



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

11661

3
24

“DESARROLLO Y EVALUACION DE UN METODO
PARA LA PRODUCCION DE GLIOTOXINA”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

(AREA MICROBIOLOGIA)

P R E S E N T A :

CAROLINA MORENO RAMOS

DIRECTORES DE TESIS:

DR. ROBERTO A. CERVANTES OLIVARES.

DRA. SARA E. VALDES MARTINEZ.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

270239



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTTLAN

COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVANZANDO
MEXICO

Coordinación General de Estudios de Posgrado
FES - Cuauttlán
Presenta.

Por medio de la presente nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis
titulada "DESARROLLO Y EVALUACION DE UN METODO PARA LA PRODUCCION DE GLIOTOXINA".

que presenta el (la) alumno (a) CAROLINA MORENO RAMOS

con Núm. de cuenta 8063110-7 N° Exp. 100911012

para obtener el grado de MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el
Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

a de de 19

NOMBRE DE LOS SINODALES

PRESIDENTE: DR. ERNESTO MORENO

VOCAL: DR. ROBERTO CERVANTES OLIVARES

SECRETARIO M.C. IRMA TEJADA CASTAREDA

1er. SUPL. DR. ANDRES ROMERO ROJAS

2do. SUPL. M.C. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO

Handwritten signatures of the synodal members corresponding to the printed names.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 8 de Tecnología de Calidad de Alimentos, ubicado en el edificio de posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuatitlán - UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Sara E. Valdés Martínez y el DR. Roberto A. Cervantes Olivares.

DEDICATORIAS

A Dios., Por darme la vida, y por toda ayuda que siempre me ha dado.

A mis padres:

Por su inmesurable amor apoyo y confianza que siempre me han brindado a través del tiempo.

A mi hermana:

Con quién cuento en todo momento y en cualquier circunstancia.

AGRADECIMIENTOS

A la FES-Cuautitlán, que me formo y que me dio las herramientas necesarias para ser un buen profesionalista.

A los síndocales, quienes enriquecieron esta tesis, con excelentes comentarios y correcciones.

A la Dra. Susana Mendoza Elvira, por su gran amistad que siempre me ha brindado y apoyo durante mi formación profesional durante mucho tiempo.

Al M.en C. Guillermo Penieres por permitirme utilizar las instalaciones a su cargo.

Al Técnico Académico Rodolfo Robles G. por su ayuda técnica en fotografía.

Al pMVZ. David Trujillo C. por su asesoría técnica en computación.

Al Ing. Agustín Padilla por la donación de las cromatoplacas .

Al pl.A. Rodolfo Vergara Cabrera por su asesoría en la edición de la tesis.

A los profesores de posgrado.

A todos los que me dieron su amistad, comprensión, cariño y apoyo en los momentos importantes y difíciles de mi vida.

INDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	III
INDICE DE TABLAS.....	III
RESUMEN.....	IV
GENERALIDADES.....	1
ASPERGILLUS.....	1
IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO.....	2
ASPERGILOSIS EN AVES.....	5
PREVENCIÓN Y CONTROL.....	7
ASPERGILLUS FUMIGATUS.....	7
CARACTERÍSTICAS DE LA COLONIA <i>A. FUMIGATUS</i>	11
GLIOTOXINA.....	12
ANÁLISIS DE GLIOTOXINA.....	15
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	20
CRECIMIENTO EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.....	21
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS.....	22
SEPARACIÓN DE BIOMASA Y EXTRACCIÓN DE LA GLIOTOXINA.....	22
IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLIOTOXINA EN LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	23
ENSAYO BIOLÓGICO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE GLIOTOXINA.....	23
DETERMINACIÓN DE PRESENCIA DE GLIOTOXINA EN DIFERENTES CEPAS.....	24
PURIFICACIÓN DE GLIOTOXINA.....	24
RESULTADOS.....	26
CRECIMIENTO DE <i>A. FUMIGATUS</i> EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.....	26
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS.....	27
PRODUCCIÓN DE GLIOTOXINA EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.....	29
DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE GLIOTOXINA EN DIFERENTES CEPAS.....	32
ENSAYO BIOLÓGICO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE GLIOTOXINA.....	33

CUANTIFICACIÓN DE GLIOTOXINA EN LAS DIFERENTES CEPAS.....	33
CARACTERIZACIÓN DE GLIOTOXINA.....	36
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	46
APÉNDICE.....	47
REFERENCIAS.....	51

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 DIFERENTES ESTRUCTURAS MICÓTICAS	2
FIGURA 2 OTRAS MICOTOXINAS PRODUCIDAS POR <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i>	10
FIGURA 3 ESTRUCTURA MICÓTICA DE <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i>	12
FIGURA 4 ESTRUCTURA DE GLIOTOXINA	13
FIGURA 5 INACTIVACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA GLIOTOXINA CON ALÚMINA NEUTRA	13
FIGURA 6A PRODUCCIÓN DE GLIOTOXINA EN MEDIO ARROZ	29
FIGURA 6B PRODUCCIÓN DE GLIOTOXINA EN MEDIO MAÍZ	30
FIGURA 6C PRODUCCIÓN DE GLIOTOXINA EN MEDIO MALTA	31
FIGURA 6D PRODUCCIÓN DE GLIOTOXINA EN TRES MEDIOS DIFERENTES (ARROZ, MAÍZ Y MALTA)	32
FIGURA 7 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA PRODUCCIÓN DE GLIOTOXINA EN LAS DIFERENTES CEPAS	33
FIGURA 8 CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR DE GLIOTOXINA	34
FIGURA 9 ESPECTRO DE MASAS DE GLIOTOXINA AISLADA DE LA CEPA C-3	36
FIGURA 10 REPRESENTACIÓN DE LA PÉRDIDA DE UN PUENTE DISULFURO EN GLIOTOXINA	36
FIGURA 11 ESPECTRO DE INFRAROJO DE GLIOTOXINA	37
FIGURA 12 REPRESENTACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE GLIOTOXINA DE LA CEPA C-3	38
FIGURA 13 HOMO DE GLIOTOXINA	38
FIGURA 14 LUMO DE GLIOTOXINA	38
FIGURA 15 HOMO DE GLIOTOXINA SIN PUENTE DISULFURO	39
FIGURA 16 LUMO DE GLIOTOXINA SIN PUENTE DISULFURO	39

INDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i>	26
GRÁFICA 2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO	27
GRÁFICA 3 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO	28

INDICE DE TABLAS Y CUADROS

CUADRO 1 RESULTADOS DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO	32
CUADRO 2 REGISTRO DE LOS PICOS OBTENIDOS EN HPLC DE LAS DIFERENTES CEPAS	35
TABLA 1 RESULTADO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PESO SECO ANOVA	47
TABLA 2 RESULTADO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE PROTEÍNAS ANOVA	47
TABLA 3 RESULTADO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CARBOHIDRATOS ANOVA	47

INDICE DE DIAGRAMAS

DIAGRAMA 1 ESTABLECIMIENTO Y CONDICIONES DEL MEDIO DE CULTIVO PARA CRECIMIENTO DE <i>A. FUMIGATUS</i>	19
DIAGRAMA 2 ESTUDIO DE 10 CEPAS DE <i>A. FUMIGATUS</i>	20

RESUMEN

El presente estudio se dividió en dos etapas, la primera etapa se abocó al establecimiento del medio y las condiciones de cultivo idóneas para el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y de la producción de gliotoxina. Para ello se probaron tres diferentes medios de cultivo líquidos, utilizando una técnica modificada a partir de la de Jones and Hancock (1988). Los medios tuvieron en común una base de minerales y teniendo como diferencia extracto de harina de maíz, extracto de harina de arroz, extracto malta. Se obtuvo una mayor producción de biomasa con medio extracto malta. Se recurrió al método de cromatografía en capa fina, para determinar la presencia de gliotoxina en los diferentes medios de cultivo, empleando un estándar de referencia para su posterior comparación, teniendo como resultado una marcada presencia de gliotoxina en medio de cultivo con extracto malta. Por lo que se decidió que este medio fuera el medio adecuado para el crecimiento de *Aspergillus fumigatus*.

La segunda etapa del trabajo se dirigió al estudio de 10 cepas obtenidas de aislamiento clínico de aspergilosis aviar, encontrando que las cepas 2,3,4,5,7,8, 9 y 10 presentaron un compuesto que se comportó similar al estándar de gliotoxina. Se llevó a cabo el uso de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) para determinar la cantidad de gliotoxina en las cepas a estudiar, obteniendo que las cepas 3 y 8 tuvieron un tiempo de retención similar al estándar. Posteriormente se eligió a la cepa 3 para realizar la caracterización de la molécula por medio de espectrometría de masas y espectrometría de infrarrojo, en el espectro de masas se obtuvo un pico de 326 m/z que corresponde al peso molecular reportado para gliotoxina, en el espectro infrarrojo se obtuvieron algunos grupos funcionales de la molécula de gliotoxina. Con esto se confirma que el método desarrollado para el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y producción de gliotoxina fue el adecuado, puesto que se llegó a la confirmación de la presencia de la molécula de gliotoxina, mediante espectroscopias de infrarrojo y de masas.

GENERALIDADES

GÉNERO ASPERGILLUS

Los miembros del género *Aspergillus* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, son frecuentemente reportados en infecciones fúngicas oportunistas pueden causar diferentes tipos de enfermedades dependiendo del estado fisiológico general o local del huésped y del agente causal que puede ser alérgico, toxigénico o patógeno (Dexter, 1985). Estos hongos, al ser consumidos mediante algunos granos, como el maíz, trigo, frijol, sorgo entre otros, y contener altas concentraciones de *Aspergillus* pueden causar en el ganado ovino y bovino, patologías como abortos micóticos, infecciones pulmonares en aves así como también toxicosis, incluso en cerdos (Rippon, 1988).

Se han reportado 132 especies y 18 variedades, sin embargo este número se ha incrementado en 35 nuevas especies al género (Alexopoulos 1985). Únicamente 16 especies y una variedad han sido registradas como agentes etiológicos de enfermedades en humanos, *Aspergillus niger* es la tercera especie más común que puede causar enfermedades, esta especie y *Aspergillus fumigatus* son las dos especies conocidas que producen aspergilomas *bolas de hongos* en tejido pulmonar.

De las especies de *Aspergillus* las más frecuentemente implicadas en enfermedades en humanos es *Aspergillus fumigatus* —entre 50-70%— *Aspergillus flavus* que es la segunda especie más común que causa propagación de enfermedades, se ha aislado de lesiones de sinusoides nasales. *Aspergillus* se encuentra disperso en el medio ambiente, como por ejemplo en el agua potable, suelo, vegetales en descomposición, pintura húmeda, alimentos, polvo y agentes sanitizantes empleados en hospitales. Otras especies de *Aspergillus* son.

<i>A. amstelodami</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. versicolor</i>
<i>A. candidus</i>	<i>A. restrictus</i>	<i>A. caesiellus</i>
<i>A. carneus</i>	<i>A. sydowi</i>	<i>A. clavatus</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. avenaceus</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>A. ustus</i>	<i>A. deflectus</i>
<i>var. echinulatus</i>		(solo reportado en perros)

IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO

El género *Aspergillus* se caracteriza por la producción de conidióforos erguidos con vesícula apical que soporta el esterigma en la cual se producen las cadenas largas de conidios. El conidióforo frecuentemente se origina de una célula pie, este puede ser hialino, amarillo verde o café terminando en una vesícula fértil, pasando de una forma esférica a ovoide y produce de una a dos series de esterigma en la vesícula formando la cabeza conidial. La mayoría de la información taxonómica acerca de *Aspergillus* es obtenida en base al crecimiento en Agar Czapek Dox y en Agar Extracto Malta y a la morfología del conidioforó (véase figura 1), (Evans y Richardson, 1991).

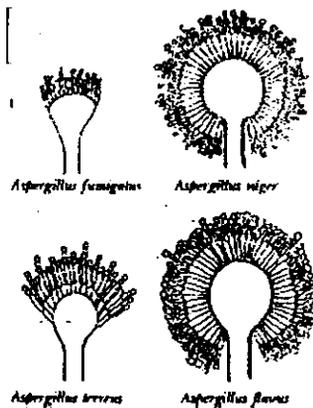


Figura 1. Diferentes estructuras micóticas

Las diferentes especies del genero *Aspergillus* pueden producir diversas enfermedades principalmente en aves y humanos, provocando una serie de procesos patológicos que incluyen los siguientes:

- Intoxicaciones producidas por la ingestión de alimento contaminado.
- Alergias y secuelas a causa de la existencia de conidias ó debido al desarrollo transitorio del hongo en orificios corporales.
- Colonización de órganos por el hongo sin que exista diseminación en las cavidades perforadas y en los tejidos debilitados.

