocratossine

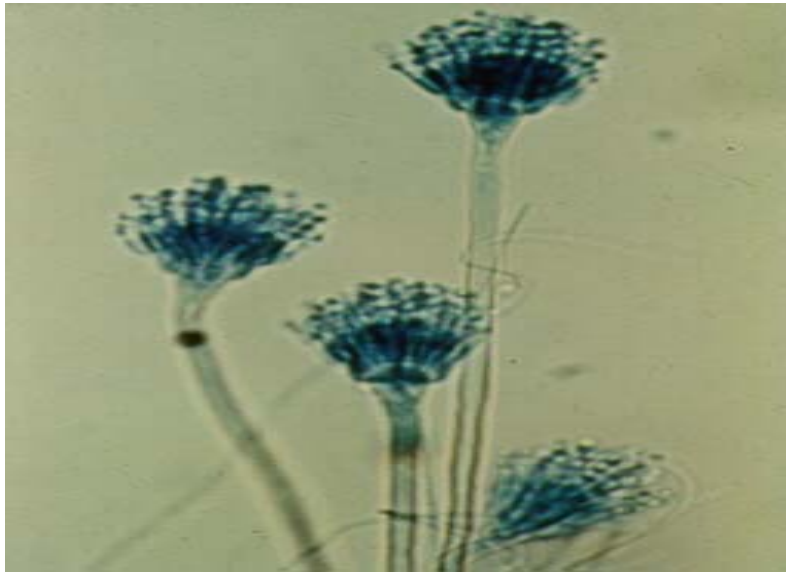


Figura 1 - *Aspergillus ochraceus*



Figura 2 - *Penicillium verrucosum*

1.1.2 Fattori che influenzano lo sviluppo dei funghi tossinogeni e la sintesi di ocratossine.

Numerosi sono i fattori che favoriscono in un primo momento la crescita dei micromiceti su differenti substrati e che consentono, successivamente, la sintesi delle micotossine.

Per prevenire la contaminazione delle derrate alimentari da micotossina occorre impedire la crescita fungina. Per fare ciò, bisogna prendere un insieme di misure che scaturiscono dalle leggi che regolano la vita delle muffe: esse hanno bisogno di acqua, di ossigeno (almeno 1-2%), di tempo e di temperatura adeguata, senza trascurare il fatto che caratteristica comune delle specie fungine nelle derrate poco idratate è la loro grande capacità di sporulazione e disseminazione.

Lo sviluppo di muffe tossigene e la successiva sintesi di micotossine può avvenire in una qualsiasi delle fasi del ciclo produttivo dell'alimento, a partire dalla coltivazione fino ad arrivare al consumo, passando per lo stoccaggio e la conservazione ed i fattori valutati risultano differenti in rapporto alla fase (campo, raccolta, stoccaggio) di vita del vegetale durante la quale avviene la contaminazione.

Le principali condizioni di sviluppo delle specie ocratossigene e delle relative micotossine si possono riassumere nei punti seguenti:

❖ **Umidità ambientale o acqua libera (a_w):** la colonizzazione fungina degli alimenti si verifica più frequentemente di quella batterica a livelli di a_w inferiori a 0.85; questo non perché i funghi non possano crescere a tenori più elevati, ma piuttosto perché i batteri sono fortemente competitivi e diventano la microflora predominante a valori di a_w compresa tra 0.85 e 1.00, in particolare

con livelli superiori a 0.90 - 0.93. Con un'aw compresa tra 0.85 e 0.93, solo alcuni batteri possono moltiplicarsi rapidamente, in particolare germi lattici e cocchi, per cui l'invasione da parte di muffe e lieviti prende il sopravvento. In base alle loro differenze di comportamento in funzione delle disponibilità d'acqua, le specie fungine sono state classificate in:

- **idrofile**: le spore germinano solo a valori di aw superiori a 0.90 e la crescita ottimale si colloca a 1.00;
- **mesofile**: le spore germinano a valori compresi tra 0.80 e 0.90 di aw e la crescita ottimale si osserva tra 0.95 e 1.00;
- **xerofile**: le spore germinano ad un valore di aw inferiore a 0.80 e la crescita ottimale si osserva intorno a 0.95.

La maggior parte delle muffe deputate alla sintesi delle ocratossine sono xerofile.

Aspergillus ochraceus sintetizza l'ocratossina A quando l'attività dell'acqua è superiore a 0.80 e la produzione ottimale si osserva a valori di aw di 0.96-0.98 (Adebajo et al., 1994; Ramos et al., 1998); mentre *Penicillium verrucosum* sintetizza la micotossina quando l'aw è compresa tra 0.80 e 0.90, con un massimo di produzione a valori di aw compresi tra 0.95 e 0.99 (0.92 più specificamente con riferimento al grano e all'orzo) (Patterson e Darnogloul, 1986; Northolt e Bullerman, 1982; Northolt et al., 1979).

Alcune volte tali micotossine sono sintetizzate durante la conservazione o la commercializzazione stessa di prodotti in precedenza ben essiccati, quando per qualche causa i prodotti ritornano ad inumidirsi. Questo, in genere, accade nelle derrate conservate alla rinfusa in magazzino o in silos per condensazione d'acqua sui pavimenti o su altre superfici fredde. Piuttosto frequente è anche l'eventualità di una condensazione di acqua sui

prodotti confezionati in buste di plastica quando il confezionamento avviene ad elevate temperature ed umidità in quanto in un secondo momento, se le buste vengono esposte a basse temperature, l'umidità residua nella plastica si condensa e consente la crescita dei micromiceti (Hesseltine, 1969; Semeniuk, 1954).

Per limitare la contaminazione degli alimenti il tenore in acqua deve essere contenuto durante la conservazione e mantenuto inferiore ad es. al 13-13,5% per i cereali e al 7-8% per i semi oleosi (se questo non supera il 10% le contaminazioni gravi sono scongiurate).

❖ **Temperatura:** le temperature ideali per lo sviluppo delle specie fungine produttrici di ocratossine sono comprese tra 20 e 30°C con l'umidità del substrato del 30% e quella relativa prossima al 100%.

Le tossine vengono prodotte a temperature in genere lievemente più basse di alcuni gradi rispetto a quelle ottimali per lo sviluppo del micelio fungino, ma che possono oscillare in un range di 10°- 50°C (per i generi *Aspergillus* e *Penicillium*) (Osweiler, 1992).

A. ocraceus sintetizza l'OTA a partire da una temperatura di 12°C, con un massimo di produzione a 30°C (Bacon et al., 1973; Haggblom, 1982; Northolt e Bullerman, 1982; Northolt et al., 1979; Ramos et al., 1998); mentre *A. nigri* cresce a temperature comprese tra 6 e 47°C con un optimum di sviluppo a 35-37°C e sintetizza la micotossina in un range di 20-25°C. Infine *A. carbonarius* si sviluppa a temperature comprese tra 10 e 40°C e produce l'OTA tra i 15 e i 35°C (Esteban et al., 2004).

La presenza della micotossina nei cereali e nei prodotti derivanti dai cereali nel Nord America e in Europa può essere interamente attribuita al *Penicillium verrucosum*; il *Penicillium*

viridicatum, invece, rappresenta uno dei maggiori produttori di ocratossine in Scandinavia (Krogh, 1978b; Rutaqvist et al., 1978; Haggblom, 1982) ed in Canada (Scott et al., 1972). Al contrario il 25-50% dei ceppi di *A. ochraceus* sono potenziali produttori di ocratossine isolate sui raccolti delle zone climatiche più calde, come Yugoslavia (Pepeljnjak e Cvetnic, 1984), Australia e delle zone ad intensa produzione di caffè (Stack et al., 1982).

Sono state evidenziate anche alte concentrazioni di OTA e di *P. cyclospium* nel mais in Kenia (Muriuki e Siboe, 1995) ponendo il problema dell'alto rischio per la popolazione in zone geografiche che fino a qualche anno fa si pensava non presentassero le condizioni climatiche idonee allo sviluppo fungino.

La temperatura di crescita varia in rapporto anche al verificarsi delle altre condizioni di crescita come la disponibilità in acqua del substrato.

Il fattore temperatura risulta essere, inoltre, determinante per la sintesi di una specifica tossina se si considera che uno stesso fungo può elaborare tossine diverse a temperature diverse (*Aspergillus ochraceus* a 25°C sintetizza ocratossina A, a 20°C sintetizza invece acido penicillico).

I trattamenti termici classici di sterilizzazione degli alimenti permettono di distruggere le muffe ma sono, per lo più, poco efficaci contro le ocratossine (termostabili come la maggior parte delle micotossine) (Pasteiner, 1997).

❖ **Atmosfera gassosa:** anche la composizione gassosa dell'atmosfera può influenzare la crescita delle specie tossigene e lo sviluppo delle relative micotossine (Northolt e Bullerman, 1982; El-Halouat e Debevere, 1997; Paster et al., 1983). Le muffe che sintetizzano ocratossine, come la maggior parte delle specie fungine tossinogene, sono aerobie ma possono adattarsi, quando sussistono

le altre condizioni ottimali, all'ambiente in atmosfera modificata contenente più CO₂ della norma.

Alcuni autori hanno, però, dimostrato che modificando la composizione in CO₂ dell'atmosfera (20% di CO₂) era possibile ridurre apprezzabilmente l'accrescimento fungino (Hesseltine, 1972); e che, inoltre, un'atmosfera contenente il 30% di CO₂ era capace di inibire completamente la produzione di OTA da parte di *A. ochraceus* (Paster et al., 1983).

Attualmente si sta puntando molto sulla costruzione di impianti di conservazione in atmosfera controllata. Tali impianti prevedono l'impiego di aria variamente modificata ed arricchita di anidride carbonica e/o azoto che congiuntamente ad una ridotta temperatura, consentono di conservare, senza pericolo di contaminazioni, anche prodotti non completamente essiccati.

La mancanza di ossigeno non comporta l'eliminazione dei micromiceti ma ne sospende l'attività e quindi la sintesi di micotossine.

❖ **pH**: anche il pH è un fattore importante che influenza la crescita dei funghi ocratossigeni e la relativa sintesi di OTA. In generale, lo sviluppo del micelio avviene a valori di pH compresi tra 4 e 8. Il pH ottimale per la produzione di OTA da parte di specie del genere *Penicillium* è di 6.5 (Bullerman, 1985).

❖ **Substrato**: il tipo di substrato è l'elemento che probabilmente più di ogni altro influenza la tossinogenesi.

A tal proposito, Madhyastha e collaboratori (1990) hanno dimostrato che l'ocratossina A viene sintetizzata da *P. verrucosum* preferibilmente sui cereali rispetto alle leguminose; invece il contrario avviene per l'*A. ochraceus* il quale colonizza principalmente le leguminose, in particolare le arachidi e la soia.

La presenza di miceti sui cereali potrebbe determinare variazioni della qualità nutrizionale degli alimenti; è stato, infatti, dimostrato che la contaminazione di grano ed orzo da parte di *P. verrucosum* ed *A. ochraceus* implica una grande riduzione della quantità di lipidi e di amido rispetto alle colture non colonizzate dalle specie fungine in questione e che anche la composizione aminoacidica subisce delle modifiche (Madhyastha e collaboratori (1993). Sembra, infatti, che le specie ocratossigene sintetizzino più facilmente ocratossina A sfruttando proprio le riserve aminoacidiche dell'ospite; in particolare prolina ed acido glutammico favoriscono la produzione di OTA nell'orzo (Hagblom e Ghosh, 1985).

La presenza di ocratossine su specie vegetali molteplici potrebbe essere anche messa in relazione ad un diverso contenuto in microelementi, tra cui zinco, boro, ferro, manganese e molibdeno.

Studi sperimentali condotti da Steel e collaboratori (1973) sulla produzione dell'ocratossina A da parte di *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 hanno dimostrato che le condizioni ottimali per quanto riguarda la composizione chimica del substrato affinché si abbia tale produzione sono di 0.055-2.2 mg/l per lo zinco, di 0.004-0.04 mg/l per il rame e di 1.2-24 mg/l per il ferro.

Bisogna puntualizzare invece che durante la conservazione, più che il substrato chimico, è lo stato fisico dell'alimento che interviene nel favorire o meno la crescita di miceti. I semi macinati anche se grossolanamente, verranno più velocemente contaminati poiché la funzione protettiva offerta dal tegumento viene a mancare.

Un prodotto poco comprimibile come granturco e arachidi, lascerà uno spazio interstiziale importante, con maggiore

interposizione di ossigeno per cui le muffe si svilupperanno più facilmente che nei silos dove i semi (ad es. di grano) sono più piccoli.

❖ **Competizione tra diversi organismi:** la sintesi di ocratossine è modulata dalla contemporanea crescita di altre specie fungine o agenti batterici.

❖ **Errori umani:** la meccanizzazione dei raccolti, più che le improprie pratiche colturali, si associa a indebolimento e distruzione degli involucri protettivi dei cereali favorendo la penetrazione e la germinazione delle spore fungine produttrici di ocratossine.

La mietitura ed i “raccolti a rasoterra” di paglia, fieno e insilati favoriscono la contaminazione da miceti poiché le spore fungine sono presenti, in genere, nel terreno e la presenza di terra nel foraggio o negli insilati favorisce la germinazione e la crescita del fungo.

Una pratica comune nella manipolazione e commercializzazione delle granaglie è la miscelatura di partite di diversa provenienza. Tale pratica viene eseguita sia per migliorare la qualità di una partita, aggiungendo un prodotto più pregiato, sia per raggiungere standard commerciali di contenuto di umidità mediante l'aggiunta di prodotto più secco. Tuttavia la miscelazione di partite di dimensioni ed umidità diverse porta alla mescolanza di semi più o meno umidi, alcuni dei quali con umidità ancora sufficiente per lo sviluppo delle muffe. Nella migliore delle ipotesi occorrono 2-4 giorni per ottenere un'uniforme distribuzione dell'umidità in tutti i punti della massa.

❖ **Condizioni di stress della pianta:** possono aumentare la sua suscettibilità all'infezione da micromiceti. In alcuni casi, la contaminazione fungina può essere secondaria a stati di sofferenza

della pianta come la mancanza d'acqua ed il danno causato dagli insetti, anche se l'ipotesi di uno sviluppo su vegetali in buone condizioni di crescita non può essere del tutto escluso.

Tra le cause predisponenti vi sono: semine squilibrate, fitte o in periodi non adatti, assenza di rotazioni colturali, irrazionale impiego dell'irrigazione (o condizioni di prolungata siccità), inadeguato utilizzo di fitofarmaci.

Gli insetti come dicevamo, possono influire sulla crescita delle specie tossinogene e sulla sintesi di OTA sia come agenti vettori, favorendo il trasporto e la disseminazione delle spore fungine, sia come agenti di danneggiamento dei prodotti, favorendo così una più massiccia colonizzazione fungina. A questo riguardo il ruolo degli insetti può assumere aspetti preoccupanti sia in campo, sia in magazzino.

1.1.3 Substrati contaminati da OTA

Grazie alla grande diffusione dei funghi produttori (*Aspergillus ochraceus* nelle regioni a clima caldo e *Penicillium verrucosum* nei paesi a clima freddo), l'ocratossina A presenta una distribuzione mondiale.

Molteplici sono gli alimenti che possono essere contaminati in primo luogo dalle diverse specie fungine produttrici di ocratossine e secondariamente dagli stessi metaboliti.

I principali substrati contaminati da OTA sono: riso, segale, mais (Figura 3), grano, sorgo, orzo, frumento, i cereali in genere (o per contaminazione diretta dei cereali o per ammuffimento delle farine) ed i prodotti da forno specialmente pane e biscotti. Inoltre, le noci, i pistacchi, le arachidi ed i sottoprodotti delle loro rispettive lavorazioni (panelli e farine d'estrazione), come anche fagioli e legumi sono di frequente contaminati dall'ocratossina A (Campbell et al., 2000; Fukal, 1990; Hennigen e Dick, 1995; Hohler, 1998; Holmberg et al., 1991; Jorgensen et al., 1996; Kuiper-Goodman e Scott, 1989; Pittet, 1998; Pohland et al., 1992, Scott et al., 1972; Scudamore, 1996, Slayne, 2001; Wolff, 2000; Yoshizawa, 1991).

In questi ultimi anni è stato messo in evidenza come l'OTA contaminini anche altri tipi di alimenti in particolare vino, birra e caffè.

Recenti studi hanno mostrato come la concentrazione di ocratossina A sia più elevata nei vini rossi, seguito da quelli rosati ed infine da quelli bianchi (Burdaspal e Legarda, 1999; Mayerus et al., 2000; Soleas et al., 2001; Ueno, 1998; Visconti et al., 1999; Zimmerli e Dick, 1996). Ciò è dovuto al diverso processo di lavorazione dell'uva; infatti, la produzione di vino rosso prevede la

fermentazione del succo insieme alle bucce probabilmente contaminate nella parte esterna dalla micotossina.

I vini dolci risultano anche più contaminati dei vini rossi (Burdaspal e Legarda, 1999; Zimmerli e Dick, 1996), in quanto, per ottenere un' uva più dolce, si effettua la vendemmia più tardi e ciò favorisce lo sviluppo delle muffe ocratossigene e delle relative micotossine. I vini che provengono dalle regioni del Mediterraneo risultano più contaminati di quelli provenienti dai Paesi del nord Europa (Hohler, 1998; Mayerus et al., 2000; Markaki et al., 2001, Zimmerli e Dick, 1996).

La presenza di OTA nel caffè è stata evidenziata per la prima volta nel 1974 (Bucheli e Taniwaki, 2002). La sua produzione nel caffè sembra sia dovuta ad *Aspergillus* spp, principalmente *A. niger*, *A. carbonarius* ed *A. ochraceus* (Bucheli et al., 2000; Bucheli e Taniwaki, 2002; Joosten et al., 2001, Téren et al., 1997). Dati recenti indicano che l'80% dell'OTA è distrutto durante la torrefazione industriale e che il caffè contaminato, venduto al dettaglio, offre solo un contributo marginale all'assunzione quotidiana di OTA (Van Der Stegen et al., 1997).

La contaminazione della birra da parte della micotossina invece sembra sia dovuta allo sviluppo di *P. verrucosum* durante la conservazione dell'orzo e durante la produzione del malto (Baxter et al., 2001).

E' stata osservata una percentuale di contaminazione del 42% nell'uva passa e nell'uva sultanina proveniente dalla Turchia e dalla Grecia (con alti livelli di contaminazione in un range di 4-53.6 µg/kg). Ugualmente alte concentrazioni sono state riscontrate in Inghilterra sugli stessi substrati con incidenza dell'88% dei campioni esaminati (MacDonald et al., 1999).

E' stata riscontrata una notevole presenza di OTA anche sulla frutta sottoposta a procedimenti di essiccazione quale prugne, albicocche e fichi (Zohri e Abdel-Gawad, 1993).

Le oleaginose ed i semi di girasole, di arachidi e di soia spesso sono invasi da funghi però, l'estrazione e i processi industriali cui sono sottoposti comportano la quasi totale eliminazione delle micotossine.

Il cacao, le spezie in genere, le foglie di te e le erbe medicinali (Halt, 1998), le mandorle ed i pistacchi possono evidenziare concentrazioni discrete di ocratossine, tuttavia, le radiazioni possono efficacemente determinare una drastica riduzione della loro concentrazione su questi prodotti di piccolo volume.

L'ocratossina A è stata anche riscontrata in alimenti d'origine animale, in particolare in prodotti a base di carne di maiale e di specie avicole (Canela et al., 1994; Curtui et al., 2001; Gareis e Wolff, 2000; Gareis e Scheuer, 2000; Holmberg et al., 1991; Jimenez et al., 2001; Jorgensen, 1998; Kuiper-Goodman e Scott, 1989). Questo si verifica se gli animali vengono alimentati con mangimi contaminati da ocratossina A (Abramson et al., 1983; Fukal, 1990; Gareis e Wolff, 2000; Pohland et al., 1992; Kuiper-Goodman e Scott, 1989; Speijers e Van Egmond, 1993). Per alcuni studiosi la presenza delle micotossine, negli alimenti di origine animale, è, tuttavia, più verosimilmente da addebitare ad altri ingredienti del prodotto sottoposto a lavorazione come, ad esempio, i pistacchi utilizzati per aromatizzare la mortadella.

Alcuni ricercatori hanno contaminato con ocratossina A la porzione esterna di un prosciutto crudo ed hanno evidenziato come la tossina contamini solo superficialmente il prodotto entrando di pochi mm nella cotenna (Escher, 1973).

Pepeljnjack e Blozevic (1982) hanno anche riscontrato la presenza di OTA in diversi prodotti carnei sottoposti ad affumicamento.

Un'altra pericolosa fonte di contaminazione può essere quella derivante dalla presenza dei miceti utilizzati nell'industria di lavorazione dei prodotti carnei (ad es. salumi) quali vari ceppi di *Penicillium* ed *Aspergillus* per conferire al prodotto qualità organolettiche apprezzabili ma che, se sono presenti le idonee condizioni, sono anche produttori di ocratossina, citrinina, citroviridina e sterigmatocistina.

La presenza della micotossina è stata riscontrata anche nel latte di bovine alimentate con mangime contaminato (Tabella 2) (Hohler, 1998; Skaug, 1999; Valenta e Goll, 1996), tuttavia sono ancora discordanti i pareri relativi alla sua presenza in questa matrice biologica i cui livelli risultano a concentrazioni tali da non destare pericolo.

Dose	Esposizione (giorni)	Metabolita escreto	Concentrazione nel latte
50 mg	4	ocratossina α	150 ppb
1 g	4	ocratossina A	100 ppb

Tabella 2 - *Residui di ocratossine nel latte di bovine alimentate con diete contaminate da OTA*



Figura 3 - *Mais contaminado da Aspergillus ochraceus*

1.2 CARATTERISTICHE CHIMICHE DELLE OCRATOSSINE

Le ocratossine costituiscono un gruppo di derivati dell'isocumarina strettamente correlati tra loro, legati al gruppo amminico della L- β -fenilalanina e classificati in base alla loro origine biosintetica come pentacetidi nell'ambito del gruppo dei polichetidi (Turner, 1971).

Vengono classificate in ocratossine: A, B, C, α , β , 4R/S-idrossiocratossina A, 10-idrossiocratossina A, ocratossina A aperta (OP-OTA) (Van der Merwe et al., 1965a,b; Steyn e Holzapfel, 1967; Steyn, 1971; Steyn, 1984; Hutchinson et al., 1971; Xiao et al., 1995; Xiao et al., 1996a) (Tabella 3).

L'ocratossina A, il 7-carbossi-5-cloro-8-idrossi-3,4-diidro-3R-metil isocumarinamide della L- β -fenilalanina, è il primo composto scoperto (isolato da colture di *Aspergillus ochraceus*, da cui poi è derivato il nome) (Van der Merwe et al., 1965; Neshiem, 1969), il più importante, il più comune e quello dotato di maggiore tossicità (Figura 4).

Le ocratossine B e C sono i derivati rispettivamente dechlorurato ed etilestere dell'ocratossina A. L'OTB manca del gruppo cloridrico in posizione C-5 ed è dieci volte meno tossico dell'OTA; l'OTC invece possiede una struttura ed una tossicità simile a quella dell'OTA.

Gli esteri dell'ocratossina A (oltre alla già citata OTC) possiedono una tossicità simile a quella dell'OTA mentre la tossicità degli esteri dell'OTB è pressoché nulla (Ueno, 1987); l'OT α ed i derivati idrossilati dell'ocratossina A (4R/S-OH-OTA) invece, non risultano essere tossici; al contrario, la forma aperta dell'OTA sembra possedere una tossicità simile a quella dell'ocratossina A (Xiao et al., 1996a).

Altri composti quali la Melleina e la 4-idrossimelleina, che sono strutturalmente correlati alla quota diidrosocumarinica dell'OTA, sono stati isolati dall' *A. ochraceus* e da altri ceppi e sono ritenuti possibili precursori dell' ocratossina A.

L'ocratossina A, e molto più raramente l'ocratossina B, sono i soli composti ritrovati come contaminanti naturali in organismi vegetali. In generale sono anche i più stabili sopravvivendo alla maggior parte dei processi industriali alimentari (Scott, 1996).

Possono essere conservati in etanolo a temperature di refrigerazione per oltre un anno senza decremento di attività (Chu e Butz, 1970); tuttavia quando presenti in soluzione devono essere protetti dalla luce, in quanto soggetti a decomposizione (Neely e West, 1972).

L'ocratossina A è un composto cristallino poco colorato, che esibisce una fluorescenza blu sotto i raggi UV. Essa ha un punto di fusione di circa 90°C, e contiene approssimativamente una mole di benzene; dopo disseccamento per un'ora a 60°C il punto di fusione oscilla in un range di 168° – 173°C. E' poco solubile in acqua, altamente solubile in solventi polari, e in bicarbonato di sodio acquoso. In seguito ad idrolisi acida, essa produce fenilalanina ed un acido lattone otticamente attivo, l'ocratossina α (che rappresenta il metabolita inattivo dell'OTA) (Figura 5).

Nome comune	Abbreviazione	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Ocratossina A	OTA	Fenilalanina	Cl	H	H	H
Ocratossina B	OTB	Fenilalanina	H	H	H	H
Ocratossina C	OTC	Etil estere fenilalanina	Cl	H	H	H
Ocratossina A metil estere	OTA metil estere	Metil estere fenilalanina	Cl	H	H	H
Ocratossina B etil estere	OTA etil estere	Etil estere fenilalanina	H	H	H	H
Ocratossina B metil estere	OTA metil estere	Metil estere fenilalanina	H	H	H	H
Ocratossina α	OTα	OH	Cl	H	H	H
Ocratossina β	OTβ	OH	H	H	H	H
4R-idrossiocratossina A	4R-OH-OTA	Fenilalanina	Cl	H	OH	H
4S-idrossiocratossina A	4S-OH-OTA	Fenilalanina	Cl	OH	H	H
10-idrossiocratossina A	10-OH-OTA	Fenilalanina	Cl	H	H	OH
Ocratossina A aperta	OP-OTA	Fenilalanina	Cl	-	-	-

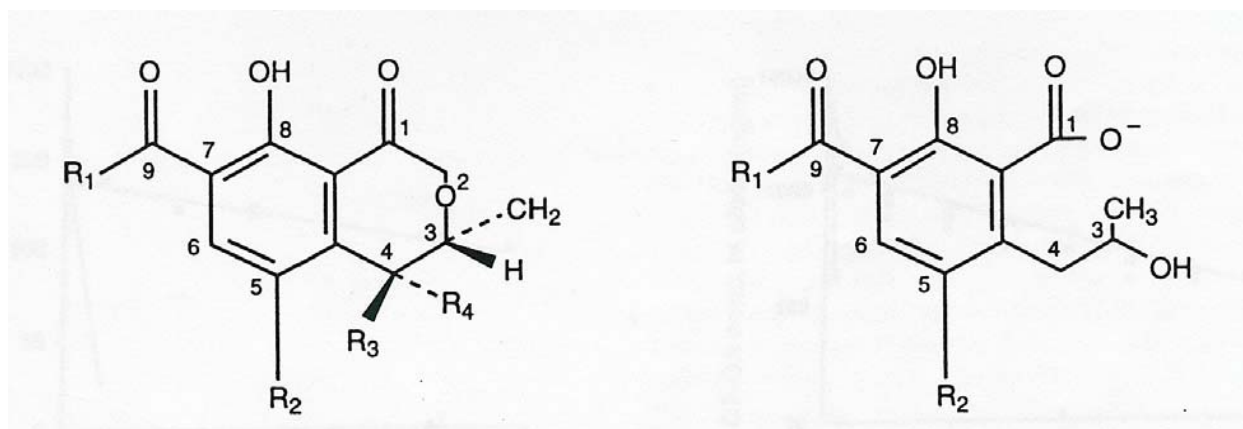


Tabella 3 - *Struttura chimica delle ocratossine*

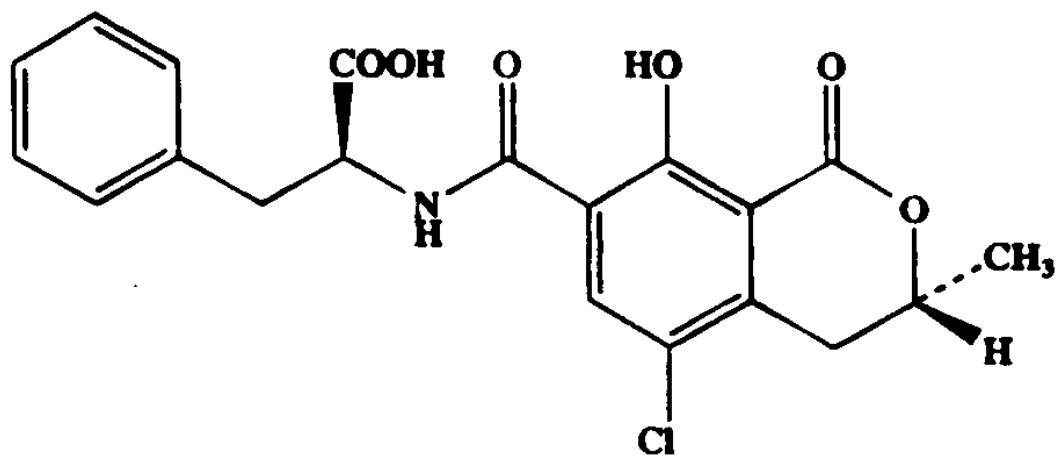


Figura 4 - *Struttura chimica dell'ocratossina A*

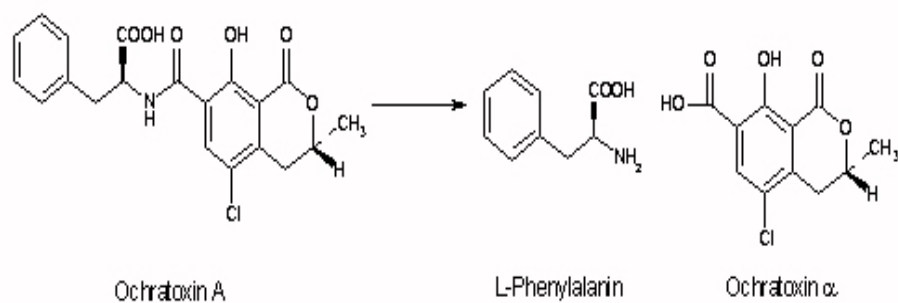


Figura 5 - *Biotrasformazione di OTA in ocratossina α*

1.3 TOSSICOCINETICA

Considerando la notevole diffusione in natura delle micotossine nelle derrate alimentari, assume particolare importanza capire la tossicologia e il destino biologico di questi composti.

Il destino di una tossina in un organismo animale è il frutto dei processi di assorbimento, distribuzione, biotrasformazione e dei processi di escrezione che, nel caso di animali d'interesse zootecnico, comprendono le modalità di passaggio dei metaboliti nella carne, uova e latte.

1.3.1 Assorbimento

L'assorbimento delle tossine avviene principalmente per via gastrointestinale attraverso il consumo di alimenti di origine vegetale contaminati dalle micotossine o per l'uomo attraverso anche l'ingestione di latte e derivati, carni, insaccati, ecc. derivanti da animali alimentati con mangimi contaminati. Tuttavia, non si può escludere la via respiratoria con inalazione di spore fungine tossinogene presenti in elevata quantità sia in particolari ambienti di lavoro (polveri che si sollevano durante le diverse operazioni e pratiche agricole) (Halstensen et al., 2004) sia in ambienti domestici umidi e poco areati (Jarvis e Miller, 2005).

Mentre le molecole lipofile e di basso peso molecolare come le aflatossine e lo zearalenone diffondono passivamente e completamente attraverso la mucosa gastrointestinale (raggiungendo una biodisponibilità del 65%), la forma non ionizzata dell'ocratossina A, degli acidi penicillici e della citrinina, attraversano le membrane lipidiche per diffusione semplice.

Considerando il rapido declino dei livelli gastrici di OTA, dopo somministrazione orale nei ratti, si è desunto che l'assorbimento abbia luogo inizialmente nello stomaco a causa delle sue proprietà acide ed in seguito a livello intestinale (digiuno) quando si instaura un gradiente di concentrazione favorevole tra il sangue ed il lume intestinale (Galtier, 1991; Galtier, 1974; Kumagai e Ai bara, 1982; Kumagai, 1988; Suzuki et al., 1977).

L'assorbimento è alto (40-60%) nel maiale, nel topo, nel ratto e nel pollo; è basso invece nei ruminanti poiché la flora ruminale (costituita principalmente da protozoi) trasforma la micotossina rapidamente in ocratossina α (Kuiper-Goodman e Scott, 1989). Ciò nonostante in alcune occasioni è stata evidenziata la presenza di OTA nel latte di bovina e nel rene e nell'urina di vitelle a cui erano state somministrate alte dosi della tossina (IARC, 1993).

La percentuale di micotossina che dagli alimenti passa nella circolazione generale differisce ampiamente da specie a specie ma mediamente i mammiferi, escluso i ruminanti, raggiungono una biodisponibilità di OTA superiore al 50% (Hagelberg et al., 1989).

1.3.2 Distribuzione

Dopo l'assorbimento le tossine convogliate nel circolo sanguigno interagiscono con le cellule ematiche o con le proteine plasmatiche in particolare con l'albumina; infatti, in quasi tutte le specie studiate, incluso nell'uomo, la frazione libera di OTA risulta essere minore dello 0.2% (Delacruz e Bach, 1990; Galtier, 1991).

L'albumina (HSA) è una proteina costituita da 585 aminoacidi e trasporta molti ligandi esogeni ed endogeni attraverso l'organismo mediante la loro interazione con due dei tre siti di legame ad α -elica in essa presenti. Questi due siti di legame sono

stati caratterizzati mediante cristallografia a raggi X e sono stati localizzati rispettivamente nel II e III dominio. Misure di spettroscopia ottica rivelano due siti di legame per l'ocratossina α nell'HSA con costanti di legame che differiscono tra loro di un fattore 50. Il sito di legame a più alta affinità si trova nel dominio IIA ($K_b=5.2 \times 10^6 M^{-1}$) e quello a più bassa affinità nel dominio III ($K_b=1.0 \times 10^5 M^{-1}$) (Dai et al., 2004).

Inoltre, è stato dimostrato che l'ocratossina A possiede una grande affinità di legame anche per altre proteine plasmatiche, diverse dall'albumina, presenti nel plasma umano e suino (Delacruz e Bach, 1990; Kuiper-Goodman e Scott, 1989; Stojkovic et al., 1984).

Risulta importante l'identificazione del legame delle tossine con le componenti ematiche in quanto tale legame può influenzare sia la loro distribuzione tissutale sia l'eliminazione dall'organismo.

L'ocratossina A compete con il fenilbutazone a causa di una comune alta affinità per lo stesso sito di legame sulla proteina sierica risultandone significative interazioni farmaco-tossicologiche (Galtier, 1991). Inoltre possiede una maggiore affinità per l'albumina rispetto al warfarin (farmaco anticoagulante), al piroxicam e all'ibuprofene (farmaci antinfiammatori non steroidei) (Dai et al., 2004).

