

## ¿Es la Ocratoxina A una micotoxina mutagénica?

Arbillaga L, Ezpeleta O y López de Cerain A\*

Dpto. de Bromatología, Tecnología de alimentos y Toxicología  
Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, C/ Irunlarrea 1, 31008 Pamplona

Recibido 12 de Enero de 2004 / Aceptado 9 de Marzo de 2004

**Resumen:** La ocratoxina A es una micotoxina producida por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* que a través de los alimentos puede pasar al ser humano. Su órgano diana es el riñón pero también es hepatotóxica, inmunotóxica y teratogénica. Ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) como posible carcinógeno humano (clase 2B) pero se desconoce si el mecanismo de acción transcurre a través de fenómenos genéticos o epigenéticos. En este artículo se revisan los datos de genotoxicidad y mutagenicidad de esta micotoxina. Aunque los primeros estudios en ensayos de reversión mutagénica con bacterias resultaron negativos, pronto se comprobó que administrada a animales de experimentación, la ocratoxina A inducía la formación de aductos especialmente en tejidos de riñón y vejiga urinaria de ratón. También se ha comprobado que esta micotoxina produce roturas monocatenarias en el ADN, da lugar a alteraciones cromosómicas e intercambios entre cromátidas hermanas e induce la síntesis de ADN fuera del período S, fenómeno indicativo de procesos de reparación. Se considera que la actividad genotóxica es dependiente de activación metabólica, en particular de varias isoformas P450, si bien los metabolitos genotóxicos no han sido aislados. Los últimos estudios realizados con ocratoxina A tritiada bajo diversas condiciones experimentales indican que el principal metabolito es el derivado monohidroxilado 4-(R) – hidroxio-ocratoxina A y que ni la ocratoxina A ni este metabolito forman aductos con el ADN, por lo que su actividad genotóxica estaría más relacionada con procesos de citotoxicidad y peroxidación lipídica, los cuales podrían dar lugar a moléculas reactivas con los ácidos nucleicos.

**Palabras clave:** ocratoxina A, genotoxicidad, mutagenicidad, aductos, micotoxinas.

**Abstract: Is the Ochratoxin A a mutagenic mycotoxine?** Ochratoxin A is a mycotoxin that is produced by species of the genus *Aspergillus* and *Penicillium* which when found in food, can then be passed into humans. Its major target is the kidney but it is also hepatotoxic, immunotoxic and teratogenic. It has been classified as being a possible human carcinogenic agent (Group 2B) by the International Agency for Research on Cancer (IARC) but it is not known if the mode of action occurs through genetic or epigenetic events. In this article, the genotoxicity and mutagenicity data of this mycotoxin are reviewed. Although the first studies using bacterial mutagenicity tests were negative, it was soon demonstrated that *in vivo*, ochratoxin A induced

adduct formation, particularly in renal tissue and urinary bladder of mice. It is also known that this mycotoxin produces DNA single-strand breaks, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges and also induces synthesis of DNA out of the S period, an indicative event of repair processes. It is considered that the genotoxic activity is dependent on metabolic activation, particularly of some P450 isoforms, although the genotoxic metabolites have not been isolated. The last studies performed with tritiated ochratoxin A under many experimental conditions indicate that the principal metabolite is the 4-(R) – hydroxi – ochratoxin A; neither ochratoxin A nor this metabolite binds covalently to DNA, so its genotoxic activity would be more related with ochratoxin A-mediated cytotoxicity and lipid peroxidation, processes which can originate reactive species with nucleic acids.

**Key words:** ochratoxin A, genotoxicity, mutagenicity, adducts, mycotoxins.

### Introducción

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por hongos filamentosos superiores de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (principalmente *A. ochraceus*, *P. verrucosum* y *A. carbonarium*), que fue descubierta por Van der Merwe en 1965 [1]. La molécula está formada por un anillo de isocumarina unido por medio de su grupo carboxilo a través de un enlace tipo amida, con una molécula de L-β-fenilalanina (Fig. 1). La OTA forma parte de una familia de compuestos con estructura similar, algunos de los cuales son producidos por las mismas especies fúngicas. Estos análogos estructurales de la OTA pueden ser metabolitos naturales o compuestos sintetizados “de novo” para la realización de estudios de estructura-actividad [2].

Especies fúngicas productoras de OTA pueden colonizar una gran variedad de alimentos y ser origen de su contaminación por esta micotoxina. No obstante, el crecimiento fúngico en el alimento no implica necesariamente la presencia de la micotoxina, porque su producción está influenciada por diversos factores como la humedad, la temperatura, el pH y la composición del alimento, entre otros, y estas condiciones influyen además de manera diferente en cada especie productora [3].

Numerosos estudios demuestran la presencia de OTA en una gran variedad de alimentos, como cereales, cerveza, vino, café, cacao, uvas pasas y especias [4-9]. Su presencia en tejidos animales y derivados cárnicos es también importante por lo que representa para el consumo humano. La carne bovina, en princi-

\*A quien dirigir la correspondencia.

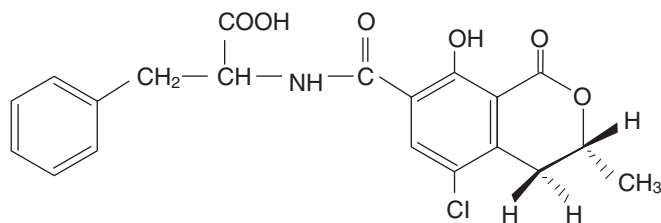


Fig. 1. Estructura química de la Ocratoxina A.

pio, no supone peligro para la salud humana ya que los rumiantes destruyen la OTA por la acción de enzimas bacterianas presentes en su panza, lo que evita que la toxina se acumule en los tejidos. Por el contrario, los alimentos derivados del cerdo, representan una fuente potencial de transmisión de la toxina a la población humana, pues se ha comprobado su presencia en riñón, hígado, tejido muscular, tejido adiposo y sangre [10,11], así como en derivados de hígado de cerdo como por ejemplo en patés [12].

#### Algunos datos toxicocinéticos y de toxicidad general

Aunque en los animales de granja no son infrecuentes las intoxicaciones graves por ingestión de OTA [13], en el hombre son muy escasos los datos de toxicidad aguda [14]. Lo que preocupa realmente hoy en día son aspectos de su toxicidad crónica, en especial por su potencial mutagénico y cancerígeno.

Una vez ingerida, esta micotoxina se absorbe casi por completo en el tracto gastrointestinal y alcanza rápidamente la circulación general [15]. Aunque la ingesta de OTA a través del consumo de alimentos contaminados no sea elevada, los parámetros toxicocinéticos y la capacidad de unirse a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, contribuyen a la larga vida media de esta micotoxina, aumentando así su potencial tóxico [16-18].

La OTA es principalmente nefrotóxica. En estudios epidemiológicos se ha asociado el consumo crónico de OTA con el desarrollo de ciertas enfermedades endémicas, tanto en animales como en el hombre. En animales de granja el consumo crónico de la OTA se ha identificado como factor determinante en la etiología de la nefropatía porcina y de la nefropatía aviar espontánea [9,19], y en el hombre se le cree responsable de la Nefropatía Endémica de los Balcanes por la similitud entre sus síntomas y los de la nefropatía aviar y porcina, pero esta enfermedad es todavía hoy día un misterio para los epidemiólogos [20,21].

También se han demostrado efectos tóxicos de la OTA sobre el sistema inmune, nervioso y sobre el hígado. Es teratogénica y carcinogénica en animales de experimentación y está clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) en el grupo 2B, como posiblemente carcinogénica en humanos [22]. En cuanto a su potencial mutagénico, los datos a veces contradictorios, son objeto de este artículo de revisión.