- Enfermedad penetrante, inflamatoria, granulomatosa, necrosante de los pulmones ó de otro órgano.
- Enfermedad generalizada y diseminada mortal.

Dentro de estas enfermedades el término aspergilosis es usado para identificar un síndrome clínico que resulta de la infección por colonización ó reacción alérgica debido a la presencia de hongos del genero *Aspergillus*.

La aspergilosis fue una de las primeras enfermedades fúngicas reconocidas en el hombre y en los animales. Según Rippon (1988) menciona que en 1815 Mayer y Emmert, describieron la primera infección pulmonar, en 1842 Rayer y Montagne identificaron *Aspergillus candidus* en saco aéreo de un pinzón real .Fresenius en 1850 empleó por primera vez el término aspergilosis en su trabajo realizado sobre la infección fúngica del saco aéreo de un pájaro, al microorganismo aislado le asigno el nombre de *Aspergillus fumigatus*. Con base en estudios reportados por Bennett en 1844 y en 1847 Sluyder acerca de la presencia de *Aspergillus* y la estrecha relación con la enfermedad en humanos, Virchow en 1856 efectuó un trabajo acerca de la enfermedad bronquial y pulmonar en humanos por lo que realizó una descripción exacta del agente etiológico que lo identifica como *Aspergillus fumigatus*. En 1910 ya se habían descrito casi todas las formas de Aspergilosis en animales (Kwon-Chung and Bennett, 1992;).

Aspergiloma *bolas fungales* fue definido según Eichner (1989) que Debe en 1938, y en 1952 Hinson et. al. definieron aspergilosis alérgica broncopulmonar. Sin embargo la importancia de aspergilosis invasiva como infección secundaria fue reconocida mucho después que la forma colonizada ó alérgica de la enfermedad.

Desde el punto de vista patógeno, los hongos pueden producir enfermedades en los animales y en los humanos por dos mecanismos; invasión del órgano vivo o producción de sustancias llamadas toxinas (micotoxinas) que posteriormente al ser ingeridas por medio de alimento contaminado, provocan alteraciones en el huésped dando origen a una micotoxicosis. Las toxinas pueden estar contenidas en las esporas y en sus micelios ó bien ser excretadas como exotoxinas en el sustrato de crecimiento. Si la toxina entra por vía digestiva, la adsorción causa generalmente una reacción en el tubo digestivo como hemorragia ó necrosis. Muchas de las toxinas poseen especificidad

por un órgano ó tejido, los más frecuentemente atacados son: hígado, riñón y sistema nervioso.

El problema de micotoxinas alcanza proporciones inimaginables en lo que respecta al número de especies de hongos toxigénicos que contaminan los alimentos y producen una variedad de metabolitos tóxicos responsables de graves lesiones en animales y el hombre.

La importancia sanitaria de las micotoxinas nos puede dar idea de los trastornos que pueden producir como son:

- Aflatoxicosis (Aspergillus y Penicillium)
- Leucoencefalomalacia (Fumonisina)
- Fotosensibilidad (Sporidesmina)
- Estrogenismo (Zearalenona)
- Nefrotoxicosis (Ocratoxina y Citrinina)

La contaminación de los alimentos para el hombre y los animales por hongos productores de toxinas lo pueden hacer por dos formas: habitando como parásito en las plantas ó contaminado dicho alimento cosechado, almacenado o procesado debido a la humedad, temperatura, luminosidad escasa, aireación defectuosa y otras condiciones para su crecimiento, esto da motivo ha establecer una división de estos hongos toxigénicos:

- Los que se desarrollan y producen toxinas en todas las circunstancias ambientales, por ejemplo *A. flavus* que produce aflatoxinas.
- Los que necesitan un sustrato específico de la planta causando un desequilibrio metabólico y provocando que se produzcan sustancias nocivas, por ejemplo, solanina en las papas (Jurado, 1989).

Sin embargo existen también hongos que tienen propiedades biológicas que constituyen la base de una gran cantidad de procesos industriales, estos tienen una gran importancia en la producción comercial de preparaciones vitamínicas, enzimas y sustancias antimicrobianas. Por ejemplo se ha obtenido la enzima glucosa oxidasa la cual es de gran importancia ya que tiene varias aplicaciones principalmente en el área alimentaria como antioxidante para prevenir cambios en el color, aroma y sabor de los alimentos durante su procesamiento., también se emplea para eliminar la glucosa residual de los huevos previniendo así las reacciones de oscurecimiento de Maillard.

Esta enzima se ha obtenido principalmente de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* tales como: *P. chrysogenum*, *P. peleteu*, *P. purpurogenum*, *P. parpegenum*, *P. glaucum*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. glaucus* (Bahena, 1993).

ASPERGILOSIS EN AVES

La aspergilosis se define como cualquier padecimiento de un miembro del género de hongos *Aspergillus*, sin embargo, cuando se menciona aspergilosis aviar generalmente se refiere a aspergilosis pulmonar que es principalmente causada por *Aspergillus fumigatus* en el momento en que se exponen animales susceptibles a altas concentraciones de conidias aéreas (Petra, M.L., 1982).

La aspergilosis aviar es más comúnmente considerada como una infección respiratoria, pero otras manifestaciones de la enfermedad ocurren en aves de corral. Algunos de los nombres que recibe este tipo de enfermedad son neumonía micótica y neumonía de las nacedoras. La aspergilosis aviar se produce principalmente de dos formas en las aves domésticas: la primera es la aspergilosis aguda que se caracteriza por brotes intensos en aves jóvenes con alta morbilidad y mortalidad, la segunda es aspergilosis crónica que se presenta en aves reproductoras y en ocasiones en parvadas adultas o aviarios. (Smith, 1989, Peden, 1992, Richard et. al., 1994)

La colonización fungal se presenta comúnmente en el alimento y en la cama de las aves, estos materiales son inevitables fuentes de contaminación sobretodo cuando llegan a humedecerse con precipitación natural, materia fecal u orina, ofreciendo condiciones idóneas para el crecimiento del hongo y por ende provocando una contaminación fungal con esporulación en gran magnitud. Los niveles de esporulación en hierba seca es aparentemente determinada por los días de lluvia en verano (Smith, 1989).

Cuando *Aspergillus* libera sus conidias estas caen en la cama de paja volviéndose fuente potencial de contaminación, el movimiento de heno o paja de las camas crea una aerolización que provoca que las aves se expongan a respirar las conidias de *Aspergillus fumigatus*, éstas miden 5µm. de diámetro e ingresan al organismo mediante la aspiración profunda de las aves depositándose en los sacos aéreos. (Bennett, 1992, Smith, 1989).

La infección en huevos para incubación no es muy frecuente, sin embargo una vez que penetra el hongo el cascarón y la membrana empieza la germinación de conidias; las condiciones propias para que se desarrolle la germinación parece ser el microambiente del poro del cascarón principalmente cuando queda cubierto con heces o con residuos de huevo quebrado, también se ha visto que contribuye el alto contenido de humedad en las incubadoras. El crecimiento fungal ocurre concéntricamente en el punto de entrada; los conidióforos son formados en la parte interior del saco aéreo y posteriormente se produce el crecimiento típico. El embrión muere después del sexto día de crecimiento del hongo, el huevo afectado se rompe liberando una nube de conidias la cual puede provocar nuevas infecciones. (Bennett, 1992, Smith, 1989).

Aspergillus fumigatus usualmente coloniza la superficie mucosal del tracto respiratorio y la superficie serosal del saco aéreo, provocando una aereosaculitis micótica, también puede ocurrir una infección primaria en los ojos y la mucosa del intestino así como infección es metastásicas a vísceras abdominales.

La sintomatología de aspergilosis aviar puede ser variada e indistinta, entre los signos que se pueden presentar están anorexia, disnea, actitud depresiva, diarrea e incluso la muerte, en un caso crónico las alas se doblan y hay signos de angustia respiratoria, pérdida de reflejo derecho o torticolis.

Entre las lesiones importantes que se presentan por la infección observadas en necropsia incluyen placas caseosas en saco aéreo y bronquiolos y áreas de necrosis caseosa en pulmón y órgano parenquimatoso del abdomen. Si el foco de infección es expuesto al aire se presenta esporulación en el órgano por lo tanto la lesión es cubierta con un polvo azul gris que son formaciones de conidias, en este caso se puede observar la cabeza conidial entera en preparaciones microscópicas.

El rasgo patológico de aspergilosis incluye supuración y necrosis caseosa en el tejido afectado y la presencia de septos e hifas con sitios paralelos, también se ha detectado que existen elementos miceliales y satelitismo alrededor de estructura vascular. (Bennett, 1992, Petrak, 1989).

PREVENCIÓN Y CONTROL

La infección por *Aspergillus fumigatus* en pollos y pavos tiene que ser controlada por medidas sanitarias en la incubadora, se debe disponer de equipo de muestreo y medios para monitorear el aire en las incubadoras, debe evitarse la cama de paja y alimentos mohosos, el examen de las instalaciones o materiales empleados para la cama o equipo comúnmente muestran el origen de la infección, la limpieza y desinfección diaria de comederos y bebederos ayudan a eliminar la infección al igual que la aspersión de la tierra alrededor de comederos y bebederos, con fungicidas.

En los brotes de *Aspergillus fumigatus* se recomienda una solución acuosa de sulfato de cobre 1:2000 para toda el agua de beber para ayudar a prevenir la propagación aunque no se recomienda este método para uso continuo. Se debe de implantar la ventilación dentro de las casetas para reducir la microflora del aire, lo cual se puede usar como medida preventiva para controlar la aspergilosis, por lo general no se dispone de medios eficaces de terapia para la aspergilosis aviar aunque ciertos medicamentos se han empleado para su tratamiento pero resultan ser demasiado caros en su aplicación, por lo que la terapia se emplea raramente y ésta es aplicada únicamente en ciertas especies de aves exóticas, administrando anfotericina B, 5-Fluorocitosina, sin embargo y a pesar del manejo de medidas preventivas contra la aspergilosis, ésta puede presentarse en algunas temporadas del año, principalmente en invierno, en casetas cerradas.

ASPERGILLUS FUMIGATUS.

Aspergillus es posiblemente el grupo más común de los hongos en el medio ambiente del hombre. Se ha observado que *Aspergillus fumigatus* se encuentra presente en material orgánico en descomposición, se observó reportado que al preparar abono con base en pedazos de hojas y ramas, se produjo un masivo crecimiento de *Aspergillus fumigatus*, por lo que las personas más expuestas a contaminación en este caso son los jardineros y agricultores que son los encargados de distribuir el abono, si estas personas son hipersensibles, pueden sufrir una respuesta alérgica severa, debido a que *Aspergillus fumigatus* se puede encontrar comúnmente en el suelo y en el aire ya

que las esporas son transportadas principalmente a través del aire, de esta las infecciones son adquiridas por inhalación en la mayoría de los casos provocando una aspergilosis. Este hongo es causal de diferentes enfermedades en pulmón en el hombre, se ha observado que se puede presentar en 3 diferentes formas que son las siguientes:

- *Aspergilosis alérgica.* En los individuos atópicos que son expuestos a *Aspergillus fumigatus* se produce Aspergilosis pulmonar alérgica o asma, esta enfermedad puede provocar una obstrucción en vías aéreas; en individuos no atópicos se produce tanto una alveolitis alérgica causada por inhalación de conidias, como un Aspergiloma o bola fúngica . (Eichner., 1984; Amitani. et. al., 1995). El Aspergiloma se puede localizar como una masa micelial densa que puede ser de varios centímetros de diámetro, esta masa se puede encontrar lineal en el epitelio o puede estar en una vía o en un bronquio, si se reconoce su existencia en un chequeo de rutina de rayos-X o en una cirugía el caso puede ser benigno, sin embargo, se hace peligroso cuando aumenta de tamaño el aspergiloma provocando rompimiento de vaso sanguíneo causando eliminación de sangre en el esputo, en algunos casos el hongo se expande radialmente y puede diseminarse a riñón y otros órganos (Dexter, 1985).
- *Aspergilosis pulmonar invasiva.* Se presenta en pacientes inmunocomprometidos se puede desarrollar de tal manera que pone en riesgo la vida del individuo, presenta una gran variedad de manifestaciones principalmente en pulmón (neumonía necrosante), riñón, hígado, sistema nervioso central, sistema cardiovascular y en algunos casos se puede extender a cualquier órgano por vía hematógena (Evans and Richardson 1991).
- *Aspergilosis localizada.* Principalmente se implanta o se deposita, y se presenta como una infección, en el ojo y en el oído (Dexter, 1985). La endocarditis aspergilosa se presenta después de una cirugía del corazón o por la administración de una droga por vía intravenosa, se caracteriza por un gran crecimiento que puede provocar una embolia en arterias (Evans. And Richardson, 1991).

