

## Fungos ocratoxigênicos e mecanismos de toxicidade da ocratoxina A

### Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A toxicity mechanisms

*Fernando Galdino Ricci<sup>1</sup>, João Gabriel de Albuquerque Cavalcanti<sup>1</sup>, Emerson José Venâncio<sup>1</sup>, Ana Angelita Sampaio Baptista<sup>2</sup>, Marielen de Souza<sup>2</sup>, Bianca Dorana de Oliveira Souza<sup>1</sup>, Franciele Semêncio Chiyoda-Rodini<sup>1</sup>, Elisa Yoko Hirooka<sup>3</sup>, Mario Augusto Ono<sup>1</sup>, Eiko Nakagawa Itano<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Patológicas, CCB, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, CCA, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Ciências de Alimentos e Tecnologia, CCA, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR, Brasil

#### Endereço para correspondência:

Fernando Galdino Ricci

Laboratório de Imunologia Aplicada - Depto. Ciências Patológicas - Centro de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina - Campus Universitário - 86051-970, Londrina, PR, Brasil.

Fone: 55.43.33714469

FAX: 55.43.33714207

E-mail: fernandogricci@hotmail.com

#### Resumo

A Ocratoxina A (OTA) ou (*R*)-*N*-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1*H*-2-benzopirano-7-il) carbonil]-*L*-fenilalanina possui massa molecular de 403,81 g/mol. É produzida por fungos filamentosos, por pelo menos 22 espécies de *Aspergillus* e 2 de *Penicillium*, sendo *A. ochraceus* a primeira espécie produtora descrita. Estes fungos são contaminantes naturais de produtos e ingredientes de origem agrícolas destinados ao consumo humano e animal, o que pode ocasionar em sérios prejuízos a saúde. A OTA é uma toxina produzida como metabólito secundário, possivelmente envolvendo duas vias de biossíntese, pelas vias de dihidro-isocumarina e *L*-β-fenilalanina. Uma vez ingerida, pode causar lesões, principalmente em rins, fígado, coração, pulmões, tecidos e órgãos do sistema imunológico, mucosas do trato gastrointestinal e sistema nervoso central. Pode causar tumores em rins de camundongos e ratos, sendo classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), no grupo 2B, como possivelmente carcinogênica para os humanos. Vários mecanismos da ação tóxica da OTA têm sido descritos na literatura, tais como; inibição de síntese de proteínas e indução de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). A OTA também pode induzir peroxidação lipídica da membrana, apoptose celular e aumento de mediadores inflamatórios. O melhor conhecimento de seus mecanismos tóxicos a nível molecular é importante para entender os efeitos causados nos órgãos-alvo em animais e humanos.

**Palavras-chave:** *Aspergillus*, imunotoxicidade, micotoxina, *Penicillium*

## Abstract

Ochratoxin A (OTA) or (R)-N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl) carbonyl]-L-phenylalanine has a molecular mass of 403.81 g/mol. Produced by filamentous fungi, for at least 22 species of *Aspergillus* and 2 of *Penicillium*, with *A. ochraceus* described as the first producer specie. These fungi are natural contaminants of agricultural products and ingredients intended to animal and human consumption, which can cause serious damage to health. OTA is a toxin produced as a secondary metabolite, possibly involving two biosynthesis pathways, via dihydro-isocoumarin and L-β-phenylalanine. Once ingested, it can cause damages, mainly to kidneys, liver, heart, lungs, tissues and organs of the immunological system, mucous membranes of the gastrointestinal tract and the central nervous system. It can cause tumors in the kidneys of mice and rats, being classified by the International Cancer Research Agency (IARC) in group 2B, as possibly carcinogenic to humans. Several mechanisms of the toxic action of OTA have been described in the literature, such as: inhibition of protein synthesis and induction of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). OTA can also induce lipid membrane peroxidation, cell apoptosis and increased inflammatory mediators. A better knowledge of its toxic mechanisms at the molecular level is important for understand the effects caused on target organs in animals and humans.

**Keywords:** *Aspergillus*, immunotoxicity, mycotoxin, *Penicillium*

## Fungos produtores de Ocratoxina A (OTA)

Diversas espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* são produtores de OTA, uma micotoxina relevante por causar impactos negativos na saúde humana e animal <sup>(1, 2, 3, 4, 5)</sup>. Esses fungos possuem temperaturas ótimas de crescimento que variam entre 15-40°C, e atividade de água entre 0,77-0,99 <sup>(5)</sup>. Podem colonizar diversas culturas agrícolas, ou produtos e alimentos vegetais durante os períodos de pré-colheita, colheita ou armazenamento <sup>(6)</sup>.