#### Aspectos moleculares de la toxicidad de la OTA

Los principales mecanismos de acción implicados en la toxicidad de la OTA son la inhibición de la síntesis de proteínas, inhibición de la respiración mitocondrial, peroxidación lipídica y secuestro del calcio intracelular. Pero estos efectos parecen ser relevantes a las concentraciones de toxina usadas experimental-

mente; mucho más elevadas que las concentraciones de exposición natural, por lo que algunos autores han propuesto que estos efectos posiblemente constituyan mecanismos de acción primarios y no específicos de la OTA [23]. En los últimos años, estudios realizados a bajas concentraciones experimentales de OTA, similares a las encontradas en la exposición natural, indican que ejerce un efecto sobre la señalización y regulación celulares. Estos cambios en la función y en el fenotipo de las células, sin destrucción ni daño celular, serían acciones específicas de la OTA [24-27].

#### Exposición humana

Los resultados sobre los efectos tóxicos de la OTA ponen de manifiesto la necesidad de evaluar la exposición humana a dicha micotoxina. Varios estudios han analizado OTA en fluidos biológicos para relacionar la exposición humana a esta toxina con los trastornos del sistema urinario, ya que el riñón es el principal órgano diana de su toxicidad. Así, en muchos países se ha detectado la presencia de OTA en plasma humano, lo que indica una exposición muy generalizada a esta micotoxina. En la mayoría de los estudios los niveles referidos son bajos (inferiores a 1 ng/mL) y por ello todavía se cuestiona si la concentración de OTA en plasma es el mejor indicador de exposición humana. A este respecto, un estudio sobre los niveles de OTA en sangre de donantes noruegos y suecos afirma que no hay correlación entre los niveles de OTA en plasma y la ingesta diaria total estimada de OTA, basándose en datos obtenidos de la literatura sobre diferentes alimentos [28].

En algunos estudios se han encontrado valores no muy diferentes entre pacientes sanos y pacientes con diferentes enfermedades renales [29-33]. Sin embargo, en otros en los que únicamente se estudiaron pacientes sometidos a diálisis frente a controles, se observaron valores de OTA significativamente más elevados en los primeros [34,35].

Los datos de exposición humana en diferentes zonas de España indican la presencia de esta micotoxina en el plasma de personas residentes en el norte [34], en el sur [36] y zona centro [37], a una concentración media equiparable a la hallada en otros países europeos como Francia [38], Italia [39,40], Suecia [41] y Dinamarca [42], e inferior a los encontrados en otras zonas geográficas como Checoslovaquia [43], Alemania [44], Polonia [45] y la zona de los Balcanes [46,47]. También está presente en países del norte de África como Túnez [48,33], Argelia [49], Marruecos [50] y Egipto [31].

Por otra parte, la exposición a la micotoxina puede representar un riesgo para la salud de los trabajadores, especialmente si no se toman medidas preventivas y de protección adecuadas ya que los niveles de OTA en el aire pueden resultar en un aumento de los niveles de suero [51]. Contradictoriamente, otro estudio reciente afirma que la exposición a la OTA presente en el aire, por parte de trabajadores de granjas, no está relacionado con un aumento de los niveles de OTA séricos y que por lo tanto la exposición inhalatoria de OTA es de menor importancia que la ingesta diaria de la micotoxina con los alimentos [52].

#### Legislación

En los últimos años, con los datos conocidos sobre la toxicidad de la OTA y de exposición a través de la dieta, varias organiza-

ciones internacionales han establecido valores de ingesta diaria admisible (IDA).

En 1991, la JECFA (Comisión mixta FAO/WHO de expertos sobre aditivos alimentarios) estableció una IDA de 16 ng/kg de pc, que corresponde con un consumo semanal admisible de 112 ng/kg de pc, basando su evaluación en el efecto nefrotóxico observado en cerdos (la especie más sensible) [53]. Este último valor se redondeó a 100 ng/kg de pc por esta misma comisión en la reunión de 1995, lo cual equivale a 14 ng/kg de pc al día [54].

Las autoridades canadienses evaluaron la OTA entre los años 1989 y 1996, y determinaron una IDA de 1,2 - 5,7 ng/kg pc, sobre la base de las propiedades carcinogénicas de esta micotoxina.

Posteriormente en 1998, el Comité Científico de la Comisión Europea sobre alimentación humana valoró los datos científicos sobre el potencial genotóxico de la OTA y sus mecanismos de acción como carcinógeno, y consideró que sería prudente reducir la exposición de OTA tanto como fuera posible, y en cualquier caso siempre inferior a 5 ng/kg de pc al día [55].

Por último la Comisión Europea publicó el reglamento (CE) n° 472/2002, por el que se establecen los límites de OTA en alimentos con el objetivo de no sobrepasar los niveles de IDA establecidos [56]. Los límites fijados son de 5 µg/kg para cereales en grano sin transformar (incluido el arroz sin transformar y el alforfón o trigo negro), de 3 µg/kg para productos derivados de los cereales (incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales en grano destinados al consumo humano directo) y de 10 µg/kg para uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas). Para café verde y tostado y productos del café, vino, cerveza, zumo de uva, cacao y productos del cacao y especias, cuyos límites debían haber sido establecidos antes del 31 de diciembre de 2003, en el momento de redactar este trabajo permanecen aún sin fijar.

### Genotoxicidad y mutagenicidad de la ocratoxina A

Un agente mutagénico es una estructura química capaz de reaccionar directa o indirectamente con los ácidos nucleicos causando cambios no letales y hereditarios en la estructura, número o

reordenación de genes. Cuando un compuesto químico es capaz de reaccionar con el ADN, por ejemplo uniéndose covalentemente a las bases nitrogenadas formando aductos, se dice que es genotóxico. Si además se demuestra que esa interacción se traduce en un cambio estable y hereditario en la estructura del ADN, es decir en una mutación, se puede afirmar que el compuesto es mutagénico.

En la década de los 60 surgió el interés sobre la evaluación del potencial mutagénico de los productos químicos, al comprobarse que muchos de ellos eran capaces de producir alteraciones en el material hereditario, cuya estructura y replicación se habían dilucidado en la década anterior. Muy pronto se desarrollaron procedimientos sencillos de ensayos con bacterias, a los que se añadía un sistema exógeno de activación metabólica, generalmente fracción S9 obtenida de hígado de rata, lo que permitió evaluar los efectos mutagénicos de un gran número de tóxicos ambientales. Los primeros estudios de mutagénesis, realizados mediante el conocido "Test de Ames", sugerían que aproximadamente el 90% de los compuestos carcinogénicos conocidos hasta la fecha eran también mutagénicos [57].

### Ensayos de mutación génica

Durante mucho tiempo la OTA fue considerada como un compuesto no mutagénico. Los primeros resultados experimentales obtenidos en ensayos que detectan mutaciones génicas en bacterias o levaduras, así lo evidenciaban [58-60] (Tabla 1). Así mismo, Würigler y col. (1991), obtuvieron resultados negativos en la estirpe de *Salmonella typhimurium* TA 102, capaz de detectar mutaciones debidas a daño oxidativo [61]. Estas primeras observaciones se han visto confirmadas en estudios más recientes, en los que se han tratado con OTA bacterias *Salmonella typhimurium* de las estirpes TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1538, TA 102 y TA 104, tanto en presencia como en ausencia de mezcla S9 obtenida de hígado de rata [62,63]. Föllmann y Lucas, (2003) ensayaron también la micotoxina en un test de mutación génica, ensayo de hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HPRT), en células de mamífero V79 (fibroblastos de pulmón de hamster chino) [63]. Con este sistema experimental obtuvieron asimismo resultados negativos tanto si las células se trataban directamente con OTA, como si se

Tabla 1. Ensayos de mutación génica.