El mecanismo molecular por el cual el hongo establece la infección aún no ha sido elucidado, sin embargo, se ha estudiado la relación que las proteínas y las glicoproteínas puedan tener en el proceso actuando como ligandos de esporas de *Aspergillus fumigatus* en la superficie celular del hospedero, por ejemplo, se ha observado que el fibrinogeno juega un papel importante en la reacción de inflamación y que la laminina, que es la mayor proteína de origen diferente al colágeno en la membrana basal, es un promotor de adherencia de *Aspergillus fumigatus in vitro* (Tronchin, et. al, 1995, Coulot et al., 1994), diversos investigadores han encontrado que las interacciones hidrófobas también se consideran importantes en la adherencia de microorganismos patógenos sobre la superficie de la célula del hospedero, los filamentos miceliales de *Aspergillus fumigatus* exhiben proteínas y glicoproteínas de superficie con propiedades hidrófobas, estas interacciones hidrófobas pueden ser importantes en la promoción de invasión de tejido por formas filamentosas del hongo, después de haber iniciado la colonización por conidias en células del hospedero ó superficie mucosal al ocurrir la infección por propagación por el aire (Peñalver et. al. 1996).

Por otra parte se ha estudiado que en procesos de aglutinación se encuentran involucrados tanto los carbohidratos como las proteínas ya que este proceso se leimina cuando estos componentes se retiran de la pared celular suprimen la aglutinación de conidias (Tronchin, et. al., 1995).

En estudios realizados *in vitro* se ha mostrado que al emplear filtrados de cultivo de *Aspergillus fumigatus* el movimiento ciliar disminuye y se produce daño en el epitelio respiratorio humano, perturbando el sistema mucociliar que es la línea de defensa principal de la vía aérea contra patógenos inhalados. Se considera que el daño esta asociado a un compuesto de bajo peso molecular, el cual fue extraído y purificado por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (HPLC), seguido de una espectrometría de masas, presentando un espectro donde se detecto un ión molecular de 326 m/z que corresponde al peso molecular de gliotoxina, este compuesto fue corroborado por el patrón de fragmentación del espectro obtenido.

La identificación por esta técnica espectroscópica permitió concluir que la gliotoxina es la causante de la disminución del movimiento ciliar en asociación con daño epitelial a una concentración de 0.2 μ g / ml, (Amitani et.al., 1995).

Considerando lo anterior se han realizado diversas investigaciones acerca de las características de esta toxina, la cual es producida por diversos hongos principalmente, *Aspergillus fumigatus* y es considerada dentro del grupo de las micotoxinas que a través de los años han adquirido una gran importancia ya que son las causantes de graves enfermedades en el hombre y en diversos animales. Algunos metabolitos producidos por *Aspergillus fumigatus* que han sido aislados e identificados se muestran en la figura 2.

Sin embargo, los estudios efectuados con gliotoxina señalan que es el compuesto que puede tener una amplia relación en la patogenia de la Aspergilosis.

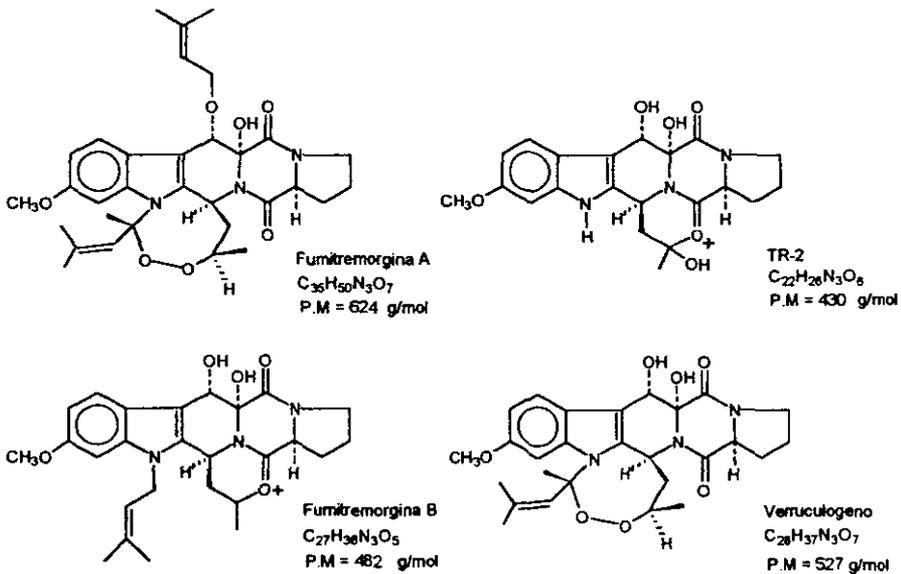


Figura 2. Otras micotoxinas producidas por *A. fumigatus*

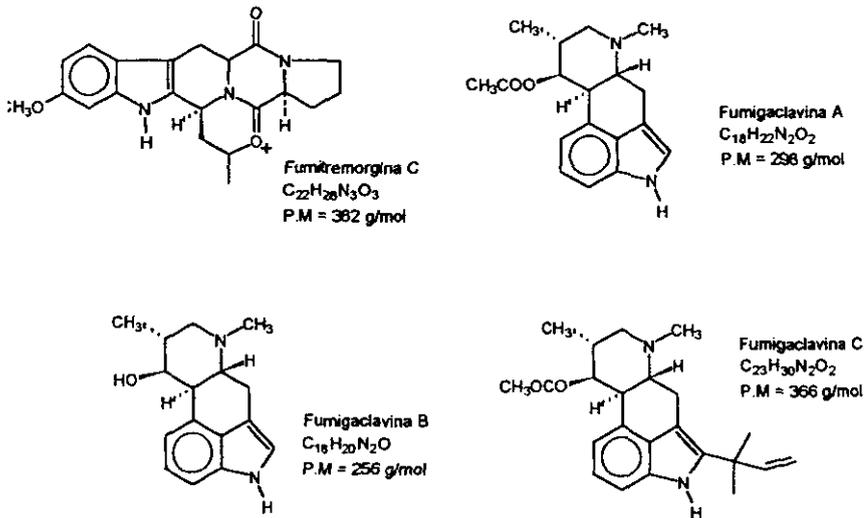


Figura 2. (Continuación).

CARACTERÍSTICAS DE LA COLONIA *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Las colonias de *Aspergillus fumigatus* crecidas en medio agar Czapek (cultivada a 25°C o 37°C) o en agar extracto de malta crecen rápidamente produciendo colonias planas de color blanco convirtiéndose en azul-verde y por último gris-verde al ocurrir la producción de conidios. La textura sobre la superficie puede ser desde aterciopelada a bastante afelpada, vellosa o algo plegada, y el reverso de la colonia es incoloro; sus colonias tienen un diámetro aproximado de 3 a 4 cm en 7 días, la característica distintiva de *Aspergillus fumigatus* es el desarrollo de masas columnares de cadenas de conidios que se originan en la vesícula (véase figura 3), estas cadenas conidiales pueden alcanzar una longitud de hasta 400 µm de crecimiento colonial.

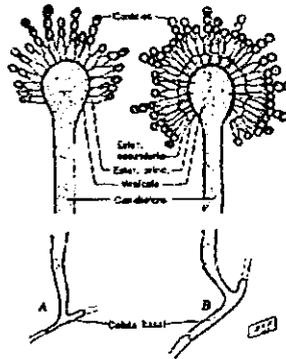


Figura 3. Estructura micótica de *Aspergillus fumigatus*

El conidioforo es corto, liso, tiene 300 μm de longitud y de 5 a 8 μm de diámetro. El conidioforo crece de manera gradual en dirección distal para formar una vesícula en forma de frasco, la vesícula tiene de 20 a 30 μm de diámetro y produce, solamente en la mitad superior, una serie sencilla de fialides (6 a 8 μm de largo) que se dirigen hacia arriba de manera paralela al eje del conidioforo. Los conidios son verdes, en masas equinuladas, globosas o subglobosas de 2 a 3 μm diámetro. (Evans et. al. 1991, Larone, 1987, Rippon.J.W., 1988).

GLIOTOXINA

La gliotoxina también ha sido identificada de aislados de *Trichoderma viridae*, *Penicillium obscuro* y *Gliocadium fimbriatum*. Su estructura química (figura 4) indica que es una, epidithiodioxopiperazina (ETP) que incluye 1,3-ciclohexadiona, un puente 1,1-disulfuro y 2,5-piperazinediona, su peso molecular es de 326.39 g/mol. Su fórmula molecular está definida como $\text{C}_{13} \text{H}_{14} \text{N}_2 \text{O}_4 \text{S}_2$.

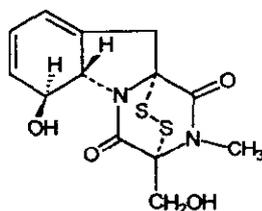


Figura 4. Estructura de gliotoxina.

La gliotoxina está relacionada con el grupo epipolitiopiperazina-3,6-dione, primeramente fue aislada por sus propiedades de antibiótico, posteriormente se encontró que causaba toxicidad aguda en animales vertebrados.

Es sensible a la oxidación y puede ser inactivada por calor a 100°C por 10 minutos. Es soluble en cloroformo, puede ser cristalizada por metanol o etanol, tiene un punto de fusión de 221°C. Es inestable a la luz, ácidos y bases fuertes (Betina, 1984, Johnson et. al., 1943), se puede extraer con disolventes orgánicos y emplear métodos de cromatografía en placa fina y de líquidos para ser identificada y cuantificada siendo este último método el más adecuado.

Al contacto con alúmina neutra a 20°C cambia su estructura, se destruye el puente disulfuro y por lo tanto pierde su actividad biológica. La modificación que se lleva a cabo se muestra en la figura 5 (Bell et al., 1958; Bose et. al., 1968).

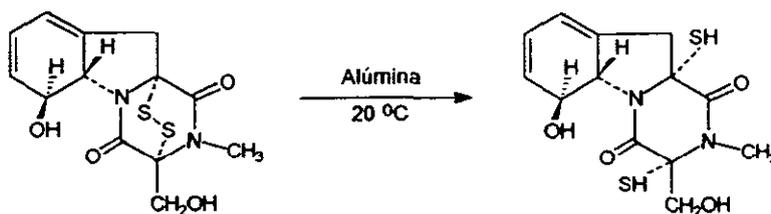


Figura 5. Inactivación de la actividad biológica de gliotoxina con alúmina neutra.

El puente disulfuro que tiene gliotoxina parece estar asociado a la actividad de la molécula ya que al ser eliminado de la estructura pierde la mayoría de sus propiedades biológicas (Trown and Bilello 1972).

En algunos trabajos se indica que al colocar gliotoxina con compuestos que contienen grupos tiol ésta se inactiva, pero se ha detectado que esta inactivación es reversible, ya que al agregar solución de yodo, se observa una regeneración completa, esto se comprobó a través de la prueba de actividad antibacteriana. También se mostró que la inactivación reversible de gliotoxina en presencia de tioles favorece la estructura dithio de gliotoxina más que la estructura thiosulfinato, la cual no es capaz de ser reversible reducción-oxidación (Cavallito et. al., 1946).

Por otro lado, las investigaciones realizadas indican que gliotoxina inhibe la hemólisis de eritrocitos de conejo lo que sugiere que puede ser un agente antiagregante, estabilizante de membrana, el puente de disulfuro en la molécula de gliotoxina puede ser el responsable de la actividad inhibitoria, ya que el desthiogilotoxina no tiene ningún efecto en la agregación de plaquetas.