A OTA foi descoberta e caracterizada em 1965, na África do Sul, após ser extraída de um meio de cultura contaminado propositalmente com o fungo *Aspergillus ochraceus*, que deu origem ao seu nome <sup>(7)</sup>. Este fungo cresce em temperaturas entre 24-37°C, sendo sua temperatura ótima para produção de OTA de 31°C <sup>(8)</sup>. Posteriormente, a OTA foi identificada em uma amostra de presunto caseiro contaminado pela espécie *Penicillium viridicatum* <sup>(9)</sup>, mas esta espécie foi depois reclassificada como *P. verrucosum* <sup>(10)</sup>. Outras espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* produzem a OTA através de seu metabolismo, e em geral as espécies de *Penicillium* possuem temperatura ótima de crescimento em regiões de clima temperado, em temperaturas mais baixas (15-22°C), e as espécies de *Aspergillus* possuem temperatura ótima de crescimento em regiões de clima tropical, com temperaturas mais elevadas (25-30°C) <sup>(1, 3, 11, 12, 13, 14)</sup>.

No gênero *Penicillium*, ocorrem divergências em relação à classificação das espécies, sendo que os estudos mais recentes consideram *P. verrucosum* e *P. nordicum* como únicas produtoras de OTA deste gênero <sup>(13, 15)</sup>. *P. verrucosum* pode contaminar cereais como trigo, cevada, aveia e centeio, além de outros produtos vegetais, sendo considerado o principal produtor de OTA presente em regiões de clima temperado, possui temperatura de crescimento entre 10-21°C e produz quantidade moderada de OTA. *P. nordicum* pode contaminar principalmente alimentos com alta concentração de cloreto de sódio (NaCl), como carnes secas e curadas e queijos, possui temperatura de crescimento de 15°C e produz grande quantidade de OTA <sup>(13, 15, 16, 17)</sup>.

No gênero *Aspergillus*, diversas espécies são produtoras de OTA: *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. melleus*, *A. petrakii*, *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. westerdijkiae*, *A. sclerotium*, *A. steynii*, *A. albertensis*, *A. wentii* e *A. sulphurous*, pertencentes a seção *Circumdati* <sup>(18, 19, 20)</sup>, e *A. niger* var. *niger*, *A. carbonarius*, *A.*

*tubingensis*, *A. foetidus*, *A. awamori*, *A. lacticoffeatus* e *A. sclerotiumniger*, pertencentes a seção *Niger*.<sup>(11, 18, 20)</sup> As espécies mais importantes deste gênero são *A. niger* e *A. carbonarius*. *A. niger* var. *niger* é um dos principais contaminantes de alimentos, sendo utilizado em processos industriais e com uso na biotecnologia, pode contaminar frutas, uvas, vinhos e grãos de café, possui temperatura de crescimento superior a 30°C e cresce na presença de alta incidência de luminosidade, produz quantidade moderada de OTA. *A. carbonarius* é um contaminante menos comum, e também pode contaminar uvas, vinhos e grãos de café, possui temperatura de crescimento de 30°C, cresce na presença de alta incidência de luminosidade e produz grande quantidade de OTA<sup>(3, 20, 21, 22)</sup>.

### ***OTA em alimentos e a contaminação humana***

A OTA pode estar presente em uma variedade de produtos de origem animal e vegetal, como: arroz, cevada, milho, painço, trigo, feijão, sorgo, soja, aveia, azeitonas, frutas secas, nozes, amendoim, grãos de café, uvas e seus produtos (suco e vinho), carne, leite e queijo<sup>(3, 20, 23)</sup>. Esses produtos estão presentes nos componentes ou são ingredientes importantes na dieta dos animais, e quando a contaminação dos alimentos ocorre, não é possível fazer sua remoção<sup>(20)</sup>. Ademais, quando os animais ingerem a OTA, pode levar a contaminação de seus produtos, como músculos e órgãos<sup>(24)</sup>.

Os principais fatores que determinam a contaminação de produtos vegetais pelas espécies produtoras são: más condições de colheita, secagem, manuseio, transporte e armazenamento de produtos vegetais<sup>(6)</sup>. Condições climáticas no momento da colheita, tipo de grão colhido (perfil nutricional), composição da população fúngica, interação e competição entre os fungos, qualidade de colheita e transporte, temperatura e umidade de armazenamento, pH e temperatura de processamento, uso de enzimas e leveduras, adição de ingredientes contaminados (frutas secas, por exemplo), limpeza, cozimento e extrusão dos alimentos são importantes condições para determinar a contaminação dos alimentos pela OTA<sup>(16)</sup>.