Sistema Experimental	[OTA]	Activación metabólica	Resultados	Referencia
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535/1537/1538	1-100 µg/placa	S9 hígado rata	-	Kuczuk y col. 1978 [58]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3	50 y 100 µg/placa	S9 hígado rata	-	Kuczuk y col. 1978 [58]
<i>S. typhimurium</i> TA98/100/1535/1537	0,5-500 µg/placa	S9 hígado rata	-	Wehner y col. 1978 [59]
<i>S. typhimurium</i> TA98/100/1535/1537/1538	50-600 µg/placa	S9 hígado rata	-	Bendele y col. 1985 [60]
<i>S. typhimurium</i> TA102	37-991 µg/placa	S9 hígado rata	-	Würigler y col. 1991 [61]
<i>S. typhimurium</i> TA100/1535/1538	100 µM <sup>(1)</sup>		+	Henning y col. 1991 [64]
Células NIH/3T3 transfectadas con distintos CYP humanos	248 µM		+	De Groene y col. 1996 [65]
<i>S. typhimurium</i> TA98/1535/1538	121-1211 µg/placa	S9 riñón ratón	+	Obrecht-Pflumio y col. 1999 [66]
<i>S. typhimurium</i> TA98/100	0-50 µg/placa	S9 Hep G2	-	Erlich y col. 2002 [62]
<i>S. typhimurium</i> TA98/100/1535/1538/102/104	0,01-500 mM	S9 hígado rata	-	Föllmann y Lucas, 2003 [63]
Ensayo HPRT en la línea celular V79	0,1-100 µM	S9 hígado rata	-	Föllmann y Lucas, 2003 [63]
Ensayo HPRT en la línea celular V79	0,016-0,8 µM <sup>(1)</sup>		-	Föllmann y Lucas, 2003 [63]

<sup>(1)</sup> Concentraciones añadidas a un cultivo de hepatocitos de rata.

añadía un medio de cultivo en el que previamente se habían incubado hepatocitos de rata con la toxina (Tabla 1).

El primer resultado positivo en un test de Ames se obtuvo utilizando como sustancia de ensayo un medio derivado de hepatocitos de rata que habían sido tratados con OTA [64], lo que sugería que serían metabolitos los responsables de su acción mutagénica (Tabla 1). Esta observación fue confirmada posteriormente en un estudio realizado en líneas celulares que expresaban distintos citocromos P450 humanos [65]. Estos autores construyeron una serie de líneas celulares NIH/3T3 que expresaban de manera estable uno de los siguientes citocromos humanos: CYP1A1, CYP1A2, CYP2C10, CYP2D6 y CYP2E1. Además, contenían el gen *lac Z'* que servía como marcador para detectar la frecuencia de mutación inducida por OTA. En el rango de concentraciones ensayado, encontraron un aumento en la frecuencia de mutación en las líneas transfectadas con CYP3A4, CYP2C10, CYP1A2 y, en menor medida, CYP1A1. En las células no transfectadas o que expresaban CYP2D6 o CYP2E1 no observaron ningún incremento en la frecuencia de mutación en el gen *lac Z'*. Por lo tanto, estos datos ponen de manifiesto un efecto mutagénico de la OTA dependiente de la activación metabólica. Además, utilizando inhibidores específicos de CYP2C10 y CYP3A4, estos autores pudieron demostrar que en la mutagenicidad de la OTA en esas líneas celulares intervenía de manera inequívoca citocromo P450.

En resumen, los datos previos obtenidos con el test de Ames utilizando como sistema de activación enzimática microsomas obtenidos a partir de hígado de rata han resultado negativos. Sin embargo, el medio en el que han crecido hepatocitos cultivados con OTA parece contener metabolitos mutagénicos, si bien estos resultados no se han reproducido en el ensayo de mutación génica en células de mamífero [63]. También células transfectadas con citocromos humanos dan lugar a metabolitos mutagénicos. Parece por lo tanto que para que la genotoxicidad de la OTA se ponga de manifiesto no basta con la presencia de enzimas citocromo P450, sino que se requieren células íntegras [65].

Por otra parte, Obrecht-Pflumio y col. 1999, utilizando microsomas obtenidos a partir de riñón de ratón y como cofactores el tradicional sistema generador de NADPH (NADP / glucosa-6-P / glucosa-6-P-deshidrogenasa) o bien ácido araquidónico, obtuvieron resultados positivos en el test de Ames, especialmente si el cofactor era ácido araquidónico [66]. Estos resultados indican

que rutas metabólicas diversas pueden dar lugar a compuestos genotóxicos, algunas de las cuales serían más activas en los órganos diana. Por esta razón, estos autores sugieren la realización del test de Ames utilizando fracciones microsomales de otros órganos además de hígado.

#### Ensayos que miden reparación de ADN

En diversos estudios se ha evaluado la capacidad genotóxica de la OTA midiendo la síntesis de ADN derivada del proceso de reparación (Tabla 2). El primer estudio referido en la literatura sobre el potencial genotóxico de la OTA fue realizado por Ueno y Kubota en el año 1976 [67]. Evaluaron trece micotoxinas, entre ellas la OTA, y cinco toxinas modificadas genéticamente, mediante un ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano propuesto por Kada y col. (1972) [68]. En este ensayo se utiliza un mutante de *Bacillus subtilis* deficiente en el sistema de reparación del ADN por recombinación, lo que le confiere mayor sensibilidad que su cepa de origen a agentes que alteran el ADN. Por esta razón, compuestos potencialmente mutagénicos inhiben el crecimiento de esta cepa mutante. La OTA no produjo inhibición del crecimiento bacteriano, por lo que se dedujo que no era capaz de lesionar el ADN. También en bacterias, otros autores han medido la capacidad de la OTA para inducir los sistemas de reparación mediante el ensayo "SOS chromotest" desarrollado por Malaveille y col. (1989) [69], en *Escherichia coli*. Sakai y col. (1992) [70] obtuvieron resultados negativos, mientras que Malaveille y col. (1994) [71], a concentraciones del orden de 1000 veces más altas, obtuvieron resultados positivos (Tabla 2).

Sin embargo, unos años más tarde, Mori y col. (1984) observaron que la OTA y otras micotoxinas inducían síntesis no programada de ADN en cultivo primario de hepatocitos de rata y ratón a 1 y 10  $\mu\text{M}$  respectivamente [72]. Bendele y col. (1985) en un sistema experimental semejante no encontraron resultados positivos en un rango de dosis inferior; debido a problemas de citotoxicidad, la concentración más alta ensayada por estos autores fue de 0,012  $\mu\text{M}$  [60]. Estos resultados se confirmaron posteriormente también *in vitro* en células diana como son, las epiteliales de vejiga de cerdo (PUBEC) [73] y las uroteliales humanas [74]. Por lo tanto estos resultados indican que como consecuencia del tratamiento de las células con la toxina, se producen lesiones en el ADN que son corregidas por los sistemas celulares de reparación, los cuales sintetizan ADN fuera del período S.

Tabla 2. Ensayos que miden reparación de ADN.