Se ha descubierto también que gliotoxina inhibe la síntesis de RNA viral en el primer estado del ciclo de replicación viral. En virus tales como picornavirus, poliovirus, echovirus, virus influenza y parainfluenza, esta actividad inhibitoria se debe a la estructura en estado oxidado de la toxina, se ha observado que la forma reducida no tiene actividad inhibitoria de la síntesis de RNA viral, debido a que pierde su puente disulfuro. La forma reducida se puede mantener experimentalmente por la adición en exceso de ditioneitol ó glutatión. (Trown and Bilello 1972, Frame and Carton, 1988, Miller et. al., 1968).

Se conoce que gliotoxina tiene un amplio rango de actividad antibacteriana, esto se mostró comparando a esta toxina con antibióticos como: penicilina, gramicidina, actinomicina, estreptomina, los resultados mostraron que este compuesto tiene una alta actividad bacteriostática, y que el efecto es en microorganismos gram negativos (Johnson, 1943).

Se ha demostrado que la toxina tiene un efecto antifagocítico y otras propiedades tanto inmunomoduladoras que inducen supresión inmunológica y el posible papel como droga de protección en trasplante de órganos (McMinn et. al., 1990).

La actividad inmunosupresora de este compuesto se descubrió cuando se trabajaba gliotoxina secretada por *Aspergillus fumigatus* manifestando el fenómeno de inhibición de fagocitosis y de adherencia de macrófagos a plástico.

Existe evidencia de que también este involucrada en la patogenia de la aspergilosis la cual puede ser producida en tejido infectado. Eichner y col., en 1986, determinaron que gliotoxina y los derivados de ésta fueron encontrados en lavados peritoneales de ratones inoculados con *Aspergillus fumigatus*.

Gliotoxina también fue aislada e identificada en una infección natural en tejido de ubre de bovino mientras otras toxinas conocidas de este agente estuvieron ausentes Fumitremorgins BC, Verruculogen, y toxina TR-2. (Baver et al., 1989).

Se determinó que a dosis orales de 7.5mg de gliotoxina por kg de peso en pavos de corral de un día de nacidos producían el 100% de mortalidad en 24 hrs.

Aunque no existan muchos estudios acerca de su toxicidad parece ser que los pavos son más sensibles que animales de otras especies por ejemplo ratas, ratones, hamsters y conejos en donde la dosis letal es de 45 a 65 mg por kg de peso cuando son inoculados intravenosa o intraperitonealmente (Richard et al., 1994, Betina, 1984).

ANÁLISIS DE GLIOTOXINA

Las investigaciones sobre la presencia de gliotoxina han estimulado el desarrollo de procedimientos para la identificación y cuantificación de la misma, y así poder contar con material disponible para investigaciones posteriores.

Para llevar a cabo el estudio de la presencia y cantidad de gliotoxina se han tenido que emplear técnicas como : cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) y espectrometría de masas para asegurarse de su presencia en diferentes medios de cultivo.

Bose et. al. 1968, realizaron las primeras investigaciones sobre gliotoxina empleando técnica de espectrometría de masas.

Mülballer et. al. (1985), Baver et. al.(1989), Richard et. al.(1989) lograron la identificación, purificación y confirmación de la presencia de gliotoxina empleando técnicas como CCF, HPLC y espectrometría de masas.

Richard et.al., en 1994 reportaron que no se tenía todavía una técnica de CCF y HPLC para la determinación de gliotoxina en tejido.

Con base en este seguimiento de procedimientos para identificar a gliotoxina se ha observado que la técnica de CCF es el método de elección para identificación de gliotoxina, pero no así para la cuantificación.

La importancia del uso de la cromatografía en capa fina, es la de servir como guía para el desarrollo de las condiciones óptimas para realizar separaciones por cromatografía de líquidos en columna. Las ventajas de seguir este procedimiento son la rapidez y el bajo costo de los ensayos experimentales. La cromatografía en capa fina se ha convertido en la herramienta de batalla de la industria para los controles de la pureza del producto, también se ha encontrado un amplio uso en los laboratorios clínicos y es la piedra angular de muchos estudios bioquímicos y biológicos.

La técnica de HPLC se ha estado empleando desde los inicios de los noventa para la cuantificación de gliotoxina, es la técnica de separación más ampliamente utilizada, debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su capacidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia.

La técnica de HPLC se puede decir que es nueva en el campo de la cromatografía de líquidos, la llave para el uso de presiones altas fue el desarrollo de material de soporte capaz de resistir presiones altas y de esta manera poder disminuir la distancia que la partícula de soluto tiene que viajar a lo largo de la columna. Se incrementa la eficiencia y resolución empleando pequeñas partículas (5 μm de diámetro) y otras fases de unión química en la superficie de la partícula. Esta técnica ofrece una separación en un tiempo muy corto de 5 a 30 min, y es adecuada para compuestos térmicamente lábiles, y compuestos fuertemente polares y biopolímeros.

Debido al empleo de presiones altas en HPLC, el tipo de soporte de la fase estacionaria es limitada, por lo que la separación se realiza con base a la variación en la composición de la fase móvil. El flujo constante de la fase móvil es esencial para efectuar una buena separación, reproducción de tiempos de retención y obtención del área del pico especialmente si se usa para un análisis cuantitativo.

La técnica de HPLC a llegado a ser importante porque con ella se puede separar una amplia variedad de mezclas de compuestos en un tiempo muy corto. (Skoog and Leary, 1994).

Los espectros de masas se obtienen por conversión de los componentes de una muestra en iones gaseosos que se mueven rápidamente y se separan en función de su relación masa-carga. Un espectro de masas de un compuesto puro proporciona diversos tipos de datos que son útiles para su identificación. El primero es el peso molecular del compuesto y el segundo su fórmula. Además, el estudio de fragmentación que se pone de manifiesto en el espectro de masas a menudo proporciona información sobre la presencia de varios grupos funcionales. Una fragmentación de las moléculas orgánicas y un registro de las masas de los fragmentos producidos, son característicos y dan información muy valiosa sobre la estructura molecular.

La muestra se introduce en una cámara con alto vacío y se somete al bombardeo con un chorro de electrones de alta energía, los cuales arrancan electrones a las moléculas orgánicas quedando con una carga positiva y un electrón desapareado por lo que se forma un catión radical conocido con el nombre de ión molecular y su masa representa el peso molecular del producto.

El pico más alto obtenido se le llama pico base, las intensidades de los demás picos, incluyendo el pico molecular se dan como por ciento, así cada pico queda definido por su masa m/e y por su intensidad. Finalmente la identidad real de un compuesto se puede establecer por comparación de su espectro de masas con los de compuestos conocidos hasta llegar a una total coincidencia (Primo, 1994)

JUSTIFICACIÓN

Aspergillus fumigatus es un importante patógeno respiratorio que afecta principalmente a especies avícolas y cuyo contacto esta latente aunque se tomen medidas de control. Se sabe que gliotoxina esta aparentemente involucrada en la patogénia de Aspergilosis y tomando en cuenta que existe poca información al respecto, en este trabajo se consideró importante llevar a cabo una investigación que proporcione información más amplia acerca de las características de esta toxina, su producción *in vitro* y su importancia dentro de la patogénia causada por *Aspergillus fumigatus*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterización química parcial de gliotoxina producida por cepas de campo de *Aspergillus fumigatus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Implementar un método *in vitro* para el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y producción de gliotoxina.

Evaluar un método de extracción para gliotoxina del medio de cultivo.

Evaluar la cinética de producción de gliotoxina

Caracterizar a la gliotoxina por el método de espectrometría de masas.

MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se dividió en dos etapas, la primera etapa consiste en el establecimiento del medio y las condiciones de cultivo idóneas para el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y la producción de gliotoxina. La segunda etapa se orientó al estudio de 10 cepas, obtenidas de aislamientos clínicos de Aspergilosis aviar, del cepario del Departamento de aves (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11) y una cepa de laboratorio A-20 que fue donada por el laboratorio Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, para detectar la que tenga una mayor producción de gliotoxina.

A continuación se describen las dos etapas y se muestran esquemáticamente en los diagramas 1 y 2.

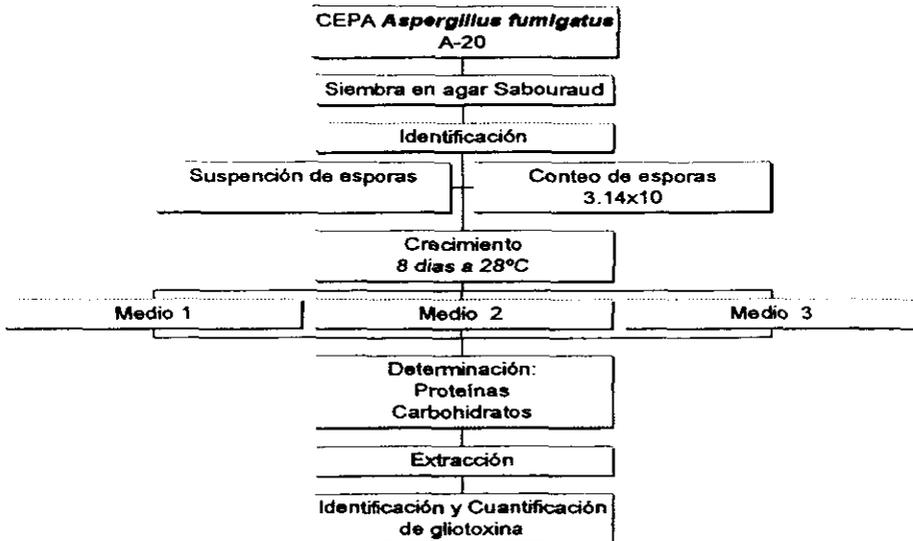


Diagrama 1. Establecimiento de las condiciones del medio de cultivo para el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y producción de gliotoxina

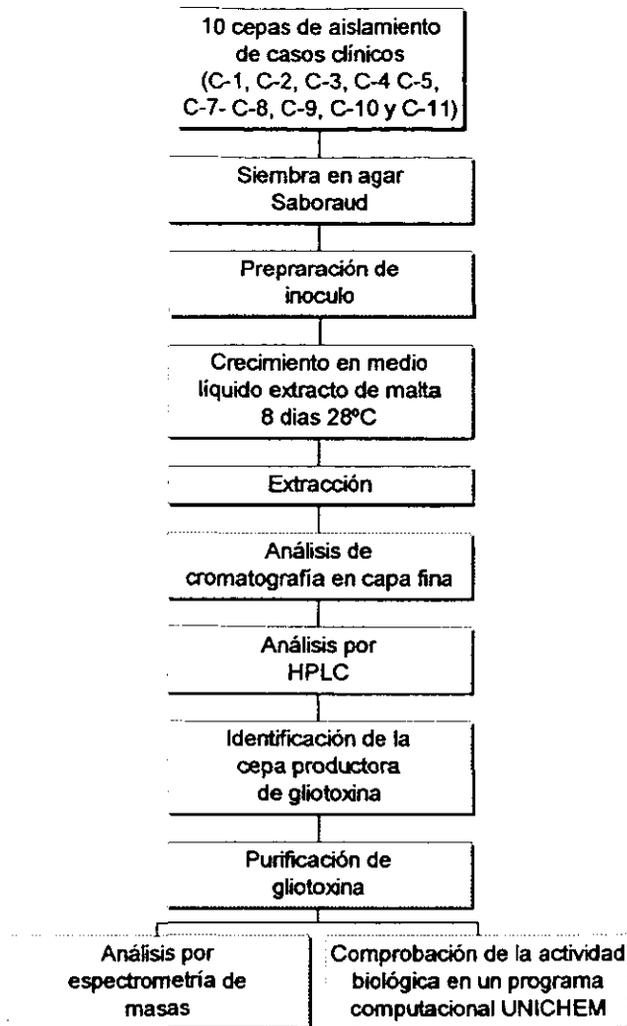


Diagrama de flujo 2. Estudio de 10 cepas de *Aspergillus fumigatus*

PREPARACIÓN DEL INOCULO

Para implementar el método de crecimiento y producción de la gliotoxina, se utilizó una cepa de *Aspergillus fumigatus* A-20. Se sembró en tubos inclinados con 10 ml de agar Sabouraud por el método de picadura, los tubos se incubaron a 28°C por 8 días en una estufa bacteriológica. La identificación de la cepa se realizó por la técnica de azul de algodón lactofenol para visualizar la estructura micótica del hongo.