Il trasporto della micotossina si realizzerebbe, principalmente, attraverso la vena porta benché possa avvenire anche tramite i vasi linfatici. E' stato descritto anche il costituirsi di un circolo enteroepatico, per l'ocratossina A, nel ratto e nel suino, la qual cosa contribuisce al suo accumulo nell'organismo animale.

Studi condotti su diverse specie di mammiferi hanno messo in evidenza come l'OTA si accumuli principalmente nei reni, poi nel

fegato, pancreas ed intestino; invece sembra che negli uccelli non si accumulino in nessun organo particolarmente.

Sembra ormai accertata la capacità dell'OTA di attraversare la placenta in maiali e ratti (Kuiper-Goodman e Scott, 1989).

1.3.3 Metabolismo

Le biotrasformazioni sono considerate come i processi enzimatici (di idrolisi, riduzione, coniugazione) che mirano alla costituzione di metaboliti più idrosolubili e atossici quali ad es. l'ocratossina α . Queste fasi si realizzano a livello epatico ma anche nel rumine e a livello gastrointestinale per azione di una microflora che ha sviluppato un'intensa attività catalitica (Galtier, 1991).

I principali metaboliti derivati dall'OTA sono: il prodotto della sua idrolisi (ocratossina α), i derivati idrossilati 4-OH-OTA e 10-OH-OTA ed i prodotti della coniugazione con il glutatione.

I principali metaboliti epatici sia nei sistemi *in vivo* che in quelli *in vitro* sembrano essere gli epimeri: 4(R)-4-idrossiocratossina A (4R) (il principale metabolita) e 4(S)-4-idrossiocratossina A (4S) ed è stato dimostrato che la formazione di questi epimeri, principalmente l'epimero R e in minor misura l'S, è determinata dalle isoforme del citocromo P450 1A1/1A2, 2B1 e 3A1/3A2 (Omar et al., 1996; Kuiper-Goodman e Scott, 1989).

Invece la presenza del metabolita idrossilato 10-OH-OTA è stata evidenziata, *in vitro*, solo dopo aver incubato microsomi di fegato di coniglio con la micotossina (Stormer et al., 1983).

L'ocratossina A, inoltre, può essere substrato dell'enzima fenilalanina idrossilasi dando luogo a tirosin-OTA (Tyr-OTA), presente nel fegato di animali intossicati. Questo metabolita a sua

volta può essere trasformato fino a 4R/S-idrossitirosin-OTA e ad altri metaboliti (Creppy et al., 1990).

In alcuni casi il fluido ruminale di vacca e di pecora esterifica l'OTA trasformandola in OTC, però può avvenire anche il processo contrario dato che l'OTC viene biotrasformato ad OTA (Xiao et al., 1996).

Studi in vivo (Storen et al., 1982) ed in vitro (Fink-Gremmels et al., 1993) hanno rivelato la presenza di altri metaboliti della micotossina che però non sono stati ancora identificati.

Nei roditori, l'idrolisi di OTA ad ocratossina α avviene nel duodeno, nell'ileo e nel pancreas ma la realizzano anche i batteri del cieco. Gli enzimi carbossipeptidasi A e chemiotripsina sono responsabili di detta idrolisi sia nei ruminanti che nei roditori (Galtier, 1991).

E' verosimile che l'OTA oltre che essere dotata di tossicità diretta possa mostrare anche una tossicità secondaria ai processi di bioattivazione come dimostrato da studi *in vitro* su colture di epatociti primari. I sistemi enzimatici ossidativi, inclusi i sistemi citocromo P450 dipendenti (nel caso specifico CYPs 1A1, 1A2, 2B1, 3A1 e 3A2) (Omar et al., 1996), producono metaboliti più tossici delle molecole di partenza come gli epossidi.

In studi sulla correlazione attività tossica - struttura chimica condotti *in vitro* su sistemi di cellule eucariotiche (cellule HeLa) ed *in vivo* è stato evidenziato come la tossicità acuta dell'OTA sia attribuibile alla quota di isocumarina; anche il gruppo carbossilico lattone può essere coinvolto nella tossicità (Neal, 1998).

1.3.4 Escrezione

Le micotossine ed i loro metaboliti vengono fondamentalmente escreti per via fecale ed urinaria.

Nel caso di micotossine che subiscono assorbimento completo e intensa metabolizzazione (citrinina, ocratossina A) il sistema di escrezione più efficiente risulta essere quello urinario (Chang e Chu, 1977; Galtier, 1974b).

La clearance della micotossina per filtrazione renale è subordinata al valore delle costanti di legame di OTA con le proteine plasmatiche. Tanto nei pesci come nelle quaglie, dove la clearance renale è rispettivamente del 4 e 0.3% della clearance totale, il sistema di escrezione epatobiliare è più importante di quello urinario. Per questo motivo, queste due specie presentano una clearance plasmatica di OTA superiore alle altre specie studiate e di conseguenza l'emivita della micotossina nel sangue è minore. OTA somministrata per via endovenosa alla concentrazione di 50 ng/g di peso corporeo in pesci, quaglie, topi, ratti e scimmie ha un'emivita di 8.3, 12, 48, 170 e 840 ore rispettivamente (Hagelberg et al., 1989).

Per confermare l'importanza del legame di OTA alle proteine plasmatiche, in relazione all'eliminazione della stessa, è stato condotto uno studio utilizzando ratti normali e ratti privi del gene codificante per l'albumina, ed è stato osservato che la concentrazione della micotossina nell'urina e nella bile dei ratti carenti in albumina è 20-70 volte superiore rispetto ai ratti normali (Kumagai, 1985).

Tanto l'escrezione biliare quanto la filtrazione glomerulare giocano un ruolo importante nell'eliminazione dell'OTA contenuta nel plasma di ratto. In questi animali il metabolita principale, sia

nelle feci che nelle urine, è l'ocratossina α seguito dall'OTA stessa e dal 4-idrossi-OTA (Kuiper-Goodman e Scott, 1989). Storen e collaboratori (1982) riscontrarono, in ratti nei quali era stata somministrata la micotossina per via orale, la presenza nelle urine di OTA a concentrazioni paragonabili al 6% della dose, di (4R)-4-idrossi-ocratossina A (1,5%) e di ocratossina α (25-27%); nelle feci era presente il 12% di OTA e il 9% di ocratossina α .

Li e collaboratori (1997) inoltre, osservarono, in uno studio eseguito su ratti a cui si era somministrata la micotossina per via endovenosa, che l'OTA veniva eliminata dall'organismo più lentamente rispetto a composti strutturalmente ad essa analoghi e ai suoi metaboliti. In particolare valutarono che l'emivita dell'OTA, dell'OP-OTA, dell'OT α , dell'OT-OH, dell'OTB e dell'OTC era di 103, 50.5, 9.6, 6, 4.2 e 0.6 ore rispettivamente e che la clearance totale dell'OTA, dell'OP-OTA, dell'OT α , dell'OT-OH e dell'OTB attraverso la bile e le urine era di 3.1, 3.6, 40, 65 e 43 ml/ora Kg rispettivamente. Osservarono, inoltre, che l'OTA, l'OTB e l'OT α venivano principalmente eliminate attraverso le urine (48%), l'OT-OH attraverso la bile (41%) e l'OP-OTA come metaboliti (43%).

Nei vitelli, l'emivita dell'OTA è di 77 ore e l'80-90% della micotossina viene eliminata in forma di ocratossina α , principalmente attraverso le urine (Screemannarayana et al., 1988); nel maiale, invece, l'emivita risulta essere di 72-120 ore (Galtier et al., 1981).

L'eliminazione per via fecale è il risultato di uno scarso assorbimento gastrointestinale, o di un'efficiente escrezione biliare della tossina e dei suoi metaboliti.

Per quanto riguarda la specie umana Studer-Rohr e collaboratori (2000) dimostrarono che l'emivita dell'OTA nel siero

è di 35.5 giorni, infatti, l'escrezione risulta particolarmente lenta; ciò è dovuto al riassorbimento di OTA durante la circolazione enteroepatica, al riassorbimento che avviene anche nel rene dopo la secrezione tubulare e al forte legame con le proteine plasmatiche.

L'escrezione renale sembra essere il principale meccanismo d'eliminazione; tuttavia studi realizzati su campioni di latte umano prelevato da donne di diversi paesi europei, hanno evidenziato come l'eliminazione dell'OTA avvenga, anche se in piccola quantità, attraverso questa via (Breitholtz-Emanuelsson et al., 1993; Micco et al., 1995; Jonsyn et al., 1995); e poiché il latte materno è il primo e l'unico alimento dei neonati, la presenza di tale micotossina nel latte rappresenta un pericolo per i lattanti, anche perché, in alcuni casi, l'OTA supera i livelli massimi tollerati. In Italia, ad esempio, è stata rilevata una elevata presenza di OTA sia nel siero (100% di positività), che nel latte materno (80% ca.) (Micco et al., 1995; Miraglia et al., 1995; Palli et al., 1999).

La presenza di OTA nel siero umano e la sua eliminazione attraverso le urine o il latte materno è stata da diversi ricercatori considerata per effettuare importanti correlazioni con l'incidenza di patologie specifiche soprattutto a carico del parenchima renale.

In suini e in specie avicole esposte all'ocratossina A sono stati trovati alti livelli residuali della micotossina nel rene e poi nel muscolo, nel fegato e, limitatamente ai suini, anche nel grasso.

Inoltre, sono stati riscontrati livelli residuali ma non particolarmente apprezzabili di OTA anche nelle uova di specie avicole esposte.

1.4 MECCANISMO D'AZIONE

Sono stati identificati alcuni meccanismi molecolari alla base degli effetti tossici indotti dalla micotossina:

1. **Inibizione della fosforilazione ossidativa e blocco della respirazione mitocondriale** associata alla deplezione dell'ATP e al conseguente rigonfiamento mitocondriale per l'impossibilità della cellula di mantenere il gradiente sodio/potassio (Meisner, 1976).

2. **Inibizione della fenilalanil-t-RNA sintetasi accompagnata da una riduzione della sintesi proteica.** La fenilalanil-tRNA sintetasi riconosce il gruppo fenilalaninico dell'OTA, che determina un'inibizione competitiva, fermando l'aminoacetilazione e bloccando l'allungamento del peptide. Poiché l'affinità dell'OTA per la fenilalanil-tRNA sintetasi è molto più bassa di quella della fenilalanina stessa, l'OTA, probabilmente, determina effetti negativi quando si accumula nelle cellule e quando la concentrazione intracellulare di fenilalanina è bassa (Kuiper-Goodman e Scott, 1989). E' stato dimostrato che aggiungendo contemporaneamente OTA e fenilalanina al mezzo di coltura si previene completamente l'inibizione della sintesi proteica (Creppy et al., 1979).

3. **Aumento della formazione di radicali liberi ed incremento delle reazioni enzimatiche di perossidazione lipidica.** Sono stati realizzati diversi studi in vitro sulla perossidazione lipidica in presenza di OTA in microsomi isolati di fegato di ratto. In uno di questi studi si osservò che la riduzione del Fe^{3+} a Fe^{2+} stimolava la perossidazione e che questa dipendeva dal NADPH citocromo P450 riduttasi, in quanto aggiungendo un chelante del ferro ed inibitori del

suddetto enzima, si limitavano tali processi (Rahimtula et al., 1988). E' stato rilevato come l'OTA sia capace di formare un complesso con il Fe^{3+} e sia capace di favorire la riduzione del Fe^{3+} a Fe^{2+} stimolando, così, i processi di perossidazione lipidica (Marquardt e Frohlich, 1992; Omar et al., 1990).

4. **Sequestro del calcio microsomiale.** Il reticolo endoplasmatico gioca un ruolo importante nell'omeostasi del calcio intracellulare. Vari studi indicano che l'inibizione della captazione del calcio, attraverso il reticolo endoplasmatico del fegato, è un episodio precoce causato dai processi di perossidazione lipidica (Marquardt e Frohlich, 1992). Studi in vivo ed in vitro hanno rivelato che l'OTA danneggia l'attività della pompa del calcio (Khan et al., 1989). Infatti è stata osservata una riduzione del 42-45% della captazione del calcio, da parte della pompa ionica, in topi a cui si era somministrata una dose di 10 mg/Kg p.c. di ocratossina A; inoltre è stato dimostrato che il trattamento di cellule microsomiali epatiche di topo con una concentrazione di 10 μ M di OTA, determinava una riduzione dell'80% del sequestro del calcio da parte del reticolo endoplasmatico. Poiché tutti questi effetti non si evidenziavano in assenza di NADPH, è stato ipotizzato che la perossidazione lipidica, indotta dalla micotossina, fosse il meccanismo scatenante.

5. **Inibizione della gluconeogenesi,** riduzione dei depositi di glicogeno epatico ed aumento dei livelli serici di glucosio (Suzuki et al., 1975).

L'ocratossina A è inoltre in grado di inibire l'attività della carbossipeptidasi A (Pitout e Nel, 1969) e di produrre su cellule in tessutocoltura, una riduzione della velocità mitotica con comparsa

di anomalie morfologiche (conseguenza della sua attività inibente la sintesi proteica) (Natori et al., 1970; Steyn et al., 1975).

Gli effetti genotossici, l'inibizione della sintesi di DNA e della mitosi così come gli effetti istopatologici osservati sui nuclei di cellule trattate (Wei e Sulik, 1993) possono essere spiegati con il meccanismo di danno diretto indotto dalla micotossina a carico del DNA inclusa la formazione di addotti al DNA stesso (dose e tempo di esposizione dipendente) (Pfohl-Leszkowicz et al., 1993) e la rottura dei singoli filamenti (Creppy et al., 1985).

E' stata messa in evidenza la presenza degli addotti durante la biopsia renale di un paziente affetto da nefropatia interstiziale cronica che presentava alti livelli ematici della micotossina (Maaroufi et al., 1994).

Altri studi hanno inoltre messo in evidenza che le lesioni tubulari renali indotte da OTA (come anche quelle riscontrate a carico degli epatociti) sono in parte da ascrivere all'induzione di processi apoptotici (Seegers et al., 1994; Atroshi et al., 2000).

L'azione particolarmente intensa sull'epitelio dei tubuli contorti prossimali del rene, si manifesta anche sulle cellule epatiche.

1.5 TOSSICITA' INDOTTA DALLE OCRATOSSINE

Le micotossicosi in genere (e quindi anche le ocratossicosi) sono intossicazioni acute e croniche riscontrate in uomini ed animali imputabili, principalmente, all'ingestione di alimenti e mangimi contaminati da micotossine.

Si tratta di malattie non trasmissibili, non epidemiche e che non rispondono alle normali terapie, ma che hanno un andamento spesso stagionale e di tipo ciclico.

L'esposizione dell'uomo alle ocratossine, come alle altre micotossine, può verificarsi, come dicevamo, principalmente attraverso il consumo di alimenti di origine vegetale contaminati o l'ingestione di residui delle micotossine o suoi metaboliti contenuti in derrate (latte e derivati, carni, insaccati, ecc.) derivanti da animali alimentati con mangimi contaminati; oppure, in seguito in seguito all'inalazione di spore fungine tossinogene presenti in elevate quantità sia in particolari ambienti di lavoro (in cui si generano per esempio polveri di cereali contaminati) sia in ambienti domestici umidi e poco aerati.

E' stato dimostrato che cani, maiali e polli sono specie più sensibili agli effetti dell'OTA rispetto ai topi e ai ratti (IARC, 1993; Kuiper-Goodman, 1991; Marquardt e Frohlich, 1992).

Dosi uniche ed elevate possono dar origine ad un'intossicazione acuta i cui principali sintomi clinici sono anoressia, perdita di peso, poliuria, polidipsia, emorragia digestiva e disidratazione, e che provocano la morte dopo poche settimane dall'assunzione.

In particolare, l'OTA è in grado di provocare gravi disordini e sintomi di tossicità acuta a livello di differenti organi e sistemi

anatomici, quali principalmente i reni, il fegato, il sangue ed il sistema immunitario.

Oltre ad una tossicità acuta o subacuta, tali micotossine sono responsabili anche di una tossicità cronica come conseguenza di un'esposizione protratta nel tempo a bassi livelli di contaminazione degli alimenti che comporta effetti cronici quali cancerogenicità, genotossicità, mutagenicità, teratogenicità ed immunosoppressione.

E', inoltre, stata accertata la capacità dell'OTA di interagire con altre micotossine, in particolare con la citrinina, producendo un effetto sinergico. Infatti, è stato osservato che la somministrazione di OTA (0.1-0.2 mg/Kg) a cani di razza Beagle determina degenerazione e necrosi con desquamazione delle cellule epiteliali renali, principalmente dei tubuli prossimali, invece, in associazione con la citrinina (5-10 mg/Kg) induce degenerazione e necrosi sia delle cellule tubulari prossimali che distali dell'epitelio renale, ed inoltre, determina ulcerazioni della mucosa intestinale (Kitchen et al., 1977).

L'effetto sinergico dell'OTA con la citrinina è stato, recentemente, confermato da uno studio in vitro, condotto su colture cellulari di linfociti porcini, in cui è risultato evidente come l'associazione delle due tossine inducesse una inibizione, superiore al 50%, della proliferazione linfocitaria (Bernhoft et al., 2004).

E' stato, inoltre, osservato che la contemporanea somministrazione di OTA e tossina T-2 determina, nel topo, malformazioni fetali (Hood et al., 1978) e che la combinazione ocratossina A (0.50 mg/Kg), aflatossina B1 (0.25 mg/Kg) induce un marcato effetto teratogeno con un incremento significativo della percentuale di mortalità fetale nei ratti (Wangikar et al., 2004).

1.5.1 Tossicità negli animali domestici

L'ocratossina A è tossica per molti animali con intensità di effetti che variano ampiamente a seconda della specie considerata, del sesso e delle modalità di somministrazione.

L'ingestione di alimenti contaminati, anche se a dosi inferiori a 0.2 mg/Kg p.c., durante periodi inferiori a quattro mesi, inducono patologie renali in tutte le specie di mammiferi monogastrici testati (Kuiper-Goodman e Scott, 1989). Tali patologie comportano la degenerazione dei tubuli prossimali seguita da fibrosi interstiziale e degenerazione glomerulare. La sintomatologia in genere è caratterizzata da un maggior consumo di acqua, aumento del volume urinario associato a poliuria, glicosuria, proteinuria ed enzimuria ed un quadro anatomo-patologico complesso caratterizzato da reni pallidi e ipertrofici ed evidente fibrosi corticale.

I maiali sono particolarmente suscettibili agli effetti dell'ocratossina A la quale, insieme alla citrinina, si considera come agente determinante nell'eziologia della nefropatia micotossica porcina, identificata per la prima volta in Danimarca nel 1928 (Scott, 1994; Krogh et al., 1979; Krogh, 1987). In seguito, l'intossicazione è stata descritta anche in altri Paesi come la Germania (Krogh, 1991), il Belgio (Krogh, 1991), la Bulgaria (Stoev et al., 1998), gli Stati Uniti (Cook et al., 1986), l'Ungheria (Krogh, 1991), la Polonia (Golinski et al., 1985; Krogh, 1991) e la Svizzera (Krogh, 1991).

E' stato dimostrato che maiali ai quali si somministravano dosi tra 0.2 e 4 mg/Kg p.c. di OTA, dosi, queste, equivalenti ai livelli riscontrati in alimenti contaminati, sviluppavano dopo 3 - 4 mesi dalla somministrazione, una nefropatia identica a quella

evidenziata in natura (Delacruz e Bach, 1990). Inoltre, se la micotossina veniva somministrata alla dose di 400 µg/kg p.c., per via orale e per 5 giorni, la micotossina veniva individuata nel tubulo prossimale dei nefroni, mediante microscopia a immunofluorescenza, con l'ausilio di anticorpi ottenuti da conigli previa iniezione di OTA coniugata all'albumina (Elling, 1977).

I sintomi clinici caratteristici della nefropatia micotossica porcina sono: polidipsia, poliuria, calo della produzione, depressione, apatia e, occasionalmente, morte. A volte non si osservano questi sintomi e la patologia si scopre solo al momento della macellazione, poiché i reni appaiono pallidi e di maggiori dimensioni.

L'esame istologico mostra degenerazione dei tubuli prossimali seguita da atrofia dell'epitelio tubulare, ialinizzazione glomerulare e fibrosi interstiziale della corteccia renale (Elling e Moller, 1973).

In uno studio condotto da Stoev e collaboratori (1998) su maiali nefropatici, l'ocratossina A fu trovata nel 100% dei campioni di siero raccolti. In questi animali, i danni al rene furono caratterizzati dalla diminuzione della funzione del tubulo prossimale, evidenziata dall'aumento dell'escrezione urinaria di glucosio e proteine e dall'aumento della concentrazione di urea e creatinina nel sangue, dove peraltro risultarono diminuiti i livelli di proteine e di glucosio (Stoev et al., 1998). Inoltre, fu evidenziato un incremento dei livelli sierici di potassio e sodio e degli enzimi aspartato-aminotransferasi (ASAT), glutammato deidrogenasi (GLDH), γ -glutamyl-transpeptidasi (GGT) e leucina aminopeptidasi (Stoev, 1998).

Oltre ad avere un effetto marcatamente nefrotossico, l'OTA può determinare nei maiali, a cui si erano somministrate alte dosi

per via orale (5-10 mg/kg, livelli raramente riscontrati in natura), effetti a livello del fegato, intestino, milza e tessuto linfatico (Szczzech et al., 1973a,b,c). Alcuni ricercatori hanno anche evidenziato, nei cinghiali, una spiccata alterazione dell'attività riproduttiva ed effetti teratogeni; infatti sembra che l'OTA sia capace di attraversare la barriera placentare ed indurre, nei suinetti, alterazioni dello sviluppo fetale (Marquardt e Frohlich, 1992).

Anche le specie avicole sembrano essere molto sensibili agli effetti tossici dell'ocratossina A, infatti, negli Stati Uniti sono stati osservati diversi casi di ocratossicosi acuta che hanno coinvolto un grande numero di volatili. In tali specie predominano i sintomi da interessamento del comparto emopoietico (con diminuzione del MCV e della concentrazione di emoglobina serica, abbassamento della percentuale di saturazione del ferro e della transferrina) (Huff et al., 1979a) seguiti da uno sfavorevole indice di conversione degli alimenti, minore incremento ponderale, ritardato raggiungimento della maturità sessuale, riduzione della deposizione e della schiudibilità delle uova ed aumentata mortalità.

In uno studio condotto in Danimarca su polli e galline macellati è stato rilevato che il 29% dei soggetti presentava una nefropatia correlata all'ingestione di OTA (Elling et al., 1975). Le lesioni renali, osservate in questo gruppo di animali, erano caratterizzate da degenerazione dei tubuli prossimali e distali dei nefroni e fibrosi interstiziali.

Generalmente, nei volatili, le lesioni epatiche si riscontrano meno frequentemente delle renali e sono caratterizzate da lieve ma diffusa vacuolizzazione degli epatociti e focolai di necrosi (Huff et al., 1988); anche se Stoev e collaboratori (2004), in un lavoro recente, hanno osservato che l'OTA induce rigonfiamento torbido e

degenerazione granulare, proliferazione di cellule mononucleari ed attivazione dei capillari endoteliali sia nel fegato che nel rene.

Frequente anche il riscontro di una massiccia soppressione della funzionalità del midollo osseo e dell'emopoiesi con deplezione degli elementi linfoidi della milza, della Borsa di Fabrizio e del timo (Chang et al., 1979; Stoev et al., 2004).

In gruppi di polli alimentati, per 20 giorni, con mangimi contaminati con la micotossina (0.2 - 4 ppm), si riscontrava una riduzione della concentrazione delle immunoglobuline IgG, IgA ed IgM sia nel siero che nei tessuti linfoidi (Dwivedi e Burns, 1984).

In soggetti esposti è stata osservata anche una riduzione della compattezza delle ossa legata a marcata demineralizzazione (Huff et al., 1980).

Alcuni effetti riscontrati si possono spiegare con il danno indotto al tubulo prossimale, però le altre alterazioni, come la riduzione del tasso di filtrazione glomerulare, la poliuria e la riduzione dell'osmolarità dell'urina, non possono essere interpretate come una semplice conseguenza di questa lesione. Sembra, infatti, che l'OTA determini effetti negativi in diverse parti del nefrone in dipendenza della concentrazione e del tempo di esposizione (Gekle e Silbernagl, 1996). Durante un'esposizione acuta sarebbe il tubulo collettore la porzione più sensibile del nefrone con evidente alterazione nell'escrezione degli elettroliti. Probabilmente, il meccanismo implicato in questo caso è il blocco del passaggio degli anioni attraverso la membrana plasmatica (Gekle et al., 1998).

Al contrario, l'esposizione cronica determinerebbe effetti negativi sia sull'emodinamica renale che sulla funzione secretoria del tubulo prossimale, con un meccanismo nel quale sembra giocare un ruolo importante l'angiotensina II. È stato osservato che l'esposizione sia acuta che cronica all'OTA determina una modifica

dell'acidificazione urinaria a causa dell'inibizione del riassorbimento dell' HCO_3^- nei tubuli e per alterazioni del pH nell'interstizio della papilla renale (Kuramochi et al., 1997; Kuramochi et al., 1997).

Inoltre, è stato dimostrato che l'OTA esercita un effetto negativo sul metabolismo del glucosio; infatti, provoca un accumulo di glicogeno nel fegato inibendo l'attivazione da parte dell'AMP-ciclico della fosforilasi-chinasi, enzima responsabile della trasformazione del glicogeno in glucosio; tra l'altro, tale micotossina determina anche un aumento del glucosio nel sangue in quanto è capace di inibire l'attività della fosfoenolpiruvato-carbossichinasi (PEPCK), enzima chiave nella gluconeogenesi renale. In maiali una dose di 4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ p.c. è sufficiente per inibire la PEPCK del 50%, mentre nei topi è necessaria una dose di 1000 - 2000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ p.c. (Marquardt e Frohlich, 1992).

Notevoli sono le perdite economiche negli animali da produzione connesse non solo all'azione nefrotossica, ma anche all'intenso effetto immunosoppressivo che si evidenzia nella specie suina in seguito ad esposizioni a lungo termine (Hult et al., 1979).

Le perdite ingenti sono, peraltro, da attribuirsi non solo alla immunodepressione ma anche alla lunga emivita biologica della micotossina e al frequente riscontro, alla macellazione, di alte quote residuali nelle carni destinate al consumo umano, la qual cosa comporta la distruzione della carcassa. Problema molto comune è che l'esposizione cronica alla micotossina quasi mai genera sintomi tali da allarmare l'allevatore, infatti livelli di 200 ppb di OTA inducono immunosoppressione, mentre i segnali tipici della nefrotossicità sono evidenziati solo quando la sua concentrazione nel mangime supera i 1400 ppb.

Nei ruminanti la flora ruminale degrada l'ocratossina A e raramente sono stati riportati casi d'intossicazione, peraltro di moderata intensità (Kiessling et al., 1984).

Vitelli nutriti per trenta giorni, con un mangime contenente OTA alla dose di 0.1 - 2 mg/kg p.c., presentano solo poliuria, incremento della GOT nel siero, una blanda enterite (Pier et al., 1976) e, nei reni, una leggera degenerazione tubulare. Inoltre, dosi protratte per quattro settimane (0.05 mg/kg p.c.) causano poliuria, abbattimento, diminuzione dell'incremento ponderale, disidratazione, riduzione del peso specifico delle urine e talvolta una lieve enterite, e da un punto di vista anatomo-patologico: reni di colore grigio, consistenza fibrosa con aspetto ondulato in superficie, necrosi dei tubuli prossimali e fibrosi interstiziale.

Anche se, l'esposizione ad una singola dose di 13.3 mg/kg p.c. induce, in tale specie, diarrea, anoressia e blocco della produzione latte pochi giorni dopo la somministrazione.

L'ocratossina A non passa velocemente attraverso la placenta, tuttavia, se iniettata nel sangue di pecore gravide a dosi sufficientemente elevate tali da procurare la morte della madre, si ritrova, entro 24 ore dalla somministrazione, anche se solo in tracce, nel sangue fetale.

La micotossina è molto tossica nel cane, anche se raramente per questa specie si rinvencono le condizioni che determinano intossicazione (quale l'assunzione di mangime contaminato). In questi animali la somministrazione per via orale di dosi elevate (5 - 10 mg/kg), livelli raramente riscontrati in natura, determina lesioni renali, danni al fegato, all'intestino, alla milza, al tessuto linfatico e ai leucociti; inoltre induce una marcata immunosoppressione con linfopenia (Szczzech et al., 1973a,b,c).

Nella Tabella 4 sono riportate alcune DL_{50} che spaziano in un range da 0.2 mg/kg p.c. nel cane a 58.3 mg/kg p.c. nel topo. È possibile osservare che le femmine risultano essere più sensibili dei maschi alla tossicità indotta dalla micotossina, anche se recentemente alcuni autori hanno osservato come l'OTA si accumuli maggiormente nei reni di ratti maschi e che l'incidenza di tumori del tubulo renale, spesso con metastasi, sia molto più alta in ratti e topi maschi rispetto a ratti e topi femmine dopo trattamento cronico con piccole dosi di OTA (Zepnik et al., 2003; Lock e Hard, 2004).

Animale	DL₅₀ (mg/kg p.c.)	Somministrazione	Autore
Topo	22-40.1	i.p.	Kuiper-Goodman & Scott (1989)
Topo	46-58.3	Per os	Kuiper-Goodman & Scott (1989)
Topo	25.7-33.8	i.v.	Kuiper-Goodman & Scott (1989)
Ratto maschio	30.3	Per os	Galtier et al. (1974)
Ratto femmina	21.4	Per os	Galtier et al. (1974)
Ratto maschio	28	Per os	Kanizawa et al. (1977)
Ratto maschio	12.6	i.p.	Galtier et al. (1974)
Ratto femmina	14.3	i.p.	Galtier et al. (1974)
Maiale della Guinea maschio	9.1	Per os	Thacker & Carlton (1977)
Scrofa della Guinea	8.1	Per os	Thacker & Carlton (1977)
White leghorn	3.4	Per os	Prior et al. (1976)
Pollo	3.3	Per os	Kuiper-Goodman & Scott (1989)
Tacchino	5.9	Per os	Prior et al. (1976)
Quaglia giapponese	16.5	Per os	Prior et al. (1976)
Trota salmonata	4.7	i.p.	Doster et al. (1972)
Cane	0.2	Per os	Kuiper-Goodman & Scott (1989)
Maiale	1.0	Per os	Kuiper-Goodman & Scott (1989)

Tabella 4 - Tossicità acuta dell'ocratossina A

1.5.2 Tossicità negli animali da esperimento

L'esposizione a basse concentrazioni di ocratossina A determina alterazioni morfologiche e funzionali a carico di diversi organi e tessuti in specie di animali da sperimentazione. Infatti è stato osservato che l'esposizione cronica causa adenomi renali e carcinomi epatocellulari sia nel topo che nel ratto (Kanisawa e Suzuki, 1978; Bendele et al., 1985; Boorman, 1989). Oltre all'effetto mutageno, genotossico, cancerogenico e teratogeno, che verrà descritto approfonditamente nei paragrafi successivi, è stato dimostrato che l'OTA è capace di indurre un marcato effetto nefrotossico (Marquardt e Frohlich, 1992; Pohland et al., 1982). È stato osservato, infatti, che una dieta costituita da mangime contaminato con l'ocratossina A (0.2 - 5 mg/kg p.c., per tre mesi) determina, nei ratti sottoposti alla sperimentazione, una marcata forma di degenerazione tubulare a tutte le concentrazioni testate (Munro et al., 1974). Zingerle e collaboratori (1997) hanno scoperto che il 70% dell'ocratossina A ingerita attraverso la dieta, viene riassorbita nei tubuli prossimali dei nefroni; è stato osservato, inoltre, che proprio a livello dei tubuli prossimali si accumula principalmente la micotossina. Un'esposizione cronica determina, nei ratti, inizialmente lesioni primarie dei tubuli prossimali, seguita da alterazioni strutturali e funzionali dei glomeruli ed involuzione dell'interstizio glomerulare (Krogh, 1980); mentre una esposizione acuta determina, in tale specie, una marcata degenerazione acidofila, con necrosi e desquamazione dell'epitelio dei tubuli prossimali (Kanisawa et al., 1977).

Il rene è sicuramente il principale organo bersaglio dell'ocratossina A in topi e ratti, ma non si deve trascurare l'effetto indotto sul fegato. Infatti, una dose di 1.8 mg/Kg p.c., due volte a

settimana per 15 giorni, è sufficiente ad innescare i processi apoptotici negli epatociti di topi, e a determinare necrosi centrolobulare con conseguente reazione infiammatoria (Atroshi et al., 2000). Anche in ratti maschi appena svezzati (di circa 60 gr ciascuno), intubati con 100 µg di Ocratossina A, è stata evidenziata la presenza di aree di necrosi focale delle cellule epatiche, degenerazione ialina caratterizzata dalla proliferazione del reticolo endoplasmatico liscio con formazione di masse di membrane lisce nel citoplasma chiamate “finger prints”.

Alcuni autori hanno proposto meccanismi che implicano processi ossidativi sia nella nefrotossicità che nell'epatotossicità dell'OTA, infatti è stato osservato che i parametri urinari dell'enzimuria, proteinuria, glicosuria e creatinuria, alterati, nel ratto, a causa del trattamento con la micotossina, potevano essere controllati mediante la somministrazione di enzimi a nota attività antiossidante quali la superossido dismutasi (SOD) e la catalasi (Baudrimont et al., 1994); inoltre il pretrattamento con sostanze antiossidanti quali il CoQ₁₀, L-carnitina, lo zinco, il magnesio, l'N-acetil-cisteina, le vitamine C ed E ed infine il selenio, riduceva del 20% la formazione di corpi apoptotici nel fegato di topo (Atroshi et al., 2000).

L'OTA, oltre ad essere nefrotossica ed epatotossica, è anche enterotossica. Tale affermazione è stata supportata da uno studio condotto da Kanisawa e collaboratori (1990) in cui è stato rilevato lo sviluppo di un'enterite acuta nel duodeno e nel digiuno di ratti maschi Wistar a cui era stata somministrata una singola dose per via parenterale della micotossina (15 mg/Kg) (Kanisawa et al., 1990).

Il rene, come dicevamo, è il principale organo bersaglio, tuttavia sono stati riscontrati effetti a carico di altri organi nel ratto,

tra cui lesioni del miocardio (Purchase e Theron, 1968), emorragie e trombosi della milza, del cervello, del fegato e del cuore, in seguito ad una singola somministrazione di 10 mg/Kg di OTA (Albassam et al., 1987); inoltre ratti alimentati per via orale con dosi giornaliere di 4 mg/kg p.c. per 4-10 giorni mostravano una marcata riduzione del livello del fibrinogeno plasmatico, dei fattori di coagulazione II, VII, X, del numero dei trombociti e dei megacariociti (Galtier et al., 1979).