Sistema Experimental	[OTA]	Resultados	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i> H17 y M45	20 y 100 $\mu\text{g}/\text{placa}$	-	Ueno y col. 1976 [67]
<i>E. coli</i> cepa PQ 37	20 $\mu\text{M}$ y 60 $\mu\text{M}$ <sup>(2)</sup>	-	Sakai y col. 1992 [70]
<i>E. coli</i> cepa PQ 37	1000, 2000 y 4000 $\mu\text{M}$	+	Malaveille y col. 1994 [71]
Hepatocitos de rata <sup>(1)</sup>	1 $\mu\text{M}$	+	Mori y col. 1986 [72]
Hepatocitos de ratón <sup>(1)</sup>	10 $\mu\text{M}$	+	Mori y col. 1986 [72]
Hepatocitos de rata <sup>(1)</sup>	0,00006-0,012 $\mu\text{M}$	-	Bendele y col. 1985 [60]
Células PUBEC	0,25-5 $\mu\text{M}$	+	Dörrenhaus y Föllmann, 1997 [73]
Hepatocitos de rata <sup>(1)</sup>	0,01-1 mM	+	Dörrenhaus y Föllmann, 1997 [73]
Células uroteliales humanas <sup>(1)</sup>	0,01-2 mM	+	Dörrenhaus y col. 2000 [74]

<sup>(1)</sup> Cultivo primario.

<sup>(2)</sup> Activación metabólica: S9 hígado rata.



Tabla 3. Ensayos que miden fragmentación de ADN.

Sistema Experimental	[OTA]	Resultados	Referencia
<b>Rotura de hebras aisladas de ADN</b>			
Células de bazo	25 $\mu$ M	+	Creppy y col. 1985 [76]
Línea celular CHO y AWRF	124 $\mu$ M	+	Stetina y Votava, 1986 [75]
Ratón / Hígado, riñón y bazo	2,5 mg/kg p.c.	+	Creppy y col. 1985 [76]
Rata / Hígado y riñón	288,8 $\mu$ g/kg p.c.	+	Kane y col. 1986 [77]
<b>Ensayo del cometa</b>			
Línea celular Hep G2	0-62 $\mu$ M	+	Erlich y col. 2002 [62]
Línea celular MDCK	1nm-500 $\mu$ M <sup>(1)</sup>	+	Lebrun y Föllmann, 2002 [78]

<sup>(1)</sup> Activación metabólica: S9 hígado rata.

Tabla 4. Ensayos de alteraciones cromosómicas.

Sistema Experimental	[OTA]	Resultados	Referencia
<b>Aberraciones cromosómicas</b>			
Linfocitos humanos	15 nM <sup>(1)</sup>	+	Manolova y col. 1990 [79]
<b>Intercambios entre cromátidas hermanas</b>			
Hámster chino / Médula ósea	25-200 mg/kg p.c.	-	Bendele y col. 1985 [60]
Células PUBEC	100 pM-100 nM	+	Föllmann y col. 1995 [80]
<b>Micronúcleo</b>			
Células OSV	12-30 $\mu$ M (6 h.)	+	Degen y col. 1997 [81]
Células SHE	5-20 $\mu$ M (3-72 h.)	+	Dopp y col. 1999 [82]
Células Hep G2	12-120 $\mu$ M (1 y 24 h.)	+	Erlich y col. 2002 [62]

<sup>(1)</sup> Activación metabólica: S9 riñón rata.

#### Ensayos que miden fragmentación del ADN

En todos los estudios en los que se ha medido fragmentación de ADN se han obtenido resultados positivos (Tabla 3). Se ha demostrado que la OTA produce roturas monocatenarias del ADN tanto en sistemas *in vitro* [75,76] como *in vivo* en rata [77] y ratón [76].

Más recientemente se han obtenido asimismo resultados positivos con el ensayo del cometa en el que células aisladas y tratadas con una solución de lisis, se someten a electroforesis en un gel de agarosa. En aquellos casos en los que se hayan producido roturas en el ADN, éste se expande desde el núcleo formando una estela en forma de cometa cuyo tamaño es directamente proporcional a la intensidad del daño sufrido. Mediante este ensayo Lebrun y Föllmann (2002) han confirmado en la línea celular MDCK, derivada de células renales de perro, que la OTA produce roturas monocatenarias de manera concentración dependiente y que este efecto aumenta tras la metabolización de la OTA con fracción S9 de hígado de rata [78]. Erlich y col. (2002) también observaron migración del ADN, en la línea celular HepG2, derivada de hepatocarcinoma humano y concluyeron que la OTA puede causar efectos genotóxicos en tejido hepático humano [62].

#### Alteraciones cromosómicas

A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos de fragmentación de ADN, sería previsible que esta micotoxina fuera capaz de producir alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales. Sin embargo, son relativamente escasos los estu-

dios en los que se ha comprobado dicho potencial (Tabla 4). Manolova y col. (1990) realizaron análisis citogenéticos a partir de cultivos de linfocitos humanos tratados con OTA en presencia y en ausencia de activación metabólica (fracción S9 de riñón de rata). Observaron aberraciones cromosómicas, particularmente trisomía-X, en aquellos cultivos tratados únicamente con la micotoxina, mientras que el nivel de estas alteraciones cromosómicas disminuía con la adición de S9 [79].

Entre los ensayos citogenéticos de genotoxicidad se incluye el de intercambio entre cromátidas hermanas si bien el mecanismo molecular por el que se producen dichos intercambios no está dilucidado. No obstante, se considera que el intercambio entre cromátidas hermanas es una manifestación citológica de que hay roturas en el ADN y consecuentemente, un intercambio entre dos cromátidas de un mismo cromosoma. El intercambio ocurre durante la replicación, y puede ser inducido por compuestos que forman aductos con el ADN o por compuestos que interfieren en la reparación de ADN. Bendele y col (1985), en hamster chino a los que se les administró OTA por vía oral no obtienen diferencias significativas en células de médula ósea [60]. Sin embargo *in vitro*, Föllmann y col. (1995) obtienen resultados positivos en células epiteliales del sistema urinario (PUBEC) tratadas con distintas concentraciones de la micotoxina (Tabla 4). También se observó que el metabolito de la OTA, OT $\alpha$ , presuntamente no tóxico, es genotóxico en este ensayo a concentraciones superiores (10 nm-10  $\mu$ M) [80].

Más recientemente, se ha estudiado la actividad mutagénica de la OTA mediante el test del micronúcleo (MN), capaz de detectar alteraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructu-

rales, pero de una manera indirecta. Los micronúcleos son pequeñas partículas que contienen fragmentos acéntricos de cromosoma, es decir sin centrómero, o cromosomas enteros, que quedan rezagados en la disyunción anafásica de los cromosomas mitóticos, razón por la cual no quedan incluidos en ninguno de los dos núcleos de las células hijas y forman un micronúcleo independiente en el citoplasma. Por lo tanto, teóricamente, mediante este ensayo se pueden detectar dos tipos de efectos: a) clastogénicos, producidos por aquellos compuestos que producen roturas cromosómicas y dan lugar a alteraciones estructurales, b) aneugénicos, producidos por aquellos compuestos que alteran el proceso normal de migración cromosómica durante la anafase mitótica y dan lugar a alteraciones numéricas. La distinción entre uno y otro tipo requiere el análisis del contenido de los micronúcleos mediante técnicas de hibridación *in situ*.