Para la preparación del inóculo la cepa se sembró por el método convencional de estría en tubos inclinados con 10 ml de agar dextrosa Sabouraud, se incubaron a 28°C de 6-8 días. Posteriormente se realizó una suspensión de esporas en una solución salina fisiológica 0.9% y tween 80 al 1% estéril. El conteo de esporas se llevó a cabo en una cámara de Neubauer, empleando una pipeta para glóbulos blancos, ajustando la suspensión de esporas a una concentración de 3.14×10^6 esporas por ml.

CRECIMIENTO EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

Se emplearon tres diferentes medios de cultivo para el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y la producción de gliotoxina, utilizando la cepa A-20. El método empleado para el crecimiento es una adaptación al método descrito por Jones and Hancock, (1988). Se define como base común a la mezcla de compuestos que continuación aparece:

MEZCLA COMÚN	D-Glucosa	6 g ⁻¹ L
	DL-Asparagina	1.5g ⁻¹ L
	KH ₂ PO ₄	0.25g ⁻¹ L
	CaCl ₂ 0.5 mM	1 ml / L
	ZnCl ₂ 1 mM	1 ml / L
	MnCl ₂ . 4H ₂ O 1 mM	3 ml / L
	MgCl ₂ . 6H ₂ O 1 mM	2 ml / L
	Fe Na EDTA 1 mM	4 ml / L
	Na ₂ S ₂ O ₃ . 5 H ₂ O 0.1 mM	5 ml / L

MEDIO: 1

Base común con amortiguador	2,200 ml
Extracto de Harina de maíz	600 ml
Inoculo	150 ml

MEDIO: 2

Base común con amortiguador	2,200 ml
Extracto de Harina de arroz	600 ml
Inoculo	150 ml

MEDIO: 3

Base común con amortiguador	2,200 ml
Caldo extracto de Malta	600 ml
Inoculo	150 ml

El cultivo del hongo se realizó en matraz Erlenmeyer de 4000 ml, a cada uno se le agregó la base común y se llevó a un volumen de 2,200 ml con amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M con pH 5.8. Se les agregaron 600 ml del extracto respectivo, después

fueron esterilizados en autoclave a 121° C a 15 Lb por 15 minutos y finalmente enfriados a temperatura ambiente. Posteriormente se les agregaron 900ml de Asparagina resuspendida en amortiguador de fosfatos 0.1M a pH 5.8 esterilizada por filtro millipore (0.22 μ m) y el inoculo, 150 ml. Los matraces inoculados fueron incubados a 28°C por 8 días en una estufa bacteriológica, durante la incubación se les adaptó un sistema de suministro de aire al interior de los matraces, para ello se empleó una bomba (elite 802) utilizando filtros con membrana de millipore de 0.22 μ para favorecer el desarrollo fungal. Se obtuvieron alícuotas de 25 ml cada 24 hrs. durante los 8 días que se llevo a cabo la fermentación.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS

A las alícuotas recolectadas a las 24, 48, 96, 120, 192 hrs. de los diferentes medios se les realizaron análisis espectrofotométrico realizando un barrido de 250 a 700 (Beckman DU-64) para observar la longitud de onda a la que absorbe la gliotoxina y que es a 250 nm. A los extractos obtenidos se les determinó el contenido de proteínas por el método de Bradford (1976) y así mismo carbohidratos por el método de Dubois et. al., (1956).

SEPARACIÓN DE LA BIOMASA Y EXTRACCIÓN DE LA GLIOTOXINA

Después de mantener la fermentación durante 8 días, se separó la biomasa del medio líquido de cada uno de los matraces, primero por una filtración a través de un embudo de cristal con papel Whatman No.1, posteriormente una segunda filtración con succión. Los filtrados recolectados de cada uno de los matraces se colocaron en embudos de separación de 500 ml y se le realizaron extracciones secuenciales con 70 ml de cloroformo, tres veces, por cada 140 ml del filtrado respectivo. Se colectaron las fases clorofórmicas y se evaporaron a sequedad en un rotavapor (Büchi R-124). Los residuos se resuspendieron en éter de petróleo y se guardaron a 4°C por 24 hrs, pasado ese tiempo se evaporaron nuevamente y se resuspendieron en un volumen final de 10 ml de etanol, que finalmente se almacenaron a 4°C.

Identificación y Cuatificación de la Gliotoxina de los Medios De Cultivo.

Los extractos concentrados obtenidos de cada medio de cultivo, se sometieron a la *identificación de gliotoxina por cromatografía en capa fina*, utilizando cromatoplasas (Whatman 0.25mm grosor, silica gel fluorescencia UV₂₅₄).

Se aplicó un estándar de gliotoxina (Sigma G9893) como referencia junto a la muestra del extracto. Las placas fueron desarrolladas empleando acetato de etilo - Hexano (70:30) y reveladas bajo luz U.V. de onda corta y posteriormente con Iodo. La determinación de la presencia de gliotoxina en los medios de cultivo se hizo por comparación visual con el estándar.

ENSAYO BIOLÓGICO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE GLIOTOXINA

Para el ensayo biológico se utilizó la prueba de hemólisis (Tilden et al., 1961). Se emplearon eritrocitos de pollo conservados en solución de Alsever's. Los eritrocitos se lavaron con solución salina fisiológica 0.9% varias veces. Posteriormente se preparó una suspensión de eritrocitos al 2%. Se realizaron diferentes diluciones de gliotoxina (estándar) : 0.3 ug/ml , 0.5 ug/ml , 0.7 ug/ml , 0.9 ug/ml , 1 ug/ml , 10 ug/ml , 50 ug/ml , 60 ug/ml, 80 ug/ml en agua destilada.

En una microplaca de plástico, se colocaron en 9 pozos 100 ul de solución de eritrocitos al 5% y 100 ul de cada una de las diluciones. Por duplicado con sus respectivos controles positivos y negativo. La placa se selló con parafilm, se incubó a 37°C por una hora y media. Pasado ese tiempo se observó la dilución en donde se presentó hemólisis.

La determinación de hemólisis también se realizó por espectrofotometría (Masseyeff.,1993), para ello se preparó el reactivo de Drabkin : (cianuro de potasio, 50 mg., ferricianuro de potasio, 200 mg, bicarbonato de sodio, 1g; en un litro de agua destilada. Esta solución es estable por varios meses. Posteriormente se agregó 0.1 ml de solución de eritrocitos al 5% más 2 ml del reactivo de Drabkin, se agita vigorosamente para promover la reacción. Se lee a 540nm. Utilizando como blanco el reactivo de Drabkin, se leyó en los 3 primeros minutos después de la agitación. Los resultados deben transformarse de absorbancia a concentración de CMHb en g/100ml, empleando el factor de 36.8 mencionado por Masseyeff.,(1993).

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE GLIOTOXINA EN LAS DIFERENTES CEPAS.

Se emplearon las 10 cepas de aislamiento clínico de Aspergilosis aviar. Las cepas fueron sembradas por el método de estría en tubos inclinados con 10 ml de agar dextrosa Sabouraud, los tubos fueron incubados a 28°C por 8 días. Se preparó un inóculo de cada cepa como se describió anteriormente. Para el cultivo del hongo se empleó el medio seleccionado en este estudio. El medio de cultivo se preparó de acuerdo a lo descrito anteriormente. Los matraces inoculados fueron incubados a 28°C en una estufa bacteriológica con bombeo de aire estéril. La fermentación se llevó a cabo durante 8 días. Después de la fermentación por 8 días, se separó la biomasa del medio líquido de cada uno de los matraces y se llevó a cabo la extracción de la gliotoxina para su determinación por cromatografía en capa fina de acuerdo a la metodología ya mencionada.

Por el método de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) se realizó la cuantificación de gliotoxina en las diferentes muestras.

PURIFICACIÓN DE GLIOTOXINA

Una vez identificada y cuantificada la gliotoxina en las diferentes cepas de estudio, se procedió a purificar y caracterizar la gliotoxina, utilizando la cepa que fue mejor productora de gliotoxina.

Se prepararon 30 lts. de medio de cultivo. El crecimiento y la extracción del medio líquido se realizó como se describió previamente. A la biomasa obtenida se le realizó primeramente una extracción con cloroformo (1000 ml) a reflujo por 4 hrs., pasado ese tiempo se separó por decantación la biomasa del cloroformo, nuevamente se hizo otra extracción con metanol a reflujo por 4 hrs. Los dos extractos tanto clorofórmico como metanólico se evaporaron a presión reducida hasta un volumen de 25 ml.

Para comprobar la presencia de gliotoxina en estos extractos se llevó a cabo una cromatografía en capa fina realizándola en las condiciones descritas previamente.

A los dos extractos se les realizó por separado una cromatografía preparativa según el proveedor (Merck), con el fin de separar cada uno de los compuestos presentes en ambos extractos.

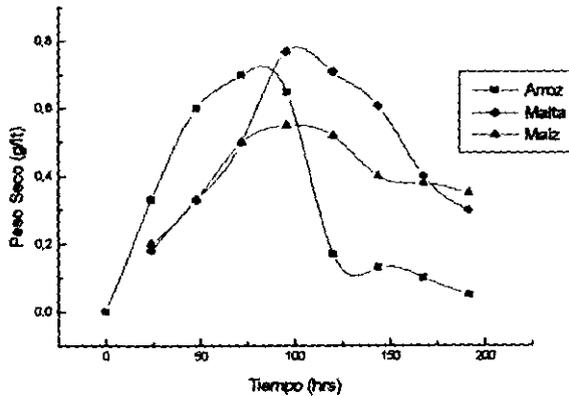
El sistema de elución empleado fue acetato de etilo-hexano (70:30). Posteriormente se observaron bajo luz U.V. de onda corta, se marcaron las diferentes zonas observadas para su posterior separación y purificación .

La caracterización del compuesto de interés se llevó acabo por espectrometría de masas en un espectrómetro de masas JEOL SX-100, la espectrometría de infrarrojo en un equipo Perkin Elmer 283 y Nicolet FT 55K.

RESULTADOS Y DISCUSION

CRECIMIENTO DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

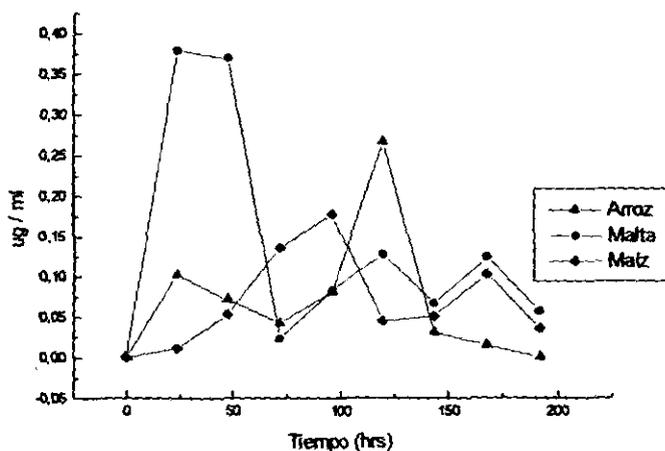
Después de obtener la muestra de 25 ml, el comportamiento de crecimiento de la cepa A-20 en los diferentes medios se muestra en la gráfica 1 en la cual el rendimiento de biomasa fue mayor en el medio de cultivo con extracto de malta. Se realizó un análisis estadístico a los resultados obtenidos en los diferentes medios de cultivo para determinar la diferencia significativa entre ellos. La Tabla 1 que se observa en el Anexo 1 nos muestra que entre los tres medios de cultivo no se presentaron diferencias significativas ($P>0.05$).