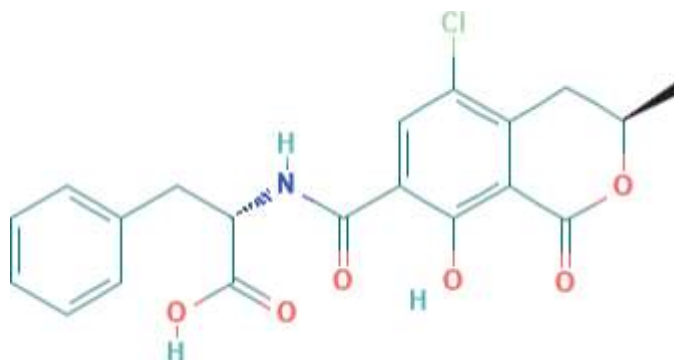
Dentre as principais micotoxinas descritas, a OTA possui importante relevância, pela elevada toxicidade e importância na saúde pública<sup>(23)</sup>. Khaneghah et al. (2018) realizaram uma meta-análise para verificar a prevalência da OTA em alimentos produzidos com cereais destinados ao consumo humano, onde a OTA estava presente em 51% desses alimentos, sendo 60% em massas, 60% em pães, 54% em flocos de milho, 51% em biscoitos e 54% em cereais matinais.

Por isso, algumas legislações buscam recomendar os níveis máximos de OTA presentes em alimentos destinados ao consumo pelos animais e humanos. Na União Europeia, os níveis máximos de OTA recomendados em cereais não processados e processados para consumo humano são de 5 µg/kg e 3 µg/kg, respectivamente<sup>(25)</sup>. Nos produtos destinados à alimentação animal, os níveis máximos permitidos são de 0,25 mg/kg de OTA em cereais e seus produtos<sup>(26)</sup>.

Além da intoxicação pela OTA ocorrer principalmente pela ingestão de produtos de origem vegetal, pode ocorrer também indiretamente pelo consumo de produtos de origem animal, tais como leite, ovos e carne<sup>(27)</sup>. Várias pesquisas tem demonstrado a abrangência global de contaminação humana por OTA, conforme evidenciado por sua detecção em soros humanos<sup>(28, 29, 30, 31, 32, 33, 34)</sup>. No Brasil, os níveis de OTA foram avaliados em amostras de plasma de 149 indivíduos residentes no estado do Paraná, Brasil, sendo detectada em 55% das amostras (média de 733,6±296,04 pg/mL, máximo de 1584,6 pg/mL), com um consumo diário estimado de 683-1004 pg/kg de peso corporal<sup>(35)</sup>.

### Propriedades físico-químicas da OTA

A estrutura química da OTA ( $C_{20}H_{18}ClNO_6$ , Figura 1) é formada por um grupo dihidro-isocumarina ligada a um grupo L- $\beta$ -fenilalanina por uma ligação do tipo amida, a OTA possui massa molecular de 403,81 g/mol<sup>(3, 36)</sup>. É considerada um ácido orgânico fraco, de estrutura cristalina e sólida, coloração branca a transparente e inodora, solúvel em solventes polares orgânicos (clorofórmio, álcoois). Em pH ácido ou neutro é solúvel em soluções alcalinas, mas pouco solúvel em água. A OTA exibe fluorescência azul em condições alcalinas e fluorescência verde em ambiente ácido<sup>(5)</sup>.



Fonte: Pubchem <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442530>> Access in: march/04/2021.

**Figura 1.** Estrutura química da OTA.

A OTA possui alta termo resistência, ponto de fusão de 168 a 173°C e resistência ao vapor sob pressão a 121°C por três horas<sup>(20, 37)</sup>. É completamente degradada quando tratada com solução concentrada contendo excesso de hipoclorito de sódio (NaOCl)<sup>(38)</sup>. Pode ser armazenada a -20°C por vários anos quando dissolvida em etanol ou metanol, sendo preservada com a evaporação do solvente e armazenada como um filme<sup>(39)</sup>.

Ao menos 20 análogos de Ocratoxinas foram identificados, dentre eles a OTA é produzida em maior quantidade<sup>(40)</sup>. Na família das Ocratoxinas, os principais representantes são OTA, Ocratoxina B (OTB) e Ocratoxina C (OTC), mas a OTA é a molécula de maior toxicidade devido ao seu átomo de cloro (Cl) presente no anel do grupo dihidro-isocumarina. A OTB é 10-20 vezes menos tóxica que a OTA, pela substituição do átomo de Cl por um átomo de hidrogênio (H). Uma alteração no grupo L- $\beta$ -fenilalanina em L- $\beta$ -fenilalanina etil éster forma a OTC, com pouca ou nenhuma toxicidade conhecida<sup>(2, 17)</sup>.

### Biossíntese da OTA

A biossíntese da OTA ainda não está totalmente elucidada, a principal hipótese é de que ocorre por meio de duas vias: na primeira via, o grupo dihidro-isocumarina é originado com a síntese de policetídeos, sendo os precursores as moléculas de malonato e acetato. Estes policetídeos dão origem à molécula de *mellein*, que sofre metilação e oxidação e dá origem à Ocratoxina- $\beta$  (OT $\beta$ ). A OT $\beta$  recebe uma molécula de Cl através de uma cloroperoxidase, formando a Ocratoxina- $\alpha$  (OT $\alpha$ ). Na segunda via, o grupo L- $\beta$ -fenilalanina é originado a partir de ácido chiquímico, que é ativado pelo éster etílico, e tem a porção acila deslocada.