En células de la vesícula seminal ovina (OSV), que carecen de actividad monooxigenasa pero expresan una elevada actividad prostaglandina H sintetasa (PGHS), se demostró que la OTA induce MN de forma dosis-dependiente y con un efecto principalmente clastogénico [81] (Tabla 4). No obstante, en contra de lo esperado, la presencia de indometacina, inhibidor de PGHS, no hizo disminuir la frecuencia de MN inducidos por OTA, lo que sugiere que la genotoxicidad de la OTA en esas células es independiente de esa vía metabólica. También en células SHE (embrión de hamster sirio) la OTA induce MN de manera dosis y tiempo dependiente [82] (Tabla 4). El número de MN inducido por la micotoxina fue estadísticamente significativo al cabo de 3 h de tratamiento a la concentración de 10  $\mu\text{M}$ , alcanzando un máximo a las 36 h y 15  $\mu\text{M}$ . Los resultados indican un efecto predominantemente clastogénico y un efecto directo sobre los filamentos de actina. Entre los estudios más recientes se encuentra el de Erlich y col. (2002) que encuentran asimismo resultados positivos en la línea celular Hep G2 a concentraciones entre 12 y 120  $\mu\text{M}$ , con un máximo de MN tras 24 h de tratamiento y 61  $\mu\text{M}$  [62].

### Formación de aductos con el ADN

Los aductos son lesiones premutagénicas que se producen por la unión covalente entre ciertos compuestos químicos de naturaleza electrofílica y los átomos de N y O de las bases nitrogenadas del ADN. *In vivo* se han obtenido resultados positivos en diversos tejidos de rata y ratón [83-86], así como en sistemas *in vitro* [87,88] (Tabla 5). Sin embargo, en estudios recientes tanto *in vivo* como *in vitro* en cultivo primario de hepatocitos humanos y de rata, los resultados obtenidos han sido negativos [89,90]. En estos últimos experimentos se ha utilizado la micotoxina marcada radiactivamente con  $^3\text{H}$  y se han determinado tanto los metabolitos como los aductos específicos generados por la micotoxina y sus metabolitos. Las conclusiones derivadas de estos trabajos se comentan en el siguiente apartado.

### Genotoxicidad y metabolismo

Como se ha podido comprobar por la información aportada en esta revisión los datos sobre la genotoxicidad de la OTA son inconsistentes y aparentemente contradictorios. Varias hechos parecen ciertos:

1) El tratamiento de animales de experimentación con la micotoxina da lugar a la *formación de aductos* en el ADN de diversos tejidos, especialmente riñón y vejiga urinaria de ratón, y

también produce *roturas monocatenarias* en dichos tejidos [76-77, 83-86].

2) Como consecuencia del tratamiento de células en cultivo con ocratoxina A se producen *roturas en el ADN* que, bajo las condiciones apropiadas, se ponen de manifiesto por las formas de *cometa*, por los *intercambios entre cromátidas hermanas*, por las *alteraciones cromosómicas* directas o bien por los *micronúcleos* [62,78-82].

3) En los ensayos de mutación génica en bacterias y células de mamífero en cultivo el tratamiento directo con la micotoxina, incluso en presencia de un sistema exógeno de activación metabólica, da resultados negativos, por lo que parece que la toxina no es capaz de revertir una mutación preexistente [58-63]. Solamente dos excepciones a esta regla: el medio de cultivo en el que han crecido hepatocitos tratados con OTA ha dado resultados positivos en el test de Ames [64]; la mezcla S9 de riñón de ratón ha dado lugar a resultados positivos en el test de Ames de manera preferente si como cofactor se utiliza ácido araquidónico en lugar de NADPH [66].

4) En cultivo primario de hepatocitos y otras células diana el tratamiento con OTA induce el proceso de *reparación de ADN*, ya que se produce síntesis de ADN fuera del período S [71-74].

5) En células transfectadas con citocromos humanos y portadoras del gen *lac Z'* el tratamiento con OTA produjo mutaciones en dicho gen consistentes principalmente en grandes deleciones [65].

Por lo tanto, salvo las excepciones citadas en el punto 3, el efecto genotóxico de la OTA se ha puesto de manifiesto o bien en ensayos que miden interacción con el ADN (aductos, reparación) o bien en ensayos que detectan fragmentación (alteraciones cromosómicas, micronúcleos, cometas), no propiamente en ensayos específicos de mutación reversa. Este efecto genotóxico se considera dependiente de activación metabólica, si bien los metabolitos genotóxicos no han sido identificados por el momento.

Dos son los vías metabólicas implicadas: citocromo P450 y prostaglandina H sintetasa (PGHS). En los experimentos de De Groene y col. (1996) los citocromos humanos implicados son CYP3A4, CYP2C10, CYP1A2 y, en menor medida, CYP1A1 [65]; Ed Adlouni y col. (2000) encuentran un aumento en la formación de aductos, detectados mediante la técnica de post-marcaje con  $^{32}\text{P}$ , en un sistema experimental con DNA aislado tratado con OTA y microsomas de levadura que expresan el citocromo humano CYP 2C9 [91]. Además, cuando la OTA se incubaba con microsomas obtenidos de riñón de conejo pretratado con fenobarbital se producía asimismo un incremento en el número de aductos [91].

Por otra parte, la PGHS se ha implicado en la bioactivación de la OTA *in vivo* sobre la base de que la co-administración de OTA junto con indometacina o aspirina, ambos conocidos inhibidores de PGHS, disminuía la formación de aductos en ratón [86]. Esta hipótesis se ha visto apoyada posteriormente en un ensayo con estirpes de *Salmonella typhimurium*, en el que la mezcla S9 de hígado de ratón resultaba más eficaz como sistema de bioactivación de la micotoxina cuando se utilizaba como cofactor ácido araquidónico en lugar de NADPH [66]. Sin embargo, en células

Tabla 5. Formación de aductos con el ADN.

Sistema Experimental	[OTA]	Activación metabólica	Resultados	Referencia
Ratón / Hígado, riñón y bazo	0,6-2,5 mg/kg p.c.		+	Pfohl-Leszkowicz y col. 1991 [83]
Ratón / Hígado, riñón y bazo	2,5 mg/kg p.c.		+	Pfohl-Leszkowicz y col. 1993a [84]
Ratón / Testículos y riñón	0,2-2,5 mg/kg p.c.		+	Pfohl-Leszkowicz y col. 1993b [85]
Ratón / Vejiga urinaria y riñón	2 mg/kg p.c.		+	Obrecht-Pflumio y col. 1996 [86]
Línea celular Vero	10-100 $\mu$ M		+	Grosse y col. 1995 [87]
DNA de salmón	250 $\mu$ M	Microsomas de hígado y riñón conejo y ratón <sup>(1)</sup>	+	Obrecht-Pflumio y Dirheimer, 2000 [88]
DNA de salmón	250 $\mu$ M	Peroxidasa HRP	+	Obrecht-Pflumio y Dirheimer 2001 [92]
DNA de salmón	100 $\mu$ M	Varios	+/-	Ed Adlouni y col. 2000 [91]
DNA de timo de ternera	100 $\mu$ M <sup>(3)</sup>	Varios	-	Gautier y col. 2001 [89]
Rata / Riñón	1 mg/kg p.c.		-	Gautier y col. 2001 [89]
Hepatocitos humanos <sup>(2)</sup>	0,1-10 $\mu$ M <sup>(3)</sup>		-	Gross-Steinmeyer y col. 2002 [90]
Hepatocitos de rata <sup>(2)</sup>	0,1-10 $\mu$ M <sup>(3)</sup>		-	Gross-Steinmeyer y col. 2002 [90]

<sup>(1)</sup> Cofactores: NADPH o ácido araquidónico.

<sup>(2)</sup> Cultivo primario.