Numerosi studi hanno messo in evidenza la capacità da parte dell'OTA di interferire con i naturali meccanismi di difesa degli organismi, compromettendo la loro funzione di protezione cellulare; infatti, è stata riscontrata, nel topo, in seguito al trattamento prolungato nel tempo (alcune settimane) con piccole dosi di ocratossina A, una diminuita sintesi dei precursori delle cellule bianche con una marcata soppressione dell'attività chemiotattica dei macrofagi (Dhuley, 1997) e dell'attività microbica delle cellule "natural killer" (NK) (Luster et al., 1987; Lea et al., 1989). L'OTA induce mielotossicità, effetto evidenziato da una marcata riduzione della massa timica e da una ipocellularità del midollo osseo, con conseguente diminuzione delle cellule staminali totipotenti e significativa riduzione della sintesi dei precursori degli eritrociti, dei granulociti, dei megacariociti e dei macrofagi (Boorman et al., 1984); inoltre è stata osservata una inibizione della produzione dell'IL-1 e del TNF- α da parte dei macrofagi attivati (Dhuley, 1997; Gupta et al., 1979, 1983).

In un lavoro recente è stato messo in evidenza che la micotossina determina gravi danni anche a carico dei polmoni e del cuore di ratti trattati per 30 giorni con dosi quotidiane di 289 μ g/Kg. Infatti, l'esame istopatologico dei polmoni ha rivelato una congestione alveolare, con iperplasia delle cellule alveolari,

proliferazione dell'epitelio respiratorio, infiammazione perivascolare e peribronchiale, infiltrazione degli pneumoniti e deformazione del parenchima polmonare con aree enfisematose; mentre l'esame del tessuto miocardico ha mostrato la presenza di estesi vacuoli citoplasmatici, necrosi dei miociti con disintegrazione del nucleo, fibrillolisi e fibre miocardiche molto dilatate con aree emorragiche (Okutan et al., 2004).

Infine uno studio condotto da Belmadani e collaboratori (1998) ha rivelato che l'OTA, in seguito ad infusione intracerebrale di 289 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ della micotossina per 24 ore per 8 giorni consecutivi, in ratti, si distribuisce in maniera diversa tra le varie regioni del cervello; in particolare si accumula per il 2.9% del totale nell'ippocampo, per il 3.3% nel tessuto striato, per il 5.1% nel mesencefalo ventrale, per il 34.4% nel cervelletto ed infine per il 50.3% nel resto del cervello. Tra queste strutture, il cervelletto ed il mesencefalo ventrale risultano essere quelle maggiormente sensibili agli effetti tossici indotti dalla micotossina, infatti è sufficiente anche una concentrazione di 0.1 ng/g di OTA per generare l'effetto citotossico (Belmadani et al., 1998).

1.5.3 Tossicità nell'uomo

Sebbene nell'uomo non siano stati riportati chiari casi di nefropatia micotossica, è abbastanza verosimile che questa potente nefrotossina, che determina danni renali ingenti in diverse specie animali, possa anche indurre alterazioni renali negli uomini esposti. A causa della stretta somiglianza tra la nefropatia cosiddetta dei Balcani (BEN) e la malattia renale dei suini indotta dall'ocratossina, è stato suggerito che l'OTA fosse un agente causale di rilevante importanza associata alla BEN (Krogh, 1974).

La BEN è una patologia renale a carattere cronico che è stata osservata prevalentemente nelle popolazioni rurali della Bulgaria, Romania, Serbia, Bosnia, Erzegovina, Croazia e Jugoslavia; infatti, è stato stimato che circa 20.000 persone soffrono di tale patologia in queste regioni (Plestina, 1992). Nel passato si è cercato di individuare i possibili fattori eziologici di tale nefropatia (batteri, virus, metalli tossici, fattori genetici) senza tuttavia giungere a risultati convincenti (Puchlev, 1973, 1974a); fino a che nel 1974 si propose come causa determinante dello sviluppo della patologia una micotossina, concentrando l'attenzione soprattutto sull'ocratossina A (Krogh e Elling, 1976).

In diversi studi epidemiologici sono state effettuate correlazioni tra la presenza di OTA negli alimenti e la maggiore incidenza di casi di BEN (Krogh et al., 1977). Numerosi campioni di alimenti destinati al consumo umano ed animale, prodotti nelle regioni endemiche, sono risultati contaminati da ocratossina A (Pavlović et al., 1979).

La nefropatia interessa maggiormente gli abitanti delle regioni rurali ma limitatamente anche quelli delle aree urbane. Ciò è stato spiegato considerando che le popolazioni contadine di questi paesi

poveri consumano alimenti prodotti in proprio e conservati, spesso, in condizioni non idonee e quindi altamente contaminati da OTA, mentre le popolazioni urbane consumano cibo prodotto a livello industriale.

La BEN è una nefropatia che colpisce più frequentemente i soggetti fra i 30 e 50 anni con maggiore incidenza di casi nei soggetti di sesso femminile (Chernoremsky et al., 1977; Hrabar et al., 1976) e progredisce lentamente fino a portare a morte. Non è stata osservata una fase acuta della malattia ed i primi sintomi sono aspecifici; essi includono affaticamento, anemia, proteinuria, ingiallimento della pelle, dolore di testa, perdita di peso, anoressia ed uremia. All'esame autoptico i reni appaiono notevolmente ridotti di volume con una diffusa fibrosi corticale, spesso senza alcun segno di infiammazione (Vukelić et al., 1992). L'esame istologico mostra la presenza di lesioni croniche della corteccia renale con fibrosi interstiziale, ialinizzazione dei glomeruli, degenerazione dell'epitelio tubulare e perdita dell'orlo a spazzola del tubulo renale (Scott, 1994; Heptinstall, 1974).

Nelle regioni endemiche della Croazia, Bulgaria e Jugoslavia, è stata riscontrata anche un'elevata incidenza di tumori uroteliali delle pelvi e dell'uretere (urinary tract tumours o UTT) (Ceović et al., 1991; Chermozemsky, 1991). E' stato suggerito che l'ocratossina A potesse essere l'agente scatenante sia della nefropatia endemica che dei tumori del tratto urinario (Castegnaro et al., 1990). A tal proposito lo IARC ha classificato l'OTA come un possibile carcinogeno per l'uomo (IARC, 1987).

Negli alimenti contaminati è stata osservata anche la co-presenza di aflatossine e soprattutto di citrinina, micotossina altamente nefrotossica che avrebbe un ruolo non trascurabile nel determinismo della BEN.

L'esposizione delle popolazioni balcaniche all'OTA è stata, inoltre, supportata da una elevatissima presenza di residui della micotossina in campioni di sangue (oltre 1-2 µg/kg) e di urine delle famiglie esposte (Castegnaro et al., 1991; Radić, 1997). Il riscontro della presenza di ocratossina A nel sangue e nel latte (Miraglia et al., 1995) viene da alcuni anni utilizzato come parametro di valutazione dei livelli di esposizione della popolazione anche di aree non particolarmente a rischio (Tabella 5).

Paese	Incidenza di campioni positivi (%)	Concentrazione di OTA (ng/ml)	Anno
Bulgaria	7	1.0-10.0	1984-90
Canada	100	0.29-2.37	1994
Croazia (Split)	55	0.20-1.39	1997
Croazia (Zagreb)	58	0.20-1.28	1997
Croazia (Osijek)	100	0.20-1.39	1997
Cecoslovacchia	24	0.10-12.6	1990
Repubblica Ceca	91	0.10-13.7	1994
Repubblica Ceca	98	0.10-1.9	1995
Danimarca	54	0.10-13.2	1986-88
Francia (Alsace)	19	0.10-12.0	1991-92
Francia (Aquitaine)	19	0.10-160	1991-92
Francia (Rhone-Alpes)	15	0.10-4.0	1991-92
Germania	51	0.1-4.0	1977
Germania	63	0.1-2.0	1985
Germania	68	0.1-8.0	1988
Ungheria	82	0.2-10.0	1995
Ungheria	77	0.1-1.4	1997
Italia	100	0.1-2.0	1992
Giappone (Tokio)	85	0.004-0.278	1992-96
Polonia	6	1.0-13.0	1983-84
Polonia	8	1.0-40.0	1984-85
Svezia (Visby)	29	0.3-7.0	1989
Svezia (Uppsala)	3	0.3-0.8	1989
Svezia (Ostersund)	6	0.3-0.8	1989
Sierra Leone	33	1.5-18.0	1996
Svizzera	100	0,06-2.14	1992-93
Tunisia	52	0.1-8.8	1993-95

Tabella 5 - Presenza di ocratossina A in campioni di sangue umano (*Bulletin of the World Health Organization 77(9),754-766 (1999)*)

1.5.4 Tossicità in vitro

Gli studi *in vitro* condotti su diverse linee cellulari primarie e continue hanno evidenziato, come già osservato negli studi *in vivo*, un particolare tropismo della micotossina per il tessuto renale, cerebrale ed epatico con effetti anche a carico del sistema immunitario.

Müller e collaboratori (2003) hanno eseguito numerosi esperimenti per valutare l'effetto immunomodulatore dell'OTA e di alcuni suoi metaboliti, principalmente l'ocratossina C, su cellule monocitiche e macrofagiche umane THP-1. Gli autori hanno osservato che le ocratossine A e C determinavano una soppressione significativa dell'attività metabolica, principalmente della funzione mitocondriale, della proliferazione e differenziazione cellulare, dell'attività fagocitica e della sintesi di ossido nitrico. Inoltre una concentrazione superiore a 1000 ng/ml di OTA determinava una riduzione superiore al 50% della vitalità cellulare. Infine, se le cellule venivano trattate con 100 ng/ml di micotossina per 24 ore, la capacità di legame degli anticorpi anti CD29 ed anti CD11 ai monociti THP-1 si riduceva del 60% e del 41% rispettivamente.

Precedentemente Creppy e collaboratori (1983) osservarono che la (4R)-4-idrossi-ocratossina A induceva una drastica caduta dei livelli di IgM e IgG in cellule immunocompetenti e determinava un incremento della mortalità cellulare pari all'80% (Creppy et al., 1983); inoltre, alla concentrazione di 5-10 µg/ml, causava una rilevante inibizione della proliferazione cellulare di colture di timoma di topo EL-4 (Marin et al., 1996b).

È stato osservato che anche linee cellulari renali (LLC-PK1 e OK) risentono dell'effetto citotossico dell'OTA, effetto evidenziato mediante il test di inibizione delle deidrogenasi mitocondriali o

saggio dell'MTT. In tali colture cellulari erano evidenti, infatti, focolai necrotici ed apoptotici (Cohen, 1993; Vaux et al., 1994; Bondy e Armstrong, 1998).

In passato sono stati eseguiti numerosi studi per chiarire il ruolo dell'OTA nei processi ossidativi. A tal proposito, Baudrimont e collaboratori (1997) hanno osservato che la micotossina (5-50 μ M), dopo 24 ore d'incubazione, induceva la perossidazione lipidica in maniera concentrazione-dipendente in cellule renali di scimmia (cellule Vero). Infatti la produzione di malondialdeide (prodotto sintetizzato durante i processi di perossidazione dei fosfolipidi di membrana) risultava notevolmente incrementata (50%) rispetto al controllo. Gli autori hanno dimostrato che l'OTA induce la formazione di radicali liberi dell'ossigeno, infatti, il trattamento delle cellule con superossido dismutase (SOD) e catalasi (molecole scavengers, molecole cioè capaci di catturare i radicali liberi e di trasformarli in molecole non tossiche) determinava una netta riduzione della produzione di malondialdeide.

Il danno ossidativo, generato in seguito alla produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), può essere una delle cause principali del marcato effetto citotossico indotto dall'OTA (Rizzo et al., 1994). È stato, d'altra parte, riscontrato che il trattamento di cellule renali ed epatiche con composti a nota attività antiossidante (vitamina E, vitamina C, flavonoidi) riducevano l'effetto apoptotico (Figura 6) generato dalla micotossina, confermando l'innescarsi dei processi ossidativi indotti dall'OTA (Atroschi et al., 2000).

Un lavoro recentissimo ha rivelato, inoltre, la capacità da parte dell'ocratossina A di indurre la secrezione di collagene in cellule epiteliali dei tubuli prossimali umani (RPTECs) e di opossum (OK). Gli autori hanno ipotizzato che l'OTA, inducendo

la deposizione di matrice extracellulare da parte delle cellule dei tubuli prossimali del rene, possa essere un'importante causa di malattie renali negli uomini (Sauvant et al., 2005).

Kamp e collaboratori nel 2005 hanno eseguito uno studio su cellule fibroblastiche polmonari di criceto, su cellule renali di scimmia e su colture primarie di rene di ratto ed hanno osservato che la micotossina induce una riduzione della vitalità cellulare ed una forte inibizione della crescita cellulare dopo 24 ore di esposizione; interferisce con il ciclo cellulare in quanto aumenta il numero di cellule nella fase G_0/G_1 e G_2/M e diminuisce il numero di cellule in fase S, a causa dell'inibizione della replicazione del DNA, probabilmente dovuta al blocco della sintesi proteica indotta dall'OTA; inoltre innesca i processi apoptotici e determina un aumento del numero di cellule necrotiche (alla concentrazione di 10 $\mu\text{mol/L}$ di OTA la maggior parte delle cellule risultavano necrotiche). Inoltre gli autori hanno evidenziato che la micotossina induce un danno ossidativo al DNA a concentrazioni non ancora citotossiche. Tale effetto insieme con la capacità dell'OTA di interferire con il ciclo cellulare ed indurre la morte cellulare potrebbero rappresentare principali fattori nella catena di eventi cellulari che conducono alla nefro-carcinogenicità dell'OTA.

È stato anche dimostrato che la micotossina causa frammentazione del DNA ed aumenta la frequenza di micronuclei in cellule renali sia umane che di ratto (Robbiano et al., 2004).

L'ocratossina A si accumula, oltre che nei reni e nel fegato, anche nel cervello in cui particolarmente sensibili risultano essere il mesencefalo ventrale ed il cervelletto, infatti, è stato osservato che la micotossina determina in colture primarie di astrociti e neuroni del mesencefalo ventrale e del cervelletto una riduzione della sintesi del DNA e delle proteine ed un aumento dei livelli di

malondialdeide e del rilascio di LDH (lattato deidrogenasi) (Belmadani et al., 1998b; Belmadani et al., 1999).

L'OTA risulta essere citotossica anche a livello intestinale, infatti Maresca e collaboratori (2001) utilizzando due linee cellulari di epitelio intestinale umano (HT-29-D4 e Caco-2-14), hanno osservato che la tossina induce un'inibizione della crescita cellulare e determina una drammatica riduzione della resistenza transepiteliale delle membrane cellulari di entrambe le linee considerate. La micotossina altera sia la funzione di barriera che la funzione di assorbimento dell'epitelio intestinale; infatti determina un aumento del 60% dell'assorbimento del glucosio sodio-dipendente ma riduce quello di fruttosio ed L-serina; inoltre non inibisce la secrezione del cloro cAMP-dipendente attraverso il canale regolatore. La micotossina, quindi, alterando le normali funzioni di difesa ed assorbimento delle membrane delle cellule intestinale, può favorire il suo assorbimento all'interno delle cellule.

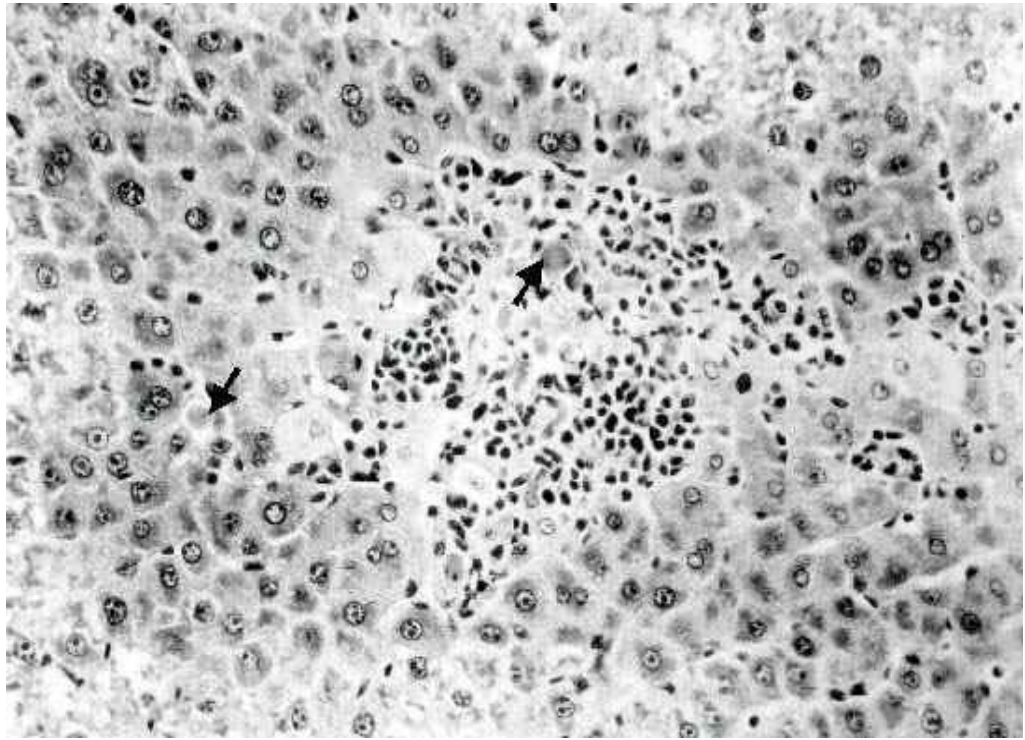


Figura 6 - *Cellule epatiche in apoptosi dopo trattamento con OTA*

1.5.5 Mutagenicità, Genotossicità, Cancerogenicità e Teratogenicità

Sebbene inizialmente si credesse che l'OTA non fosse mutagena per il *Saccharomyces cerevisiae* e per la *Salmonella Typhimurium* (TA1535, TA1538, TA98 e TA100), come evidenziato nel test di Ames condotto con o senza attivazione metabolica, più recentemente l'azione mutagena dell'OTA è stata osservata in seguito al trattamento di frazioni microsomiali di rene di topo con la micotossina in associazione con il NADPH o l'acido arachidonico come cofattori. I risultati di tali esperimenti hanno rivelato che l'OTA induceva la formazione di mutazioni principalmente in presenza dell'acido arachidonico piuttosto che in presenza del NADPH nel ceppo TA1535 (Obrecht-Pflumio et al., 1999). L'analisi di queste mutazioni ha evidenziato che erano costituite, principalmente, da grandi delezioni. Questi esperimenti sembrano indicare che l'OTA non ha un'azione mutagena diretta sul DNA ma che tuttavia può generare le mutazioni indirettamente in seguito alla bioattivazione metabolica. Infatti è noto che gli xenobiotici possono generare in vivo composti endogeni reattivi che successivamente possono formare addotti al DNA. Ciò è stato dimostrato, ad esempio, per gli estrogeni (Liehr et al., 1993) e per la malondialdeide generata durante i processi di perossidazione lipidica (Seto et al., 1983; Basu et al., 1988).

A tal proposito, Rahimtula e collaboratori (1988) hanno evidenziato la capacità da parte dell'OTA di innescare i processi di perossidazione lipidica, in cellule microsomiali di rene, e generare malondialdeide. Tuttavia, nel test di riparazione SOS del DNA in *E. coli*, l'OTA ha dato risultati positivi sia in presenza che in assenza di sistemi di attivazione metabolica (Malaveille et al., 1994).

I risultati di alcune indagini dimostrano che l'attivazione dell'OTA a composti genotossici avvenga attraverso reazioni biochimiche che coinvolgono enzimi perossidasi e che comportano la formazione di addotti prevalentemente a livello delle basi guaniniche del DNA.

La somministrazione di indometacina o aspirina a topi prima del trattamento con l'OTA riduce la formazione di addotti. Ciò suggerisce il coinvolgimento della prostaglandina sintetasi nella produzione epatica dei metaboliti reattivi dell'OTA. Nel tessuto renale di ratti maschi gli addotti al DNA potevano essere visualizzati anche in seguito ad una singola somministrazione orale di 18 µg/kg p.c. di OTA (Grosse et al., 1995).

Si ipotizza che l'insorgenza di alcuni tumori del rene e della vescica in pazienti provenienti dalle regioni considerate endemiche per la BEN, sia correlabile alla presenza di questi stessi addotti al DNA e ai conseguenti effetti mutageni, evidenziando come i processi metabolici giochino un ruolo importante nell'effetto nefrotossico indotto dalla micotossina (Maaroufi et al., 1994).

Per molto tempo l'OTA è stata considerata una sostanza non genotossica poiché i saggi relativi condotti davano sempre risultati negativi anche se, spesso, controversi. È stato recentemente dimostrato che l'ocratossina A, determina la sintesi non programmata del DNA (UDS) in maniera concentrazione-dipendente, in colture cellulari epiteliali di vescica di maiale ed uroteliali umane trattate con 250-1000 nM della micotossina, tale sintesi, è stata evidenziata anche alle concentrazioni di 50 nM (Follmann et al., 1995).

Nel 1985 Creppy (Creppy et al., 1985) dimostrò che l'OTA induceva frammentazioni del filamento di DNA in colture primarie murine di milza. Queste alterazioni furono anche evidenziate in

esperimenti *in vivo* nel rene, fegato e milza dei topi BALB/c che avevano ricevuto una singola dose intraperitoneale di OTA od anche in seguito a un trattamento cronico (Creppy et al., 1985; Kane et al., 1986). Tali risultati sono stati successivamente confermati da Stetina e Votava nel 1986.

E' stata osservata anche la formazione di micronuclei nelle colture di cellule epiteliali di vescichette seminali degli ovini (Degen et al., 1997), e di effetti clastogenici nei cromosomi in metafase (Dharmshila e Sinha, 1994).

L'OTA provoca un aumento della frequenza degli scambi tra i cromatidi fratelli (SCE) nelle cellule epiteliali della vescica dei maiali (Follmann et al., 1995) e delle aberrazioni cromosomiche (in particolare la trisomia X) in colture di linfociti umani (Manolova et al., 1990).

Sono stati ampiamente studiati anche i potenziali effetti cancerogeni indotti dall'OTA, prevalentemente dopo somministrazione per via orale, in animali da laboratorio, fornendo risultati spesso contrastanti. Nel 1976 lo IARC (International Agency for Research on Cancer) concluse che una valutazione del rischio cancerogeno dell'OTA non potesse essere fatta per l'inadeguato numero di animali utilizzati negli studi effettuati (IARC, 1976).

Due anni dopo Kanizawa e Suzuki (1978) pubblicarono uno studio da cui si evinceva che l'OTA è chiaramente cancerogena nei ratti maschi. In base ai dati di una ricerca successiva, lo IARC concluse che c'erano evidenze limitate della cancerogenicità dell'OTA e che in assenza di dati epidemiologici adeguati non poteva essere fatta una valutazione definitiva della cancerogenicità dei composti in riferimento all'uomo (IARC, 1993).

La micotossina tuttavia sembrava aumentare l'incidenza di tumori epatocellulari nei topi di entrambi i sessi rispetto ai controlli e produceva adenomi e carcinomi nelle cellule renali come evidenziato negli studi condotti dal National Cancer Institute (NTP) (Boorman, 1989). Tali studi, infatti, misero in evidenza che una dose di 210 mg/Kg p.c. di OTA induceva lo sviluppo di neoplasie nel 72% dei topi maschi e nel 16% delle femmine dopo 2 anni di trattamento. Alla dose di 70 mg/kg p.c. il 39% dei maschi e il 4% delle femmine sviluppavano tumori dei tubuli renali.

Le ricerche condotte da Kanisawa e Suzuki (1978) e da Boorman (1989) hanno dimostrato che l'OTA è un cancerogeno renale nei topi e nei ratti e che i maschi risultano essere più sensibili delle femmine.

Sulla base dei dati raccolti lo IARC, nel 1993, ha concluso che i numerosi studi descritti suggeriscono una correlazione tra esposizione all'OTA e la BEN e fra la distribuzione geografica della BEN e l'alta incidenza di mortalità da tumori delle vie urinarie, in quanto i pazienti colpiti da BEN sono risultati 90 volte più a rischio di contrarre tumori della pelvi, del rene e dell'uretere rispetto alla popolazione non colpita. L'OTA è stata classificata pertanto, nel gruppo 2B come sostanza potenzialmente cancerogena per gli uomini.

Non va sottovalutato che la citrinina (prodotta anch'essa da micromiceti del genere *Penicillium*) ha un effetto sinergico con l'OTA nell'induzione di neoplasie renali come delle altre forme di tossicità attribuite alla micotossina e che quindi, come nella nefropatia endemica, spesso l'eziologia della patologia deve essere attribuita alla concomitante presenza di più fattori.

OTA induce effetti embriotossici e teratogeni in diverse specie animali inclusi topi, ratti, polli e quaglie (Kuiper-Goodman e

Scott, 1989; Scudamore et al., 1998) in quanto è stato dimostrato il suo passaggio attraverso la barriera placentare.

Il sistema nervoso centrale è uno dei distretti più suscettibili durante lo sviluppo organogenetico (con necrosi cerebrale). Nei neonati nati da femmine alimentate per via orale con dosi di 1.25 e 2.25 mg/kg p.c. durante i giorni 15, 16, 17 di gestazione, vennero testate alcune funzioni neurocomportamentali come la capacità di salire una superficie verticale, di nuotare e di muoversi in circolo (Poppe et al., 1983). Tutti i test indicavano che l'OTA induceva un marcato ritardo nello sviluppo neurocomportamentale evidenziato durante la crescita postnatale.

La somministrazione di una dose di 5 mg/Kg p.c. di OTA, per via intraperitoneale, a femmine di topo gravide, nei primi 7-12 giorni di gestazione, induceva un aumento della mortalità prenatale, una diminuzione del peso fetale e diverse malformazioni inclusa l'anaencefalia, oltre ad anomalie degli occhi, faccia, dita e coda (Hayes et al., 1974).

La simultanea inoculazione di OTA (2 o 4 mg/kg p.c.) e di tossina T-2 (0,5 mg/kg p.c.), per via intraperitoneale, a topi all'ottavo e decimo giorno di gestazione determinava un incremento dell'incidenza di malformazioni T-2 indotte del feto (anomalie degli arti e della coda). I cuccioli nati da ratti trattati per os con l'ocratossina A, a dosi di 0.75 e 1.0 mg/kg p.c., al 6° - 15° giorno di gestazione, presentavano diminuzione del peso e diverse anomalie a carico dell'apparato scheletrico (coste ondulate e agenesia delle vertebre) (Brown et al., 1976). Inoltre Wangikar e collaboratori (2004) osservarono che anche dosi più basse di OTA (0.125, 0.25, 0.50 mg/Kg) somministrate a ratti durante la gestazione tra il 6° e il 15° giorno causavano alterazioni morfologiche degli organi interni dei feti. In particolare l'esame

istologico degli organi fetali prelevati rivelò un aumento dell'incidenza di lesioni patologiche al fegato, al rene, al cervello e agli occhi. Inoltre la micotossina causava la proliferazione delle cellule del dotto biliare con la formazione di un nuovo dotto biliare, determinava una cattiva ossificazione delle ossa del cranio lasciando il cervello esposto, causava, inoltre, ipoplasia del cervelletto e difetti della retina.

PARTE SECONDA

2. PIANO DI LAVORO

L'ocratossina A è una potente nefrotossina capace di indurre ingenti danni renali in tutte le specie animali studiate; risulta essere molto dannosa anche per l'uomo, con aspetti di tossicità probabilmente imputabili alla lunga emivita che l'OTA mostra possedere in questa specie (O'Brien e Dietrich, 2005).

Negli animali l'OTA sembra indurre una nefropatia tubulo-interstiziale simile a quella osservata in corso di BEN, come pure sembra determinare adenomi e carcinomi renali (Kane et al., 1986; Aukema et al., 2004).

La tossicità dell'ocratossina A non è limitata solo alle alterazioni morfologiche e funzionali renali, ma coinvolge altri organi e sistemi. Studi condotti in vivo su diverse specie animali evidenziano la capacità della micotossina di indurre effetti tossici anche a carico del fegato e del cervello (Creppy et al., 1985; Belmadani et al., 1998), di essere un agente immunomodulatore, spesso immunosoppressivo (Singh et al., 1990; Politis et al., 2005; Harvey et al., 1992) ed un potente teratogeno (Wei e Sulik, 1993; Kuiper-Goodman e Scott, 1989).

I principali meccanismi molecolari, coinvolti nella tossicità dell'OTA, sono l'inibizione della sintesi proteica e l'induzione dello stress ossidativo con formazione di radicali liberi e perossidazione dei lipidi, come suggerito da studi condotti su cellule di mammifero (Gillman et al., 1999; Hoehler et al., 1996,1997; Rahimtula et al., 1988).

Sebbene molti degli effetti tossici e carcinogenetici dell'OTA siano noti, in letteratura ci sono ben poche informazioni, a volte anche contrastanti, sui meccanismi alla base dell'immunotossicità. Infatti, mentre numerosi studi sperimentali hanno evidenziato come

la micotossina in questione sia capace di indurre linfopenia, neutrofilia, eosinofilia, di sopprimere la produzione di anticorpi (Müller et al., 1995, 2003) e di inibire l'attività delle cellule natural killer (Luster et al., 1987); viceversa, si è visto come essa sia capace di incrementare l'attività fagocitica dei macrofagi peritoneali (Boorman et al., 1984).

Sulla base di tale premessa lo scopo della presente ricerca è stato di dare un contributo al chiarimento dei meccanismi d'azione alla base di alcuni degli effetti (a volte controversi) indotti dall'OTA.

In una prima fase dello studio, in vivo, sono state valutate alcune delle alterazioni d'organo strutturali e funzionali indotte nel topo dopo singola somministrazione per via orale di ocratossina A.

Dopo attento esame dei lavori in vivo già pubblicati sulle specie rodentrici e preliminari studi di tossicità, è stata scelta la dose di ocratossina A utilizzata nel trattamento acuto. Tale dose (10 mg/Kg) pur essendo relativamente alta risulta ben lontana dalla DL_{50} per il topo per os (46 mg/Kg) (Moroi et al., 1985).

Più in particolare si è proceduto all'esame di alcuni parametri ematochimici ed urinari di funzionalità epato-renale quali la transaminasi glutammico ossalacetica (GOT), la creatininemia e l'azotemia sul siero e la creatinuria e l'azoturia sulle urine ed è stato valutato il grado di perossidazione lipidica eventualmente indotto dall'OTA nei principali parenchimi.

La perossidazione lipidica è una reazione a catena innescata dai radicali liberi dell'ossigeno, molecole instabili ed altamente reattive per la presenza di elettroni spaiati sull'orbitale esterno (Halliwell, 1991; Gutteridge, 1995). I primi bersagli dei radicali liberi sono i fosfolipidi delle membrane biologiche che vanno incontro a perossidazione lipidica con la formazione di ulteriori

radicali quali la lipoperossi ($\text{LOO}\cdot$), lipidi idroperossi (LOOH), lipidi alcossi ($\text{LO}\cdot$) e prodotti di frammentazione come la malondialdeide (MDA) (Esterbauer et al., 1991; Rizzo et al., 1994).

Tutte queste molecole possono esercitare la loro azione lesiva sul DNA e sulle strutture cellulari soprattutto mitocondriali e lisosomiali, con liberazione di enzimi proteolitici, autodigestione della cellula ed innesco dei processi di morte cellulare programmata (apoptosi e necrosi). Le specie reattive dell'ossigeno si formano normalmente in qualsiasi cellula vivente poiché sovrintendono a tutte le reazioni di ossidoriduzione utili alla sua sopravvivenza. La presenza di modeste quantità di radicali dell' O_2 , hanno, talora, estrema rilevanza nei processi biologici poiché è correlata alla funzione *killing* del fagocita e alla modulazione delle sostanze vasoattive rilasciate dall'endotelio (Halliwell et al., 1992).

Quando in vivo si verifica una produzione continua di radicali liberi (RL), tale da soverchiare la capacità antiossidante dell'organismo, si viene a creare una condizione di stress ossidativo, in cui non sono più garantiti il mantenimento del patrimonio antiossidante ed il contenimento della produzione di RL (Halliwell, 1994).

Lo studio della produzione delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (di cui l'MDA è il maggiore prodotto generato) ha lo scopo di rilevare la capacità della micotossina di indurre uno stress ossidativo e quindi di iniziare la serie di eventi che, secondo quanto riportato, influenzerebbero molto negativamente la sopravvivenza cellulare rappresentando le prime alterazioni di un danno tessutale e d'organo.

In una seconda fase del lavoro in vivo, invece, è stata indagata l'eventuale azione proinfiammatoria dell'OTA che potrebbe in parte almeno spiegare alcuni degli effetti tossici osservati. In

particolare, è stata valutata, mediante saggio della mieloperossidasi (MPO), la migrazione e l'accumulo dei polimorfonucleati nei tessuti infiammati, è noto, infatti, che l'MPO è un enzima contenuto nei granuli intracellulari nei neutrofili azzuffi; la sua presenza, quindi, dà una chiara indicazione dell'infiltrazione di tali cellule durante un processo flogistico. Mediante analisi western blot, invece, è stata indagata la modulazione operata dall'ocratossina A sull'espressione della cicloossigenasi di tipo 2 (COX-2), enzima coinvolto nel processo infiammatorio.

La cicloossigenasi è l'enzima che consente la produzione di prostaglandine, importantissimi mediatori della risposta infiammatoria sintetizzati a partire dall'acido arachidonico. Sono state isolate due isoforme della cicloossigenasi, l'isoforma costitutiva COX-1 e quella inducibile COX-2. La COX-1 ha il compito di controllare omeostaticamente la produzione fisiologica di prostaglandine. In seguito a stimoli fisiologici di varia natura, l'enzima catalizza la biosintesi di trombossano A (TXA)₂ nelle piastrine, della prostaglandina I₂ (PGI-2) nell'endotelio vasale e nella mucosa dello stomaco e della prostaglandina E₂ (PGE-2) nel rene (Smith, 1989; Vane, 1994; Seibert et al., 1997). Dopo stimolazione con LPS o alcune citochine, molti tipi di cellule, incluso le cellule endoteliali e i macrofagi, esprimono l'isoforma inducibile della cicloossigenasi, la COX-2, la quale è responsabile della produzione di numerose prostaglandine proinfiammatorie nella sede del processo flogistico (Xie et al., 1992; Lee et al., 1992; Maier et al., 1990; Fu et al., 1990).

Allo scopo di verificare se la micotossina fosse in grado di modulare anche i meccanismi fisiologici di risposta tissutale che si instaurano durante l'infiammazione è stato valutato il suo ruolo

sull'espressione delle heat shock protein 70, proteine con funzione citoprotettiva espresse dalle cellule in corso di flogosi.