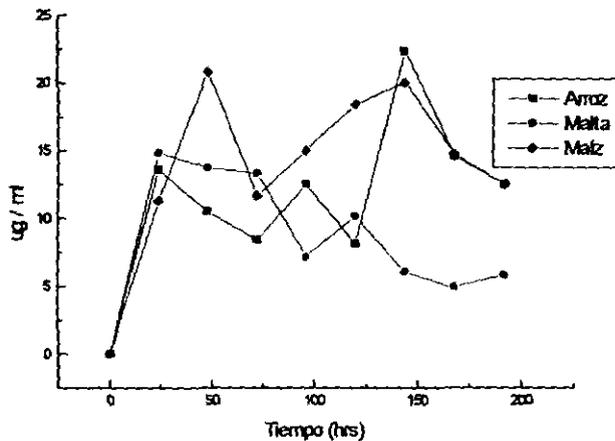
Gráfica 1. Cinética de crecimiento de *Aspergillus fumigatus*

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS

La concentración de proteínas (Bradford,1976) y carbohidratos (Dubois,1956) de las alicuotas de los sobrenadantes de los 3 medios de cultivo con la cepa A-20 a diferentes tiempos de la fermentación se presentan en las gráficas 2 y 3. Con respecto a las proteínas y carbohidratos podemos observar en la Tabla 2 que se encuentra en el Anexo 1 se puede observar que del análisis de varianza como prueba estadística mostrando que no existe diferencia significativa ($P>0.05$).



Gráfica 2. Concentración de proteínas en las alicuotas de los medios de cultivo durante todo el periodo de fermentación.



Gráfica 3. Concentración de carbohidratos en las alicuotas de los medios de cultivo durante todo el periodo de fermentación.

En las gráficas 2 y 3 se observa que la cantidad de proteínas y carbohidratos presentes en el medio de cultivo con extracto de malta es menor, debido a un mayor consumo por parte del microorganismo durante la fermentación. Sin embargo el estudio estadístico por medio del análisis de varianza muestra en la tabla 3 del Anexo que no existe diferencia significativa entre los tres medios de cultivo.

PRODUCCIÓN DE GLOTOXINA EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

La pureza de los productos se siguió por medio de cromatoplaques de sílica gel utilizando como eluyente en diferentes proporciones, al sistema *n*-hexano-acetato de etilo, como reveladores se empleó vapores de yodo. La figura 6a corresponde al extracto de arroz, se observó que en las primeras horas no hubo presencia de la posible gliotoxina, a las 120 hrs de la fermentación se manifiesta una marca muy tenue la cual se acentuó a las 192 hrs, lo cual es indicativo de la aparición de gliotoxina.

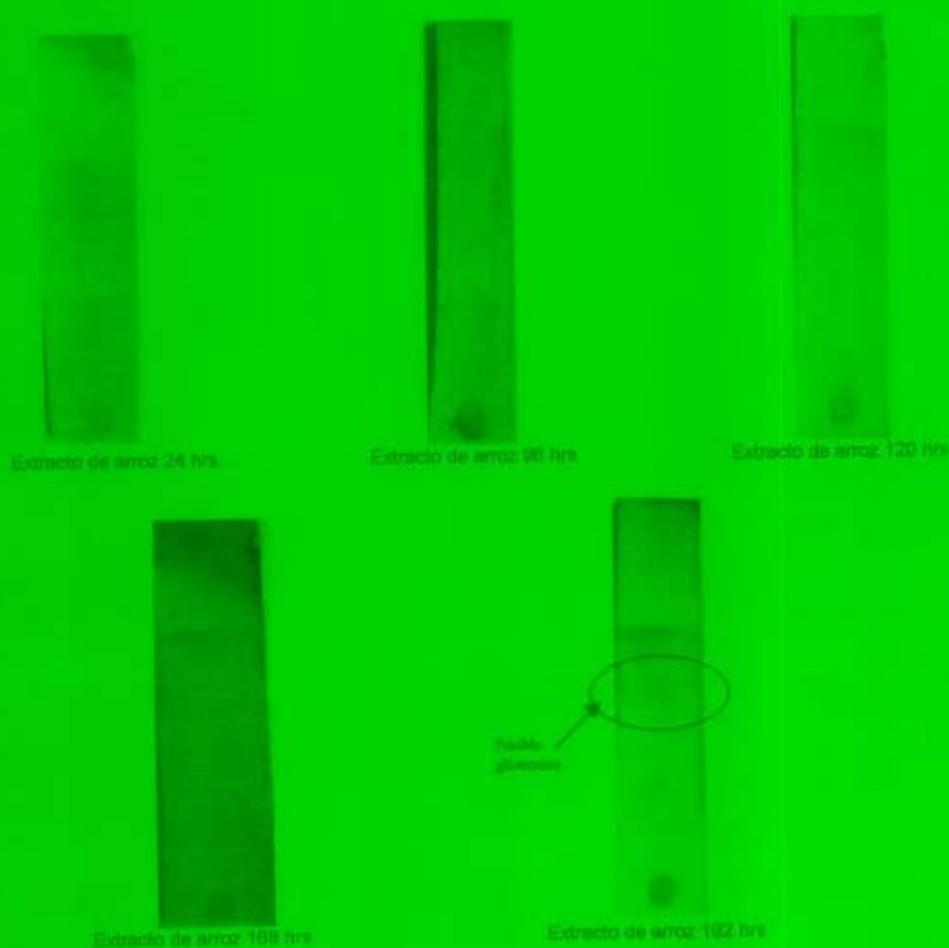


Figura 6a. Producción de gliotoxina en medio arroz.

En la figura 6b se empleó extracto maíz se observó la presencia de un compuesto con el mismo Rf de glicoxina comparado con un estándar a las 96 hrs de la fermentación, este mismo compuesto presenta una mayor concentración a las 168 y 192 hrs.

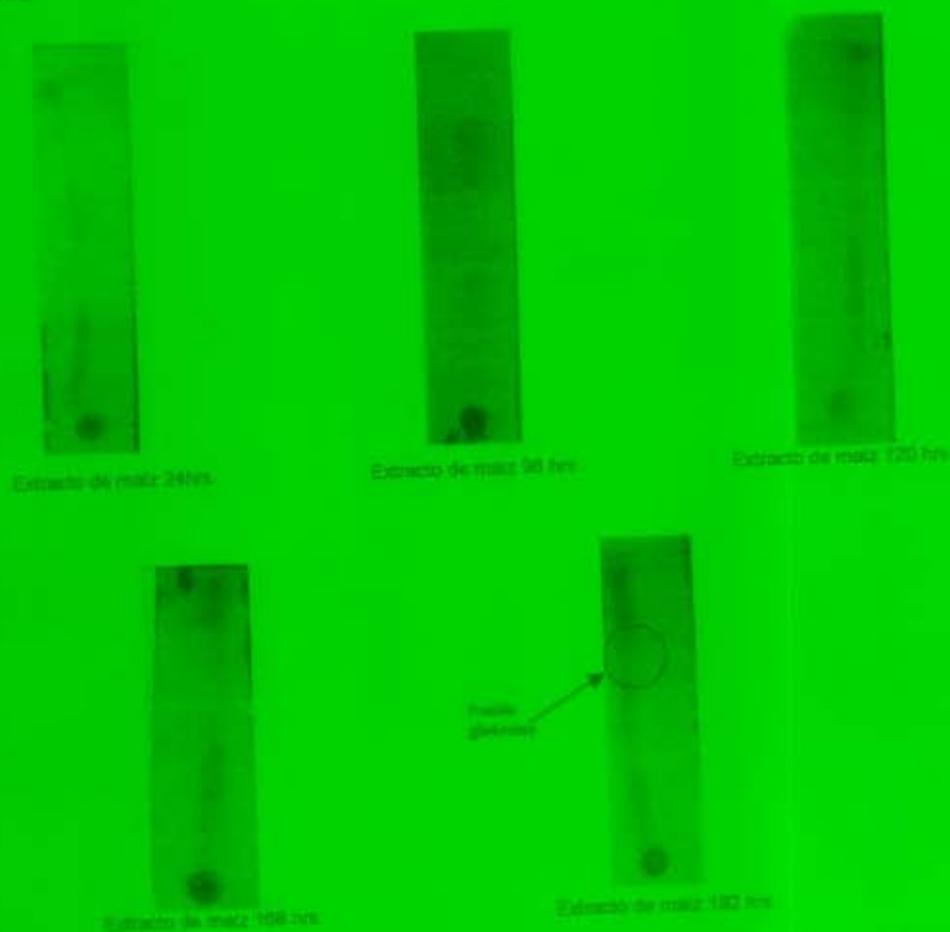


Figura 6b. Producción de glicoxina en medio maíz.

En la figura 6c se muestran las placas cromatográficas de las alícuotas del medio que contenían extracto de malta, la presencia de la posible gliotoxina se presenta a las 96 hrs de haber iniciado la fermentación y a las 192 hrs su concentración es mayor, a este tiempo se percibió también la presencia de otros compuestos desconocidos con diferente polaridad a gliotoxina, de esta cromatografía se deduce que la mejor producción de gliotoxina se efectúa en el medio de cultivo donde fue utilizado extracto de

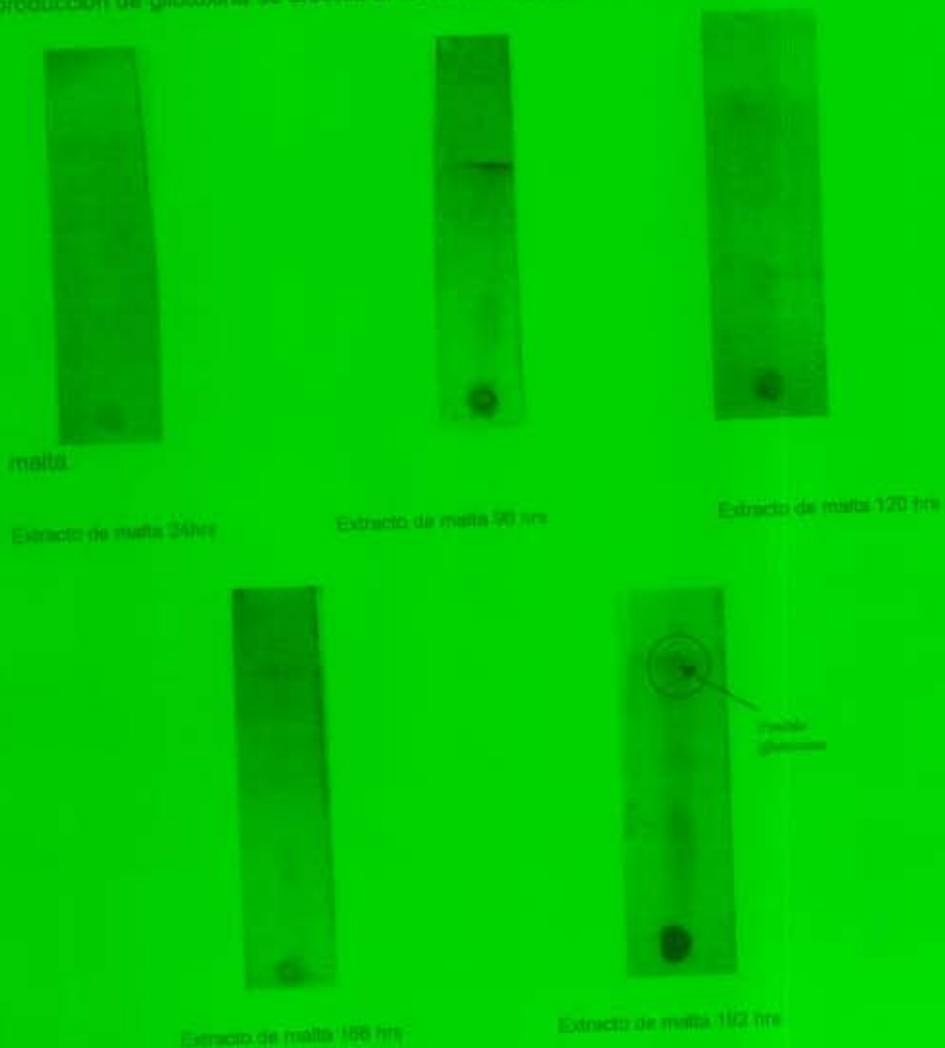


Figura 6c. Producción de gliotoxina en medio malta.

En la figuras 6d se muestran los resultados de las placas cromatográficas en capa fina, en donde se puede observar el comportamiento de producción de gliotoxina en los tres diferentes medios de cultivo, empleando la cepa A-20:



Figura 6d. Producción de gliotoxina en tres medios diferentes (arroz, malta y malta).

En el Cuadro 1 se puede observar el resumen de los resultados obtenidos en las cromatoplaques de las alícuotas de los tres diferentes medios de cultivo probados.