<sup>(3)</sup> OTA marcada radiactivamente con <sup>3</sup>H. Determinación de aductos por conteo de centelleo.

de vesícula seminal ovina, que expresan gran cantidad de PGHS, la indometacina no inhibía la formación de micronúcleos [81]. Por lo tanto el papel que juega esta vía de transformación metabólica en la genotoxicidad de la OTA está pendiente de confirmar. Por último, Ed Adlouni y col. (2000) deducen que el enzima glutation-S-transferasa estaría también implicada en la genotoxicidad de la OTA al encontrar que la inhibición de dicho enzima reducía la formación de aductos [91].

A este respecto, consideramos muy esclarecedor el estudio de Gautier y col (2001) [89] que utilizando OTA tritiada comprobaron, bajo diversas condiciones experimentales, la formación de metabolitos, que determinan mediante HPLC, así como la capacidad genotóxica de la micotoxina y sus metabolitos, que determinan mediante la detección de aductos específicos de OTA por conteo de centelleo. Estos autores llegan a interesantes conclusiones que pasamos a resumir: a) En microsomas de hígado, tanto de rata como humano, el único metabolito que se forma es el derivado hidroxilado 4 - (R) - OH -OTA. No encuentran diferencias entre sexos y comprueban que este metabolito no es genotóxico. b) En microsomas de riñón de rata, ratón o humano no encuentran metabolitos de la OTA y tampoco detectan unión covalente al ADN. c) En sistemas experimentales con PGHS y peroxidasa (HRP) no encuentran evidencia de formación de aductos. En todos los experimentos incluyen controles positivos de compuestos que o bien son metabolizados por los sistemas enzimáticos utilizados o bien dan lugar a aductos, por lo que se excluye la posibilidad de falsos negativos bajo las condiciones experimentales utilizadas en ese estudio.

Por lo tanto, concluyen que la OTA no da lugar a metabolitos que reaccionen directamente con el ADN. Posiblemente la actividad genotóxica de la OTA sea secundaria a procesos de citotoxicidad y peroxidación lipídica que generarían radicales libres responsables de las lesiones producidas en el ADN.

En los estudios anteriores los aductos se habían medido mediante la técnica de post-marcaje con <sup>32</sup>P que no es específica, por lo que no se puede asegurar que en los aductos detectados por ese procedimiento esté presente una molécula de ocratoxina o meta-

bolito [83-88,92]. Por el contrario, la técnica de centelleo utilizada por estos autores detecta exclusivamente aductos de OTA o derivados al disponer de la toxina marcada radiactivamente [89,90]. El límite de detección del conteo de centelleo en las condiciones de ese estudio es de 2,7 aductos / 10<sup>9</sup> bases y el límite de detección de la técnica de post-marcaje es entre 3 y 20 veces aproximadamente más alto. Por lo tanto, todos los aductos detectados por la técnica de post-marcaje deberían ser detectados mediante centelleo. Puesto que no ocurre así se puede deducir que la mayor parte de los aductos atribuidos anteriormente a la toxina no contendrían un residuo OTA, sino que las lesiones serían consecuencia de la citotoxicidad de la OTA [89].

Tampoco Gross-Steinmeyer y col (2002) en cultivo primario de hepatocitos de rata y humanos tratados con OTA tritiada encuentran aductos en el ADN [90]. Identifican tres metabolitos, uno de los cuales es el derivado hidroxilado 4 - (R) - OH -OTA, y otros dos unidos a pentosa y hexosa, respectivamente. Su límite de detección es de 2 aductos / 10<sup>9</sup> bases, por lo que concluyen también que la OTA no da lugar a metabolitos que reaccionen con el ADN. Sus resultados, por tanto, apoyan la hipótesis de Gautier y col. (2001) [89], reforzada por el hecho de que en hepatocitos humanos y de rata metabólicamente activos, después del tratamiento con OTA se produce una disminución de la relación GSH/GSSG [90].

### Conclusión

En resumen, a la vista de todos estos datos, aunque el efecto genotóxico de la OTA está fuera de toda duda, el mecanismo de acción está todavía sin esclarecer y cobra fuerza la hipótesis de una acción indirecta derivada de la citotoxicidad de la micotoxina y no tanto de su capacidad intrínseca de reacción con el ADN.

### Bibliografía

1. Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott B, Theron JJ (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. Nature 4976: 1112-3.