In particolare, le heat shock protein (*hsp*) costituiscono una famiglia di proteine altamente conservate che si ritrovano in tutti gli organismi viventi, dai procarioti agli uomini. Negli eucarioti esse risultano principalmente espresse in fibroblasti, in cellule muscolari lisce ed endoteliali (Ellis, 1987; Trautinger et al., 1999). In base al loro peso molecolare, le proteine da shock termico, si suddividono in sei sottofamiglie: le grandi *hsp* da 110, 90, 70, 60 e 40 kDa e le piccole *hsp* da 30 a 18 kDa (Lindquist e Craig, 1988).

Le *hsp70* costituiscono la parte centrale di un grande e complesso sistema di chaperoni molecolari.

La naturale struttura tridimensionale delle proteine, che è di fondamentale importanza per la loro stabilità e funzione, è determinata dal corretto ripiegamento delle catene polipeptidiche neosintetizzate. Alcune proteine acquisiscono spontaneamente la conformazione idonea, in quanto sono proteine dotate della capacità di autoassemblarsi. Tuttavia, molte altre proteine mancano di questa capacità e restano intrappolate in una conformazione stabile, che non corrisponde alla forma finale normale. In questi casi deve intervenire una chaperonina ad impedire che la molecola si stabilizzi in una conformazione inattiva.

Le heat shock protein 70 sono, tra l'altro, coinvolte in importanti processi cellulari come il trasporto di proteine attraverso le membrane (Herrmann e Neupert, 2000; Pfanner, 2000; Schatz e Dobberstein, 1996), e il disassemblaggio di vescicole rivestite di clatrina (Schmid et al., 1985; Schmid e Rothman, 1985).

Nei mammiferi sono state isolate e caratterizzate due isoforme di *hsp70*; una forma di 73 kDa, costitutivamente espressa nella cellula, essenziale per il corretto ripiegamento della catena

polipeptidica neosintetizzata sotto condizioni fisiologiche, ed una forma inducibile di 72 kDa responsabile della ricostituzione di proteine denaturate in seguito all'esposizione delle cellule ad ipertermia, interventi chirurgici, anestesia, danni tissutali, ischemia, infiammazione, stress ossidativo e nutrizionale ed esposizione a metalli pesanti ed etanolo; inoltre, tali chaperonine, hanno il compito di indirizzare le proteine denaturate verso la degradazione proteosomale e l'espulsione dalla cellula (Blake et al., 1990; Christman et al., 1985; Welch, 1992). Il sistema delle *hsp70* rappresenta, quindi, un naturale meccanismo di protezione della cellula dagli agenti ambientali siano essi di natura fisica o chimica.

Nella seconda fase della ricerca, è stato condotto uno studio in vitro per chiarire, utilizzando un sistema controllato sperimentalmente, alcuni dei meccanismi di tossicità emersi dalle precedenti procedure sperimentali e per approfondire, nelle cellule immunocompetenti, l'effetto immunomodulatore dell'OTA evidenziato nello studio in vivo.

I sistemi in vitro consentono lo studio degli effetti tossici a livello cellulare e molecolare e comprendere i meccanismi alla base di tali effetti è importante per chiarire quanto osservato in vivo ai livelli molto più complessi dell'organismo.

A tale scopo sono state utilizzate cellule macrofagiche della linea continua J774 A.1 per verificare ed approfondire, in seguito al trattamento per tempi diversi e con concentrazioni differenti della micotossina, le modalità di modulazione dell'induzione e quindi dell'espressione di enzimi coinvolti nel processo infiammatorio quali la nitrossido sintasi inducibile (iNOS) e la cicloossigenasi di tipo 2 (COX-2) e per valutare se tale induzione fosse regolata dal fattore di trascrizione NK-kB. Inoltre, è stato indagato, in vitro, il

ruolo di modulazione dell'OTA sull'espressione della heat shock protein inducibile (*hsp72*).

Sono state scelte cellule macrofagiche della linea J774 A.1, per l'esecuzione degli esperimenti in vitro, poiché i macrofagi rivestono un ruolo cruciale nella risposta immune non specifica e acquisita e perchè i risultati già ottenuti sui macrofagi primari indicano un chiaro coinvolgimento di queste cellule nella tossicità indotta dalla micotossina. Diversi fattori ambientali (e anche le micotossine), potenzialmente in grado di influenzare i meccanismi di difesa macrofagica (presentazione di frammenti immunogenici-antigenici ai linfociti T o B, processazione dell'antigene), alterano le risposte immunitarie macrofago-dipendenti.

Inizialmente è stato condotto uno studio di citotossicità per poter selezionare le concentrazioni più appropriate della micotossina da utilizzare nei successivi protocolli sperimentali. Sulla base dei risultati ottenuti, sono state adottate concentrazioni della micotossina di 1 - 3 - 10 μ M.

Quando i macrofagi vengono attivati rilasciano monossido d'azoto (NO). Esso è un messaggero vascolare e neuronale, un agente citotossico e citostatico e mentre a basse concentrazioni contribuisce alla fisiologica regolazione della pressione sanguigna attraverso il mantenimento del tono vasale, l'aumentata sintesi è responsabile della perdita del tono vascolare, dell'ipotensione e dell'inadeguata perfusione tessutale, caratteristica dello shock settico in corso di infezione da batteri gram negativi. L'NO è una molecola estremamente instabile, infatti, viene rapidamente convertita da parte di acqua e ossigeno in nitriti e nitrati che rappresentano i metaboliti stabili ed inattivi della molecola (Palmer et al., 1987). Il monossido d'azoto è il prodotto della ossidazione di uno degli atomi di azoto del gruppo guanidinico dell'aminoacido L-

arginina. Questa reazione è catalizzata dall'enzima nitrossido sintasi (NOS). Sono state isolate e purificate tre distinte isoforme dell'enzima che variano in maniera notevole sia per la loro localizzazione subcellulare che per struttura, cinetica, regolazione e, di conseguenza, per il ruolo funzionale. Due di questi enzimi localizzati a livello endoteliale e neuronale, sono espressi in maniera costitutiva e sono, quindi, chiamati NOS costitutivi (cNOS). Queste due isoforme producono quantità modeste di NO per periodi brevi e sono enzimi Ca^{2+} -calmodulina dipendenti. Rilasciano NO entro pochi secondi dal legame della calmodulina in seguito alla stimolazione recettoriale.

Il monossido d'azoto, prodotto dalle cellule endoteliali e neuronali, stimola una guanilatociclastasi citoplasmatica con formazione di GMPc come secondo messaggero (Moncada et al., 1991). Al contrario, la terza isoforma dell'enzima è Ca^{2+} -calmodulina indipendente e, soprattutto, non è presente nelle cellule quiescenti che devono, quindi, essere stimolate per esprimerla; per questo motivo, è chiamata NOS inducibile. La iNOS è espressa nella maggior parte delle cellule nucleate, tra cui i macrofagi, in seguito a stimolazione con varie citochine come l'INF- γ , IL-1 e il TNF- α e/o lipopolisaccaride della parete batterica dei Gram negativi (LPS). Una volta espresso, l'enzima produce grandi quantità di NO per il tempo in cui si trova in forma attiva. Nei macrofagi l'induzione è parte fondamentale del meccanismo di difesa cellulare per l'eliminazione di microrganismi e cellule tumorali. L'NO è infatti citotossico e citostatico per i batteri, protozoi, cellule tumorali e funghi ma, in alcuni casi, può indurre effetti tossici sulle stesse cellule ospiti (produttrici di NO) e su cellule ad esse adiacenti (Deakin et al., 1995).

Ulteriore obiettivo della presente tesi è stato valutare se l'OTA regola l'espressione della iNOS e della COX-2 e se tale modulazione avviene mediante l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B.

Il fattore di trascrizione NF- κ B gioca un ruolo fisiologico e patologico importante in diverse cellule e tessuti e sembra essere coinvolto nell'induzione di una serie di molecole biologicamente attive come citochine, chemochine, molecole MHC, fattori di crescita e molecole di adesione cellulare.

Dal punto di vista strutturale NF- κ B rappresenta una famiglia di fattori di trascrizione detta "Rel" che forma omodimeri ed eterodimeri il cui prototipo è un eterodimero di p50/NF- κ B1 e p65/RelA. La forma più comune di NF- κ B, situata nel citoplasma cellulare in uno stato inattivo, è costituita da un trimero proteico costituito da p50, p65 e I κ B nel rapporto 1:1:1 (Baeuerle e Henkel, 1994). Ogni monomero è costituito da una porzione che lega il DNA e da una regione regolatoria che interagisce fortemente con una classe di proteine inibitorie specifiche chiamate I κ B. Le proteine I κ B mascherano il segnale di traslocazione nucleare (nuclear localization sequenze) del dimero NF- κ B e impediscono la traslocazione nucleare e l'attivazione dei geni bersaglio (Baldwin, 1996). Sono state identificate diverse isoforme di I κ B, in particolare ne sono state caratterizzate due: I κ B α e I κ B β (Baeuerle e Baltimore, 1998). Sebbene entrambe le proteine interagiscano con la stessa regione di NF- κ B, esse mostrano differenti meccanismi di regolazione ed attività biologiche. Attualmente si ritiene che I κ B α sia coinvolto nella regolazione del processo di attivazione che avviene a livello citoplasmatico, mentre I κ B β sembra favorire la migrazione nucleare e nello stesso tempo prevenire il legame a NF- κ B di I κ B α risintetizzato (Thanos e Maniatis, 1995).

L'attivazione del fattore di trascrizione può essere indotta da agenti biologici (virus e batteri), chimici (H_2O_2 -radicali liberi) o fisici (radiazioni UV, fumo di sigaretta), nonché da alcune citochine, quali l'interleuchina 1 e 2 o il TNF- α e β (Sen et al., 1986).

I meccanismi molecolari responsabili della dissociazione di NF-kB da I κ B sono diversi a seconda del tipo cellulare, della natura e della sede d'origine degli stimoli che li hanno innescati; il meccanismo più chiaramente caratterizzato coinvolge proteinchinasi ed eventi fosforilativi a livello del complesso NF-kB/I κ B. In particolare I κ B viene fosforilato ad opera di chinasi specifiche IKK, in seguito viene ubiquitinato e degradato rapidamente da un proteosoma (Ghosh et al., 1998). Una volta attivo NF-kB trasloca nel nucleo, interagisce con siti specifici del DNA ed inizia la trascrizione di geni coinvolti in numerosi processi fisiologici come sviluppo embrionale, controllo della proliferazione cellulare e dell'apoptosi, sviluppo neuronale e neurodegenerazione (Baeuerle et al., 1994; Baeuerle et al., 1996; O'Neill et al., 1997).

Numerosi lavori, condotti in questi ultimi anni, hanno dimostrato come NF-kB sia responsabile della regolazione dell'espressione degli enzimi iNOS e COX-2 in diverse linee cellulari (cellule macrofagiche murine della linea continua J774A.1; cellule cancerogene umane - adenocarcinoma del colon; colture cellulari dell'endotelio vascolare umano - cellule HUVEC) (D'Acquisto et al., 1997; Kojima et al., 2000; Schmedtje et al., 1997; Xie et al., 1994). Inoltre, è stato evidenziato come uno stress ossidativo, indotto da uno stato di ischemia, possa determinare un incremento dell'espressione del messaggero per l'iNOS e dell'enzima stesso, in tessuti di fegato di ratto, attraverso NF-kB (Hur et al., 1999). Partendo da questi presupposti si è voluto

verificare se NF-kB avesse un ruolo nei meccanismi a monte del processo infiammatorio modulato dall'ocratossina A rappresentando una molecola importante nel processo di regolazione dell'infiammazione.

2.1 DESCRIZIONE DELLE METODOLOGIE APPLICATE

2.1.1 STUDIO IN VIVO DELLA TOSSICITÀ DELL'OCRATOSSINA A

2.1.1.a Trattamento degli animali e determinazione di parametri ematochimici ed urinari

Sono stati utilizzati topi maschi di razza albina del ceppo Swiss del peso di 28 ± 2 g. Gli animali sono stati stabulati a temperatura costante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), con cicli di 12 ore luce-buio e con libero accesso all'acqua e al cibo.

I topi sono stati divisi in gruppo trattati e animali di controllo (8 animali per ciascun gruppo). Agli animali sottoposti al trattamento è stata somministrata per via orale una singola dose di OTA (10 mg/kg p.c.) sciolta in una soluzione di NaHCO_3 0.1 M pH 7.4 in un volume finale di 400 μl ; gli animali di controllo hanno ricevuto il solo veicolo.

La via di somministrazione e la dose di ocratossina A sono state scelte in seguito ad esperimenti preliminari condotti in laboratorio, partendo da dati riportati in letteratura, che hanno consentito di definire la dose capace di indurre tossicità ma non la morte degli animali nelle 24 ore successive alla somministrazione della micotossina (Albassam et al., 1987; Moroi et al., 1985).

Dopo trattamento con OTA gli animali sono stati posti per 24 ore in gabbie metaboliche senza cibo, per la raccolta delle urine.

Trascorso questo periodo gli animali sono stati anestetizzati con enflurano. Si è proceduto, quindi, alla raccolta del sangue mediante puntura intracardiaca e al successivo sacrificio degli animali per dislocazione cervicale.

Dopo lavaggio della cavità peritoneale di tutti gli animali, con 10 ml di soluzione fisiologica, sono stati raccolti i macrofagi peritoneali. Infine, sono stati prelevati fegato, reni, colon, duodeno ed ileo, rapidamente posti in ghiaccio e conservati a -80°C fino al momento delle analisi.

Dopo circa 24 ore dal prelievo, il sangue coagulato è stato centrifugato a 1500 giri per 15 minuti a 4°C ed il siero è stato conservato per la successiva analisi dei parametri biochimici.

Sul siero sono stati ricercati la creatininemia, l'azotemia e l'enzima transaminasi glutammico-ossalacetica (GOT) mediante le abituali tecniche di laboratorio mentre sulle urine si è proceduto alla determinazione dell'azoturia e della creatinuria ed inoltre è stata valutata la presenza di sangue, urobilina, glucosio, proteine, chetoni, nitriti e leucociti ed è stato misurato il pH.

2.1.1.b Saggio della malondialdeide (MDA)

Tale saggio, eseguito su tessuti di fegato e di rene, permette di valutare il grado di perossidazione lipidica attraverso la misura spettrofotometrica dell'assorbanza, a 550 nm, di un addotto colorato che si forma quando la malondialdeide (MDA) reagisce con l'acido tiobarbiturico (TBA) (Test TBARS, ThioBarbituric Acid-Reactive Substances); la concentrazione di MDA in ogni

tessuto viene determinata mediante confronto con una curva standard di riferimento di 1,1,3,3-tetrametossipropano (MDA).

Per eseguire il saggio venivano pesati 0.250 g di tessuto a cui si addizionava 1 ml di KCl all' 1.15%, in seguito il campione veniva omogenato con il Polytron Micro-Turrax T8 (IKA-WERKE) e centrifugato per 22 minuti a 4°C in ultracentrifuga a 15000 giri; infine veniva prelevato il surnatante. A 200 µl di ciascun campione si addizionavano 200 µl di sodiododecilsolfato (SDS) all'8.1%, 1.5 ml di acido acetico al 20%, 1.5 ml di acido tiobarbiturico (TBA) allo 0.8% e 600 µl di acqua distillata. La curva standard di riferimento veniva preparata utilizzando 200 µl di 1,1,3,3-tetrametossipropano al 99% e malonaldehyde bis (dimethyl acetal) al 95% a concentrazioni crescenti (5 µM - 1 mM), 200 µl di sodiododecilsolfato (SDS) all'8.1%, 1.5 ml di acido acetico al 20%, 1.5 ml acido tiobarbiturico, 200 µl di KCl e 600 µl di acqua distillata. Infine veniva preparato un bianco con 200 µl di sodiododecilsolfato (SDS) all'8.1%, 1.5 ml di acido acetico al 20%, 1.5 ml acido tiobarbiturico, 200 µl di KCl e 600 µl di acqua distillata.

Tutte le provette venivano prima bollite per 1 ora a 95°C e poi raffreddate per un'altra ora in camera fredda. In seguito veniva prelevato 1 ml da ciascuna provetta e veniva centrifugato per 20 minuti a 14000 rpm a 4°C. Infine, in una piastra da 96 pozzetti si ponevano per pozzetto 200 µl di bianco, 200 µl di ciascun punto della curva e di tutti i campioni e veniva letta l'assorbanza a 550 nm con un lettore di piastra Multiskar titertek. Le concentrazioni di MDA di ciascun campione venivano calcolate mediante confronto delle assorbanze dei campioni con le OD₅₅₀ della curva di MDA.

2.1.1.c Saggio della mieloperossidasi (MPO)

Il saggio dell'MPO consente di valutare l'attività della mieloperossidasi, un enzima contenuto nei granuli azzurofilari intracellulari dei polimorfonucleati (PMNs). Tale enzima, quindi, può essere utilizzato come indicatore dell'accumulo dei neutrofilari migrati nei tessuti durante un processo infiammatorio.

Per eseguire il saggio venivano pesati 0.100 g di tessuto (duodeno) a cui si addizionava 1 ml di esadeciltrimetilammonio bromuro allo 0.5% solubilizzato in un tampone di fosfato di potassio 50 mM a pH 6.0 (HTAB-buffer), in seguito il campione veniva prima omogenato con il Polytron Micro-Turrax T8 (IKA-WERKE) eseguendo 3 cicli da 10 secondi ognuno alla massima velocità e poi centrifugato a 4°C per 2 minuti a 13000 rpm. Infine, per valutare l'attività della mieloperossidasi sul surnatante prelevato, si caricavano 25 µl di ciascun campione in una piastra da 96 pozzetti a cui si addizionavano 175 µl di un buffer costituito da O-dianisidina diidrocloreuro solubilizzata in un tampone di fosfato di potassio 50 mM a pH 6.0 e da perossido di idrogeno all'1%. Venivano piastrati anche 25 µl di bianco costituito da HTAB buffer a cui si addizionava lo stesso buffer utilizzato per i campioni. L'assorbanza veniva misurata a 450 nm con un lettore di piastra Multiskar titertek effettuando la lettura dopo 30, 60 e 90 secondi a partire dal primo campione piastrato.

Le unità di mieloperossidasi (U.MPO) di ciascun campione sono state estrapolate considerando che 1 U.MPO è uguale ad 1 µmole di H₂O₂ convertita in un composto colorato che dà una variazione di assorbanza di 1.13 x 10⁻² nm/min. Le unità di mieloperossidasi sono state infine espresse come unità di MPO/µg

di proteine totali presenti nell'omogenato la cui concentrazione proteica è stata determinata mediante il dosaggio Biorad.

2.1.1.d Valutazione dell'induzione enzimatica della COX-2 e dell'hsp72 nei macrofagi peritoneali mediante analisi western blot

Il liquido di lavaggio raccolto dalla cavità peritoneale di ciascun animale veniva centrifugato a 1500 rpm per 10 minuti e la pellet, veniva sospesa nel mezzo di Eagle modificato da Dulbecco (DMEM) e supplementato con FBS al 10%, NaHCO₃ al 4.4%, penicillina (100 U/ml), streptomicina (100 µg/ml), L-glutammina (2 mM) ed hepes (25 mM). Le cellule venivano lasciate aderire in piastre aderenti P60 per 3 ore a 37°C in atmosfera umidificata con una pressione parziale di anidride carbonica pari al 5%. In seguito veniva prelevato il surnatante per il dosaggio dei nitriti e le cellule venivano lavate con soluzione fisiologica fredda per 2 volte e lisate con una specifica soluzione lisante (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM, NaF 10 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, Na₃VO₄ 1 mM, leupeptina 10 µg/ml, inibitore della tripsina 10 µg/ml) in ghiaccio per un'ora. In seguito i lisati cellulari venivano centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C e conservati a - 80°C fino al loro utilizzo per l'analisi western blot.

La concentrazione proteica dei lisati cellulari veniva determinata con il dosaggio proteico Bio-Rad, utilizzando come riferimento una curva standard di albumina sierica bovina (BSA, 1 µg/µl).

Per l'analisi western blot ai lisati cellulari dei macrofagi peritoneali (30 µg di proteine) veniva addizionato il tampone di

Laemmli (50 mM di Tris-HCl a pH 6.8 contenente il 10% (v/v) di glicerolo, il 5% di 2-mercaptoetanololo, lo 0.1% di sodiododecilsolfato (SDS), lo 0.002% (p/v) di blu bromofenolo) ed essi venivano bolliti per 5 minuti a 95°C.

Le proteine provenienti dal lisato cellulare di ogni campione venivano separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide all'8% in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE). Le proteine separate venivano poi trasferite dal gel di separazione su una membrana di nitrocellulosa (Amersham) mediante un apparato di trasferimento semi-umido (Bio-Rad) ad amperaggio costante di 264 mA per 45 minuti a temperatura ambiente. Dopo il trasferimento le membrana venivano lavate due volte con PBS 1X ed in seguito, per saturare i siti di interazione aspecifica, venivano trattate con una soluzione di PBS 1X al 5% di latte scremato (Bio-Rad) per 40 minuti a temperatura ambiente. Le membrane venivano quindi incubate per 20 ore a 4°C rispettivamente con un anticorpo primario anti-COX-2, diluito 1:1250 in PBS 1X al 5% di latte scremato e allo 0.1% di tween-20 (PMT), per la valutazione dell'espressione della COX-2, e con un anticorpo primario anti-*hsp72*, diluito 1:30000 in PMT, per la valutazione dell'espressione della proteina da shock termico inducibile. Le membrane venivano in seguito lavate per 4 volte con PMT per allontanare quote residuali dell'anticorpo primario ed incubate con un anticorpo secondario-HRP diluito 1:2000 (anticorpo anti-immunoglobulina di coniglio legato alla perossidasi di rafano). Le bande proteiche che avevano reagito con gli anticorpi coniugati alla perossidasi di rafano venivano visualizzate su film ai raggi X (X-Omat JB-1, Kodak) dopo 1-10 minuti di esposizione mediante metodiche di chemiluminescenza (ECL-Kit Amersham).

Proteine a peso molecolare noto venivano utilizzate come standard (Rainbow™, Amersham).

2.1.1.e Valutazione dell'induzione enzimatica della COX-2 e della hsp72 nei tessuti mediante analisi western blot

I tessuti di fegato e di rene, prelevati da ciascun animale, venivano lisati con un tampone lisante costituito da una soluzione 20 mM di Tris-HCl pH 7.5, 10 mM di NaF, 150 mM di NaCl, 1 mM di fenilmetilsulfonilfluoruro, 1 mM di Na₃VO₄, 10 µg/ml di leupeptina, 10 µg/ml dell'inibitore della tripsina e dall'1% di Nonidet P-40. I lisati venivano tenuti in ghiaccio per un'ora e poi centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C e conservati a – 80°C fino al loro utilizzo per l'analisi western blot.

Dopo aver determinato la concentrazione proteica di ciascun campione mediante il dosaggio Bio-Rad, allo scopo di valutare il possibile ruolo di modulazione di OTA sull'espressione della COX-2 e dell'*hsp72* veniva eseguita un'analisi western blot secondo la metodica descritta nel paragrafo 2.1.1.d.

2.1.2 STUDIO IN VITRO DELLA TOSSICITÀ DELL'OCRATOSSINA A

2.1.2.a Colture cellulari

Sono state utilizzate cellule macrofagiche murine della linea cellulare continua J774 A.1. Le cellule venivano tenute in coltura in mezzo di crescita di Eagle modificato da Dulbecco (DMEM) e supplementato con siero fetale bovino al 10% (FBS), NaHCO₃ al 4.4%, penicillina (100 U/ml), streptomina (100 µg/ml), L-glutammina (2 mM), hepes (25 mM).

Le cellule venivano tenute in coltura in monostrato in dischi di Petri da 60 mm (P60), ed incubate a 37°C in atmosfera umidificata con una pressione parziale di anidride carbonica pari al 5%.

2.1.2.b Valutazione della vitalità cellulare con il test dell' MTT

L'attività citotossica dell'OTA su cellule macrofagiche murine J774 A.1 veniva valutata attraverso il saggio di citotossicità con MTT (sale di tetrazolio). Tale sale solubile, di colore giallo, viene convertito nella forma insolubile (sale di formazano) di colore amaranto dalle deidrogenasi mitocondriali di cellule vive, per cui la misura spettrofotometrica dell'assorbanza del campione sarà funzione della quota di colorante convertito dalle cellule vitali.

Dopo distacco con sistema meccanico, le cellule venivano poste in piastre da 96 pozzetti in numero di $3 \times 10^4 / 100 \mu\text{l} / \text{pozzetto}$ in mezzo completo (DMEM al 10% di FBS).

Dopo 2 ore di adesione le cellule venivano incubate in DMEM al 5% di FBS con ocratossina A a concentrazioni crescenti (30 nM - 100 μM) sino ad un volume finale di 150 μl . Dopo 72 ore di incubazione a 37°C venivano aggiunti 25 μl di 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT, 5 mg/ml) in ogni pozzetto; e dopo 3 ore le cellule venivano lisate con 100 μl di una soluzione lisante (20% di sodio dodecil solfato e 50% di dimetil formamide, pH 4.7). Dopo un'incubazione di 20 ore a 37°C, la piastra veniva analizzata mediante lettore di piastra Multiskar titertek a 620 nm. L'analisi delle densità ottiche dei campioni (OD_{620}), confrontata con quella dei controlli consentiva di ottenere una curva concentrazione-effetto della tossicità per la linea cellulare in esame (Mosmann, 1983).

I risultati venivano espressi come percentuale di mortalità media \pm S.E.M.

2.1.2.c Trattamento dei macrofagi murini J774A.1 con ocratossina A ed allestimento dei lisati cellulari

Le cellule ($1.5 \times 10^6 / \text{ml}$) venivano lasciate aderire in piastre aderenti P60 per 3 ore in mezzo completo (DMEM al 10% di FBS) a 37°C e al 5% di CO_2 in atmosfera umidificata. In seguito, le cellule venivano trattate con OTA alle concentrazioni di 1, 3 e 10 μM . Dopo 72 ore di incubazione il mezzo veniva sostituito con DMEM al 5% di FBS e dopo 22 ore veniva prelevato il surnatante

per eseguire il dosaggio dei nitriti. Le cellule, lavate con un tampone fosfato salino (PBS) freddo, venivano poi lisate con una specifica soluzione lisante (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM, NaF 10 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, Na_3VO_4 1 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, inibitore della tripsina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in ghiaccio per un'ora. In seguito i lisati cellulari venivano centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C e conservati a - 80°C fino al loro utilizzo per l'analisi western blot.

La concentrazione proteica dei lisati cellulari veniva determinata con il dosaggio proteico Bio-Rad, mediante una curva standard di albumina sierica bovina (BSA, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

2.1.2.d Valutazione dell'induzione dell'espressione dell'iNOS e della COX-2 mediante analisi western blot

Ai lisati cellulari (70 μg di proteine), ottenuti con la metodica esposta nel paragrafo 2.1.2.c, veniva addizionato il tampone di Laemmli (50 mM di Tris-HCl a pH 6.8 contenente il 10% (v/v) di glicerolo, il 5% di 2-mercaptoetanololo, lo 0.1% di sodiododecilsolfato (SDS), lo 0.002% (p/v) di blu bromofenolo) ed essi venivano bolliti per 5 minuti a 95°C.

Le proteine provenienti dal lisato cellulare di ogni campione venivano separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide all'8% in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE). Le proteine separate venivano poi trasferite dal gel di separazione su una membrana di nitrocellulosa (Amersham) mediante un apparato di trasferimento semi-umido (Bio-Rad) ad amperaggio costante di 264 mA per 45 minuti a temperatura ambiente. Dopo il trasferimento le membrana venivano lavate due volte con PBS 1X

ed in seguito, per saturare i siti di interazione aspecifica, venivano trattate con una soluzione di PBS 1X al 5% di latte scremato (Bio-Rad) per 40 minuti a temperatura ambiente. Le membrane venivano quindi incubate per 20 ore a 4°C rispettivamente con un anticorpo primario anti-iNOS, diluito 1:1000 in PBS 1X al 5% di latte scremato e allo 0.1% di tween-20 (PMT), per la valutazione dell'espressione dell'iNOS e con un anticorpo primario anti-COX-2, diluito 1:1250 in PMT, per la valutazione dell'espressione della COX-2. Le membrane venivano successivamente lavate per 4 volte con PMT per allontanare quote residuali dell'anticorpo primario ed in seguito venivano incubate con un anticorpo secondario-HRP diluito 1:2000 (anticorpo anti-immunoglobulina di topo e di coniglio legato alla perossidasi di rafano rispettivamente).

Le bande proteiche che avevano reagito con gli anticorpi coniugati alla perossidasi di rafano venivano visualizzate su film ai raggi X (X-Omat JB-1, Kodak) dopo 1-10 minuti di esposizione mediante metodiche di chemiluminescenza (ECL-Kit Amersham).

Proteine a peso molecolare noto venivano utilizzate come standard (Rainbow™, Amersham).

2.1.2.e Valutazione dell'induzione dell'espressione dell'hsp72 e di IκBα mediante analisi western blot

Per la valutazione dell'induzione nel tempo dell'espressione dell'hsp72 e di IκBα, mediante analisi western blot, le cellule venivano incubate con la micotossina (3 μM) per 3, 5, 7, 20 e 24 ore e per 5, 15, 30, 45, 60 e 120 minuti rispettivamente.

Trascorsi questi tempi ciascun campione veniva lisato, come descritto nel paragrafo 2.1.2.c, e di ciascun lisato ottenuto veniva determinata la concentrazione proteica mediante il dosaggio Bio-Rad per la successiva analisi western blot eseguita secondo la metodica descritta nel paragrafo 2.1.2.d. In questo caso, però, le membrane venivano incubate con un anticorpo primario anti-*hsp72*, diluito 1:30000 in PMT, per la valutazione dell'espressione della proteina da shock termico inducibile e con un anticorpo primario anti-IkBa, diluito 1:2000, per la valutazione dell'espressione di IkBa. In seguito esse venivano incubate con un anticorpo secondario-HRP diluito 1:2000 (anticorpo anti-immunoglobulina di coniglio legato alla perossidasi di rafano).

2.1.2.f Determinazione del rilascio di monossido d'azoto mediante dosaggio dei nitriti

La modulazione dell'espressione dell'iNOS veniva valutata mediante rilevazione del suo prodotto finale, il monossido d'azoto (NO), adoperando il metodo di Thomsen (1991). Tale metodo valuta il rilascio dei nitriti, quali metaboliti diretti dell'NO, nel surnatante delle cellule trattate, attraverso una reazione colorimetrica con il reattivo di Griess (1% di sulfanilamide e 0.1% di naftiletilendiamina in acido fosforico al 5%). 100 µl di reattivo di Griess venivano aggiunti a 100 µl del surnatante in una piastra da 96 pozzetti e dopo 10 minuti veniva letta l'assorbanza a 550 nm con un lettore di piastra Multiskar titertek a 550 nm. Le concentrazioni di NO₂⁻ (µM) venivano calcolate mediante confronto delle assorbanze dei campioni con le OD₅₅₀ di una retta

standard di nitrito di sodio preparata nel mezzo di coltura al 5% di FBS che è stato anche utilizzato come bianco in tutti gli esperimenti.

2.1.2.g Analisi statistica

I risultati sono stati espressi come media \pm S.E.M.

Per la valutazione statistica dei risultati è stato utilizzato l'Anova test, seguito dal test di Bonferroni.

PARTE TERZA

3. RISULTATI

3.1 RISULTATI DEGLI ESPERIMENTI IN VIVO

3.1.1 Valutazione dei parametri ematochimici ed urinari

La somministrazione di una singola dose per via orale di OTA (10mg/Kg) determina un evidente effetto nefrotossico ed epatotossico nel topo. L'analisi dei parametri ematochimici ed urinari rivela, infatti, una alterata funzionalità renale in quanto si osserva un lieve incremento della creatinemia ed un aumento significativo dei livelli sierici dell'azotemia (Tabella 6a) (Figura 7).

L'analisi del siero consente, inoltre, di rilevare anche un aumento significativo dell'enzima transaminasi glutammico-ossalacetica (GOT) nei topi sottoposti al trattamento con l'OTA ($p < 0.05$) rivelando un'alterazione della struttura e probabilmente della funzione delle cellule epatiche (Figura 7) (Tabella 6a).

Incremento significativo è stato anche riscontrato nelle concentrazioni urinarie dell'azoturia e della creatinuria negli animali trattati con la micotossina rispetto agli animali di controllo (Tabella 6b) (Figura 8). L'analisi biochimica delle urine non rivela altre alterazioni di rilievo considerando l'assenza di emazie, urobilina, glucosio, nitriti e leucociti negli animali trattati rispetto ai valori fisiologici di riferimento con un pH invariato in entrambi i gruppi.

Tuttavia il riscontro di chetoni e tracce di proteine indica la presenza nei soggetti trattati di cataboliti del metabolismo delle proteine (Tabella 6c).

a)

Gruppo	Azotemia (mg/dl)	Creatininemia (mg/dl)	GOT (IU/l)
Animali di controllo	42.72±2.1	0.25±0.05	100.00±14.3
Animali trattati con OTA	73.95±7.3**	0.27±0.06	190.00±11.4**

b)

Gruppo	Azoturia (mg/dl)	Creatinuria (mg/dl)
Animali di controllo	3296±1261	30.36±8.0
Animali trattati con OTA	8643±691*	58.92±7.3*

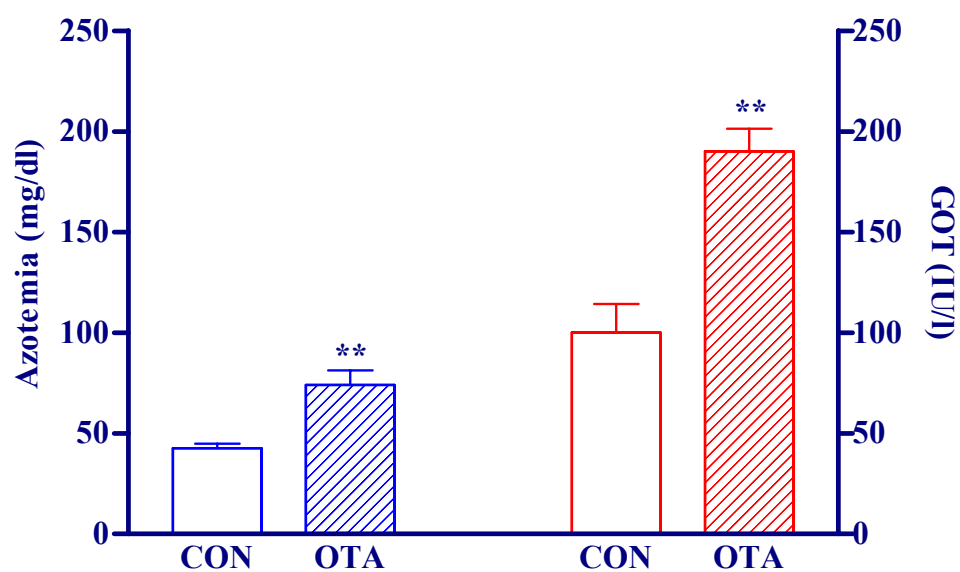
c)

	Animali di controllo	Animali trattati con OTA
Peso specifico	1010	1015
pH	7	7
Leucociti	Neg	Neg
Nitriti	Neg	Neg
Proteine	Neg	Tracce
Glucosio	Neg	Neg
Chetoni	Neg	+
Urobilina	Neg	Neg
Sangue	Neg	Neg

Tabella 6 - a) Livelli sierici dell'azotemia, della creatininemia e dell'enzima transaminase glutammico ossalacetica (GOT) negli animali trattati con OTA (10 mg/Kg) e negli animali di controllo. **b)** Livelli urinari dell'azoturia e della creatinuria. **c)** Analisi biochimica delle urine prelevate, nell'arco delle 24 ore, da animali di controllo e da animali trattati con OTA (10 mg/Kg). I valori riportati sono espressi come media ± S.E.M.