Cuadro 1. Resultados de las muestras obtenidas en los diferentes medios de cultivo mostrados en cromatoplaques

Tiempo (hrs)	Arroz	Malta	Malta
24	ND	ND	ND
96	ND	Marca tenue	Marca tenue
120	Marca tenue	Marca tenue	Marca tenue
168	Marca tenue	Marca tenue	Posible gliotoxina (mta)
192	Posible gliotoxina (mta)	Posible gliotoxina (mta)	Posible gliotoxina (mta)

ND: No Determinado

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE GLIOTOXINA EN DIFERENTES CEPAS

En la figura 7 se muestran las cromatoplacas de las diferentes cepas de aislamiento clínico de aspergilosis aviar, donde se observa que las cepas 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 y 10 se obtuvieron compuestos que se comportan igual al estándar de referencia de gliotoxina por lo que se deduce que puede ser el mismo compuesto.

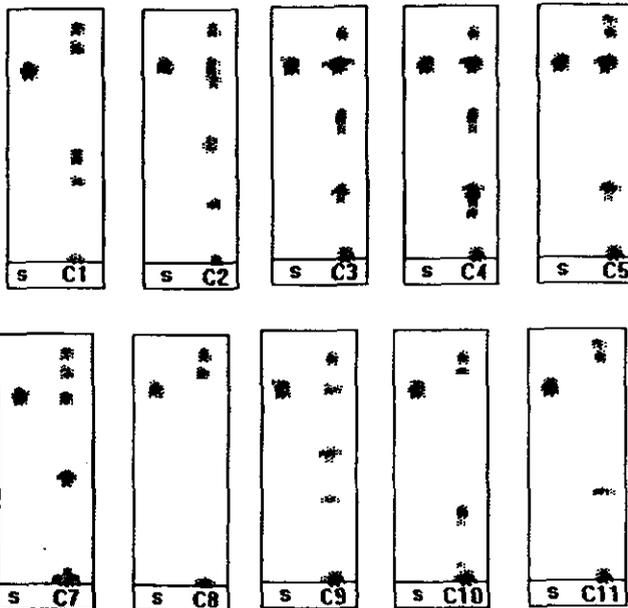


Figura 7. Representación esquemática de la producción de gliotoxina en las diferentes cepas.

En las cepas C1, C8 y C11 no se observó ningún compuesto similar a gliotoxina estándar de referencia ya que se presentaron compuestos con diferente polaridad.

ENSAYO BIOLÓGICO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE GLIOTOXINA

Esta prueba se utilizó como alternativa para determinar la presencia de gliotoxina, por medio de la presencia de hemólisis, empleando el estándar de gliotoxina se logró obtener la mínima concentración detectada, presentándose en $1 \mu\text{g/ml} = 1000\text{ng/ml}$ donde se observó hemólisis. Esta prueba fue realizada por triplicado.

CUANTIFICACIÓN DE GLIOTOXINA EN LAS DIFERENTES CEPAS

Para la cuantificación de gliotoxina en las diferentes cepas se utilizó la técnica de Cromatografía de Líquidos a Alta Presión (HPLC). Con esta técnica se observaron diferencias notables en la producción de gliotoxina en las cepas, en la figura 8 se presenta el cromatograma de gliotoxina estándar la cual presenta un tiempo de retención de 3.03 min.



Figura 8. Cromatograma del estándar de gliotoxina.

Considerando este dato como referencia se procedió a determinar la presencia y cantidad de gliotoxina. En el Cuadro 2 se registran los picos más abundantes obtenidos de todas las cepas, así mismo los cromatogramas se presentan en el apéndice 1. También en este Cuadro se muestran que las cepas C3 y C8 presentan un tiempo de retención similar al estándar de gliotoxina, y la cepa C1, C2, C3, C5, C7, C9, C10 y C11 tuvieron un tiempo de retención cercano al estándar. En el apéndice se muestran los cromatogramas obtenidos para cada cepa.

CUADRO 2
REGISTRO DE LOS PICOS OBTENIDOS EN HPLC DE LAS DIFERENTES CEPAS.

Cepas	Picos Registrados	Tiempo de Retención	% de Área
C1	4	2.69	3.35
		4.36	3.25
		5.33	5.95
		9.13	85.03
C2	7	1.17	7.52
		1.91	5.19
		2.53	8.32
		2.64	10.30
		3.35	0.24
		4.33	10.01
		5.32	56.99
C3	6	2.70	2.44
		3.08	3.65
		4.36	1.40
		5.27	2.85
		9.12	72.16
		16.14	16.02
C5	6	2.68	3.04
		3.58	1.48
		4.41	3.57
		5.35	9.80
		9.23	72.17
		16.63	7.31
C7	6	1.04	16.38
		1.74	10.94
		2.46	12.09
		2.58	18.73
		4.28	14.74
		5.23	27.09
C8	5	1.23	16.77
		2.98	70.67
		5.29	4.23
		5.59	4.85
		6.54	1.21
C9	8	1.15	1.97
		1.23	1.16
		1.97	1.45
		2.53	11.17
		5.17	47.52
		7.35	1.26
		8.83	32.56
22.14	2.86		
C10	5	1.14	3.85
		1.23	2.67
		1.98	3.31
		2.53	7.10
		5.16	82.89
C11	6	1.14	5.85
		1.23	5.38
		1.93	10.04
		2.53	26.63
		5.24	51.63
		6.65	0.446

CARACTERIZACIÓN DE GLIOTOXINA.

Para la caracterización de gliotoxina se empleó la cepa C-3 de la cual se obtuvieron 5 ml de un concentrado de color amarillo del cual se obtuvieron 30 mg de un precipitado blanco con punto de fusión de 219-220°C.

La identificación de este precipitado se hizo mediante las técnicas espectroscópicas más usadas como, Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico y de Infrarrojo. En la figura 9 se presenta el espectro de masas que se obtuvo con el empleo de la técnica de impacto electrónico, resultando una señal $m/z = 326$ que corresponde al ión molecular, la señal referente a $m/z = 262$ representa el pico base que corresponde a la pérdida de un puente disulfuro, (Trown and Biello 1972) esta pérdida es esquematizada en la figura 10.

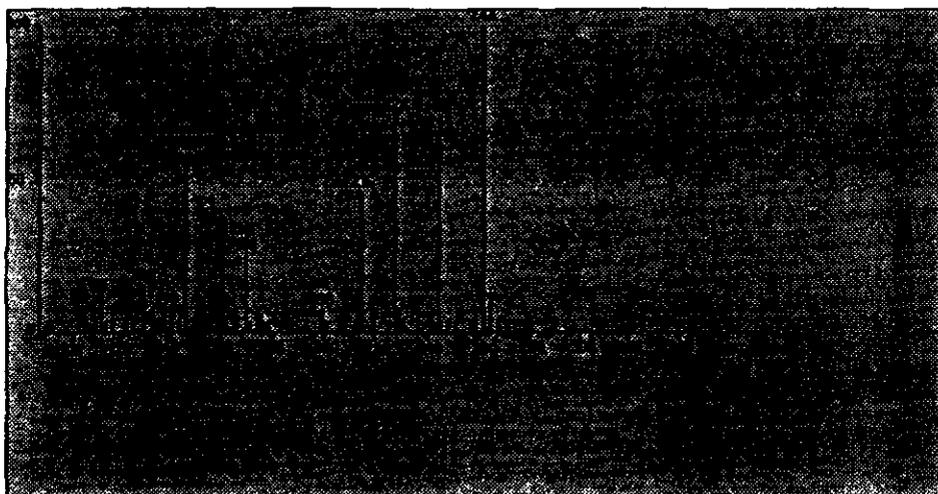


Figura 9. Espectro de masas de gliotoxina aislada de la cepa C-3.

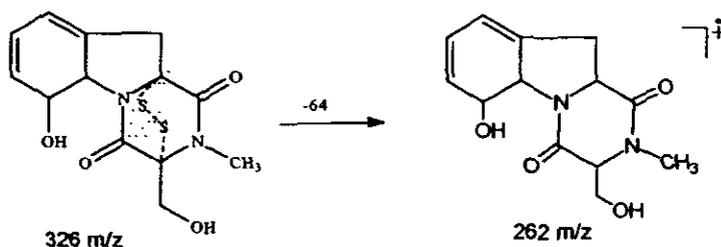


Figura 10. Representación de la pérdida de un puente disulfuro en gliotoxina.

Con los datos propuestos de la espectrometría de masas podemos afirmar que el compuesto blanco purificado de la cepa C-3 es gliotoxina.

En la figura 11 se presenta el resultado del espectro de infrarrojo de gliotoxina, obteniéndose lo siguiente: Gliotoxina, IR $\nu(\text{cm}^{-1})$ película 3430.1 (grupo OH) 3051.2 ($\text{Csp}_2\text{-H}$) 1467.091 (C=O), donde se corroboran los grupos funcionales que pertenecen al compuesto en estudio.

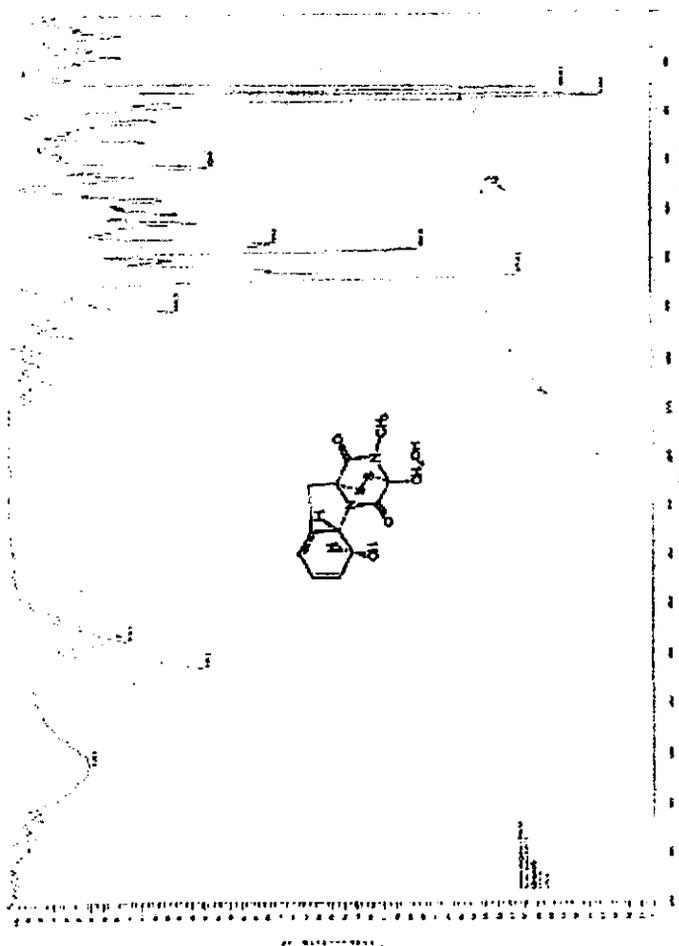


Figura 11. Espectro de infrarrojo de Gliotoxina aislada de la cepa C-3

Para estudiar la estructura de gliotoxina y proponer los posibles átomos que contribuyen a la actividad biológica (HOMO y LUMO) se empleó UNICHEM[®] (AM1), los cuales están basados en cálculos de mecánica cuántica. En la figura 12 se presenta la conformación de gliotoxina, lográndose apreciar el puente disulfuro y la estereoquímica que presenta.

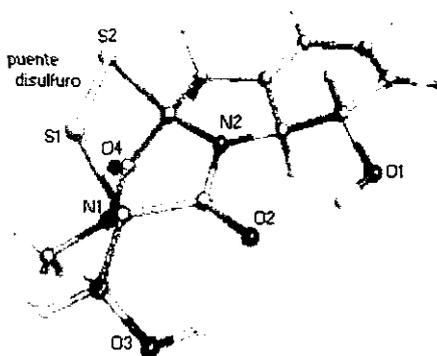


Figura 12. Representación de la estructura de gliotoxina de la cepa C-3

Actualmente no se conoce con certeza la naturaleza electrónica del receptor con el que interactúa gliotoxina, por ello consideramos importante calcular para gliotoxina el orbital molecular más alto ocupado y el orbital molecular más bajo desocupado esto es, el HOMO y LUMO respectivamente. Tanto en el HOMO como en el LUMO se establece la parte más reactiva de la molécula, en el caso del HOMO se indica la parte nucleofílica y el LUMO la parte electrofílica (figura 13 y 14)



Figura 13. HOMO de gliotoxina

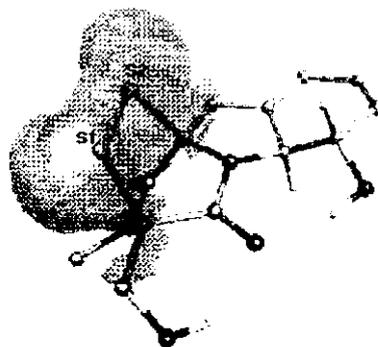


Figura 14. LUMO de gliotoxina.