Posteriormente, esses dois grupos se ligam através de um peptídeo sintetase para formar uma ligação do tipo amida, dando origem à OTC. Na última etapa, ocorre a formação da OTA pela transesterificação e desesterificação da OTC por uma esterase <sup>(14, 20)</sup>.

Outro estudo utilizou marcação de carbono nos intermediários da OTA e sugerem que a molécula de *mellein* e a OTC não tem envolvimento com a biossíntese da OTA, mas a OTβ é transformada em OTB por um grupo amida para depois receber a molécula de Cl, dando origem à OTA, portanto a OTB não seria um subproduto da OTA, mas faz parte da sua biossíntese como um intermediário <sup>(14)</sup>.

### ***Efeitos tóxicos***

Após a ingestão oral, a OTA é absorvida principalmente pelo intestino delgado, sendo a mucosa intestinal um dos primeiros alvos da ação tóxica. Estudos demonstram que a OTA causa alterações na morfologia e lesões celulares na mucosa intestinal, levando à diminuição da altura das vilosidades e alargamento das bases, deixando as criptas com formato irregular e afetando a absorção dos nutrientes em ratos e em aves <sup>(41, 42, 43)</sup>. A OTA também aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal <sup>(44)</sup>, provavelmente por remoção de isoformas de claudina específicas de junções estreitas que formam a barreira intestinal e evitam a entrada de substâncias tóxicas ou patógenos, quando presentes no lúmen da mucosa intestinal <sup>(45)</sup>. Também foi relatado diminuição de expressão de citocinas IL-8, IL-6, IL-17A, IL-12 e IL-18 <sup>(46)</sup>.

Após absorção pelo trato intestinal, a OTA se liga rapidamente às proteínas plasmáticas <sup>(2)</sup>, alcançando o rim, onde também induz danos. A nefrotoxicidade é um dos efeitos tóxicos mais relevantes, evidenciadas em várias espécies animais, com indução de lesões nos túbulos proximais renais <sup>(1, 4, 5, 38, 47, 48, 49, 50, 51)</sup> e aumento na expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), indicativo de proliferação celular nos rins <sup>(52)</sup>. Além disso, estudos demonstram aumento das enzimas marcadoras de lesões renais tais como: creatinina, ácido úrico e ureia, e diminuição de Cálcio (Ca) e fósforo (P) circulantes <sup>(53, 54, 55, 56)</sup> em animais intoxicados. Também foi evidenciado que a OTA pode causar tumores renais em camundongos e ratos <sup>(47, 49)</sup>.

Em humanos, a intoxicação pela OTA está associada a doenças renais, como a nefropatia endêmica dos Balcãs (BEN) <sup>(50, 57, 58, 59)</sup>. Nesta região endêmica, dos países dos Balcãs, tem sido descrito casos de desenvolvimento de adutos de DNA no tecido renal e desenvolvimento de tumores renais associados a ingestão alimentar de OTA <sup>(8)</sup>, todavia sem comprovação de associação desses achados com BEN. A OTA é classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) no grupo 2B, como possivelmente carcinogênica para humanos, com base em evidências de indução de tumores renais e hepáticos relatados em camundongos e ratos <sup>(47, 49)</sup>.

O fígado é um dos órgãos-alvo e de atuante na biotransformação da OTA, lesões hepáticas têm sido evidenciadas em ratos <sup>(60)</sup> e em aves <sup>(61, 62)</sup>, com inflamação linfoplasmocítica, esteatose e necrose em ratos <sup>(63)</sup>. Em concordância com as lesões histológicas, é observado também aumento de enzimas marcadoras de lesões hepáticas, tais como alanina aminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST) e gamaglutamiltransferase (GGT) <sup>(53, 54, 56)</sup>.

Estudos demonstram que a OTA induz efeitos tóxicos sobre os órgãos ou tecidos linfóides como timo, medula óssea, bursa de Fabricius (em aves), tecido linfóide associada as mucosas, com supressão de imunidade inata e adaptativa celular e humoral em várias espécies <sup>(1, 64, 65)</sup>. A imunidade inata representa a primeira linha de defesa de hospedeiro <sup>(66)</sup>, e foi

evidenciado que a OTA pode suprimir a atividade fagocítica de neutrófilos, macrófagos, bem como a atividade de células matadoras naturais ou *naturalkiller* (NK) em camundongos e também de induzir diminuição na produção de citocinas, tais como interferon, IL-1 $\alpha$ , e TNF- $\alpha$  (1, 67). A depressão da resposta imune celular induzida por OTA foi demonstrada em várias espécies, tanto por ensaios *in vitro* ou *in vivo*. Ensaios *in vitro* demonstram que linfócitos humanos, suínos, murinos e aves perdem ou tem a capacidade diminuída de proliferação ao sofrerem estímulos específicos e/ou aos mitógenos, assim como de inibir a produção de IL-2 ou expressar receptor para IL-2 (1, 64, 68), moléculas estas essenciais para a proliferação de linfócitos<sup>(66)</sup>. A supressão da resposta imune celular também tem sido evidenciada *in vivo* por meio de testes intradérmicos (1).