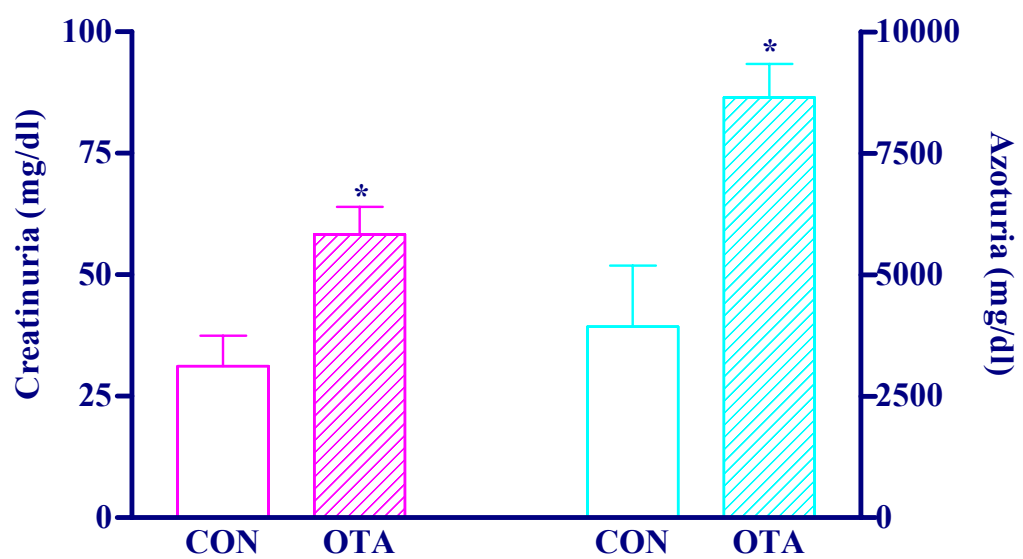
* p<0.05 vs Controllo

** p<0.01 vs Controllo



**** p<0.01 vs controllo**

Figura 7 - Livelli di azotemia e dell'enzima transaminasi glutammico-ossalacetica (GOT) rilevati nel siero prelevato dopo 24 ore dalla somministrazione di OTA (10 mg/Kg) nel topo.



* $p < 0.05$ vs controllo

Figura 8 - Livelli di creatinuria ed azoturia rilevati nelle urine di topo raccolte nelle 24 ore successive alla somministrazione per via orale di OTA (10 mg/Kg).

3.1.2 Valutazione del grado di perossidazione lipidica mediante saggio della malondialdeide (MDA)

I dati ottenuti mediante il saggio dell'MDA mostrano che l'OTA, alla dose di 10 mg/Kg, induce, 24 ore dopo il trattamento per os, un aumento significativo della perossidazione lipidica a livello epatico (2.99 ± 0.44 vs 1.22 ± 0.11 μM / di proteine tissutali, $p < 0.01$) e renale (6.23 ± 0.32 vs 3.09 ± 0.34 $\mu\text{M}/\text{mg}$ di proteine tissutali, $p < 0.001$) (Figura 9), mentre non è stata osservata un'evidente produzione delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico negli altri tessuti analizzati (duodeno, ileo, colon).

3.1.3 Valutazione della migrazione dei polimorfonucleati nei tessuti infiammati. Saggio della mieloperossidasi (MPO)

L'azione proinfiammatoria della micotossina è stata studiata attraverso il saggio dell'MPO, enzima contenuto nei granuli azzurrofilari dei neutrofili, utilizzato come indicatore della infiltrazione dei polimorfonucleati in corso di flogosi.

L'attività tossica dell'OTA è associata ad un aumento dell'infiltrazione dei polimorfonucleati nel duodeno degli animali trattati rispetto agli animali di controllo, come dimostrato indirettamente dall'incremento della mieloperossidasi 24 ore dopo la somministrazione di OTA (5.87 ± 1.9 vs 0.61 ± 0.1 U.MPO/mg di proteine tissutali, $p < 0.05$) (Figura 10). A livello renale ed epatico non sono state evidenziate alterazioni significative di tale parametro.

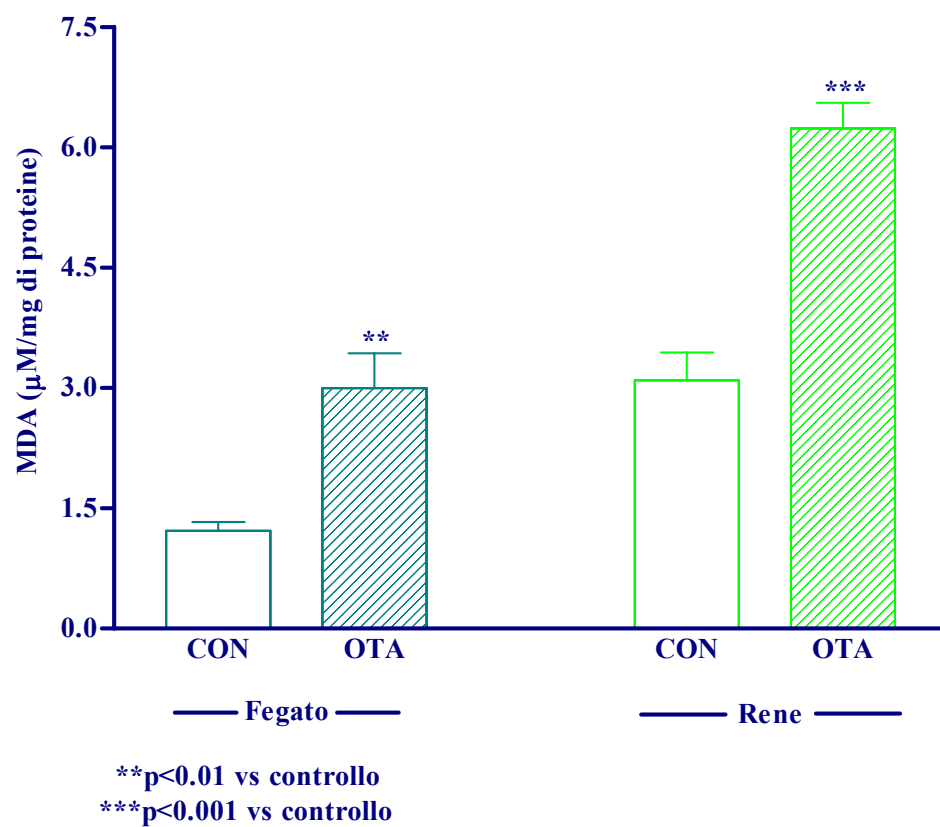


Figura 9 - Livelli di MDA indotti nel fegato e nel rene di topo dopo singola somministrazione di OTA alla dose di 10 mg/Kg. I valori sono espressi come media \pm S.E.M.

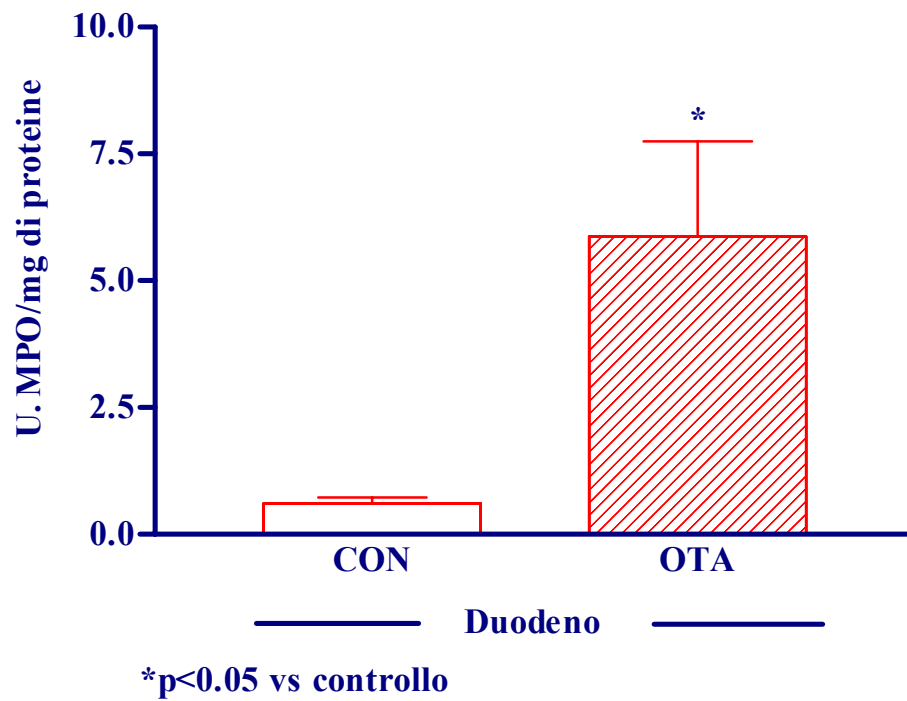


Figura 10 - Livelli di MPO nel duodeno indotti nel topo dopo singola somministrazione di OTA alla dose di 10 mg/Kg. I valori sono espressi come media \pm S.E.M.

3.1.4 Valutazione dell'espressione della COX-2 e della hsp72 mediante analisi western blot

Dall'analisi western blot eseguita sui lisati cellulari di macrofagi peritoneali, prelevati da ciascun gruppo di animali sottoposti alla sperimentazione, è risultato evidente che l'OTA induce un aumento significativo dell'espressione della COX-2 (20.16 ± 4.0 vs 4.72 ± 1.5) (Figura 11) e dell'*hsp72* (9.41 ± 2.8 vs 0.52 ± 0.07) (Figura 12).

I risultati dell'analisi western blot eseguita sui lisati tissutali di rene mostrano una riduzione significativa dell'espressione della COX-2 (0.86 ± 0.3 vs 5.77 ± 1.7) e dell'*hsp72* (5.34 ± 0.09 vs 10.33 ± 1.7) negli animali trattati con la micotossina rispetto ai controlli (Figura 13, 14). Anche nel tessuto epatico l'OTA determina una riduzione significativa della COX-2 (0.35 ± 0.1 vs 1.21 ± 0.2) e dell'*hsp72* (1.15 ± 0.3 vs 2.7 ± 0.5) rispetto agli animali di controlli (Figura 15, 16).

Le membrane di nitrocellulosa, su cui sono state trasferite le proteine contenute nei lisati cellulari dei macrofagi peritoneali e nei lisati tissutali di rene e fegato, sono state cimentate con un anticorpo primario anti- β -actina, per accertare la buona esecuzione della metodica.

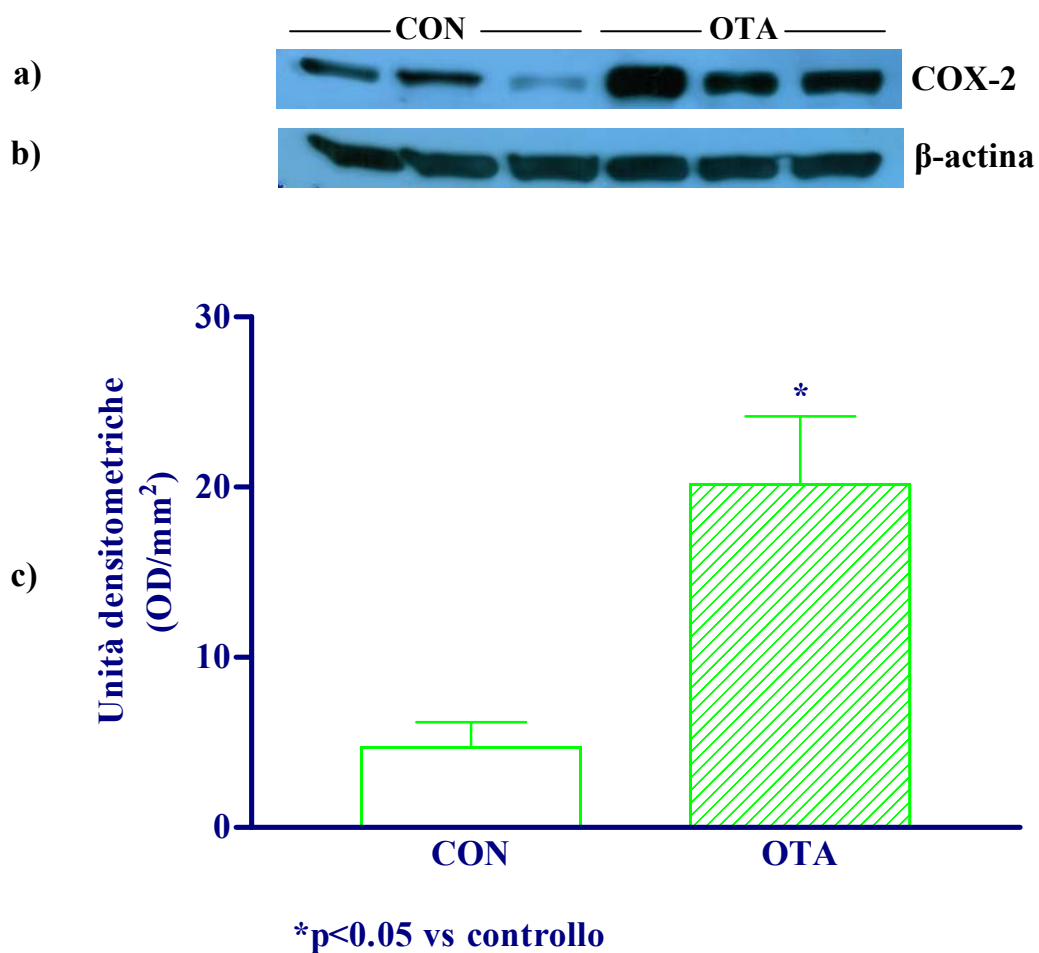


Figura 11 - a) Immunoblot rappresentativo dell'espressione della COX-2 misurata mediante analisi western blot eseguita su lisati cellulari di macrofagi peritoneali ottenuti da topi 24 ore dopo singolo trattamento. **b)** Immunoblot indicativo dell'espressione della β -actina eseguito a conferma di una corretta esecuzione sperimentale. **c)** Risultati dell'analisi densitometrica espressi come media \pm S.E.M di tre esperimenti separati.

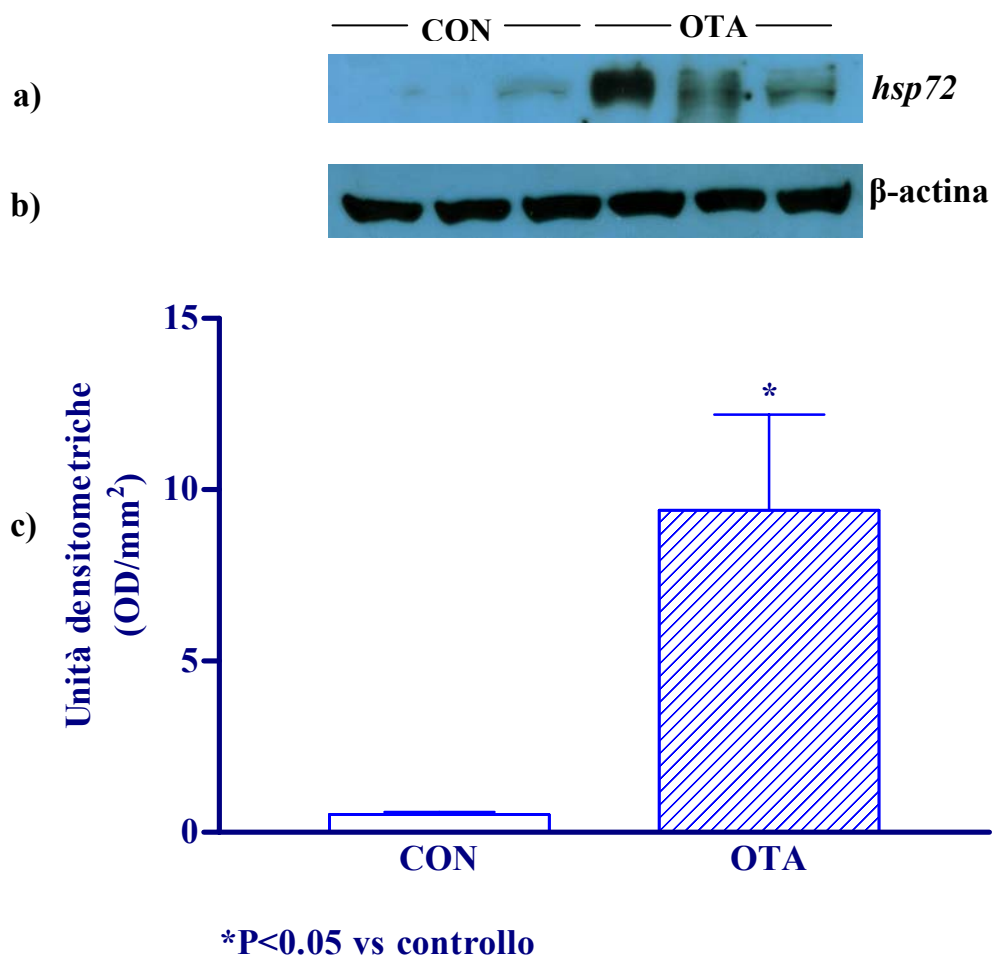
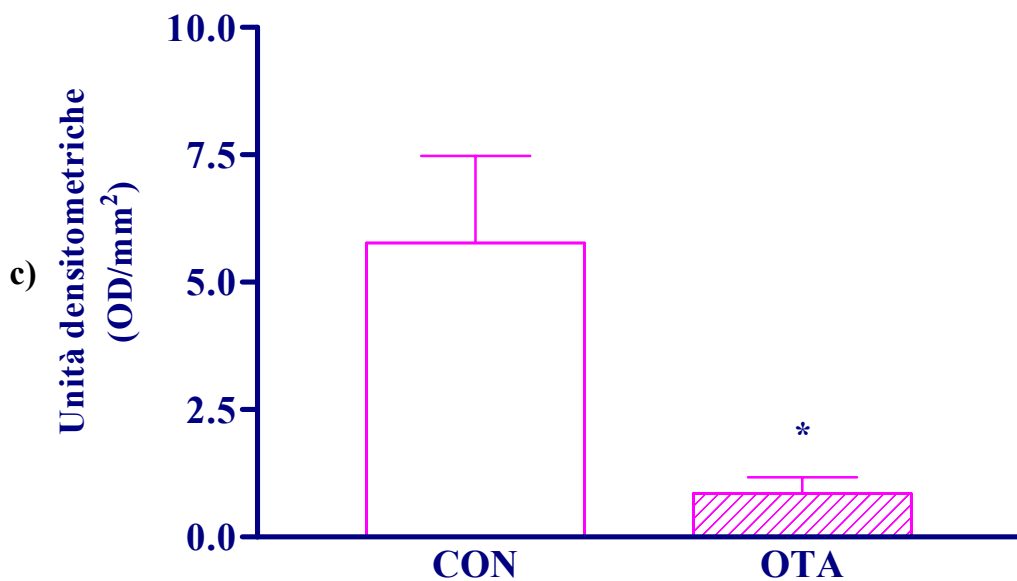
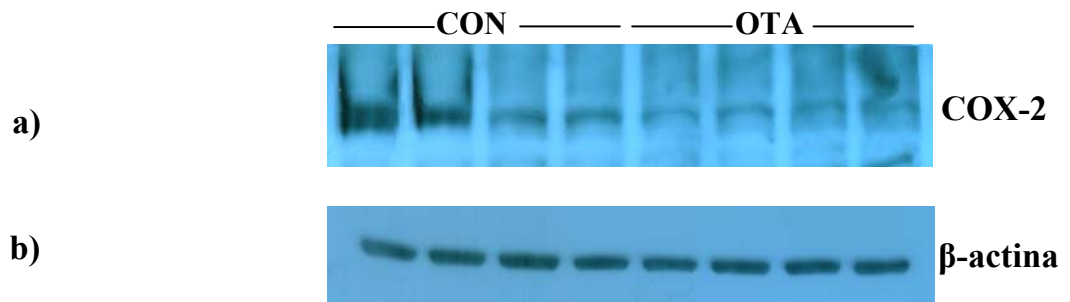


Figura 12 - a) Immunoblot rappresentativo dell'espressione della *hsp72* misurata mediante analisi western blot eseguita su lisati cellulari di macrofagi peritoneali ottenuti da topi 24 ore dopo un singolo trattamento. **b)** Immunoblot indicativo dell'espressione della β -actina eseguito a conferma di una corretta esecuzione sperimentale. **c)** Risultati dell'analisi densitometrica espressi come media \pm S.E.M di tre esperimenti separati.



*p<0.05 vs controllo

Figura 13 - a) Immunoblot rappresentativo dell'espressione della COX-2 misurata mediante analisi western blot eseguita su lisati tissutali di rene ottenuti da topi 24 ore dopo un singolo trattamento. **b)** Immunoblot indicativo dell'espressione della β -actina eseguito a conferma di una corretta esecuzione sperimentale. **c)** Risultati dell'analisi densitometrica espressi come media \pm S.E.M di quattro esperimenti separati.

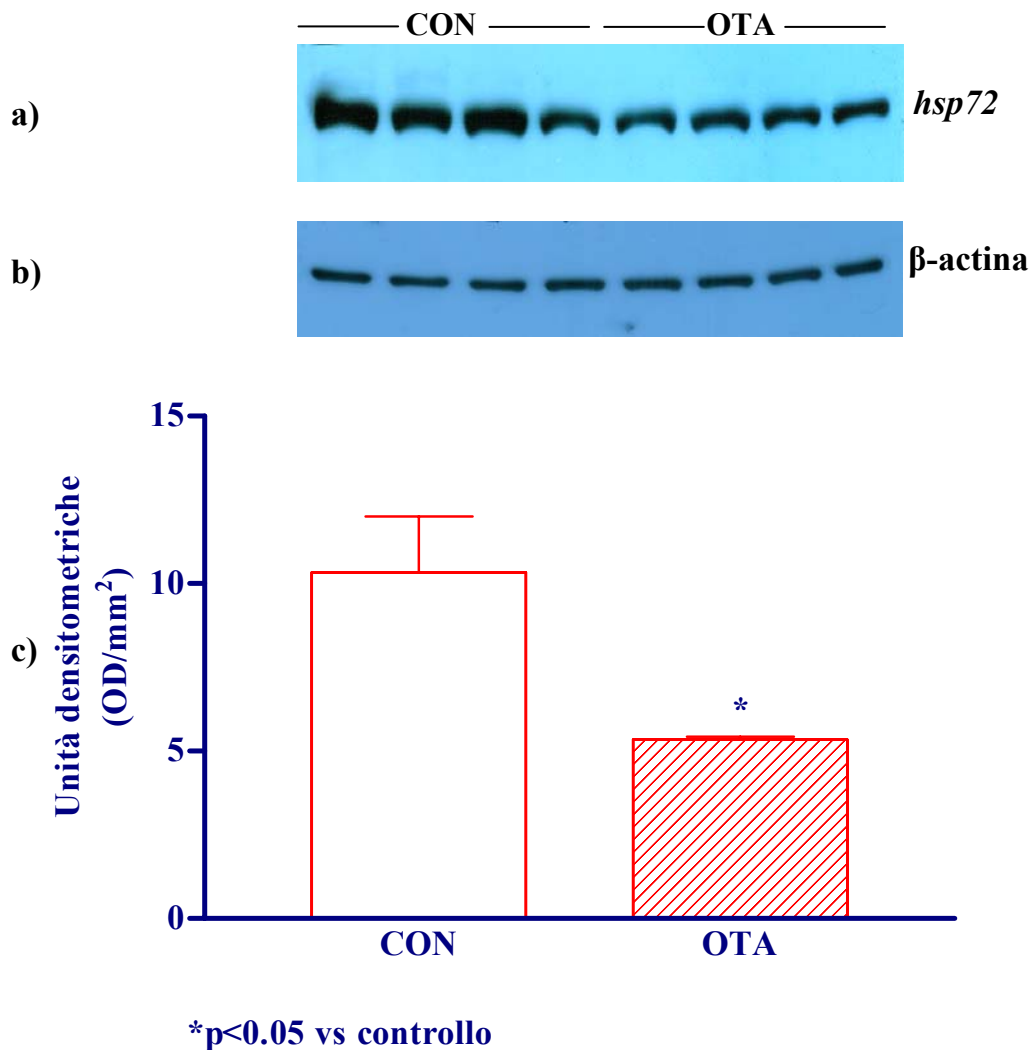
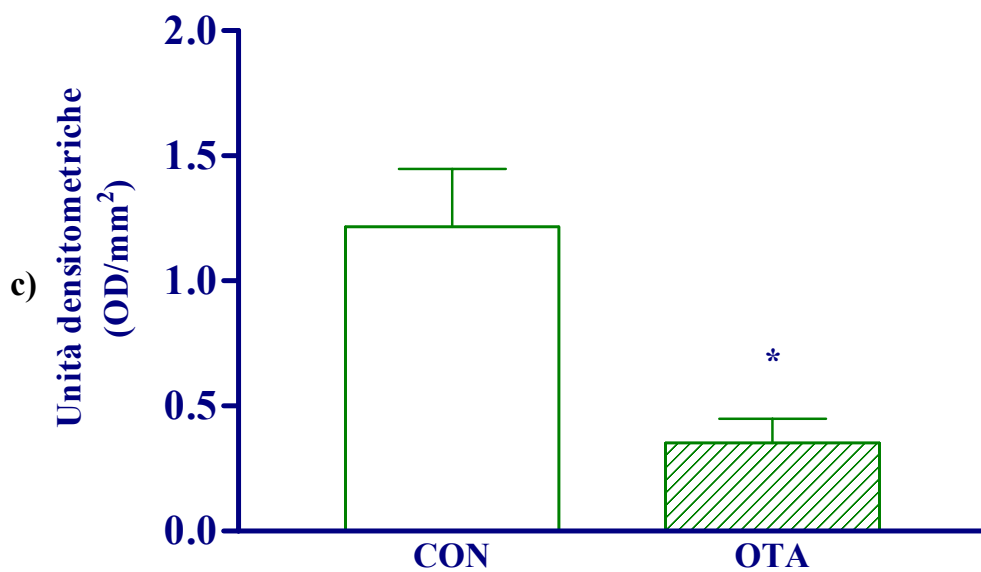
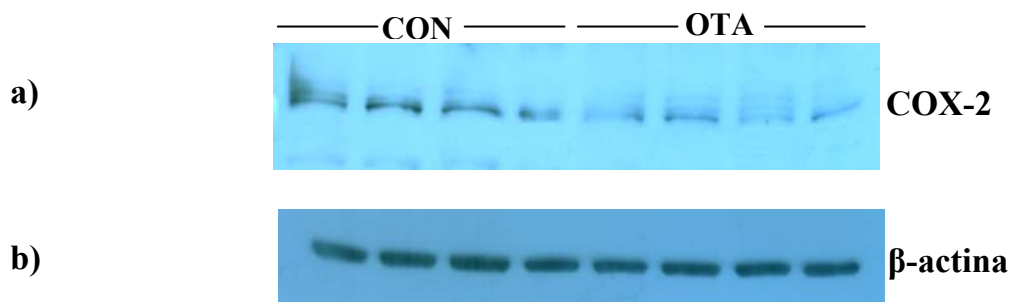
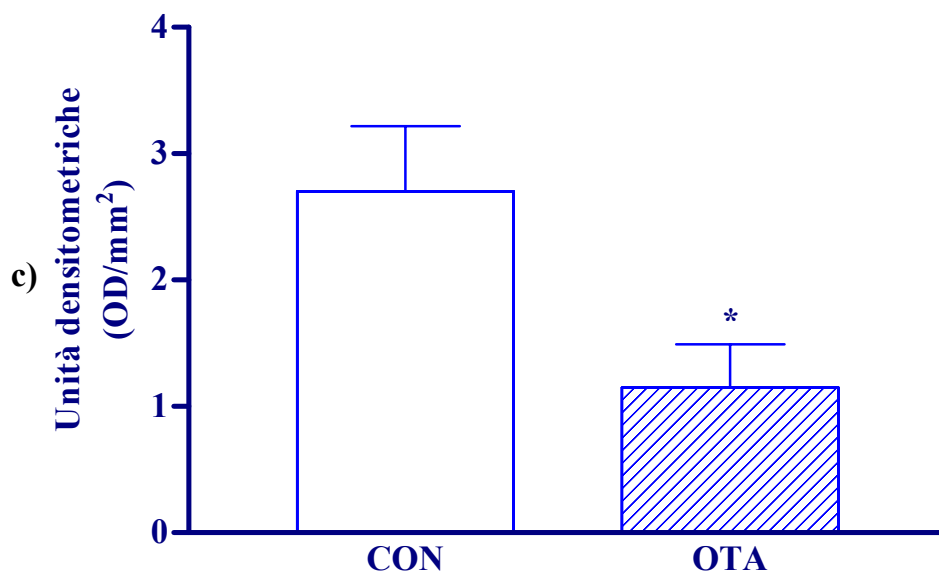


Figura 14 - a) Immunoblot rappresentativo dell'espressione della *hsp72* misurata mediante analisi western blot eseguita su lisati tissutali di rene ottenuti da topi 24 ore dopo un singolo trattamento. **b)** Immunoblot indicativo dell'espressione della β -actina eseguito a conferma di una corretta esecuzione sperimentale. **c)** Risultati dell'analisi densitometrica espressi come media \pm S.E.M di quattro esperimenti separati.



*p<0.05 vs controllo

Figura 15 - a) Immunoblot rappresentativo dell'espressione della COX-2 misurata mediante analisi western blot eseguita su lisati tissutali di fegato ottenuti da topi 24 ore dopo un singolo trattamento. **b)** Immunoblot indicativo dell'espressione della β -actina eseguito a conferma di una corretta esecuzione sperimentale. **c)** Risultati dell'analisi densitometrica espressi come media \pm S.E.M di quattro esperimenti separati.



* $p < 0.05$ vs controllo

Figura 16 - a) Immunoblot rappresentativo dell'espressione della *hsp72* misurata mediante analisi western blot eseguita su lisati tessutali di fegato ottenuti da topi 24 ore dopo un singolo trattamento. **b)** Immunoblot indicativo dell'espressione della β -actina eseguito a conferma di una corretta esecuzione sperimentale. **c)** Risultati dell'analisi densitometrica espressi come media \pm S.E.M di quattro esperimenti separati.

3.2 RISULTATI DEGLI ESPERIMENTI DI TOSSICITA' IN VITRO

3.2.1 Valutazione della citotossicità dell'ocratossina A su cellule J774 A.1

E' stata valutata l'azione citotossica dell'ocratossina A (30 nM - 100 μ M) su cellule macrofagiche murine della linea continua J774 A.1 mediante il saggio di citotossicità con MTT. I risultati mostrano che la micotossina, dopo 72 ore di trattamento, induce una mortalità cellulare concentrazione dipendente. Infatti, si osserva che le concentrazioni di OTA testate inducono l'effetto di mortalità cellulare in percentuale variabile dal 12% al 70% rispetto al controllo cui è stata attribuita una vitalità del 100% (Figura 17).

La LC₅₀ (lethal concentration 50) risulta essere di 18.5 μ M confermando, in analogia a quanto riportato negli studi in vivo, la particolare sensibilità del sistema immunitario all'azione della micotossina. Come risulta dalla figura 17 le concentrazioni della micotossina (1-3-10 μ M) inducono un danno cellulare correlato ad un effetto citotossico non particolarmente marcato. Tali concentrazioni sono state, quindi, utilizzate nello svolgimento delle successive procedure sperimentali.

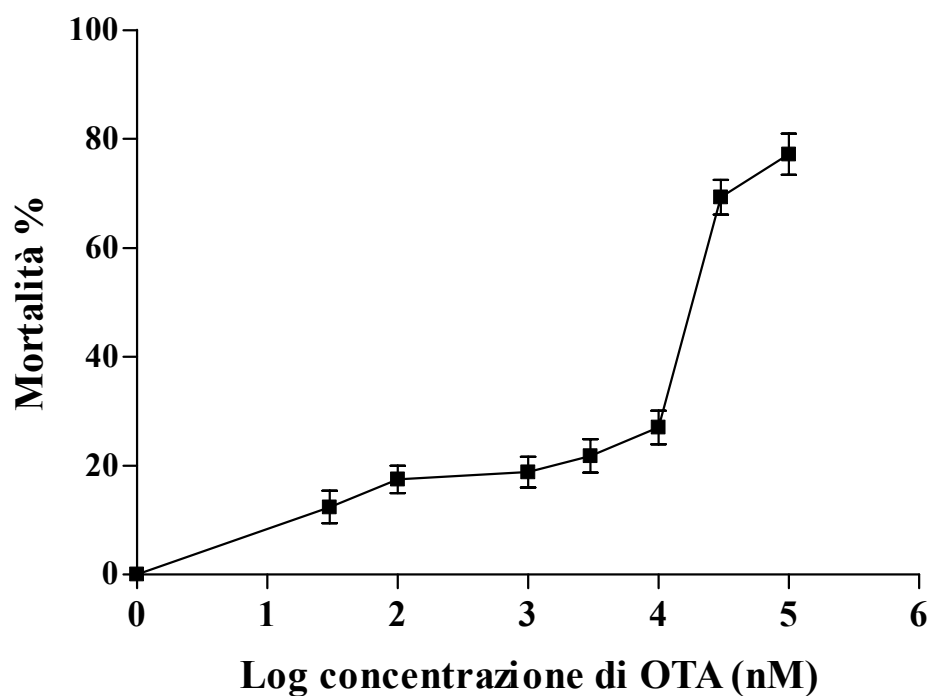


Figura 17 - Risultati degli esperimenti di citotossicità condotti trattando cellule macrofagiche murine della linea J774 A.1 con concentrazioni differenti di OTA (30 nM, 100 nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM, 30 μM, 100 μM) espresse su base logaritmica e successiva incubazione di 72 ore. I valori riportati sono la media ± S.E.M. della mortalità percentuale di 3 esperimenti separati.