2. Xiao H, Madhyastha S, Marquardt RR, Li S, Vodela JK, Frohlich AA, Kemppainen BW (1996). Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analoges: structure-activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol* 137: 182-92.
3. Moss MO (1996). Mycotoxins. *Mycol Res* 100: 513-23.
4. European Commission (1995). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population in EU member states. 3° informe SCOOP. (Working document in support of a SCF risk assessment of ochratoxin A). Coordinador: Dinamarca. Noviembre.
5. Legarda TM y Burdaspal PA (1998). Ocratoxina A en cervezas elaboradas en España y en otros países Europeos. *Alimentaria*, abril: 115-22.
6. Studer-Rohr I, Dietrich DR, Schlatter J, Schlatter C (1995). The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food Chem Toxicol* 33: 341-55.
7. Zimmerli B y Dick R (1996). Ochratoxin A in table wine and grape- juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit Contam* 13: 655-68.
8. Burdaspal PA y Legarda TM (1999) Ocratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros países europeos. *Alimentaria*, enero-febrero: 107-13.
9. Krogh P (1987). Ochratoxicosis in food. En: *Mycotoxins in food*. Krogh P, editor. Food science and technology, series monographs. Academic Press.
10. Josefsson EBG y Möller TE (1980). Heat stability of ochratoxin A in pig products. *J Sci Food Agr* 31: 1313-5.
11. Jorgensen K (1998). Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Addit Contam* 15: 550-4.
12. Jiménez AM, López de Cerain A, González-Peñas E, Bello J (2001). Determination of OTA in pig liver derived pâtés by high-performance liquid chromatography. *Food Addit Contam* 18: 559-63.
13. Kuiper-Goodman y Scott PM (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. Review. *Biomedical and Environmental sciences* 2: 179-248.
14. Di Paolo N, Guarnieri A, Garosi G, Sacchi G, Mangiarotti AM, Di Paolo M (1994). Inhaled mycotoxins lead to acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 9 Suppl 4: 116-20.
15. Kumagai S y Aibara K (1982). Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 64: 94-102.
16. Chu FS (1971). Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin. *Arch Biochem Biophys* 147: 359-66.
17. Chu FS (1974). A comparative study of the interaction of ochratoxins with bovine serum albumin. *Biochem Pharmacol* 23: 1105-13.
18. Schlatter CH, Studer-Rohr J, Rásonyi TH (1996). Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Addit Contam* 13: 43-4.
19. Hamilton PB, Huff WE, Harris JR, Wyatt RD (1982). Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. *Poult Sci* 61: 2172-4
20. Bozic Z, Duancic V, BeliczkaM, Kraus O, Skljarov I (1995). Balkan endemic nephropathy: still a mysterious disease. *Eur J Epidemiol* 11: 235-8.
21. Plestina R (1996). Nephrotoxicity of ochratoxin A. *Food Addit Contam* 13 Suppl: 49-50.
22. IARC (1993). Ochratoxin A. En: *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: 489-521.
23. Gekle M, Gabner B, Freudinger R, Mildenerger S, Silbernagl S, Pfaller W Schramek H (1998). Characterization of an ochratoxin A dedifferentiated and cloned renal epithelial cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 152: 282-91.
24. Schramek H, Wilflingseder D, Pollack V, Freudinger R, Mildenerger S, Gekle M (1997). Ochratoxin A-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 is associated with Madin-Darby canine kidney-C7 cell dedifferentiation. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 1460-7.
25. Benesic A, Mildenerger S, Gekle M (2000). Nephritogenic ochratoxin A interferes with hormonal signalling in immortalized human kidney epithelial cells. *Pflug Arch* 439: 278-87.
26. Gekle M, Schwerdt G, Freudinger R, Mildenerger S, Wilflingseder D, Pollack V, Dander M y Schramek H (2000). Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 837-44.
27. Horvath A, Upham BL, Ganey V, Trosko JE (2002). Determination of the epigenetic effects of ochratoxin in a human kidney and a rat liver epithelial cell line. *Toxicol* 40: 273-82.
28. Thuvander A, Paulsen JE, Axberg K, Johansson N, Vidnes A, Enghardt-Barbieri H, Trygg K, Lund-Larsen S, Jahrl S, Widenfalk A, Bosnes V, Alexander J, Hult K y Olsen M (2001). Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food Chem Toxicol* 39: 1145-51.
29. Frohlich AA, Marquardt RR, Ominski KH (1991). Ochratoxin A as a contaminant in the human food chain: a Canadian perspective. En: Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H. Ed. *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications, Lyon 115: pp. 139-43.
30. Tápai K, Téren J, Mesterházy A (1997). Ochratoxin in the sera of blood donors and ill persons. *Proceedings of the fifth European Fusarium seminar, Szeged Hungría*. pp. 307-8.
31. Wafa EW, Yahya RS, Sobh MA, Eraky I, El Baz M, El Gayar HA, Betbeder AM, Creppy EE (1998). Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study. *Human Exp Toxicol* 17: 124-9.
32. Gilbert J, Brereton P, MacDonalds S (2001). Assessment of dietary exposure to ochratoxin A in UK using a duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. *Food Addit Contam* 18(12): 1088-93.
33. Grosso F, Saïd S, Mabrouk I, Freymy JM, Castegnaro M, Jemmali M, Dragacci S (2003). New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food Chem Toxicol* 41: 1133-40.
34. Jiménez AM, López de Cerain A, González-Peñas E, Bello J, Betbeder AM, Creppy EE (1998). Exposure to ochratoxin A in Europe: comparison with a region of northern Spain. *J Toxicol Toxin Rev* 17: 479-91.
35. Malir F, Roubal T, Brndiar M, Osterreicher J, Severa J, Knizek J, Kacerovsky J, Tmejova M, Betbeder AM, Braudimont I, Creppy EE (2001). Ochratoxin A in the Czech republic. *J Toxicol Toxin Rev* 20 (3-4): 261-74.
36. Pérez de Obanos A, López de Cerain A, Jiménez AM, González-Peñas E, Bello J (2001). Ocratoxina A en plasma humano: nuevos datos de exposición en España. *Rev Toxicol* 18: 19-23.
37. Burdaspal PA y Legarda TM (1998). Datos sobre presencia de ocratoxina A en plasma humano en España. *Alimentaria*, mayo: 103-9.
38. Creppy EE, Betbeder AM, Charbi A, Counord J, Castegnaro M, Bartsch H, Moncharmont P, Fouillet B, Chambon P, Dirheimer G (1991). En: Castegnaro M, Plestina R, Dieheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H. Ed. *Human ochratoxicosis in France. Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications, Lyon: pp. 145-51.
39. Breiholtz-Emanuelsson A, Minervini F, Hult K, Visconti A (1994). Ochratoxin A in human serum samples collected in



- southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidney disorders. *Natural Toxins* 2: 366-70.
40. Palli D, Miraglia M, Saieva C, Masala G, Cava E, Colatosti M, Corsi AM; Russo A, Brera C (1999). Serum levels of ochratoxin A in healthy adults in Tuscany: correlation with individual characteristics and between repeat measurements. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 8: 265-9.
  41. Breiholtz-Emanuelsson A, Olsen M, Dahlbäck A, Hult K (1991). Plasma ochratoxin A levels in three Swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique. *Food Addit Contam* 8(2): 183-92.
  42. Hald B (1991). Ochratoxin A in human blood in European countries. En: Castegnaro M, Plestina R, Dieheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H. Ed. *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC scientific publications, Lyon: pp. 159-64.
  43. Ruprich J y Ostry V (1993). Study of human exposure to ochratoxin A and assessment of possible sources. *Central Eur J Publ Health* 1: 46-8.
  44. Bauer J y Gareis M (1987). Ochratoxin A in the food chain. *Zentral-Veterinarmed-B* 34(8): 613-27.
  45. Golinsky P, Grabarkiewicz-Szcesna J, Chelkowski J, Hult K, Kostecki M (1991). Possible sources of ochratoxin A in human blood in Poland. En: Castegnaro M, Plestina R, Dieheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H. Ed. *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications, Lyon: pp. 153-8.
  46. Krogh P (1976). Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy. *Nordisk Veterinaermedicin* 28: 452-8.
  47. Fuchs R, Radic B, Ceovic S, Sostaric B, Hult K (1991). Human exposure to ochratoxin A. En: Castegnaro M, Plestina R, Dieheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H. Ed. *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications, Lyon: pp. 131-5.
  48. Bacha H, Maaroufi K, Achour A, Hamammi M, Ellouz F, Creppy EE (1993). Ochratoxines et ochratoxicoses humaines en Tunisie. En: Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G. Ed. *Human ochratoxicosis and its pathologies*, INSERM, John Libbey Eurotext LTD, Paris 231: pp. 111-21.
  49. Khalef A, Zidane C, Charef A, Gharbi A, Tadjerouna M, Betbeder AM, Creppy EE (1993). Ochratoxicoses humaines en Algérie. En: Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G, Ed. *Human ochratoxicosis and its pathologies*, INSERM, John Libbey Eurotext LTD, Paris 231: pp. 123-7.
  50. Filali A, Betbeder AM, Baudrimont I, Benayad A, Soulaymani R, Creppy EE (2002). Ochratoxin A in human plasma in Morocco. A preliminary survey. *Human Exp Toxicol* 21(5): 241-5.
  51. Iavicoli I, Brera C, Carelli G, Caputi R, Marinaccio A, Miraglia M (2002). External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A. *Int Arch Occup Environ Health* 75(6): 381-6.
  52. Skaug MA (2003). Levels of ochratoxin A and IgG against conidia of *Penicillium verrucosum* in blood samples from healthy farm workers. *Ann Agric Environ Med* 10(1): 73-7.
  53. JECFA (1991). Evaluation of certain food additives and contaminants. Thirty-seventh report. WHO Technical Report Series N° 806, p. 29-31.
  54. JECFA (1995). Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-fourth report. WHO Technical Report Series N° 806, p 35-6.
  55. Opinion of the Scientific Committee on Food on Ochratoxin A (expressed on 17 September 1998) Consumer Policy and Consumer Health Protection.
  56. Comisión Europea. Reglamento (CE) N° 472/2002 de la Comisión de 12 marzo de 2002 que modifica el Reglamento (CE) N° 466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* 2002; L 75/18-20.
  57. McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 72(12): 5135-9.
  58. Kuczuk MH, Benson PM, Heath H, Hayes AW (1978). Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 53: 11-20.
  59. Wehner FC, Thiel PG, Van Reusburg SJ, Demasius PC (1978). Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxins. *Mutat Res* 58: 193-203.
  60. Bendele AM, Neal SB, Oberly TJ, Thompson CZ, Bewsey B, Hill LE, Rexroat MA, Carlton WW, Probst GS (1985). Evaluation of ochratoxin A for mutagenicity in a battery of bacterial and mammalian cell assay. *Food Chem Toxicol* 23: 911-8.
  61. Würzler FE, Friederich U, Schlatter J (1991). Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, citrinin, patulin and cneatine in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat Res* 261: 209-16.
  62. Ehrlich V, Darroudi F, Uhl M, Steinkellner H, Gann M, Majer BJ, Eisenbauer M, Knasmüller S (2002). Genotoxic effects of ochratoxin A in human-derived hepatoma (HepG2) cells. *Food Chem Toxicol* 40: 1085-90.
  63. Föllmann W y Lucas S (2003). Effects of the mycotoxin ochratoxin A in bacterial and a mammalian in vitro mutagenicity test system. *Arch Toxicol* 77(5): 298-304.
  64. Henning A, Fink-Gremmels J, Leistner L (1991). Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. En: Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky In, Bartsch H. Ed. *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and urinary tract tumors*. IARC Scientific Publications, Lyon 115: pp. 255-60.
  65. de Groene EM, Hassing IGAM, Blom MJ, Seinen W, Fink-Gremmels J, Horbarch GJ (1996). Development of human cytochrome P450-expressing cell lines: application in mutagenicity testing of ochratoxin A. *Cancer Research* 56: 299-304.
  66. Obrecht-Pflumio S, Chassat T, Dirheimer G, Marzin D (1999). Genotoxicity of ochratoxin A by *Salmonella* mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes. *Mutat Res* 446: 95-102.
  67. Ueno Y y Kubota K (1976). DNA-attacking ability of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant cells of *Bacillus subtilis*. *Cancer Research* 36: 445-51.
  68. Kada K, Tsuchikawa K y Sadaie Y (1972). In vitro and host-mediated *Rec assay* procedures for screening chemical mutagens, and phloxine, mutagenic red dye detected. *Mutat Res* 16: 165-74.
  69. Malaveille C, Vineis P, Estéve J, Ohshima H, Brun G, Hautefeuille A, Gallet P, Ronco G, Terracini B, Bartsch H (1989). Levels of mutagens in the urine of smokers of black and blond tobacco correlate with their risk of bladder cancer. *Carcinogenesis* 10: 577-86.
  70. Sakai M, Abe KI, Okumura H, Kawamura O, Sugiura Y, Horie Y, Ueno Y (1992). Genotoxicity of fungi evaluated by *SOS microplate assay*. *Natural Toxins* 1: 27-34.
  71. Malaveille C, Brun G, Bartsch H (1994). Structure-activity studies in *E. Coli* strains on ochratoxin A (OTA) and its analogues implicate a genotoxic free radical and a cytotoxic thiol derivative as reactive metabolites. *Mutat Res* 307: 141-7.
  72. Mori H, Kawai K, Ohbayashi F, Kuniyasu T, Yamazaki M, Hamasaki T, Williams GM (1984). Genotoxicity of a variety of