A supressão da resposta imune humoral induzida por OTA tem sido amplamente investigada em várias espécies, sendo utilizado como indicativo de supressão dessa resposta: número reduzido de células produtoras de anticorpos, diminuição de resposta linfoproliferativa de linfócitos B, redução nos níveis de imunoglobulinas totais e níveis de anticorpos específicos aos agentes infecciosos ou a outros imunógenos, como eritrócitos de carneiro (43, 55, 64, 68, 69, 70).

A OTA apresenta afinidade para o cérebro e pode causar problemas neurológicos graves em humanos (4, 71), com evidências de possíveis participações na patogênese de transtorno de espectro do autismo (4). Ensaios *in vitro* utilizando linhagem celular demonstram que a OTA afeta a integridade cito-esquelética dos astrócitos, bem como a expressão de genes ligadas ao sistema de resposta inflamatória (72), e de acordo com Park et al. (2019), a neurotoxicidade por OTA pode ocorrer por meio de inibição de proliferação e de apoptose dependente de mitocôndria em astrócitos humanos.

### ***Mecanismos de ação da OTA***

Devido à presença do grupo L- $\beta$ -fenilalanina em sua estrutura química, Creppy, Röschenthaler e Dirheimer (1984), demonstraram que a OTA pode competir com o aminoácido fenilalanina presente em células do organismo, inibindo a utilização de fenilalanina em seus processos e na síntese de proteínas, e que este efeito poderia ser revertido com o fornecimento de um excesso do aminoácido fenilalanina. Porém, outro estudo realizado *in vitro* demonstrou que a presença do aminoácido fenilalanina não diminuiu a toxicidade da OTA, e a OTA não teve capacidade de afetar os processos dependentes da fenilalanina (73).

A OTA é uma inibidora de síntese de proteínas, isso já foi demonstrado tanto *in vivo* quanto *in vitro* (37), porém os mecanismos pelo qual isso ocorre não são totalmente claros, onde alguns estudos afirmam que pode inibir a atividade da enzima fenilalanina ácido ribonucleico transportador (t-RNA) sintase (74), e outros afirmam que ela pode inibir a formação de aminoacil-tRNA sintase pela inibição da produção de adenosina trifosfato (ATP) mitocondriais, o que impede a ligação do aminoácido ao tRNA (17).

Nas mitocôndrias, a OTA diminui a respiração celular, pois atua como inibidora competitiva das proteínas transportadoras da membrana interna, inibe o transporte de elétrons e a fosforilação intramitocondrial de adenosina difosfato (ADP), levando à inibição da produção de ATP e de energia pelas células (75).

OTA pode causar genotoxicidade, pois acredita-se que após a biotransformação, produz espécies eletrofilicas, que se ligam e formam adutos de forma covalente com o ácido desoxirribonucleico (DNA), o que estimula a mutagenicidade. Também acredita-se que espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pela OTA lesionam diretamente o DNA (76, 77).

A OTA induz à formação acentuada de ROS, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, essas ROS causam lesões oxidativas em lipídeos, DNA e proteínas. Na intoxicação pela OTA o excesso

de ROS supera a capacidade antioxidante das células do organismo, o que induz às lesões<sup>(17, 37, 77)</sup>. A OTA também induz a formação de espécies reativas de nitrogênio (RNS), ao aumentar a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que causa a elevação de óxido nítrico (NO) e de nitratos e nitritos, estes altos níveis de NO podem causar estresse nitrosativo pois reagem com oxigênio (O<sub>2</sub>) e formam óxido nitroso (NO<sub>2</sub>) e hidroxilas (OH)<sup>(36, 37)</sup>.

Outro importante mecanismo da OTA é a indução de peroxidação lipídica, isso ocorre em microssomos dependentes de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), pois ela utiliza o ferro (Fe) como cofator, com a formação de um complexo OTA-Fe<sup>3+</sup>, depois reduzido em OTA-Fe<sup>2+</sup>, com formação de hidroxilas (OH)<sup>(36, 78)</sup>. A peroxidação lipídica também induz o aumento da permeabilidade da membrana celular ao Ca<sup>2+</sup>, que causa redução de seu armazenamento intracelular<sup>(37)</sup>.