3.2.2 Dosaggio dei nitriti e analisi western blot degli enzimi iNOS e COX-2

Dall'analisi western blot eseguita sui lisati delle cellule J774 A.1 trattate con l'OTA alle concentrazioni di 1, 3 e 10 μM , si evidenzia come la micotossina induca un aumento concentrazione-dipendente dell'espressione dell'enzima iNOS (4.13 ± 0.38 , 5.37 ± 0.40 e 5.43 ± 0.35 vs 3.38 ± 0.20 rispettivamente per l'OTA 1, 3 e 10 μM) (Figura 18). Tale risultato è stato in parte confermato dai dati riguardanti il dosaggio dei nitriti (metaboliti diretti del monossido d'azoto rilasciati nel surnatante da cellule opportunamente stimulate); infatti, l'OTA induce un lieve aumento della produzione di nitriti alle concentrazioni di 1 e 3 μM (3.32 μM e 3.50 μM rispettivamente vs 2.85 μM nelle cellule di controllo). I dati relativi all'analisi western blot effettuata per valutare l'eventuale effetto di modulazione dell'enzima COX-2 mostra come l'OTA, alle concentrazioni di 1 e 3 μM , induce un aumento dell'espressione della cicloossigenasi inducibile (5.2 ± 0.21 e 6.4 ± 0.21 vs 4.8 ± 0.11 rispettivamente per l'OTA 1 e 3 μM). Tale effetto non è riscontrabile alla concentrazione di 10 μM (Figura 19) e ciò è probabilmente imputabile all'effetto citotossico della micotossina riscontrato a questa concentrazione (mortalità pari al 27%).

Come controllo positivo è stato utilizzato un lisato di cellule J774 A.1 stimulate con 100 ng/ml di lipopolisaccaride (LPS).

Inoltre, come già precedentemente descritto, le membrane di nitrocellulosa, su cui sono state trasferite le proteine contenute nei lisati cellulari dei macrofagi J774 A.1, sono state cimentate con un anticorpo primario anti- β -actina, per accertare la buona esecuzione della metodica.

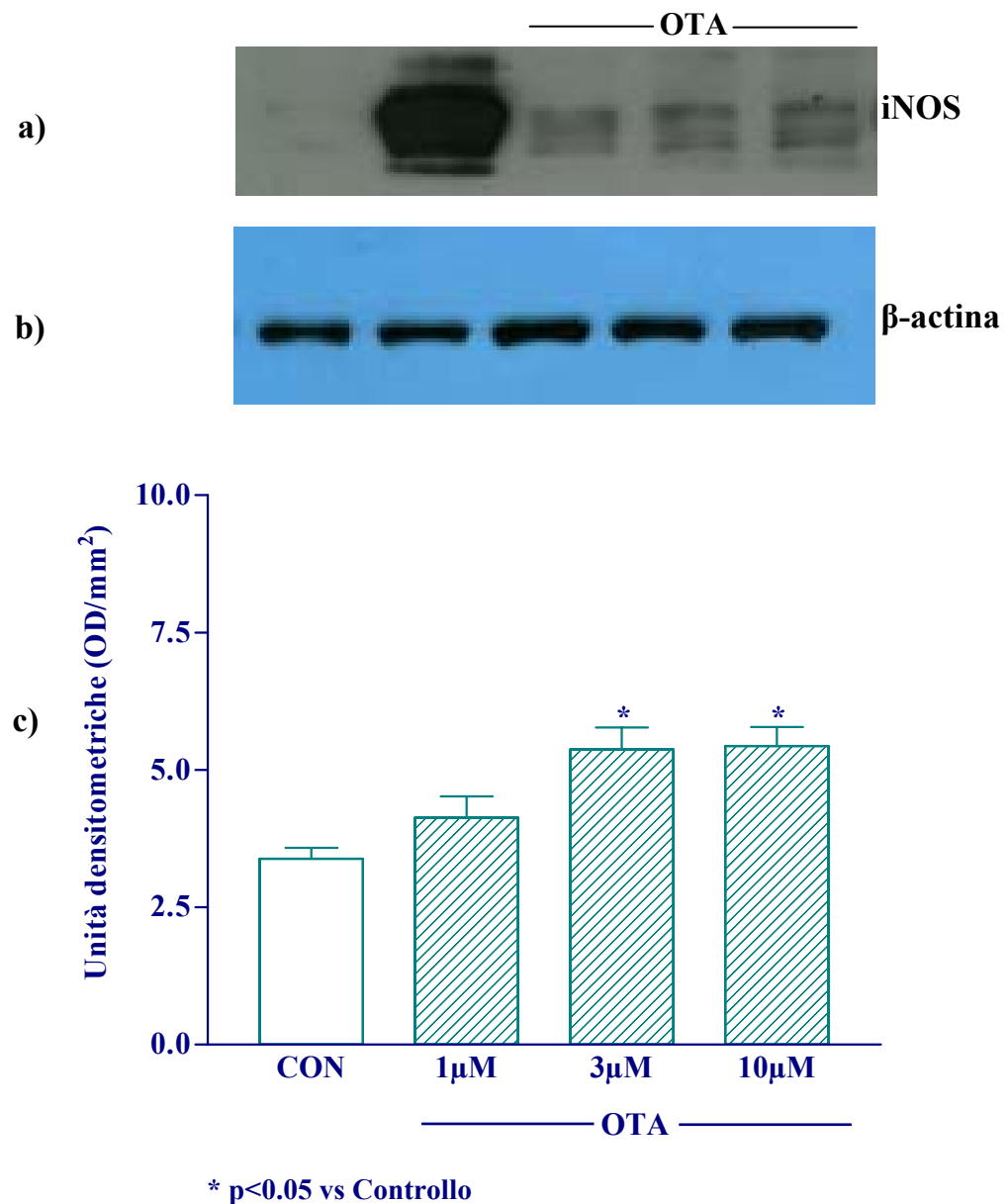


Figura 18 - a) Analisi western blot su lisati di cellule J774 A.1 dopo trattamento con ocratossina A a diverse concentrazioni (1-3-10 μ M) per la valutazione dell'espressione dell'iNOS indotta dalla micotossina. Come controllo positivo è stato utilizzato un lisato di cellule J774 A.1 stimulate con 100 ng/ml di LPS. **b)** Analisi western blot della β -actina utilizzata come proteina di riferimento. **c)** Grafico riassuntivo rappresentante la media \pm S.E.M. delle unità densitometriche ottenute dall'analisi western blot eseguito per valutare l'espressione della iNOS indotta da OTA alle concentrazioni 1, 3 e 10 μ M.

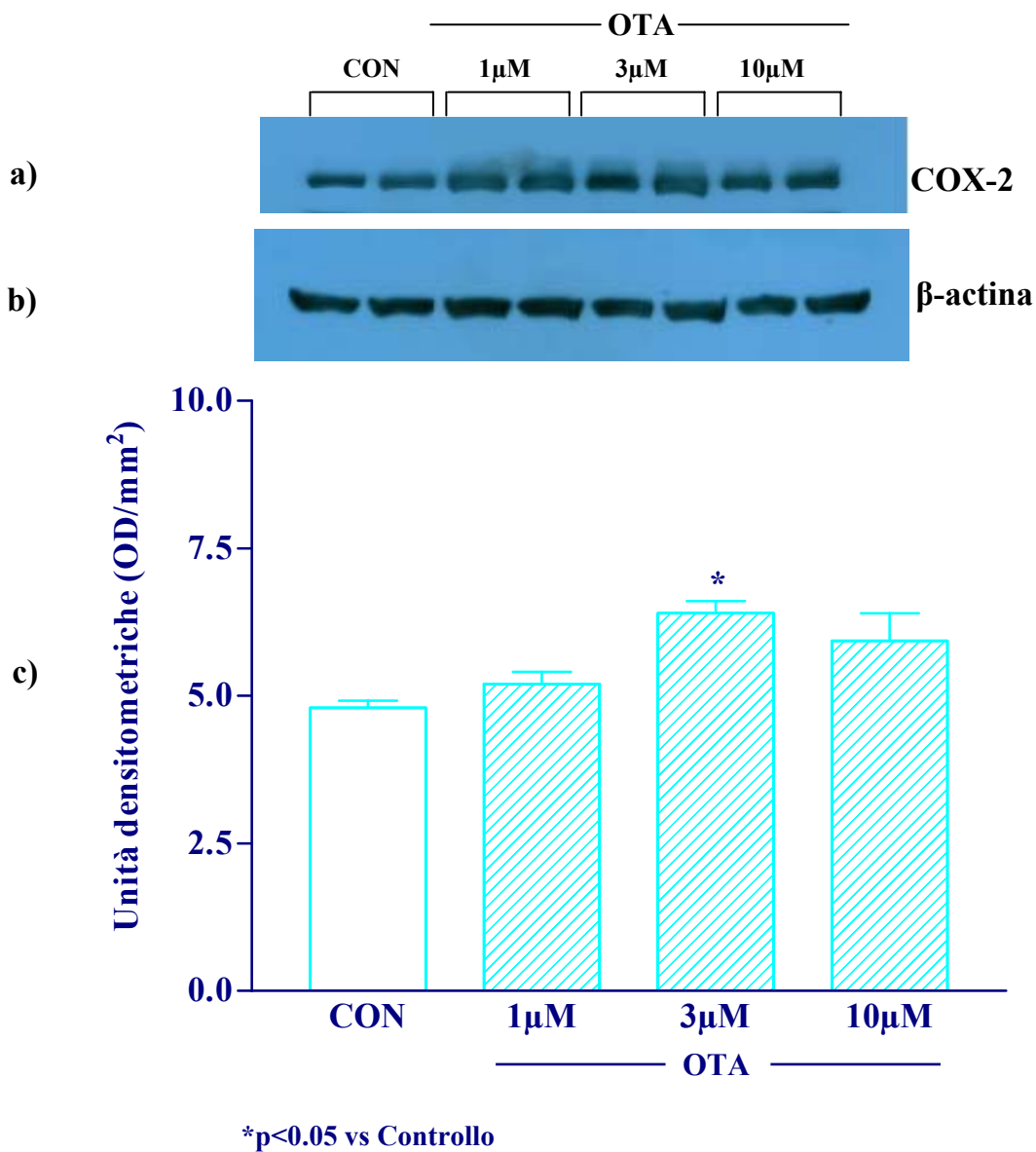


Figura 19 - a) Analisi western blot eseguita su lisati di cellule J774 A.1 dopo trattamento con ocratossina A a diverse concentrazioni (1-3-10 μM) per la valutazione dell'espressione dell'enzima COX-2 indotta dalla micotossina. Come controllo positivo è stato utilizzato un lisato di cellule J774 A.1 stimolate con 100 ng/ml di LPS. **b)** Analisi western blot della β-actina utilizzata come proteina di riferimento. **c)** Grafico riassuntivo rappresentante la media ± S.E.M. delle unità densitometriche ottenute dall'analisi western blot eseguito per valutare l'espressione della COX-2 indotta da OTA alle concentrazioni 1, 3 e 10 μM.

3.2.3 Valutazione dell'espressione dell'hsp72 mediante analisi western blot

E' stata valutata la capacità da parte dell'OTA di indurre l'espressione dell'*hsp 72* nel tempo. In particolare, le cellule sono state trattate con un'unica concentrazione di ocratossina A (3 μ M) ed incubate per 3, 5, 7, 20 e 24 ore.

Per l'esecuzione di questi esperimenti è stata utilizzata la concentrazione 3 μ M perchè è risultato, dai dati di citotossicità ottenuti, che non induce un danno cellulare particolarmente marcato (mortalità del 21%) e tale da condizionare la risposta delle J774 A.1 all'induzione dei meccanismi cellulari di difesa correlati al sistema proteico dell' *hsp72*.

I tempi di incubazione sono stati scelti in base a dati riportati in letteratura secondo cui l'espressione dell'*hsp70*, in seguito all'induzione da parte di vari stimoli infiammatori, aumenta in un intervallo compreso tra 1 e 24 ore con un picco di espressione dalle 2 alle 5 ore (Snyder et al., 1992; Schell et al., 2005).

I risultati mostrano che l'OTA è capace di indurre un lieve aumento dell'espressione della proteina dopo 3 ore di incubazione (11.88 ± 0.07 vs 11.06 ± 0.01) ma già dopo 5 ore si osserva una riduzione di tale effetto rispetto al controllo che si accentua in maniera significativa dopo 7, 20 e 24 ore (Figura 20).

L'analisi western blot per la β -actina è stata eseguita anche in questo caso a conferma di una idonea procedura sperimentale.

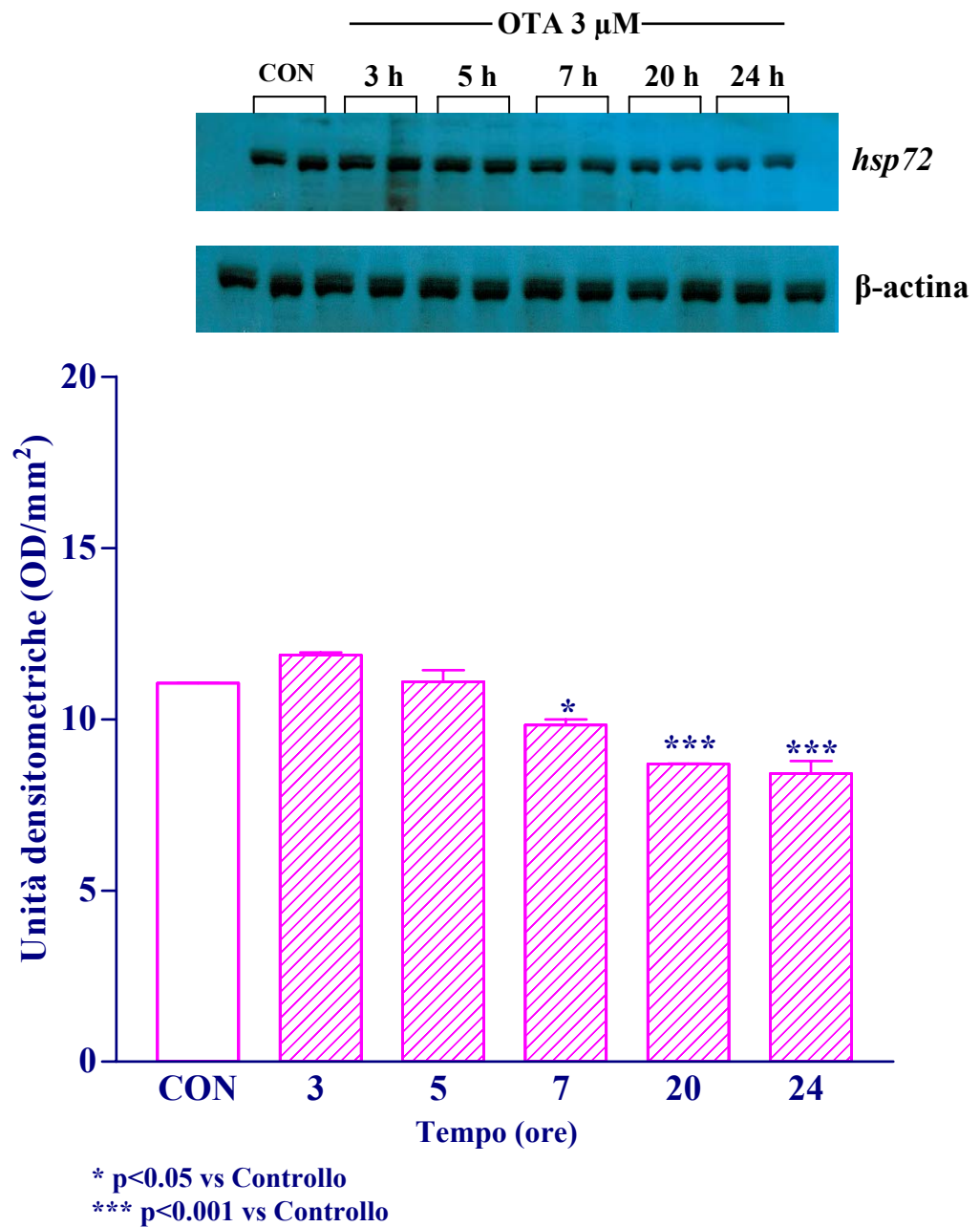


Figura 20 - a) Analisi western blot eseguita su lisati di cellule J774 A.1 dopo trattamento con ocratossina A (3 μ M) a diversi tempi di esposizione (3, 5, 7, 20, 24 ore) per la valutazione dell'espressione dell'*hsp72* indotta dalla micotossina. **b)** Analisi western blot della β -actina utilizzata come proteina di riferimento. **c)** Grafico riassuntivo rappresentante la media \pm S.E.M. delle unità densitometriche ottenute dalle analisi western blot.

3.2.4 Valutazione dell'espressione di IκBα mediante analisi western blot

Dall'analisi western blot eseguita sui lisati cellulari di macrofagi murini J774 A.1, trattati con un'unica concentrazione di ocratossina A (3 μM) ed incubati per 5, 15, 30, 45, 60 e 120 minuti, è risultato evidente come l'OTA induca la degradazione di IκBα, determinando così l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF-κB. Infatti, i risultati mostrano come la micotossina determina una riduzione significativa dell'espressione della proteina dopo 5 minuti di esposizione (8.65 ± 0.25 vs 11.16 ± 0.50), la quale, però, viene rapidamente risintetizzata dopo 30 minuti di incubazione con la micotossina, come evidenziato dall'aumento della sua espressione a tale tempo (Figura 21).

Anche in questo caso è stata utilizzata una concentrazione di OTA di 3 μM in quanto la scarsa citotossicità provocata non dovrebbe influenzare la risposta delle cellule nell'induzione di IκBα.

I tempi di incubazione sono stati scelti in base a studi presenti in letteratura in cui è risultato evidente come l'induzione della degradazione della proteina inibitrice di NF-κB avvenga nell'arco di alcune ore con un picco di espressione tra i 15 e 30 minuti (Kaul et al., 1998).

Anche in questi esperimenti l'analisi western blot relativa alla β-actina ha consentito di verificare l'esatta esecuzione delle procedure sperimentali

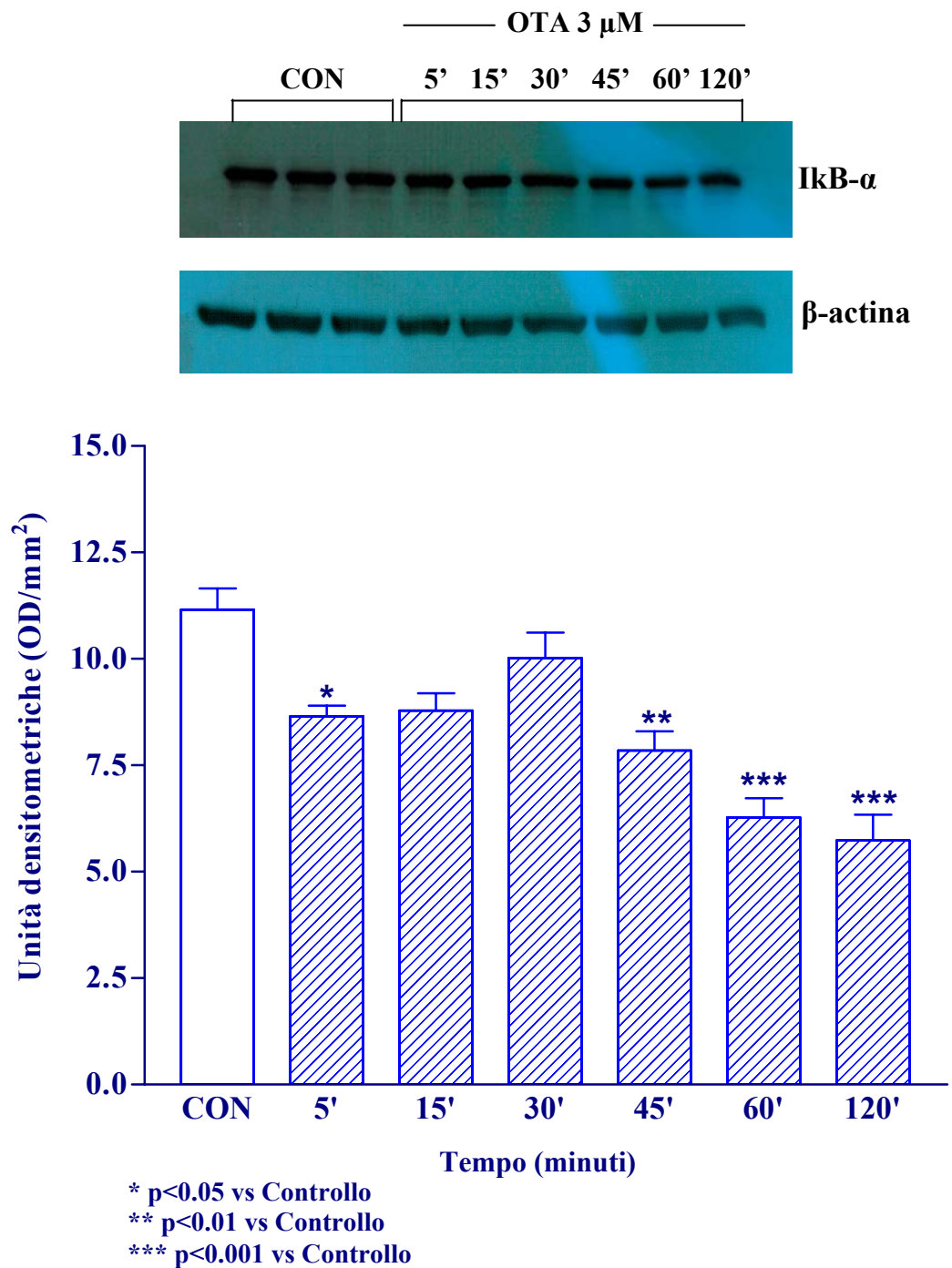


Figura 21 - a) Analisi western blot eseguita su lisati di cellule J774 A.1 dopo trattamento con ocratossina A (3 μ M) a diversi tempi di esposizione (5, 15, 30, 45, 60, 120 minuti) per la valutazione dell'espressione di I κ B- α indotta dalla micotossina; **b)** Immunoblot relativo alla β -actina utilizzata come proteina di riferimento; **c)** Grafico riassuntivo rappresentante la media \pm S.E.M. delle unità densitometriche ottenute dall'analisi western blot.

4. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti nelle procedure sperimentali precedentemente esposte mostrano come una singola somministrazione di OTA determini effetti nefrotossici ed epatotossici riscontrabili 24 ore dopo il trattamento. L'effetto nefrotossico dell'OTA è correlabile all'innalzamento dell'azotemia che si riscontra nei casi di insufficienza renale. Tra le cause possibili alla base di tale alterazione funzionale possono essere incluse: l'uso di farmaci a tropismo renale, una condizione di disidratazione, emorragie interne, nefrite, ostruzione delle vie urinarie, ma anche nefrosi ed eccessivo catabolismo delle proteine.

Quest'ultimo fattore potrebbe anche giustificare l'aumento significativo dei livelli di creatinuria in quanto, come è noto, la creatinina, il cui rialzo si riscontra negli stati di elevato catabolismo proteico, viene escreta esclusivamente dal rene. L'alterazione della morfologia funzionale glomerulare, che la micotossina probabilmente induce, comporterebbe un incremento di quest'ultimo parametro che, di conseguenza, non si correla ad un aumento significativo della creatininemia. E' noto, infatti, che un'insufficienza renale acuta o cronica, l'ostruzione del tratto urinario, i farmaci, l'ipertensione, l'anzianità, l'assunzione eccessiva di carne o vitamina C e diverse tossine possono aumentare i livelli di creatininemia per mancata escrezione renale della creatinina.

Nel nostro caso, l'effetto nefrotossico dell'OTA comporterebbe un aumento dei livelli ematici della creatinina che, tuttavia, è parzialmente controllato dalla contemporanea facilitata escrezione renale del catabolita conseguente al danno strutturale e

all'alterata attività di emunzione renale che ad esso consegue. E' comunque lecito ipotizzare che le alterazioni dei parametri ematochimici riportate siano anche da addebitare al noto meccanismo d'azione di inibizione della sintesi delle proteine indotta dalla micotossina che andrebbe ad alterare il metabolismo delle proteine stesse aumentandone il catabolismo. La presenza di chetoni e proteine nei campioni di urina degli animali trattati con la micotossina supporta tale ipotesi.

L'aumento significativo della concentrazione dell'enzima transaminase glutammico-ossalacetica (GOT) nel siero degli animali trattati rispetto agli animali di controllo rappresenta un dato probante di un effetto epatotossico che si manifesta a carico delle unità funzionali del parenchima. Tale effetto consegue ad un'alterazione morfologica delle membrane epatocitarie; la GOT, infatti, è un enzima citoplasmatico il cui aumento serico indica una rottura della cellula epatica ed il conseguente riversamento della proteina nello spazio extracellulare e quindi nel torrente circolatorio. E' ovvio che l'effetto secondario di tale processo risulta in un danno funzionale (prevalentemente metabolico).

I risultati del dosaggio della malondialdeide eseguito su tutti i tessuti prelevati hanno messo in evidenza come la micotossina induca un aumento significativo (rispetto ai controlli) della perossidazione dei lipidi di membrana nel fegato e nel rene modificando la struttura del bilayer fosfolipidico delle membrane cellulari e con ogni probabilità, le funzioni ad essa correlate (fluidità di membrana, endocitosi). E' noto che i principali responsabili dei processi ossidativi sono i radicali liberi dell'ossigeno (ROS) i quali agiscono a livello dei doppi legami dei fosfolipidi delle membrane biologiche determinando la formazione dei derivati perossidati delle componenti lipidiche quali le aldeidi

(malondialdeide (MDA), 4-idrossinonenale (HNE), esanale) di cui la malondialdeide rappresenta il principale prodotto generato (Esterbauer et al., 1991). Il saggio dell'MDA, fornisce, quindi, un indice chiaro e attendibile dell'attività di perossidazione lipidica conseguente all'azione di agenti ossidanti. I risultati osservati indicano come anche un unico trattamento in acuto sia capace di indurre il danno di membrana; essi, inoltre, sono in linea con quanto emerso da studi in vivo in cui è stata evidenziata la capacità da parte dell'ocratossina A di indurre, nel ratto, in seguito a somministrazione protratta (250 µg/Kg di OTA per quattro settimane), uno stress ossidativo. E' stato osservato, infatti, un incremento significativo dei livelli di malondialdeide sia nel siero che nei lisati tissutali di fegato e rene degli animali a cui era stata somministrata la micotossina rispetto ai livelli riscontrati negli animali controllo (Meki e Hussein, 2001). Anche i risultati di studi in vitro, condotti su membrane microsomiali di fegato di ratto, hanno evidenziato un incremento dei livelli di malondialdeide dopo trattamento con la micotossina (Rahimtula et al., 1988; Hasinoff et al., 1990; Omar et al., 1990).

Sembra che l'OTA possa mediare la generazione dei radicali liberi dell'ossigeno attraverso la formazione di un complesso Fe^{3+} - OTA ed innescare così i processi ossidativi (Omar et al., 1990; Gautier et al., 2001). A conferma dell'importanza di tale effetto indotto dall'ocratossina A nei meccanismi patogenetici alla base dei principali danni causati dalla micotossina, recenti studi in vitro hanno suggerito che lo stress ossidativo indotto dai ROS sia un meccanismo importante nel processo che conduce all'effetto citotossico mediato dall'OTA, in quanto è stato dimostrato che sostanze ad azione antiossidante come l' α -tocoferolo riducono la mortalità cellulare indotta dalla micotossina e diminuiscono

significativamente la produzione dei radicali liberi dell'ossigeno (Baldi et al., 2004).

I risultati del saggio dell'MPO hanno messo in evidenza come l'OTA sia capace di determinare un incremento dell'attività mieloperossidasi in tutti i tessuti esaminati; solo nel duodeno, però, è stato osservato un aumento significativo di tale parametro.

Tale saggio ha permesso di valutare se l'ocratossina A costituisca uno stimolo flogogeno, valutazione effettuata attraverso la misura del grado di infiltrazione e di accumulo dei neutrofilo nei tessuti esaminati. È noto che la mieloperossidasi è un enzima contenuto nei granuli citoplasmatici dei neutrofilo e la sua presenza fornisce un'indicazione attendibile della migrazione di tali cellule immunitarie che, in corso di flogosi, svolgono la funzione principale di fagocitosi e digestione degli agenti responsabili dello stato infiammatorio.

Il motivo per cui l'attività mieloperossidasi sembra aumentare, significativamente, solo nel duodeno è da attribuire, probabilmente, al fatto che l'assorbimento della micotossina avviene principalmente a livello intestinale e più specificamente a livello duodenale. È a livello, quindi, di tale distretto che si raggiungono concentrazioni della micotossina sufficienti ad indurre l'accumulo dei polimorfonucleati.

Tale risultato è in accordo con quanto riportato in uno studio eseguito da Kanisawa e collaboratori (1990), che ha messo in evidenza come una singola somministrazione, per via orale, di OTA alla dose di 15 mg/Kg, induca, nel ratto, lo sviluppo di una enterite acuta esclusivamente a livello del duodeno e del digiuno dove è possibile evidenziare la marcata presenza della micotossina. Inoltre, studi realizzati sul topo, hanno dimostrato come l'OTA induca un aumento della concentrazione della micotossina e dei suoi

metaboliti nella bile e di conseguenza nell'intestino, confermandone l'escrezione biliare e la formazione di un circolo enteroepatico (Roth et al., 1988; Fuchs et al., 1988).

Altro scopo della ricerca è stato valutare il ruolo della micotossina sull'induzione del processo flogistico, attraverso la modulazione dell'espressione dell'enzima COX-2, nei lisati tissutali e nei lisati delle cellule macrofagiche peritoneali.

E' noto che le cicloossigenasi sono enzimi che catalizzano la sintesi delle prostaglandine, importanti mediatori chimici del processo infiammatorio, a partire dall'acido arachidonico (AA).

Quest'ultimo è un acido grasso poliinsaturo che viene direttamente assunto con la dieta oppure ricavato nell'organismo per trasformazione dell'acido linoleico, acido grasso essenziale.

L'AA non si trova libero nella cellula, ma è normalmente esterificato nei fosfolipidi di membrana e, affinché possa essere utilizzato dalle cellule nella produzione delle prostaglandine, deve essere innanzitutto dissociato dai fosfolipidi. Questo fenomeno è mediato dall'attivazione di fosfolipasi cellulari come la fosfolipasi A₂ e fosfolipasi C e catalizzato da stimoli di natura meccanica, chimica e fisica o tramite l'azione di altri mediatori. Una volta avvenuta l'attivazione si assiste alla biosintesi dei metaboliti dell'acido arachidonico attraverso due vie: la via cicloossigenasica che determina la sintesi delle prostaglandine PGE₂ nel rene, delle PGD₂ e PGF_{2 α} nelle mastcellule, delle PGI₂ nell'endotelio vasale e nella mucosa dello stomaco e del trombossano nelle piastrine; e la via lipoossigenasica che determina, nei neutrofili, la sintesi dei leucotrieni, altri mediatori coinvolti nei processi infiammatori. In condizioni basali, tali mediatori sono presenti in piccole quantità, ma sono overespressi nelle cellule immunitarie o nei tessuti in seguito a stimoli flogogeni di varia natura quali endotossine,

immunocomplessi, tossine, danni fisici o in seguito all'induzione da parte di citochine proinfiammatorie quali l'IL-1, il TNF α e β , e la famiglia dell'IL-8, prodotte principalmente da linfociti e macrofagi attivati.

I risultati degli esperimenti eseguiti sui macrofagi peritoneali, prelevati da ciascun gruppo sottoposto alla sperimentazione, mostrano come una singola somministrazione di OTA induca l'espressione della COX-2 nei lisati cellulari. Tale dato indica come la micotossina moduli un processo quale quello flogistico che può rivestire un ruolo importante nella eziopatogenesi della micotossicosi e mostra un effetto che risulta in accordo con quanto riportato in alcuni studi, sia in vitro che in vivo, che hanno rivelato come, anche altri metaboliti fungini, siano in grado di indurre l'espressione della COX-2. E' stato dimostrato, infatti, che il deossinivalenolo, micotossina prodotta da diverse specie del genere *Fusarium*, conosciuta anche con il nome di vomitossina, induce un incremento dell'espressione della cicloossigenasi di tipo 2. Tale effetto è stato osservato sia in cellule macrofagiche della linea RAW 264.7, trattate, per ventiquattro ore, con la micotossina (50-250 ng/ml) (Moon e Pestka, 2002); sia in topi a cui veniva somministrata, per via orale, una singola dose di vomitossina (5-25 mg/Kg). I picchi di espressione dell'enzima erano osservabili, nella milza e nelle placche di Peyer, dopo sole due ore dal trattamento dimostrando la rapida induzione dell'effetto proinfiammatorio (Moon e Pestka, 2003). Anche la fumonisina B1, micotossina prodotta da funghi del genere *Fusarium* (*F. moniliforme*, *F. proliferatum*) è in grado di indurre un aumento dell'espressione della COX-2, in cellule macrofagiche della linea continua J774 A.1, dopo trattamento, per settantadue ore, con concentrazioni della micotossina 0.1 - 10 μ M (Meli et al., 2000).

I risultati dell'analisi western blot eseguita per valutare il ruolo di modulazione dell'OTA sull'espressione della COX-2, nei lisati tissutali, mostrano che, a differenza di quanto riscontrato per i macrofagi peritoneali, la micotossina induce una riduzione dell'espressione dell'enzima sia nel rene che nel fegato. Ciò, probabilmente, è da imputare: al marcato danno tessutale indotto dalla micotossina in questi organi bersaglio che determina una conseguente inibizione dei processi reattivi normalmente innescati nei tessuti da stimoli idonei; oppure al noto meccanismo d'azione di inibizione della sintesi proteica operata dall'OTA che causerebbe, tra l'altro, anche una ridotta sintesi a livello epatico e renale della COX-2.

È stata, poi, valutata la modulazione dell'espressione della proteina da shock termico 72 che risulta overespressa in diverse tipologie cellulari, durante i processi infiammatori, con lo scopo di riparare i danni indotti a livello cellulare dalle ammine vasoattive e dagli altri mediatori del processo flogistico. E' ipotizzabile che l'OTA possa interferire anche con il sistema delle proteine *hsp70*.