- mycotoxins in the hepatocyte primary culture/ DNA repair test using rat and mouse hepatocytes. *Cancer Research* 44: 2918-23.
73. Dörrenhaus A y Föllmann W (1997). Effects of ochratoxin A on DNA repair in cultures of rat hepatocytes and porcine urinary bladder epithelial cells. *Arch Toxicol* 71: 709-13.
  74. Dörrenhaus A, Flieger A, Golka K, Schulze H, Albrecht M, Degen GH, Föllmann W (2000). Induction of unscheduled DNA synthesis in primary human urothelial cells by the mycotoxin ochratoxin A. *Toxicol Sci* 53: 271-7.
  75. Stetina R y Votava M (1986). Induction of single-strand breaks and DNA synthesis inhibition by patulin, ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B<sub>1</sub> in cell lines CHO and AWRP. *Folia Biol (Praha)* 32: 128-44.
  76. Creppy EE, Kane A, Dirheimer G, Lafarge-Frayssinet C, Mousset S, Frayssinet C (1985). Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. *Toxicol Lett* 28(1): 29-35.
  77. Kane A, Creppy EE, Roth A, Roschenthaler R, Dirheimer G (1986). Distribution of the (3H)-label from low doses of radioactive ochratoxin A ingested by rats, and evidence for DNA single-strand breaks caused in liver and kidneys. *Arch Toxicol* 58(4): 219-24.
  78. Lebrun S y Föllmann W (2002). Detection of ochratoxin A-induced DNA damage in MDCK cells by alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). *Arch Toxicol* 75: 734-41.
  79. Manolova Y, Manolov G, Parvanova L, Petchkova-Bocharova J, Castegnaro M, Chernozemsky I (1990). 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: 143-9.
  80. Föllmann W, Hillebrand IE, Creppy EE, Bolt HM (1995). Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and alpha. *Arch Toxicol* 69: 280-6.
  81. Degen GH, Gerber MM, Obrecht-Pflumio S, Dirheimer G (1997). Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures. *Arch Toxicol* 71: 365-71.
  82. Dopp E, Müller J, Hahnel C, Schiffmann D (1999). Induction of genotoxic effects and modulation of the intracellular calcium level in syrian hamster embryo (SHE) fibroblast caused by ochratoxin A. *Food Chem Toxicol* 37: 713-21.
  83. Pfohl-Leszkowicz A, Chakor K, Creppy EE, Dirheimer G (1991). DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. *IARC Scientific Publications* 115: pp. 245-53.
  84. Pfohl-Leszkowicz A, Grosse Y, Kane A, Creppy EE, Dirheimer G (1993a). Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A. *Mutat Res* 289: 265-73.
  85. Pfohl-Leszkowicz A, Grosse Y, Kane A, Gharbi A, Baudrimont I, Obrecht S, Creppy EE, Dirheimer G (1993b). Is the oxidative pathway implicated in the genotoxicity of ochratoxin A? En: Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G (eds). *Human ochratoxicosis and its pathologies. Colloque INSERM; 231: John Libbey Eurotext, London, pp. 177-87.*
  86. Obrecht-Pflumio S, Grosse Y, Pfohl-Leszkowicz A, Dirheimer G (1996). Protection by indomethacin and aspirin against genotoxicity of ochratoxin A, particularly in the urinary bladder and kidney. *Arch Toxicol* 70: 244-8.
  87. Grosse Y, Baudrimont I, Castegnaro M, Betbeder AM, Creppy EE, Dirheimer G, y col (1995). Formation of OTA metabolites and DNA-adducts in monkey kidney cells. *Chem Biol Interact* 95: 175-87.
  88. Obrecht-Pflumio S y Dirheimer G (2000). In vitro DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A. *Chemicobiological interactions* 127: 29-44.
  89. Gautier J, Richoz J, Welti DH, Markovic J, Gremaud E, Guengerich FP, Turesky RJ (2001). Metabolism of ochratoxin A: absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes. *Chem Res Toxicol* 14(1): 34-45.
  90. Gross-Steinmeyer K, Weymann J, Hege H-G, Metzler M (2002). Metabolism and lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin A in cultured rat and human primary hepatocytes. *J Agric Food Chem* 50: 938-45.
  91. El Adlouni C, Pinelli E, Azémar B, Zaoui D, Beaune P, Pfohl-Leszkowicz A (2000). Phenobarbital increases DNA adduct and metabolites formed by ochratoxin A: role of CYP 2C9 and microsomal glutathione-S-transferase. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 123-31.
  92. Obrecht-Pflumio S y Dirheimer G (2001). Horseradish peroxidase mediates DNA and deoxyguanosine 3'-monophosphate adduct formation in the presence of ochratoxin A. *Arch Toxicol* 75(10): 583-90.