A OTA também induz a apoptose celular, embora os mecanismos não estão totalmente claros, possivelmente ocorre devido à desregulação de vias de transdução de sinais celulares, estresse oxidativo, aumento de mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6) e lesões no DNA<sup>(2, 36, 37)</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bondy GS, Pestka JJ. Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews* 2000; 3(2): 109-143.
2. O'Brien E, Dietrich DR. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology* 2005; 35(1): 33-60.
3. Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Malir J, Toman J. Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins* 2016; 8(7): 191.
4. Ratnaseelan AM, Tsilioni I, Theoharides TC. Effects of mycotoxins on neuropsychiatric symptoms and immune processes. *Clinical Therapeutics* 2018; 40(6): 903-917.
5. Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, Stela M, Saluk-Bijak J, Siadkowski A, Bijak M. Molecular aspects of mycotoxins-A serious problem for human health. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(21): 8187.
6. Khaneghah AM, Fakhri Y, Raeisi S, Armoon B, Sant'Ana AS. Prevalence and concentration of ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol and total aflatoxin in cereal-based products: a systematic review and meta-analysis. *Food and Chemical Toxicology* 2018; 118, 830-848.
7. Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott DB, Theron JJ. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 1965; 205(4976): 1112- 1113.
8. Reddy L, Bhoola K. Ochratoxins—Food contaminants: Impact on human health. *Toxins* 2010; 2(4): 771-779.
9. Walbeek WV, Scott PM, Harwig J, Lawrence JW. *Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A. *Canadian Journal of Microbiology* 1969; 15(11): 1281- 1285.

10. Pitt JI. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology* 1987; 53(2), 266-269.
11. Abarca ML, Bragulat MR, Castella G, Cabanes FJ. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 1994; 60(7), 2650-2652.
12. Téren J, Varga J, Hamari Z, Rinyu E, Kevei F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 1996; 134(3), 171-176.
13. Larsen TO, Svendsen A, Smedsgaard J. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 67(8), 3630-3635.
14. Wang Y, Wang L, Liu F, Wang Q, Selvaraj JN, Xing F, Zhao Y, Liu Y. Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. *Toxins* 2016; 8(3), 83.
15. Cabañes FJ, Bragulat MR, Castellá G. Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins* 2010; 2(5): 1111-1120.
16. Duarte SC, Pena A, Lino CM. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology* 2010; 27(2): 187-198.
17. Khatoon A, Abidin Z. An extensive review of experimental ochratoxicosis in poultry: I. Growth and production parameters along with histopathological alterations. *World's Poultry Science Journal* 2018; 74(4): 627-646.
18. Varga J, Kevei E, Rinyu E, Téren J, Kozakiewicz Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* 1996; 62(12): 4461- 4464.
19. Frisvad JC, Frank JM, Houbraken JAMP, Kuijpers AF, Samson RA. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* 2004; 50(1): 23-43.
20. El Khoury A, Atoui A. Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins* 2010; 2(4): 461-493.
21. Palacios-Cabrera H, Taniwaki MH, Hashimoto, JM, Menezes HCD. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. *Brazilian Journal of Microbiology* 2005; 36(1): 24-28.
22. Geisen R, Schmidt-Heydt M, Stoll D, Touhami N. Aspects of the occurrence, genetics, and regulation of biosynthesis of the three food relevant *Penicillium* mycotoxins: ochratoxin A, citrinin, and patulin. In: *Physiology and Genetics*. Springer; 2018. p. 413-433.
23. Duarte SC, Lino CM, Pena A. Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin A: a review of the worldwide status. *Food Additives and Contaminants* 2010; Biosauáde, Londrina, v. 23, n. 2, 2021



27(10): 1440-1450.

24.Iqbal SZ, Nisar S, Asi MR, Jinap S. Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. *Food Control* 2014; 43: 98-103.

25.European Commission. Commission Regulation (EC) No. 472/2002 of 12 March 2002. Amending Regulation (EC) No. 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* 2002; 50: 18-20.

26.Kyprianou M. European Commission: Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, Ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (2006/576/EC). *Official Journal of the European Communities* 2006; 229: 7-9.

27.Battacone G, Nudda A, Pulina G. Effects of ochratoxin A on livestock production. *Toxins* 2010; 2(7): 1796-1824.

28.Malir F, Roubal T, Brndiar M, Osterreicher J, Severa J, Knizek J, Kacerovsky J, Tmejova M, Betbeder AM, Baudrimont I, Creppy EE. Ochratoxin A in the Czechrepublic. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* 2001; 20(3-4), 261-274.

29.Grosso F, Said S, Mabrouk I, Fremy JM, Castegnaro M, Jemmali M, Dragacci S. New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology* 2003; 41(8), 1133-1140.

30.Märtlbauer E, Usleber E, Dietrich R, Schneider E. Ochratoxin A in human blood serum—retrospective long-term data. *Mycotoxin Research* 2009; 25(4), 175-186.

31.Coronel MB, Marin S, Tarragó M, Cano-Sancho G, Ramos AJ, Sanchis V. Ochratoxin A and its metabolite ochratoxin alpha in urine and assessment of the exposure of inhabitants of Lleida, Spain. *Food and Chemical Toxicology* 2011; 49(6), 1436-1442.

32.Di Giuseppe R, Bertuzzi T, Rossi F, Rastelli S, Mulazzi A, Curtis A, Iacoviello L, Capraro J, Pietri A. Plasma ochratoxin A levels, food consumption, and risk biomarkers of a representative sample of men and women from the Molise region in Italy. *European Journal of Nutrition* 2012; 51(7), 851-860.