Esse rappresentano, infatti, un insieme di proteine ubiquitarie, presenti nelle cellule eucariotiche, in eubatteri ed in molti archibatteri, che costituiscono un fondamentale meccanismo naturale di protezione delle cellule da agenti stressanti quali l'esposizione a condizioni di ipertermia, anestesia, interventi chirurgici, danni tissutali, ischemia-riperfusion, infiammazione, stress ossidativo ed una varietà di altri stimoli come l'esposizione a metalli pesanti, sovradosaggio con aminoacidi analoghi, farmaci ed etanolo (Christman et al., 1985; Welch, 1992). E' noto come l'attivazione della risposta allo shock termico (che è stata la prima condizione segnalata come capace di generare l'espressione delle *hsp*) sia strettamente associata alla remissione dell'infiammazione

in diversi modelli sperimentali (Jaattela et al., 1992; Ianaro et al., 2001b; Van Molle et al., 2002).

I risultati della ricerca hanno evidenziato la capacità da parte della micotossina di indurre un aumento dell'espressione dell'*hsp72* nei macrofagi peritoneali. Ciò conferma ulteriormente l'abilità dell'OTA di instaurare un processo infiammatorio e di innescare tutte le reazioni che direttamente o indirettamente dipendono da tale processo come l'attivazione dei meccanismi citoprotettivi nelle cellule coinvolte (ad esempio nei macrofagi, che, come è noto, sono le prime cellule immunitarie ad intervenire in corso di flogosi).

Viceversa, risulta che l'OTA determini una riduzione dell'espressione dell'*hsp72* in tessuti di rene e di fegato, effetto, molto probabilmente, imputabile alla rapida e diretta inibizione, operata dalla micotossina, degli stessi meccanismi di difesa cellulari con un blocco della trascrizione genica della proteina.

Altra spiegazione del risultato osservato potrebbe essere, in analogia con quanto ipotizzato per la ridotta espressione della cicloossigenasi, il marcato danno tissutale che rende i parenchimi iporesponsivi ed incapaci di mettere in atto i meccanismi di protezione già esposti. Infine, è importante considerare il meccanismo di inibizione della sintesi proteica che comporterebbe anche per l'*hsp72*, come in generale per le altre proteine, una riduzione dei livelli d'espressione tissutale.

La sperimentazione condotta in vitro ha avuto lo scopo di confermare ed approfondire l'effetto immunomodulatore dell'OTA evidenziato dai risultati dello studio in vivo. A tale proposito è stato scelto, come sistema sperimentale, una linea cellulare continua di macrofagi murini J774 A.1., allo scopo di mimare, in condizioni sperimentali controllate, gli effetti riscontrati nei macrofagi primari.

I risultati ottenuti hanno riguardato la capacità della micotossina di modulare la produzione dell'NO, l'espressione della COX-2, dell'*hsp72* e dell'NF-kB fattore coinvolto nei meccanismi a monte di regolazione del processo infiammatorio.

È noto che i macrofagi possono essere attivati in seguito ad uno stimolo proinfiammatorio quale endotossine di batteri Gram negativi e citochine (IL-1, IFN- γ , TNF- α), sintetizzando e rilasciando, tra l'altro, monossido d'azoto, molecola sintetizzata dall'enzima nitrossido sintasi inducibile. E' ormai ben noto il ruolo dell'NO nel processo infiammatorio, infatti, non solo aumenta la permeabilità vascolare ed il flusso ematico locale, ma induce anche un concomitante aumento della sintesi delle prostaglandine ad opera delle cicloossigenasi (Di Rosa et al., 1996; Salvemini et al., 1993).

I risultati presentati evidenziano la capacità da parte dell'ocratossina A di indurre l'espressione dell'enzima iNOS, risultato confermato dal dosaggio dei nitriti eseguito sui surnatanti cellulari che indica un lieve ma non significativo aumento dei livelli di monossido d'azoto nelle cellule trattate rispetto ai controlli. L'ocratossina A induce, inoltre, un aumento della COX-2 in tale sistema sperimentale, ribadendo l'instaurarsi di una risposta infiammatoria.

Tuttavia, contrariamente ai risultati sui macrofagi peritoneali, è stato osservato, dopo un'iniziale aumento, una progressiva riduzione dei livelli dell'*hsp72*, risultato, questo, di complessa interpretazione. Probabilmente, la concentrazione di OTA testata (3 μ M) induce un'iniziale risposta citoprotettiva con un aumento dei livelli dell'*hsp72* (evidenziato dopo 3 ore di esposizione) ma successivamente, prevalendo l'effetto citotossico, come già osservato in vivo nel parenchima epatico e renale, si osserva una

progressiva riduzione dell'espressione di questa proteina anti-infiammatoria ($p < 0.001$ vs controllo).

Lo studio in vitro ha consentito, inoltre, di indagare sul ruolo del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B nell'induzione e nella regolazione dell'espressione dell'iNOS e della COX-2 mediata dall'ocratossina A.

Numerosi studi hanno messo in evidenza come l'induzione di tali enzimi, da parte di vari stimoli proinfiammatori, in diverse linee cellulari, sia regolata da NF- κ B; è plausibile ipotizzare, quindi, che anche l'ocratossina A rappresenti uno stimolo proinfiammatorio sufficiente ad indurre la loro espressione attraverso tale via; ipotesi, tra l'altro, supportata dai risultati ottenuti che rivelano come l'OTA sia capace di attivare tale fattore mediante la degradazione di I κ B α . Ricordiamo, a tale proposito, che I κ B α è la proteina responsabile della regolazione dell'attivazione del fattore di trascrizione in questione, infatti essa maschera il segnale di traslocazione nucleare di NF- κ B trattenendolo nel citoplasma ed impedendone, così, l'attivazione genica. L'esposizione cellulare a citochine proinfiammatorie, radicali liberi, radiazioni ultraviolette, radiazioni ionizzanti, proteine virali, lipopolisaccaridi batterici ed anche il fumo di sigaretta (Sen et al., 1986), determina la rapida fosforilazione di I κ B α e la sua successiva degradazione ad opera di proteosomi; ciò causa il distacco della molecola dall'NF- κ B che, attivato, potrà traslocare nel nucleo per interagire con siti specifici κ B sul DNA, presenti in numerose regioni promoter, ed iniziare la trascrizione di una grande varietà di geni. La trascrizione *ex novo* di I κ B α si riflette in una rapida espressione della proteina, che una volta sintetizzata può riassociarsi con la porzione attiva nucleare di NF- κ B, riducendone l'attività.

I risultati mostrano che l'OTA determina una riduzione dell'espressione di I κ B α dopo cinque e dieci minuti di esposizione alla micotossina, dimostrando, quindi, di essere in grado di indurre la degradazione dell'inibitore proteico in questione, il quale, però, viene rapidamente risintetizzato dopo trenta minuti di esposizione all'OTA, molto probabilmente attraverso la regolazione positiva della sua trascrizione da parte di NF-kB.

In un lavoro recentissimo (Al-Anati et al., 2005) è stato messo in evidenza che l'OTA induce il rilascio con modalità dose e tempo dipendente del TNF- α , citochina proinfiammatoria prodotta dai macrofagi attivati, che determina a sua volta la sintesi di molecole di adesione endoteliale, di altre citochine, di fattori di crescita, di eicosanoidi e di ossido di azoto; inoltre, provoca l'aggregazione e l'attivazione dei neutrofili, con aumentata risposta di queste cellule ad altri mediatori e la liberazione di enzimi proteolitici da parte delle cellule mesenchimali, contribuendo così al danneggiamento dei tessuti. Nel lavoro riportato è indicato chiaramente che lo stesso acido arachidonico insieme con i suoi metaboliti derivati dalla via cicloossigenasica (prostaglandine) sopprimono marcatamente il rilascio della citochina mediato dall'OTA, mentre i metaboliti derivati dalla via lipoossigenasica e dalla via del citocromo P-450 ne favoriscono il rilascio. Gli autori hanno ipotizzato che il meccanismo attraverso il quale l'acido arachidonico determina l'inibizione del rilascio del TNF- α potrebbe coinvolgere il fattore di trascrizione NF-kB, in quanto è stato osservato che in presenza di un inibitore del fattore di trascrizione, anche il rilascio, mediato dall'OTA, del TNF- α veniva inibito. Però, come sia capace la micotossina di indurre la trascrizione di NF-kB è ancora un meccanismo sconosciuto.

E' noto che i radicali liberi dell'ossigeno possono influenzare l'attività del fattore di trascrizione nucleare poiché modificano un residuo di cisteina essenziale per il legame al DNA a livello della subunità p50 del dimero NF-kB (Matthews et al., 1993); ed inoltre, influenzano direttamente o indirettamente l'attività di una chinasi responsabile della fosforilazione e degradazione di I κ B α (Bonizzi et al., 2000). Ciò si correla e supporta ulteriormente i risultati dello studio in vivo in quanto sembra sempre più evidente che l'induzione di uno stress cellulare, con liberazione di radicali liberi e l'innescò dei conseguenti processi di perossidazione lipidica, possa rappresentare uno dei primi meccanismi di tossicità messi in atto dall'OTA responsabile della cascata di eventi successivi quali l'instaurarsi di una reazione infiammatoria (regolata da NF-kB) e il danno tessutale.

5. CONCLUSIONI

I risultati mostrati nella presente tesi di dottorato confermano, in accordo con quanto riportato in letteratura, come l'ocratossina A abbia un chiaro effetto nefrotossico ed epatotossico.

La micotossina risulta anche in grado di stimolare la risposta del sistema immunitario attraverso l'aumento dell'espressione di enzimi direttamente coinvolti nell'induzione del processo infiammatorio, di quelli che regolano a monte l'instaurarsi di tale processo e di proteine impegnate nei meccanismi di protezione della cellula dai danni indotti da vari agenti come quelli responsabili della flogosi. I diversi effetti evidenziati nella sperimentazione in vivo sono adeguatamente supportati e spesso correlabili a quelli dello studio in vitro. Tali effetti trovano nella perossidazione lipidica, che rappresenta il primo momento della produzione di radicali liberi responsabili dello stress ossidativo, il principale meccanismo induttore.

I risultati dello studio mostrano, in conclusione, come l'ocratossina A, alterando la fisiologica composizione della membrana plasmatica (e le funzioni cellulari che da essa dipendono), sia capace di agire su diverse strutture e sistemi inducendo importanti alterazioni biochimiche a loro volta causa di gravi patologie cellulari e d'organo.

L'effetto osservato sulle cellule macrofagiche di aumento dell'espressione degli enzimi coinvolti nell'instaurarsi del processo flogistico è correlabile ad un'azione immunostimolante. Tale riscontro fornisce un contributo al chiarimento dei meccanismi alla base della tossicità esercitata dalla micotossina sul sistema immunitario in quanto a tutt'oggi sono riportati in letteratura pareri

contrastanti e relativi sia ad una immunosoppressione che, più raramente, alla stimolazione della risposta immunitaria cellulo-mediata.

Lo studio riportato può essere utilizzato come base di partenza per una serie di ricerche potenzialmente vasta che miri a far luce su altri possibili meccanismi responsabili della patogenesi delle varie forme della micotossicosi come il coinvolgimento di proteine cellulari di trasduzione del segnale.

6. BIBLIOGRAFIA

Abarca M.L., Bragulat M.R., Castella G., Cabanes F.J. “Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *Niger*”. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2650-2652 (1994).

Abarca M.L., Bragulat M.R., Castella G., Accensi F., Cabanes F.J. “New ochratoxigenic species in the *Aspergillus* genus”. *J. Food Prot.* **60**, 1580-1582 (1997).

Abarca M.L., Accensi F., Bragulat M.R., Cabanes F.J. “Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp”. *J. Food Protect.* **64**, 903-906 (2001).

Abarca M.L., Accensi F., Bragulat M.R., Castella G., Cabanes F.J. “*Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market”. *J. Food Prot.* **66**, 504-6 (2003).

Abarca M.L., Accensi F., Cano J., Cabanes. “Taxonomy and significance of black aspergilli”. *Antonie van Leeuwenhoek* **86**, 33-49 (2004).

Abramson D., Mills J.T., Boycott B.R. “Mycotoxins and mycoflora in animal feedstuffs in western Canada”. *Can. J. Comp. Med.* **47**, 23-26 (1983).

Accensi F., Abarca M.L., Cano J., Figuera L., Cabanes F.J. “Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A.niger* aggregate”. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **79**, 365-270 (2001).

Adebajo L.O., Bamgbelu O.A., Olowu R.A. “Mould contamination and the influence of water activity and temperature on mycotoxin production by two aspergilli in melon seed”. *Nahrung* **38**, 209-17 (1994).

AL-Anati L., Katz N., Petzinger E. “Interference of arachidonic acid and its metabolites with TNF- α release by ochratoxin A from rat liver”. *Toxicology* **208**, 335-346 (2005).

Albassam M.A., Yong S.I., Bhatnagar R., Sharma A.K., Prior M.G. “Histopathologic and electron microscopic studies on the acute toxicity of ochratoxin A in rats”. *Veterinary Pathology* **24**, 427-435 (1987).

Atroshi F., Biese I., Saloniemi M. “Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice”. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **3**, 281-291 (2000).

Aukema H.M., House J.D., Bankovic-Calic N., Ogborn M.R. “Increased renal fibrosis and expression of renal phosphatidyl-inositol 4-kinase-beta and phospholipase C (gamma 1) proteins in piglets exposed to ochratoxin A”. *Nephron Physiol.* **96**, 19-25 (2004).

Bacon C.W., Sweeney J.G., Robbins J.D., Burdick D. “Production of penicillic acid and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ochraceus*: temperature and moisture requirements”. *Appl. Microbiol.* **26**, 155-160 (1973).

Baeuerle P.A., Baltimore D. “Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor”. *Cell* **53**, 211-217 (1988).

Baeuerle P.A., Henkel T. “Function and activation of NF-kappa B in the immune system”. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 141-179 (1994).

Baeuerle P.A., Baltimore D. “NF-kappa B: ten years after”. *Cell* **87**,13-20 (1996).

Baldi A., Losio M.N., Cheli F., Rebucci R., Sangalli L., Fusi E., Bertasi B., Pavoni E., Carli S., Politis I. “Evaluation of the protective effects of alpha-tocopherol and retinol against ochratoxin A cytotoxicity”. *Br. J. Nutr.* **91**, 507-512 (2004).

Baldwin A.S. Jr . “The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveres and insights”. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 649-683 (1996).

Basu A.K., O’Hara S.M., Valladier P., Stone K., Mols O., Marnett L.J. “Identification of adducts formed by reaction of guanine nucleosides with malondialdehyde and structurally related aldehydes”. *Chem. Res. Toxicol.* **1**, 53-59 (1988).

Baudrimont I., Betbeder A.M., Gharbi A., Pfol-Leszkowicz A., Dirheimer G., Creppy E.E. “Effect of superoxide dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by subchronical administration of ochratoxin A in rats”. *Toxicology* **89**, 101-111 (1994).

Baudrimont I., Ahouandjivo R., Creppy E.E. “Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in Vero cells in culture by several agents”. *Chemico-Biological Interactions* **104**, 29-40 (1997).

Baxter E.D., Slaiding I.R., Kelly B. “Behavior of ochratoxin A in brewing”. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **59**, 98-100 (2001).

Belmadani A., Tramu G., Betbeder A.M. “Regional selectivity to ochratoxin A, distribution and cytotoxicity in rat brain”. *Arch. Toxicol.* **72**, 656-662 (1998).

Belmadani A., Steyn P.S., Tramu G., Betheder A.M., Baudrimont I., Creppy E.E. “Selective toxicity of ochratoxin A in primary cultures from different brain regions”. *Arch. Toxicol.* **73**, 108-114 (1999).

Bendele A.M., Carlton W.W., Krogh P., Lillehoj E.B. “Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/65 X C3H) F1 mouse”. *J. Natl. Cancer Inst.* **75**, 733-742 (1985).

Berndt W.O., Hayes A.W. “In vivo and in vitro changes in renal function caused by ochratoxin A in the rat”. *Toxicology.* **12**, 5-17 (1979).

Bernhoft A., Keblys M., Morrison E., Larsen H.J., Flaoyen A. “Combined effects of selected Penicillium Mycotoxins on in vitro proliferation of porcine lymphocytes”. *Mycopathologia* **158**, 441-450 (2004).

Beuchat L.R. “Food and beverage mycology”. 2^o Ed. *Van Nostrand Reinhold*, New York (1987).

Blake M.J., Gershon D., Fargnoli J., Holbrook N.J. “Discordant expression of heat shock protein mRNAs in tissue of heat-stressed rats”. *J. Biol. Chem.* **265**, 15275-15279 (1990).

Bondy GS., Armstrong CL. “Cytotoxicity of nephrotoxic fungal toxins to kidney-derived LLC-PK1 and OK cell lines”. *Cell. Biol. Toxicol.* **14**, 323-32 (1998).

Boorman G.A., Hong H.L., Dieter M.P., Hayes H.T., Pohland A.E., Stack M., Luster M.I. “Mycotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A”. *Toxicology Appl. Pharmacol.* **72**, 304-312 (1984).

Boorman G.A. “NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A (Cas No. 303-47-9) in F344/N rats (gavage studies)”. *NIH Publications, Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, Research Triangle park* No. **89**, 2813 (1989).

Breitholtz-Emanuelsson A., Olsen M., Oskarsson A., Palminger I., Hult K. “Ochratoxin A in cow’s milk and in human milk with corresponding human blood samples”. *Journal of the AOAC International* **76**, 842-846 (1993).

Brown M.H., Szczech G.M.M., Purmalis B.P. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **37**, 331-338 (1976).

Bucheli P., Kanchanomai C., Meyer I., Pittet A. “Development of ochratoxin A during Robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying”. *J. Agr. Food Chem.* **48**, 1358-1362 (2000).

Bucheli P., Taniwaki M.H. “Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee”. *Food Addit. Contam.* **19**, 655-665 (2002).

Bullerman L.B. “Interactive effects of temperature and pH on mycotoxin production”. *Lebensm. Wiss. Technol.* **18**, 197-200 (1985).

Burdaspal P.A., Legarda T.M. “Ocratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros países europeos”. *Alimentaria* **36**, 107-113 (1999).

Cabañes F.J., Accensi F., Bragulat M.R., Abarca M.L., Castellà G., Minguez S., Pons A. “What is the source of ochratoxin A in wine?”. *Int J. Food Microbiol.* **79**, 213-215 (2002).

Campbell H., Choo T.M., Vigier B., Underhill L. “Mycotoxin in barley and oat sample from eastern Canada”. *Can. J. Plant Sci.* **80**, 977-980 (2000).

Canela R., Viladrich R., Velazquez C.A., Sanchis V. “A survey of porcine kidneys and chicken liver for ochratoxin A in Spain”. *Mycopathologia* **125**, 29-32 (1994).

Castegnaro M., Michelon J., De Meo M., Laget M. “Destruction of ochratoxin A and citrinin using sodium hypochlorite”. *IARC Sci. Publ.* **113**, 9-13 (1991).

Ceovic S., Grims P., Mitar J. “The incidence of tumours of the urinary organs in a region of endemic nephropathy and in a control region (author’s transl)”. *Lijec. Vjesn.* **98**, 301-304 (1976).

Chang F.C., Chu F.S. “The fate of ochratoxin A in rats”. *Food Cosmet. Toxicol.* **15**, 199-204 (1977).

Chang C.F., Huff W.E., Hamilton P.B. “A leucocytopenia induced in chickens by dietary ochratoxin A”. *Poultry Sci.* **58**, 555-558 (1979).

Chelkowski J., Samson R.A., Wiewiorowska M., Golinski P. “Ochratoxin A by isolated strains of the conidial stage of *Aspergillus glaucus* Link ex grey (= *Eurotium herbariorum* Wiggers Link ex Gray) from cereal grains”. *Die Nahrung* **4**, 267-269 (1987).

Chernoremsky I.N., Stoyanov I.S., Petkova-Bocharova T.K., Nocolov I.G., Draganov I.V., Stoichev I., Tanchev Y., Naidenov D., Kalcheva

N.D. “Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in Vratza district Bulgaria”. *International Journal of Cancer* **19**, 1-11 (1977).

Christman M.F., Morgan R.W., Jacobson F.S., Ames B.N. “Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock protein in *Salmonella typhimurium*”. *Cell* **41**, 753-762 (1985).

Chu F.S., Butz M.E. “Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*”. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **53**, 1253-1257 (1970).

Ciegler A. “Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group”. *Can. J. Microbiol.* **18**, 631-636 (1971).

Ciegler A., Fennell D.I., Sansing G.A., Detroy R.W., Bennett G.A. “Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: classification into subgroups”. *Appl. Microbiol.* **26**, 271-278 (1973).

Cohen J.J. “Apoptosis”. *Immunology Today* **14**, 126-130, (1993).

Cook W.O., Osweiler G.D., Anderson T.D., Richard J.L. “Ochratoxicosis in Iowa swine”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **188**, 1399-1402 (1986).

Creppy E.E., Lugnier A.J., Beck G., Roschenthaler R., Dirheimer G. “Action of ochratoxin A on cultured hepatoma cells - reversion of inhibition by phenylalanine”. *Febs letters* **104**, 287-290 (1979).

Creppy E.E., Stormer F.O., Roschenthaler R., Dirheimer G. “Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-4-hydroxyochratoxin A and

ochratoxin alpha, on immune response in mice”. *Infect. Immunity* **39**, 1015-1018 (1983).

Creppy E.E., Kane A., Dirheimer G., Lafarge-Frayssinet C., Mousset S., Frayssinet C. “Genotoxicity of ochratoxin A in mice: dann single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney”. *Toxicol. Lett.* **28**, 29-35 (1985).

Creppy E.E., Chakor K., Fisher M.J., Dirheimer G. “The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxylase in isolated rat hepatocytes and “in vivo”. *Archives of Toxicology.* **64**, 279-284 (1990).

Curtui V., Gareis M., Usleber E., Märtilbauer E. “Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone”. *Food Addit. Contam.* **18**, 730-738 (2001).

D’Acquisto F., Iuvone T. Rombola L., Sautebin L., Di Rosa M., Carnuccio R. “Involvement of NF-kB in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages”. *FEBS Lett.* **418**, 175-178 (1997).

Dai J., Park G., Perry J.L., Il’Ichev Y.V., Bow D.A.J., Pritchard J.B., Faucet V., Pfohl-Leszkowicz A., Manderville R.A., Simon J.D. “Molecular aspects of the transport and toxicity of ochratoxin A”. *Acc. Chem. Res.* **37**, 874-881 (2004).

Deakin A.M., Payne A.N., Whittle B.J.R., Moncada S. “The modulation of IL-6 and TNF- α release by nitric oxide following stimulation of J774 cells with LPS and IFN- γ ”. *Cytokine* **7**, 408-416 (1995).

Degen G.H., Gerber M.M., Obrecht-Pflumio S., Dirheimer G. “Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures”. *Arch. Toxicol.* **71**, 365-371 (1997).

Devegowda G., Radu M.V.L.N., Nazar A., Swamy H.V.L.M. “Mycotoxin picture worldwide: Novel solutions for their counteraction”. In: *Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium. Biotechnology in the Feed Industry. Passport of the year 2000. Edited by T.P. Lyon and K.A. Jacques, Nottingham: Nottingham University Press. pp 241-255, (1998).*

Delacruz L., Bach P.H. “The role of ochratoxin A metabolism and biochemistry in animal and human nephrotoxicity”. *Journal of Biopharmaceutical Sciences* **1**, 277-304 (1990).

Dharmshila K., Sinha S.P. “Effect of retinol on ochratoxin-produced genotoxicity in mice”. *Food Chem. Toxicol.* **32**, 471-475 (1994).

Dhuley J.N. “Effect of some Indian herbs on macrophage functions in ochratoxin A treated mice”. *Journal of Ethnopharmacology* **58**, 15-20 (1997).

Di Paolo N., Guarnieri A., Loi F., Sacchi G., Mangiarotti A.M., Di Paolo M. “Acute renal failure from inhalation of mycotoxins”. *Nephron* **64**, 621-625 (1993).

Di Rosa M., Ialenti A., Ianaro A., Sautebin L. “Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways”. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **54**, 229-238 (1996).

Dirheimer G. “Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity”. *Food Add. Contam.* **13**, 43-44 (1996).

D'Mello J.P.F., Macdonald A.M.C. "Mycotoxin". *Anim. Feed Sci. Tech.* **69**, 155-166 (1997).

Dwivedi P., Burns R.B., Maxwell M.H. "Ultrastructural study of the liver and kidney in ochratoxicosis A in young broiler chicks". *Res. Vet. Sci.* **36**, 104-116 (1984).

Dwivedi P., Burns R.B. "Effect of ochratoxin A on immunoglobulins in broiler chicks". *Res. Vet. Sci.* **36**, 117-121 (1984).

El-Banna A.A., Pitt J.I., Leistner L. "Production of mycotoxins by *Penicillium* species". *System Appl. Microbiol.* **10**, 42-46 (1987).

Elling F., Moller T. "Mycotoxic nephropathy in pigs". *Bull. World Health Org.* **49**, 411-418 (1973).

Elling F., Hald B., Jacobsen C., Krogh P. "Spontaneous toxic nephropathy in poultry associated with ochratoxin A". *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Swect. A.* **83**, 739-741 (1975).

Elling F. "Demonstration of ochratoxin A in kidneys of pigs and rats by immunofluorescence microscopy". *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A.* **85**, 151-156 (1977).

Ellis J. "Proteins as molecular chaperones". *Nature* **328**, 378-379 (1987).

El-Halouat A., Debevere J.M. "Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes". *Int. J. Food Microbiol.* **35**, 41-48 (1997).

Escher F.E., Koehler P.E., Ayres J.C. “Production of ochratoxin A and B on country cured ham”. *Appl. Microbiol.* **26**, 27-30 (1973).

Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabañes F.J. “Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli”. *Microbiology* **155**, 861-866 (2004).

Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. “Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes”. *Free Rad. Biol. Med.* **11**, 81-128 (1991).

Fink-Gremmels J., Blom M., Vannijnanten F.W. “In vitro investigations on ochratoxin A metabolism”. In: *Creppy E.E., Castegnaro M., Dirheimer G.: Human ochratoxicosis and its pathologies, INSERM, John Libbey EurotextLtd.* **231**, 67-74 (1993).

Follmann W., Hillebrand I.E., Creppy E.E., Bold H.M. “Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated by OTA and α OTA”. *Archives of Toxicology* **69**, 280-286 (1995).

Frisvad J.C., Lund F. “Toxin and secondary metabolite production by *Penicillium* species growing in stored cereals”. In: *Occurrence and significance of mycotoxins. Ed. Scudamore K.A. Central Science Laboratori, Londra.* pp. 146-171 (1993).

Fu J.Y., Masferrer J.L., Sebert K., Raz A., Needleman P. “The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes”. *J. Biol. Chem.* **265**, 16737-16740 (1990).

Fuchs R., Appelgren L.E., Hult K. “Distribution of ¹⁴C-ochratoxin A in mouse monitored by whole-body autoradiography”. *Pharmacol. Toxicol.* **63**, 355-360 (1988).

Fukal L. “A survey of cereals, cereal products, feedstuffs and porcine kidneys for ochratoxin A by radioimmunoassay”. *Food Addit. Contam.* **7**, 253-258 (1990).

Galtier P. “Devenir de l’ochratoxine A dans l’organisme animal. Distribution tissulaire et élimination chez le rat”. *Ann. Rech. Vet.* **5**, 319-328 (1974b).

Galtier P. “Devenir de l’ochratoxine A dans l’organisme animal. Transport sanguin de la toxine chez le rat”. *Ann. Rech. Vet.* **5**, 311-318 (1974).

Galtier P., Boneu B., Charpenteau, J.L., Bodin G. “Physiopathology of hemorrhagic syndrome related to ochratoxin A intoxication in rats”. *Food Cosmet. Toxicol.* **17**, 49-53 (1979).

Galtier P., Alvinerie M., Charpenteau J.L. “The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pig, rabbits and chickens”. *Food Cosmet. Toxicol.* **19**, 735-738 (1981).

Galtier P. “Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals”. *IARC Science Publications* **115**, 187-200 (1991).

Gareis M., Wolff J. “Relevance of mycotoxin contaminated feed for farming animals and carry over of mycotoxins in food of animal origin”. *Mycoses* **43**, 79-83 (2000).

Gareis M., Scheuer R. "Ochratoxin A in meat and meat products". *Arch. Lebensmittelhyg* **51**, 102-104 (2000).

Gautier J.C., Holzhaeuser D., Markovic J., Gremaud E., Schilter B., Turesky J. "Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats". *Free Rad. Biol. Med.* **30**, 1089-1098 (2001).

Gekle M., Silbernagl S. "Renal Toxicodynamics of ochratoxin A: a pathophysiological approach". *Kidney Bood Pressure Research* **19**, 225-235 (1996).

Gekle M., Gabner B., Freudinger R., Mildenberg S., Silbernagl S., Pfaller W., Schramek H. "Characterization of an ochratoxin A-differentiated and cloned renal epithelial cell line". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **152**, 282-291 (1998).

Ghosh S., May M.J., Kopp E.B. "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses". *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225-260 (1998).

Gillman I.G., Clark T.N., Manderville R.A. "Oxidation of ochratoxin A by an Fe-porphyrin system: model for enzymatic activation and DNA cleavage". *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 1066-1076 (1999).

Golinski P., Hult K., Grabarkiewicz-Szczesna J., Chelkowski J., Szebiotko K. "Spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in porcine kidney and serum samples in Poland". *Appl. Environ. Microb.* **49**, 1014-1015 (1985).

Grosse Y., Baudrimont I., Castegnaro M., Creppy E.E., Dirheimer G., Pfohl-Leszkowicz A. "Ochratoxin A metabolites and DANN-adducts formation in monkey kidney cell". *Chemico-Biological interaction* **95**, 175-187 (1995).

Gupta M., Bandyopadhyay S., Paul B., Majumder S.K. “Haematological changes produced in mice by ochratoxin A”. *Toxicology* **14**, 95-99 (1979).

Gupta M., Sasmal D., Bandyopadhyay S., Bagchi G., Chatterjee T., Dey S. “Haematological changes produced in mice by ochratoxin A and citrinin”. *Toxicology* **26**, 55-62 (1983).

Gutteridge J.M.C. “Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage”. *Clin. Chem.* **41**, 1819-1828 (1995).

Hagelberg S., Hult K., Fuchs R. “Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties”. *Journal of Applied Toxicology*. **9**, 91-96 (1989).

Hagblom P. “Production of ochratoxin A in barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum*: effect on fungal growth, time, temperature, and inoculum size”. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1205-1207 (1982).

Hagblom P. E., Ghosh J. “Postharvest production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* in barley with different protein levels”. *Appl. Environ. Microb.* **49**, 787-790 (1985).

Hagelberg S., Hult K., Fuchs R. “Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties”. *Journal of Applied Toxicology* **9**, 91-96 (1989).

Halliwell B. “Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease”. *Am. J. Med.* **91**, 14-22 (1991).

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Cross C.E. “Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now?”. *J. Lab. Clin. Med.* **119**, 598-620 (1992).

Halliwell B. “Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence?”. *Lancet* **344**, 721-724 (1994).

Halstensen A.S., Nordby K.C., Elen O., Eduard W. “Ochratoxin A in grain dust-estimated exposure and relations to agricultural practices in grain production”. *Ann. Agric. Environ. Med.* **11**, 245-254 (2004).

Halt M. “Moulds and mycotoxins in herb tea and medicinal plants”. *Eur. J. Epidemiol.* **14**, 269-74 (1998).

Harvey R.B., Elissalde M.H., Kubena L.F., Weaver E.A., Corrier D.E., Clement B.A. “Immunotoxicity of ochratoxin A to growing gilts”. *Am. J. Vet. Res.* **53**, 1966-1970 (1992).

Hasinoff B.B., Rahimtula A.D., Omar R.F. “NADPH-cytochrome-P450 reductase promoted hydroxyl radical production by the iron(III)-ochratoxin A complex”. *Biochim. Biophys. Acta* **1036**, 78-81 (1990).

Hayes A.W., Hood R.D., Lee H.L. “Teratogenic effects of ochratoxin A in mice”. *Teratology* **9**, 93-97 (1974).

Hennigen M.R., Dick T. “Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul, Brazil”. *Food Addit. Contam.* **12**, 677-681 (1995).

Heptinstall R.H. “Pathology of the kidney”. *Little Brown & Co.*, Boston **11**, 828-836 (1974).

Heenan C.N., Shaw K.J., Pitt J.I. "Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar". *J. Food Mycol.* **1**, 67-72 (1998).

Herrmann J.M., Neupert W. "Protein transport into mitochondria". *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 210-214 (2000).

Hesseltine C.W. "Mycotoxins". *Mycopathol. Mycol. Appl.* **39**, 371-83 (1969).

Hesseltine C.W., Vandergraft E.E., Fennell D.I., Smith M.L., Shotwell O.L. "Aspergilli as ochratoxin producers". *Mycologia* **64**, 539-550 (1972).

Hoehler D., Marquardt R.R., McIntosh A.R., Xiao H. "Free radical generation as induced by ochratoxin A and its analogs in bacteria (*Bacillus brevis*)". *J. Biol. Chem.* **271**, 27388-27394 (1996).

Hoehler D., Marquardt R.R., McIntosh A.R., Hatch G.M. "Induction of free radicals in hepatocytes, mitochondria and microsomes of rats by ochratoxin A and its analogs". *Biochim. Biophys. Acta* **1357**, 225-233 (1997).

Hohler D. "Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action". *Z. Ernährungswiss.* **37**, 2-12 (1998).

Holmberg T., Breitholtz-Emanuelsson A., Haggblom P., Schwan O., Hult K. "*Penicillium verrucosum* in feed of ochratoxin A positive swine herds". *Mycopathologia* **116**, 169-176 (1991).

Hood R.D., Kuczuk M.I.I., Szezech G.M. "Effects in mice of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and T-2 toxin". *Teratology* **17**, 25-30 (1978).

Horie Y. “Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*”. *Nippon Kingakukai Kaiho* **36**, 73-76 (1995).

Hrabar A., Suljaga K., Borcic B., Aleraj B., Ceovic S., Cvoriscid D. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **27**, 137-145 (1976).

Huff W.E., Doerr J.A., Hamilton P.B. “Decreased glycogen mobilization during ochratoxicosis in broiler chickens”. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 122-126 (1979a).

Huff W.E., Doerr J.A., Hamilton P.B., Hamann D.D., Peterson R.E., Ciegler A. “Evaluation of bone strength during aflatoxicosis and ochratoxicosis”. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 102-107 (1980).

Huff W.E. Kubena L.F., Harvey R.B. “Progression of ochratoxicosis in broiler chicks”. *Poultry Sci.* **67**, 1139-46 (1988).

Hult K., Hokby E., Gatenbeck S., Rutqvist L. “Ochratoxin A in pig blood: method of analysis and use as a tool for feed studies”. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 772-776 (1979).

Hur G.M., Ryu Y.S., Yun H.Y., Jeon B.H., Kim Y.M., Seok J.H., Lee J.H. “Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene expression by activation of NF- κ B”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 917-922 (1999).

IARC. “Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic, aromatic amines and mycotoxins”. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Lyon. vol.56 (1993).

Jarvis B.B., Miller D. “Mycotoxins as harmful indoor air contaminants”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 367-372 (2005).

Jiménez A.M., Sanchis V., Mateo R., Hernandez E. “*Penicillium* pre-harvest corn in Valencia (Spain) II. Study of the enzymatic and toxigenic capacities of the species”. *Mycopathologia* **96**, 13-18 (1986).

Jiménez A.M., Lopez de Cerain A., Gonzalez-Penas E., Bello J. “Determination of ochratoxin A in pig liver-derived pates by high-performance liquid chromatography”. *Food Addit. Contam.* **18**, 559-63 (2001).

Jonsyn F.E., Maxwell S.M., Hendrickse R.G. “Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone”. *Mycopathologia* **131**, 121-126 (1995).

Joosten H.L.M.J., Goetz J., Pittet A., Schellenberg M., Bucheli P. “Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries”. *Int. J. Food Microbiol.* **65**, 39-44 (2001).

Jorgensen K., Rasmussen G., Thorup I. “Ochratoxin A in danish cereals 1986-1992 and daily intake by the danish population”. *Food Addit. Contam.* **13**, 95-104 (1996).

Jorgensen K. “Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A”. *Food Addit. Contam.* **15**, 550-554 (1998).

Kamp H.G., Eisenbrand G., Schlatter J., Würth K., Janzowski C. “Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells”. *Toxicology* **206**, 413-425 (2005).

Kane A., Creppy E.E., Roth A., Roschenthaler R., Dirheimer G. “Distribution of the [³H]-label from low doses of radioactive ochratoxine A ingested by rats, and evidence for DNA single-strand breaks caused in liver and kidneys”. *Arch. Toxicol.* **58**, 219-224 (1986).

Kanisawa M., Suzuki S., Kozuka Y., Yamazaki M. “Histopathological studies on the toxicity of ochratoxin A in rats. I. Acute oral toxicity”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **42**, 55-64 (1977).

Kanisawa M., Suzuki S. “Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin”. *Gann.* **69**, 599-600 (1978).

Kanisawa M., Suzuki S., Moroi K. “The mode of action of ochratoxin A in acute enteritis in rats”. *JEPTO* **10**, 56-63 (1990).

Kaul N., Gopalakrishna R., Gundimeda U., Choi J., Forman H.J. “Role of protein kinase C in basal and hydrogen peroxide-stimulated NF- κ B activation in the murine macrophage J774A.1 cell line”. *Arch. Biochem. Biophys.* **350**, 79-86 (1998).

Khan S., Martin M., Bartsch H., Rahimtula A.D. “Perturbation of liver microsomal calcium homeostasis by ochratoxin A”. *Biochemical Pharmacology* **38**, 67-72 (1989).

Kiessling K., Petterson H., Sandholm K., Olson M. “Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa and rumen bacteria”. *Appl. Environm. Microbiology* 1070-1073 (1984).

Kitchen D.N., Carlton W.W., Tuite J. “Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in Beagle dogs. II. Pathology”. *Vet. Pathol.* **14**, 261-272 (1977).

Kojima M., Morisaki T., Izuhara K., Uchiyama Y., Matsunari Y., Katano M., Tanaka M. “Lipopolysaccharide increases cyclooxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor-kB activation”. *Oncogene* **19**, 1225-1231 (2000).

Kozakiewicz Z., Paterson R.R.M., Bridge P.D. “Novel approaches to the identification of mycotoxin producing *Penicillium* species”. In: *Occurrence and significance of mycotoxins. Central Science Laboratory. Londra Scudamore (Ed.)*. pp. 64-75 (1993).

Krogh P., Elling F. “Fungal toxins and endemic (Balkan) nephropathy”. *The Lancet* **3**, 40 (1976).

Krogh P., Hald B., Plestina R., Ceovic S. “Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs”. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **85**, 238-240 (1977).

Krogh P. “Casual associations of mycotoxic nephropathy”. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A.* **269**, 1-28 (1978b).

Krogh P., Elling F., Friis C.H.E., Mald B., Larsen A.E., Lillehoj E.B., Madsen A., Mortensen H.P., Rasmussen F., Ravuskou U. “Porcine nephropathy induced by longterm ingestion of ochratoxin A”. *Vet. Pathol.* **16**, 466-475 (1979).

Krogh P. “Ochratoxins in food”. In: *P. Krogh Mycotoxins in food. Food science and technology series of monographs, Academic press.* 97 (1987).

Krogh P. “Causal association of mycotoxic nephropathy”. In: *Medical mycology, Preusser H.J. (ed.)* **8**, 291-299 (1980).

Krogh P. “Porcine nephropathy associated with ochratoxin A”. In: *Mycotoxins and animal foods*. Smith J.E., Henderson R.S. Ed. CRC Press pp. 627-645 (1991).

Kuiper-Goodman T., Scott P.M. “Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A”. *Biomed. Environ. Sci.* **2**, 179-248 (1989).

Kuiper-Goodman T. “Risk assessment of ochratoxin A residues in food”. In: Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chemozemsky I.N., Bartsch H. (Eds.). *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Sci. Publ. No. **115**, 307 (1991).

Kumagai S., Ai Bara K. “Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **64**, 94-102 (1982).

Kumagai S. “Ochratoxin A: plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats”. *Food and Chemical Toxicology* **23**, 941-943 (1985).

Kumagai S. “Effect of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejunal absorption of ochratoxin A in rats”. *Food Chem. Toxicol.* **26**, 753-758 (1988).

Kuramochi G., Gekle M., Silbernagl S. “Ochratoxin A disturbs pH homeostasis in the kidney: increase in pH and HCO₃⁻ in the tubules and vasa recta”. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* **434**, 392-397 (1997).

Kuramochi G., Gekle M., Silbernagl S. “Derangement of pH homeostasis in the renal papilla: ochratoxin A increases pH in vasa recta blood”. *Nephron* **76**, 472-476 (1997).

IARC. “Ochratoxin A”. In: *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.* **56**, 489-521 (1993).

Larsen T.O., Svendsen A., Smedsgaard J. “Biochemical characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*”. *Appl. Environ. Microb.* **67**, 3630-3635 (2001).

Lea T., Steien K., Stormer F.C. “Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression”. *Mycopathologia* **107**, 153-159 (1989).

Lee S.H., Soyoola E., Chanmugarn P. “Selective expression of mitogen inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide”. *J.Biol. Chem.* **267**, 25934-25939 (1992).

Lee H.B., Magan N. “Environmental factors and nutritional utilization patterns affect niche overlap indices between *Aspergillus ochraceus* and other spoilage fungi”. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**, 300-304 (1999).

Li S., Marquardt R.R., Frohlich A.A., Vitti T.G., Crow G. “Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **145**, 82-90 (1997).

Liehr G., Xan X., Bhat H.K. “³²P-Postlabelling in studies of hormonal carcinogenesis”. In: *D.H. Phillips, M. Castegnaro, H. Bartsch Eds. Postlabelling methods for detection of DNA adducts. IARC Scientific Publications No.124*, 149-155 (1993).

Linquist S., Craig E.A. “The heat shock proteins”. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631-777 (1988).

Lock E.A., Hard G.C. “Chemically induced renal tubule tumors in the laboratory rat and mouse: review of the NCI/NTP database and categorization of renal carcinogens based on mechanistic information”. *Crit. Rev. Toxicol.* **34**, 211-299 (2004).

Luster M.I., Germolec D.R., Burleson G.R., Jameson C.W., Ackermann M.F., Lamm K.R., Hayes H.T. “Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A”. *Cancer Res.* **47**, 2259-2263 (1987).

Maaroufi K., Pfohl-Leszkowics A., Achour A., el May M., Grosse Y., Hammami M., Ellouz F., Creppy E.E., Bacha H. “Ochratoxin A genotoxicity, relation to renal tumours”. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis* **71**, 21-31 (1994).

MacDonald S., Wilson P., Barnes K., Damant A., Massey R., Mortby E., Shepherd M.J. “Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey”. *Food Addit. Contam.* **16**, 253-60 (1999).

Madhyastha S.M., Marquardt R.R., Frohlich A.A., Platford G., Abramson D. “Effects of different cereals and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*”. *J. Agr. Food Chem.* **38**, 1506-1510 (1990).

Madhyastha S.M., Marquardt R.R., Abramson D. “Effect of ochratoxin producing fungi on the chemical composition of wheat and barley”. *J. Food Quality* **16**, 287-299 (1993).

Maier J.A. M., Hla T., Machag T. “Cyclooxygenase is an immediate early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells”. *J. Biol. Chem.* **265**, 10805-10809 (1990).

Malaveille C., Brun G., Bartsch H. “Structure-activity studies in *E. coli* strains on ochratoxin A (OTA) and its analogues implicate a genotoxic free radical and cytotoxic thiol derivative as reactive metabolites”. *Mutat. Res.* **307**, 141-147 (1994).

Manolova Y., Manolov G., Parvanova L., Petkova-Bocharova T., Castegnaro M., Chernozemski I.N. “Induction of characteristic chromosomal aberrations, particularly X-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A, a mycotoxin implicated in Balkan endemic nephropathy”. *Mutat. Res.* **231**, 143-149 (1990).

Maresca M., Mahfound R., Pfohl-Leszkowicz A., Fantini J. “The mycotoxin ochratoxin A alters intestinal barrier and absorption functions but has no effect on chloride secretion”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **176**, 54-63 (2001).

Markaki P., Delpont-Binet C., Grosso F., Dragacci S. “Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography”. *J. Food Protect.* **64**, 533-537 (2001).

Marin L.M., Murtha J., Dong W., Pestka J.J. “Effects of mycotoxins on cytokine production and proliferation in EL-4 thymoma cells”. *J. Toxicol. Environ. Health* **48**, 379-396 (1996b).

Marquardt R.R., Frohlich A.A. “A review of recent advances in understanding ochratoxicosis”. *Journal of Animal Science* **70**, 3968-3988 (1992).

Mayerus P., Bresch H., Otteneder H. “Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings”. *Arch. Lebensmittelhyg* **51**, 95-97 (2000).

Meki A.R., Hussein A.A. “Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney”. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **130**, 305-313 (2001).

Meisner H. “Energy-dependent uptake of ochratoxin A by mitochondria”. *Arch. Biochem. Biophys.* **173**, 132-140 (1976).

Meli R., Ferrante M.C. Mattace Raso G., Cavaliere M., Di Carlo R., Lucisano A. “Effect of fumonisin B1 on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in LPS stimulated J774A.1 cells”. *Life Science* **67**, 2845-2853 (2000).

Micco C., Miraglia M., Brera C., Corneli S., Ambrozzi A. “Evaluation ochratoxin A level in human milk in Italy”. *Food additives and Contaminants* **12**, 351-354 (1995).

Mills J.T., Abramson D. “Ochratoxigenic potential of *Penicillium* spp. isolated from stored rapessed and cereals in western Canada”. *Canadian Journal of Plant Phatology* **4**, 37-41 (1982).

Mills J.T., Abramson D., Frohlich A.A., Marquardt R.R. “Citrinin and ochratoxin A production by *Penicillium* spp. from stored durum wheat”. *Canadian Journal of Plant Phatology* **11**, 357-360 (1989).

Mills J.T., Seifert K.A., Frisvad J.C., Abramson D. “Nephrotoxicogenic *Penicillium* species occurring on farm-stored cereal grains in western Canada”. *Mycopathologia* **130**, 23-28 (1995).

Miraglia M., De Dominicis A., Brera C., Corneli S., Cava E., Menghetti E., Miraglia E. “Ochratoxin A levels in human milk and related food samples: an exposure assessment”. *Natural Toxins* **3**, 436-444 (1995).

Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. “Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology”. *Pharmacological Reviews* **43**, 109-142 (1991).

Moon Y., Pestka J.J. “Vomitoxin-induced cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages mediated by activation of ERK and p38 but not JNK mitogen-activated protein kinases”. *Toxicol. Sci.* **69**, 373-382 (2002).

Moon Y., Pestka J.J. “Cyclooxygenase-2 mediates interleukin-6 upregulation by vomitoxin (deoxynivalenol) in vitro and in vivo”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **187**, 80-88 (2003).

Moroi K., Suzuki S., Kuga T., Yamazaki M., Kanisawa M. “Reduction of ochratoxin A toxicity in mice treated with phenylalanine and phenobarbital”. *Toxicology Letters* **25**, 1-5 (1985).

Müller G., Kielstein P., Kohler H., Berndt A., Rosner H. “Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defense reactions in the mouse model”. *Mycoses* **38**, 85-91 (1995).

Müller G., Rosner H., Rohrmann B., Erler W., Geschwend G., Gräfe U., Burkert B., Möller U., Diller R., Sachse K., Köhler H. “Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cell line THP-1”. *Toxicology* **184**, 69-82 (2003).

Munro I.C., Moodie C.A., Kuiper-Goodman T., Scott P.M., Grice H.C. “Toxicologic changes in rats fed graded dietary levels of ochratoxin A”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **28**, 180-188 (1974).

Muriuki G.K., Siboe G.M. “Maize flour contaminated with toxigenic fungi and mycotoxins in Kenia”. *Afr. J. Health Sci.* **2**, 236-341 (1995).

Natori S., Sasaki F., Kurata H., Hudagawa S., Ichinoe M., Saito M., Umeda M. “Chemical and cytotoxicity survey on the production of ochratoxins and penicillic acid by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm”. *Chem. Pharm. Bull.* **18**, 2259-68 (1970).

Neal G.E. “Toxicological research into the effects of some secondary fungal metabolites in food and feeds”. In: *Natural Toxicants in Food: Progress and Prospects*, ed. *Watson D.H.* CRC Press, Boca Raton, FL. 299-326 (1998).

Neely W.C., West A.D. “Spectroanalytical parameters of fungal metabolites.3.Ochratoxin A”. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **55**, 1305-1309 (1972).

Neshiem S. “Isolation and purification of ochratoxins A and B and preparation of their methyl and ethyl esters”. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **52**, 975-983 (1969).

Northolt M.D., Van Egmond H.P., Paulsch W.E. “Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature”. *J. Food Protect.* **42**, 485-490 (1979).

Northolt M.D., Bullerman L.B. “Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions”. *J. Food Protect.* **45**, 519-526 (1982).

Obrecht-Pflumio S., Chassat T., Dirheimer G., Marzin D. “Genotoxicity of ochratoxin A by *Salmonella* mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes”. *Mutat. Res.* **446**, 95-102 (1999).

O’Brien E., Dietrich D.R. “Ochratoxin A: the continuing enigma”. *Crit. Rev. Toxicol.* **35**, 33-60 (2005).

Omar R.F., Hasinoff B.B., Mejilla F., Rahimtula A.D. “Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation”. *Biochemical Pharmacology* **40**, 1183-1191 (1990).

Omar R.F., Gelboin H.V., Rahimtula A.D. “Effect of cytochrome P450 induction on the metabolism and toxicity of ochratoxin A”. *Biochem. Pharmacol.* **51**, 207-216 (1996).

O’Neill L.A., Kaltschmidt C. “NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function”. *Trends Neurosci.* **20**, 252-258 (1997).

Osweler G.D. “Mycotoxins”. In : *Disease of Swine. Seventh edition.* Edited by A.D. Leman B.E., Straw W.L. Mengling S., D’Allaire and D.J. Taylor. London: Wolfe Publishing. pp735-743, (1992).

Palli D., Miraglia M., Sapeva C., Masala G., Cava E., Colatosti M., Corsi A.M., Russo A., Brera C. “Serum levels of ochratoxin A in Health Adults in Tuscany: Correlation with Individual Characteristics and between Repeat Measurements”. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **8**, 265-269 (1999).

Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. “Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor”. *Nature* **327**, 524-526 (1987).

Pasteiner S. “Coping with mycotoxin contaminated feedstuffs”. *Feed International* pp. 112-16 (1997).

Paster N., Lisker N., Chet I. "Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm grown under controlled atmospheres". *Appl. Environ. Microb.* **45**, 1136-1139 (1983).

Patterson M., Darnoglou A.P. "The effect of water activity and pH on the production of mycotoxins by fungi growing on a bread analogue". *Lett. Appl. Microbiol.* **3**, 123-125 (1986).

Pepeljnjak S., Blozevic N. "Contamination with moulds and occurrence of ochratoxin A in smoked meat products from endemic nephropathy regions in Yugoslavia". *Proceedings of the Vth IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Edited by Pfannhauser W. and Czedick-Eysenberg (Vienna Austrian Chemical Society).* pp102-105 (1982).

Pepeljnjak S., Cvetnic Z. "Distribution of moulds on stored grains in households in an area affected by endemic nephropathy in Yugoslavia". *Mycopathology* **86**, 83-87 (1984).

Pfanner N. "Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences". *Curr. Biol.* **10**, R412-R415 (2000).

Pfohl-Leszkowicz A., Grosse Y., Kane A., Castegnaro M., Creppy E.E., Dirheimer G. "Preponderance of DNA-adducts in kidney after ochratoxin A exposure". In : *Human Ochratoxicosis and its Pathologies.* Creppy E.E., Castegnaro M. and Dirheimer G. *Eurotext* **231**, 199-207 (1993).

Pfohl-Leszkowicz A., Grosse Y., Kane A., Creppy E.E., Dirheimer G. "Differential DNA adduct formation and disappearance in the three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A". *Mut. Res.* **289**, 265-273 (1993).

Pier A.C., Cysewski S.J., Richard J.L., Baetz A.L., Mitchell L. *US Anim. Health Assoc. 80th Annual Meeting* (1976).

Pitout M.J., Nel W. “The inhibitory effect of ochratoxin A on bovine carboxypeptidase A in vitro”. *Biochem. Pharmacol.* **18**, 1837-43 (1969).

Pitt J.L., Hocking A.D. “Fungi and food spoilage”. 2^o Ed. *Chapman and Hall*, Londra (1997).

Pitt J.L. “*Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A”. *Appl. Environ. Microb.* **53**, 266-269 (1987).

Pittet A. “Natural occurrence of mycotoxins in food and feed an uptake review”. *Rev. Med. Vét.Toulouse* **149**, 479-492 (1998).

Pohland A.E., Nesheim S., Friedman L. “Ochratoxin A: a review”. *Pure Appl. Chem.* **64**, 1029-1046 (1992).

Politis I., Fegeros K., Nitsch S., Schatzmayr G., Kantas D. “Use of Trichosporon mycotoxinivorous to suppress the effects of ochratoxicosis on the immune system of broiler chicks”. *Br. Poult. Sci.* **46**, 58-65 (2005).

Poppe S.M., Stuckhardt J.L., Szczech G.M. “Postnatal behavioral effects of ochratoxin A in offspring of treated mice”. *Teratology* **27**, 293-300 (1983).

Puchlev A. “La nephropathie endémique en Bulgarie”. *Extrait du Symposium sur la nephropathie endémique de l'Académie serbe des sciences et des arts.* pp. 15-27 (1973).

Puchlev A. In: *Proceedings of the 2end International Symposium on Endemic Nephropathy*. Bulgarian Academy of Sciences, Sofia pp.15-18 (1974a).

Purchase I.F.H., Theron J.J. “The acute toxicity of ochratoxin A to rats”. *Food Cosmet. Toxicol.* **6**, 479-483 (1968).

Rahimtula A.D., Bereziat J.C., Bussacchini-Griot V., Bartsch H. “Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity”. *Biochemical Pharmacology* **37**, 4469-4477 (1988).

Ramos A.J., Labernia N., Marin S., Sanchis V., Magan N. “Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains”. *Int. J. Food Microbiol.* **44**, 133-140 (1998).

Rizzo A.F., Atroshi F., Ahotupa M., Sankari S., Elovaara E. “Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin”. *J. Vet. Med. A.* **41**, 81-90 (1994).

Robbiano L., Baroni D., Carrozzino R., Mereto E., Brambilla G. “DNA damage and micronuclei induced in rat and human kidney cells by six chemicals carcinogenic to the rat kidney”. *Toxicology* **204**, 187-195 (2004).

Roth A., Chakor K., Creppy E.E., Kane A., Roschenthaler R., Dirheimer G. “Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice”. *Toxicology* **48**, 293-308 (1988).

Rutaqvist L., Bjorklund N.E., Hult K., Hokby E., Carlsson B. “Ochratoxin A as the cause of spontaneous nephropathy in fattening pigs”. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 920-925 (1978).

Salvemini D., Misko T.P., Mansferrer J.L., Seibert K., Currie M.G., Needleman P. “Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes”. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 7240-7244 (1993).

Sanchis V., Viñas I., Jiménez M., Calvo M.A., Hernandez E. “Mycotoxin-producing fungi isolated from bin-stored corn”. *Mycopathologia* **80**, 89-93 (1982).

Sauvant C., Holzinger H., Mildenerger S., Gekle M. “Exposure to nephrotoxic ochratoxin A enhances collagen secretion in human renal proximal tubular cells”. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 31-37 (2005).

Schatz G., Dobberstein B. “Common principles of protein translocation across membranes”. *Science* **271**, 1519-1526 (1996).

Schell M.T., Spitzer A.L., Johnson J.A., Lee D., Harris H.W. “Heat shock inhibits NF- κ B activation in a dose- and time-dependent manner”. *Journal of Surgical Research* **129**, 90-93 (2005).

Schmedtje J.F., Ji Y.S., Liu W.L., Dubois R.N., Runge M.S. “Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF- κ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells”. *J. Biol. Chem.* **272**, 601-608 (1997).

Schmid S.L., Braell W.A., Rothman J.E. “ATP catalyzes the sequestration of clathrin during enzymatic uncoating”. *J. Biol. Chem.* **260**, 10057-10062 (1985).

Schmid S.L., Rothman J.E. “Two classes of binding sites for uncoating protein in clathrin triskelions”. *J. Biol. Chem.* **260**, 10050-10056 (1985).

Scott P.M., Van Walbeek W., Kennedy B. and Anyeti D. “Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin, and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products”. *J. Agric. Food Chem.* **20**, 1103-1109 (1972).

Scott P.M. “Penicillium and Aspergillus toxins”. In: *J.D. Miller, Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxin. Trenholm, Eagan Press*, 261 (1994).

Scott P.M. “Effects of processing and detoxication treatments on ochratoxin A: Introduction”. *Food Addit. Contam.* **13**, 19-22 (1996).

Scott P.M. “Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing”. *J. AOAC Int.* **79**, 875-882 (1996).

Screemannarayana O., Frohlich A.A., Vitti T.G., Marquardt R.R., Abramson D. “Studies of the tolerance and disposition of ochratoxin A in young calves”. *J. Anim. Sci.* **66**, 1703-1711 (1988).

Scudamore K.A. Clarke J.H., Hetmanski M.T. “Isolation of *Penicillium* strains producing ochratoxin A, citrinin, xanthomegnin, viomellein and vioxanthin from stored cereal grains”. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**, 82-87 (1993).

Scudamore K.A. “Ochratoxin A in animal feed effects of processing”. *Food Addit. Contam.* **13**, 39-42 (1996).

Scudamore K.A. “Mycotoxins”. In: *Natural Toxicants in Food*, ed. *Watson D.H. CRC Press, Boca Raton, FL.* pp.147-181 (1998).

Seegers J.C., Lottering M-L., Garlinski P.J. “The mycotoxin ochratoxin A causes apoptosis-associated DNA degradation in human lymphocytes”. *Med. Sci. Res.* **22**, 417-419 (1994).

Seibert K., Zhang Y., Leahy K., Hauser S., Masferrer J., Isakson P. “Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues”. *Adv. Exp. Med. Biol.* **400A**, 167-170 (1997).

Semeniuk G. “Storage of Cereal Grains and Their Products”. In: *Anderson J.A. and Alcock A.W. Eds. Amer. Ass. Cereal Chem. Monograph series*, Vol. II, pp.77-151 (1954).

Sen R., Baltimore D. “Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences”. *Cell* **46**, 705-716 (1986).

Seto H., Okura T., Takesue T., Ikemura T. “Reaction of malondialdehyde with nucleic acid. Formation of fluorescent pyrimido[1,2-a]purin-10(3H)-one nucleosides”. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **56**, 1799-1802 (1983).

Skaug M.A. “Analysis of norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A”. *Food Addit. Contam.* **16**, 75-78 (1999).

Singh G.S., Chauhan H.V., Jha G.J., Singh K.K. “Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks”. *J. Comp. Pathol.* **103**, 399-410 (1990).

Slayne M.A. “Ochratoxin A in food in the U.K”. In: *Mycotoxins and phycotoxins in perspective of the turn of the millenium*. Ed. De Koe W.J., Samson R.A., Van Egmond H.P., Gilbert J., Sabino M. Wageningen Holland. pp.143-149 (2001).

Smith W.L. “The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action”. *Biochem. J.* **259**, 315-329 (1989).

Smith T.K., Seddon I.R. “Synergism demonstrated between fusarium mycotoxins”. *Feedstuffs* 12-17 (1998).

Snyder Y.M., Guthrie L., Evans G.F., Zuckerman S.H. “Transcriptional inhibition of endotoxin-induced monokine synthesis following heat shock in murine peritoneal macrophages”. *J. Leukoc. Biol.* **51**, 181-187 (1992).

Soleas G.J., Yan J., Goldberg D.M. “Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection”. *J. Agr. Food Chem.* **49**, 2733-2740 (2001).

Speijers G.J.A., Van Egmond H.P. “Worldwide ochratoxin A levels in food and feeds”. *Human Ochratoxicosis and its Pathologies. Colloque INSERM*, edited by Creppy E.E., Castegnaro and Dirheimer G. **231**, 85-100 (1993).

Stack M.E., Mislivec P.B., Gibson R., Pohland A.E., Denizel T. In: *Proceedings of the V International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins* Vienna, Austria pp.196-199 (1982).

Steele J.A., Davis N.D., Diener U.L. “Effect of zinc, copper, and iron on ochratoxin A production”. *Appl. Microbiol.* **25**, 847 (1973).

Stetina R., Votava M. “Induction of DNA single-strand breaks and DNA synthesis inhibition by patulin, ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1 in

cell lines CHO and AWRP". *Folia Biologica (Praha)* **32**, 138-144 (1986).

Steyn P.S., Holzapfel C.W. "The synthesis of ochratoxin A and B metabolites of *Aspergillus ochraceus*". *Wilh. Tetrahedron* **23**, 4449-4461 (1967).

Steyn P.S. "Ochratoxin and other dihydroisocoumarins". In: *Microbial Toxins: Fungal Toxins (A.Ciegler, S. Kadis, S.J. Ajl Eds)*. Vol. V, pp. 179-205 (1971).

Steyn P. S., Vlegaar R., Du Preez N.P., Blyth A.A., Seegers J. C. "The in vitro toxicity of analogs of ochratoxin A in monkey kidney epithelial cells". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **32**, 198 (1975).

Steyn P.S. "Ochratoxins and related dihydroisocoumarins". In: *Mycotoxins-Production, Isolation, Separation and Purification. (V.Betina Ed.)* pp. 183-216 (1984).

Stoev S.D. "The role of ochratoxin A as a possible cause of Balkan endemic nephropathy and its risk evaluation". *Veterinary and Human Toxicology* **40**, 352-360 (1998).

Stoev S.D., Stoeva J.K., Anguelov G., Hald B., Creppy E.E., Radic B. "Haematological, biochemical and toxicological investigations in spontaneous cases with different frequency of porcine nephropathy in Bulgaria". *J. Vet. Med. A.* **45**, 229-236 (1998).

Stoev S.D., Stefanov M., Denev S., Radic B., Domijan A.M., Peraica M. "Experimental mycotoxicosis in chickens induced by ochratoxin A and penicillic acid and intervention with natural plant extracts". *Vet. Res. Commun.* **28**, 727-746 (2004).

Stojkovic R., Hult K., Gamulin S., Plestina R. “High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents”. *Biochemistry International* **9**, 33-38 (1984).

Storen O., Holm H., Stormer F.C. “Metabolism of ochratoxin A by rats”. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 785-789 (1982).

Stormer F.C., Storen O., Hansen C.E., Pedersen J.I., Aasen A.J. “Formation of (4R)-and (4S)-4-Hydroxyochratoxin A and 10-hydroxinochratoxin A from ochratoxin A by rabbit liver microsomes”. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 1183-1187 (1983).

Studer-Rohr I., Schlatter J., Dietrich D.R. “Kinetic parameter and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans”. *Arch. Toxicol.* **74**, 499-510 (2000).

Suzuki S., Satoh T., Yamazaki M. “Effects of ochratoxin A on carbohydrate metabolism in rat liver”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **32**, 116-122 (1975).

Suzuki S., Satoh T., Yamazaki M. “The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats”. *Jap. J. Pharmacol.* **27**, 735-744 (1977).

Sweeney M.J., Dobson A.D.W. “Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species”. *Int. J. Food Microbiol.* **43**, 141-158 (1998).

Szczecz G.M., Carlton W.W., Tuite J. “Ochratoxicosis in beagle dogs. II Pathology”. *Vet. Pathol.* **10**, 219-231 (1973a).

Szczecz G.M., Carlton W.W., Tuite J., Caldwell R. “Ochratoxin A toxicosis in swine”. *Vet Pathol.* **10**, 347-364 (1973b).

Szczzech G.M., Carlton W.W., Tuite J. “Ochratoxicosis in beagle dogs. I. Clinical and clinopathological features”. *Vet. Pathol.* **10**, 135-154 (1973c).

Téren J., Varga J., Hamari Z., Rinyu E., Kevei F. “Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains”. *Mycopathologia* **134**, 171-176 (1996).

Téren J., Palagyi A., Varga J. “Isolation of ochratoxin producing *Aspergilli* from green coffee beans of different origin”. *Cereal Res. Commun.* **25**, 303-304 (1997).

Thanos D., Maniatis T. “NF-kappa B: a lesson in family values”. *Cell* **80**, 529-532 (1995).

Trautinger F., Kokesch C., Klosner G., Knobler R.M., Kindas-Mugge I. “Expression of the 72-kDa heat shock protein is induced by ultraviolet. A radiation in a human fibrosarcoma cell line”. *Exp. Dermatol.* **8**, 187-192 (1999).

Turner W.B. “Fungal Metabolites”. *Academic Press, New York* (1971).

Ueno Y. “Mycotoxins”. In: *Toxicological Aspect of Food.* (ed.) Miller K. Elsevier, London pp.139-204 (1987).

Ueno Y., Kawamura O., Sugiura Y. “Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immuno-affinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi”. In: *Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chemozemsky I.N., Bartsch H. (Eds.). Mycotoxins,*

endemic nephropathy and urinary tract tumours. IARC Sci. Publ. No. 115, 71-75 (1991).

Ueno Y. “Residue and risk of ochratoxin A in human plasma and beverages in Japan”. *Mycotoxins* **47**, 25-32 (1998).

Urbano G.R., Taniwaki M.H., Leitao M.F., Vicentini M.C. “Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw brazilian coffee”. *J. Food Protect.* **64**, 1226-1230 (2001).

Valenta H., Goll M. “Determination of ochratoxin A in regional samples of cow’s milk from Germany”. *Food Addit. Contam.* **13**, 669-676 (1996).

Van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L., Scott D.B., Theron J.J. “Ochratoxin A, a toxic metabolite produced *Aspergillus ochraceus* Wilh”. *Nature* **205**, 1112-1113 (1965a).

Van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L. “Micotoxins. II. The constitution of ochratoxins A, B, C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh”. *J. Chem. Soc.* 7083-7088 (1965b).

Van Der Stegen G., Jorissen U., Pittet A., Saccon M., Steiner W., Vincenzi M., Winkler M., Zapp J., Schlatter C. “Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA)”. *Food Addit. Contam.* **14**, 211-216 (1997).

Vane J. “Towards a better aspirin”. *Nature* **367**, 215-216 (1994).

Van Walbeek W., Scott P.M., Harwing J., Lawrence J.W. “*Penicillium viridicatum* westling: a new source of ochratoxin A”. *Can. J. Microbiol.* **15**, 1281-1285 (1969).

Varga J., Kevei F., Rinyu E., Téren J., Kozakiewicz Z. “Ochratoxin production by *Aspergillus* species”. *Appl. Environ. Microb.* **62**, 4461-4464 (1996).

Vaux D.L., Haecker G., Strasser A. “An evolutionary perspective on apoptosis”. *Cell* **76**, 777-781 (1994).

Vazquez-Belda B., Fente-Sampayo C.A., Quinto-Fernandez E., Franco-Abuin C., Rodriguez-Otero J.L., Cepeda-Saez A. “Incidencia de hongos toxigenicos in queseria de la zona de Arzua (La Coruña España)”. *Food Sci. Technol. Int.* **1**, 91-95 (1995).

Visconti A., Pascale M., Centonze G. “Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography”. *J. Chromatog. A.* **864**, 89-101 (1999).

Wangikar P.B., Dwivedi P., Sharma A.K., Sinha N. “Effect in rats of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and aflatoxin B(1). II. Histopathological features of teratological anomalies induced in fetuses”. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* **71**, 352-358 (2004).

Wei X., Sulik K.K. “Pathogenesis of craniofacial and body wall malformations induced by ochratoxin A in mice”. *Am. J. Med. Genet.* **47**, 862-871 (1993).

Welch W.J. “Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease”. *Physiol. Rev.* **72**, 1063-1081 (1992).

Wolff J. “Ochratoxin A in cereals and cereal products”. *Arch. Lebensmittelhyg* **51**, 85-88 (2000).

Xiao H., Marquardt R.R., Frohlich A.A., Ling Y.Z. “Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A”. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 524-530 (1995).

Xiao H., Madhyastha S., Marquardt R.R., Li S., Vodela J.K., Frohlich A.A., Kemppainen B.W. “Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: Structure-activity relationships”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **137**, 182-192 (1996a).

Xiao H., Marquardt R.R., Abramson D., Frohlich A.A. “Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*”. *Applied and Environmental Microbiology.* **62**, 648-655 (1996b).

Xie W., Robertson D.L., Simmons D.L. “Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a new target for non-steroidal anti-inflammatory drugs”. *Drug. Dev. Res.* **25**, 249-265 (1992).

Xie Q.W., Kashiwabara Y., Nathan C. “Role of transcription factor NF-kB/Rel in induction of nitric oxide synthase”. *J. Biol. Chem.* **269**, 4705-4708 (1994).

Yoshizawa T. “Natural occurrence of mycotoxins in small grain cereals (wheat, barley, rye, oats, sorghum, millet, rice). In: *Mycotoxins and animal foods*. Ed. Smith J.E., Henderson R.S. CRC Press, Londra. pp 301-324 (1991).

Zepnik H., Volkel W., Dekant W. “Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F 344 rats after oral administration”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **192**, 36-44 (2003).

Zimmerli B., Dick R. "Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment". *Food Addit. Contam.* **13**, 655-668 (1996).

Zingerle M., Silbernagl S., Gekle M. "Reabsorption of the nephrotoxin ochratoxin A along the rat nephron in vivo". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**, 220-224 (1997).

Zohri A.A., Abdel-Gawad K.M. "Survey of mycoflora and mycotoxins of some dried fruits in Egypt". *J. Basic. Microbiol.* **33**, 279-88 (1993).