33.Khalifa KH, Ghali R, Mazigh C, Aouni Z, Machgoul S, Hedhili A. Ochratoxin A levels in human serum and foods from nephropathy patients in Tunisia: Where are you now?. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2012; 64(5), 509-512.

34.Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Roubal T. Ochratoxin A exposure biomarkers in the Czech Republic and comparison with foreign countries. *Biomarkers* 2012; 17(7), 577-589.

35.Rigobello FF. *Quantitative analysis of Ochratoxin A (OTA) in human plasma by enzyme-linked immunosorbent assay, and in vitro cytotoxic effect of OTA and FB<sub>1</sub> on Jurkat and P3UI cell lines*. 2015. 59 p. Thesis (Doctoral degree in Experimental Pathology) – State University of Londrina.

36.Tao Y, Xie S, Xu F, Liu A, Wang Y, Chen D, Pan Y, Huang L, Peng D, Wang X, Yuan Z. *Biosaúde, Londrina*, v. 23, n. 2, 2021

Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology* 2018; 112: 320-331.

37.Kőszegi T, Poór M. Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins* 2016; 8(4): 111.

38.Castegnaro M, Mohr U, Pfohl-Leszkowicz A, Estève J, Steinmann J, Tillmann T, Michelon J, Bartsch H. Sex-and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *International Journal of Cancer* 1998; 77(1): 70-75.

39.Valenta H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography A* 1998; 815(1): 75- 92.

40.Huffman J, Gerber R, Du L. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers* 2010; 93(9), 764-776.

41.Albassam MA, Yong SI, Bhatnagar R, Sharma AK, Prior MG. Histopathologic and electron microscopic studies on the acute toxicity of ochratoxin A in rats. *Veterinary Pathology* 1987; 24(5): 427-435.

42.Sharma M, Mandal AB, Singh R. Effect of Aflatoxin, Ochratoxin and their interaction on growth performance, immunity and jejunal morphometry of broiler chickens. *Indian Journal of Poultry Science* 2016; 51: 253-258.

43.Ricci FG, Terkelli LR, Venancio, EJ, Justino L, Santos BQ, Baptista AAS, Oba A, Souza BDO, Bracarense APFRL, Hirooka EY, Itano EN. Tryptophan Attenuates the Effects of OTA on Intestinal Morphology and Local IgA/IgY Production in Broiler Chicks. *Toxins* 2021; 13: 5.

44.Maresca M, Mahfoud R, Pfohl-Leszkowicz A, Fantini J. The mycotoxin ochratoxin A alters intestinal barrier and absorption functions but has no effect on chloride secretion. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2001; 176(1): 54-63.

45.McLaughlin J, Padfield PJ, Burt JP, O'Neill CA. Ochratoxin A increases permeability through tight junctions by removal of specific claudin isoforms. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2004; 287(5): C1412-C1417.

46.Marin, DE, Pistol GC, Gras MA, Palade ML, Taranu I. Comparative effect of ochratoxin A on inflammation and oxidative stress parameters in gut and kidney of piglets. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2017; 89: 224-231.

47.Bendele AM, Carlton WW, Krogh P, Lillehoj EB. Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J× C3H) F1 mouse. *Journal of the National Cancer Institute* 1985; 75(4): 733-742.

48.Fukui Y, Hoshino K, Kameyama Y, Yasui T, Toda C, Nagano H. Placental transfer of ochratoxin A and its cytotoxic effect on the mouse embryonic brain. *Food and Chemical Toxicology* 1987; 25(1): 17-24.

49.Boorman GA, McDonald MR, Imoto S, Persing R. Renal lesions induced by ochratoxin A exposure in the F344 rat. *Toxicologic Pathology* 1992; 20(2): 236-245.

50. Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular nutrition & food research* 2007; 51(1): 61-99.
51. Nedeljković-Trailović J, Trailović S, Resanović R, Milićević D, Jovanović M, Vasiljević M. Comparative investigation of the efficacy of three different adsorbents against OTA-induced toxicity in broiler chickens. *Toxins* 2015; 7(4): 1174-1191.
52. Mally A, Pepe G, Ravoori S, Fiore M, Gupta RC, Dekant W, Mosesso P. Ochratoxin A causes DNA damage and cytogenetic effects but no DNA adducts in rats. *Chemical Research in Toxicology* 2005; 18(8): 1253-1261.
53. Pozzo L, Salamano G, Mellia E, Gennero MS, Doglione L, Cavallarin L, Tarantola M, Forneris G, Schiavone A. Feeding a diet contaminated with ochratoxin A for chickens at the maximum level recommended by the EU for poultry feeds (0.1 mg/kg).  
1. Effects on growth and slaughter performance, haematological and serum traits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2013; 97: 13-22.
54. Jeevana LM, Srikanth MK, Ch S, Narasimha RY. A study on toxicobiochemical effects of dietary ochratoxin and citrinin combination in broiler chicken. *The Pharma Innovation* 2017; 6(9, Part F): 400.
55. Khan SA, Venancio EJ, Fernandes EV, Hirooka EY, Oba A, Flaiban KK, Itano EN. Low doses of ochratoxin-A decrease IgY and IgA production in broiler chicks. *Toxins* 2018; 10(8): 316.
56. Rao TP, Varra M, Kumar TS. Effect of dietary Ochratoxin on body weight and biochemical changes in broiler chicks. *The Pharma Innovation* 2018; 7: 947-950.
57. Božić Z, Duančić V, Belicza M, Kraus O, Skljarov I. Balkan endemic nephropathy: still a mysterious disease. *European Journal of Epidemiology* 1995; 11(2): 235-238.
58. Pfohl-Leszkowicz A, Bartsch H, Azémar B, Mohr U, Estève J, Castegnaro M. MESNA protects rats against nephrotoxicity but not carcinogenicity induced by ochratoxin A, implicating two separate pathways. *Facta Universitatis Series Medicine and Biology* 2002; 9: 57-63.
59. Pfohl-Leszkowicz A. Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 2009; 60(4): 465-482.
60. Aydın G, Özçelik N, Cicek E, Soyöz M. Histopathologic changes in liver and renal tissues induced by ochratoxin A and melatonin in rats. *Human & Experimental Toxicology* 2003; 22(7): 383-391.
61. Elaroussi MA, Mohamed FR, El Barkouky EM, Atta AM, Abdou AM, Hatab MH. Experimental ochratoxicosis in broiler chickens. *Avian Pathology* 2006; 35(4): 263-269.
62. Milićević D, Jovanović M, Matekalo-Sverak V, Radičević T, Petrović MM, Lilić S. A

survey of spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in chicken tissues and concurrence with histopathological changes in liver and kidneys. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 2011; 29(2): 159-175.

63.Damiano S, Longobardi C, Andretta E, Prisco F, Piegari G, Squillacioti C, Montagnaro S, Pagnini F, Badino P, Florio S, Ciarcia R. Antioxidative Effects of Curcumin on the Hepatotoxicity Induced by Ochratoxin A in Rats. *Antioxidants* 2021; 10(1): 125.

64.Marin DE, Taranu I. Ochratoxin A and its effects on immunity. *Toxin Reviews* 2015; 34(1): 11-20.

65.Khan, SA, Venancio, EJ, Ono, MA, Fernandes, EV, Hirooka, EY, Shimizu, CF, Oba, A, Flaiban, KKMC, Itano, EN. Effects of subcutaneous ochratoxin-A exposure on immune system of broiler chicks. *Toxins* 2019; 11(5): 264.

66.Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. Elsevier Health Sciences; 2014. 608 p.

67.Luster, MI, Germolec DR, Burlison GR, Jameson CW, Ackermann MF, Lamm KR, Hayes HT. Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Research* 1987; 47(9): 2259-2263.

68.Lea T, Steien K, Størmer FC. Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia* 1989; 107(2-3): 153-159.

69.Creppy EE, Rösenthaller R, Dirheimer G. Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Food and Chemical Toxicology* 1984; 22(11): 883-886.

70.Thuvander A, Breitholtz-Emanuelsson A, Olsen M. Effects of ochratoxin A on the mouse immune system after subchronic exposure. *Food and Chemical Toxicology* 1995; 33(12): 1005-1011.

71.Park S, Lim W, You S, Song G. Ochratoxin A exerts neurotoxicity in human astrocytes through mitochondria-dependent apoptosis and intracellular calcium overload. *Toxicology Letters* 2019; 313: 42-49.

72.Hong JT, Lee MK, Park KS, Jung KM, Lee RD, Jung HK, Park KL, Yang KH, Chung, SY. (2002). Inhibitory effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist on ochratoxin A-induced cytotoxicity and activation of transcription factors in cultured rat embryonic midbrain cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 2002; 65(5-6): 407-418.

73.Bruinink A, Sidler C. The neurotoxic effects of ochratoxin-A are reduced by protein binding but are not affected by l-phenylalanine. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1997; 146(2): 173-179.

74.Dirheimer G. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. *Food Additives and Contaminants* 1996; 13: 45-48.

75. Meisner H, Chan S. Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems. *Biochemistry* 1974; 13(14): 2795-2800.
76. Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA. An update on direct genotoxicity as a molecular mechanism of ochratoxin A carcinogenicity. *Chemical Research in Toxicology* 2012; 25(2): 252-262.
77. Lan M, Zhang Y, Wan X, Pan MH, Xu Y, Sun SC. Melatonin ameliorates ochratoxin A-induced oxidative stress and apoptosis in porcine oocytes. *Environmental Pollution* 2020; 256: 113374.
78. Rahimtula AD, Béréziate JC, Bussacchini-Griot V, Bartsch H. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochemical Pharmacology* 1988; 37(23): 4469-4477