De las figuras 13 y 14 que indican el HOMO y LUMO de gliotoxina se puede inferir que la parte más reactiva de esta molécula es el puente disulfuro, esto último corrobora lo propuesto por Trown, que afirma que al romperse el puente disulfuro gliotoxina pierde su actividad biológica, (figuras 15 y 16). Así mismo, se propuso calcular el HOMO y LUMO de gliotoxina cuando pierde el puente disulfuro, notando una diferencia en la distribución electrónica tanto en el HOMO como en el LUMO.

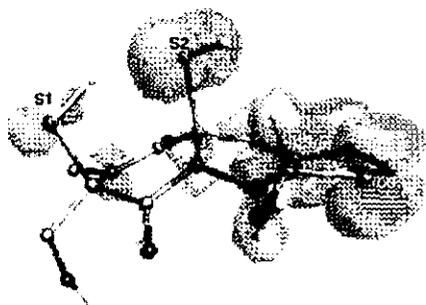


Figura 15. HOMO de gliotoxina sin puente disulfuro



Figura 16. LUMO de gliotoxina sin puente disulfuro

De acuerdo a la teoría de la llave y la cerradura podemos afirmar que el puente disulfuro es muy importante en la actividad biológica, es decir hay una relación estructura-actividad entre la toxina y el aceptor.

En la literatura se describen varios métodos para el cultivo de *Aspergillus fumigatus* y la producción de gliotoxina. Müllbacher et al (1985); Richard et al., (1989); Darshana and Larsen (1991); Bayer et al., (1989); Amitani et al., (1995), emplearon medios de cultivo tales como Medio Eagle's y medio 199, que son de muy alto costo ya que se usan principalmente para cultivo celular, lo que representa una desventaja el utilizarlos. Richard et al., (1989) emplearon granos de arroz como medio de cultivo, el cual es un método muy lento de realizar, por lo que se consideró importante el implementar un método para el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y producción de gliotoxina que fuera barato y fácil laborar, para esto se tomó como base el medio propuesto por Jones and Hancock (1988), el cual consiste en un medio líquido que emplea como fuente de carbono glucosa al 0.6%, en el medio estudiado en el presente trabajo se adicionaron como fuente de carbono adicional harina de arroz, harina de maíz ó extracto de malta, respectivamente pues se consideró que al contener una fuente de carbono en mayor concentración el microorganismo creció más fácilmente, para ello se utilizó una cepa de referencia como lo es la A-20, ya que la experiencia previa en este laboratorio se verificó que producía gliotoxina, por lo que se uso como referencia para emplearla en los diferentes medios a estudiar.. En la gráfica # 1, muestra el comportamiento de crecimiento de *Aspergillus fumigatus* en los diferentes medios de cultivo estudiados, donde se observó que la velocidad de crecimiento fue mayor en el medio adicionado de harina de arroz, el cual alcanzó la fase estacionaria después de las 75 hrs, del inicio de la fermentación. En el caso del medio con extracto malta aunque la velocidad de crecimiento y el tiempo requerido para alcanzar la fase estacionaria fueron menor y mayor respectivamente la producción de biomasa obtenida en este medio fue mayor, teniendo un máximo de crecimiento a las 100 hrs.de iniciada la fermentación.

El seguimiento del consumo de nutrientes por parte de *Aspergillus fumigatus* en los tres medios de cultivo estudiados fue llevado a cabo empleando la técnica de Bradford para determinar proteínas(1976) y la técnica de Dubois (1956) para determinar carbohidratos, esto se muestra en las gráficas # 2 y 3. Chávez et al., (1992), reportó que el arroz contiene 78.8% de carbohidratos, 7.4%, de proteínas, mientras que el maíz tiene 73% de carbohidratos y 7.9 % de proteínas lo que muestra que hay cantidades altas de carbohidratos y bajo contenido de proteínas, lo cual se pudo corroborar al inicio del estudio donde se puede ver que de los tres medios probados el que proporcionó mayor cantidad de proteínas y menor de carbohidratos fue el extracto malta y los de

arroz y de maíz proporcionaron mayor contenido de carbohidratos y menor de proteínas ya que el extracto de malta contiene grandes cantidades de enzimas principalmente alfa y beta amilasas cuya actividad conjunta sobre los carbohidratos provocan su hidrólisis lo que han aprovechado los microorganismos (García, 1993; Monroy, 1981). De los extractos de los diferentes medios de cultivo a intervalos de tiempo de 24 hrs. durante la fermentación, con la finalidad de determinar el consumo de los nutrientes del medio de cultivo por el microorganismo, esto se muestra en las gráficas 2 y 3.

En la gráfica # 2 se observó un incremento en la concentración de proteínas a las 120 hrs. de la fermentación en el medio con extracto arroz, se considera que este incremento puede estar relacionado con la velocidad de crecimiento de *Aspergillus fumigatus*, ya que ha esa hora se inicio la lisis del microorganismo lo que provoca una liberación de proteínas al medio de cultivo.

Caber mencionar que tanto la gráfica 1, 2 y 3 inician en cero, debido a que el programa no lo ubicó en su lugar.

El fenómeno de aumento en el contenido de proteína en el medio de cultivo de malta y de maíz se inicio a las 150 hrs. de fermentación, lo correspondería a proteínas de exportación hacia el medio por parte del microorganismo, ya que la lisis del microorganismo se inicio aproximadamente a las 150 hrs.

Con respecto a la concentración de carbohidratos (gráfica 3) presentes en los medios, tanto en el medio con extracto maíz como en el medio con extracto arroz, los niveles detectados fueron de 20 y 22.5 $\mu\text{g/ml}$ en comparación con el medio con malta que fue de 12 $\mu\text{g/ml}$, esto puede explicarse debido a que por naturaleza se sabe que estos dos productos contienen grandes cantidades de almidón en forma nativa, el cual es hidrolizado por *Aspergillus fumigatus*, a azúcares asimilables antes de ser utilizados, fenómeno que no se observó en el medio con extracto de malta, la malta por naturaleza tiene gran cantidad de enzimas que hidrolizan a los azúcares que el microorganismo puede asimilar fácil y rápidamente, lo anterior podría explicar la razón por la cual se obtuvo una mayor producción de biomasa en este medio que en los otros. De estos resultados es obvio mencionar que de los tres medios de cultivo modificados estudiados el más adecuado para el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* es el de extracto de malta. Este medio en comparación con los reportados por Darshana and Larsen (1991); Richard. et al. (1989) Amitani et al. (1995), Baver et al., (1989), tiene amplias ventajas en cuanto a su costo.

Habiendo seleccionado el medio de malta como el más adecuado se procedió a evaluar la presencia de gliotoxina en el medio de cultivo y posteriormente determinarla en los otros dos, para ello se recurrió al empleo de cromatografía en capa fina, puesto que en la literatura cita Müllbacher et al., (1985); Richard et al., (1989); Baver et al.,(1989), el uso de cromatografía en capa fina para determinar la presencia de gliotoxina. Por otro lado es importante mencionar que son muy variables los datos reportados en cuanto al sistema de elución empleado para tener buena separación de gliotoxina, cuando se repitieron las condiciones de elución ya establecidas ninguno fue eficiente para la separación, por lo que se implementó el sistema acetato de etilo-hexano con el cual se tuvo una buena separación de la muestra. Para verificar la presencia de gliotoxina se utilizó un estándar de gliotoxina como referencia, con lo que se obtuvieron valores de Rf igual al estándar, esto se realizó por triplicado en cromatoplasmas con estándar únicamente y con estándar más la muestra. En la fig.6 se muestran los cromatogramas realizados a cada uno de los medios de cultivo, en donde la producción de gliotoxina en medio extracto arroz se detectó hasta después de las 120hrs., siendo muy poca la cantidad producida. En el medio extracto maíz se determinó la presencia de gliotoxina a las 96 hrs. de la fermentación y a las 168 hrs. la concentración fue mayor, de igual manera fue el comportamiento en el medio extracto malta, pero con mayor producción de gliotoxina, además de que se encontró la presencia de otros compuestos desconocidos presentando polaridades diferentes a la gliotoxina. Para observar mejor este hecho en la figura 6d se tienen los cromatogramas de cada medio, obtenidos a las 192 hrs., donde se observa que el medio con extracto de malta había mayor presencia de gliotoxina. Con esto se confirmó que el medio óptimo para el crecimiento y producción de gliotoxina por *Aspergillus fumigatus* fue el medio con extracto de malta.

Al haber establecido las condiciones de desarrollo de cromatografía en capa fina, se prosiguió a crecer las diferentes cepas obtenidas de aislamiento clínico de Aspergilosis aviar, empleando tanto el medio de cultivo seleccionado por cromatografía en capa fina y así poder determinar la producción de gliotoxina en cada una de ellas. En la fig.7 se muestran los resultados obtenidos del estudio del método de cromatografía de capa fina realizado al final de la fermentación de las cepas a estudiar, de las cuales las cepas 2, 3, 4, 5, 7, 9 y 10, presentaron un compuesto que tuvo similitud al ser comparado con el estándar de gliotoxina, no así para las cepas 1, 8 y 11 que manifestaron compuestos con polaridad diferente a gliotoxina.

Por otra parte se realizó un ensayo biológico para determinar la presencia de gliotoxina y así tener otra opción además de cromatografía en capa fina. Tilden et al (1961) propuso la prueba de hemólisis para determinar la presencia de gliotoxina, esta prueba es rápida de realizar, aunque cabe mencionar que actualmente la prueba de hemólisis no es muy utilizada debido a que existen otros métodos más sensibles como es la técnica de Elisa, para la que se requiere de infraestructura especial con la cual no se contaba en ese momento, por lo que se llevó a cabo una prueba de hemólisis. La determinación se realizó visualmente y por medio de un método espectrofotométrico, el método para la determinación del grado de hemólisis de las células fue la cuantificación de la hemoglobina liberada en el sobrenadante que no sedimenta a la misma velocidad que las células; para ello se siguió el método para cuantificar cianometahemoglobina presente en la muestra, se utilizaron eritrocitos de pollo obteniendo hemólisis a una concentración de 15 ng/ml, al realizar la determinación visualmente se tuvo que la mínima concentración detectada fue de 1 µg / ml, en la cual se presentó hemólisis, comparando los dos resultados se observa que se tiene mayor sensibilidad al hacer la determinación espectrofotométricamente, lo cual ya es una ventaja en este tipo de técnicas, por lo que podría ser una herramienta útil para la determinación de la presencia de gliotoxina. En base a que ya no se contaban con volúmenes de extractos de los diferentes medios para realizar este ensayo, por lo que desafortunadamente solo se trabajó con el estándar.

Con el propósito de confirmar la presencia y cantidad de gliotoxina en las diferentes cepas, se decidió llevar a cabo el método de cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC), ya que este método se ha estado utilizando para ello por Richard, et al (1989); Darshana and Larsen (1991) ; Amitani et al., (1995), por lo que se consideraron las condiciones de realización establecidas para poder adecuar y estandarizar nuestras propias condiciones óptimas de corrida. Primeramente se realizó con el estándar de referencia, con el que se obtuvo un tiempo de retención de 3.03 min., este valor se consideró como referencia para así identificar y cuantificar la gliotoxina en las diferentes cepas a estudiar. En la Cuadro 2 se señala el número de picos obtenidos con cada cepa, así como el tiempo de retención y el porcentaje de área de cada pico, de la cual resulta importante mencionar que las cepas con tiempo de retención parecido al estándar de gliotoxina fueron las cepas 3 y 8, mientras que las cepas 1, 2, 5, 7, 9, 10 y 11 presentaron un tiempo de retención aproximado al estándar de referencia de gliotoxina. Las cepas 9, 10 y 11 tuvieron un comportamiento muy similar entre ellas

puesto que presentaron un compuesto con tiempo de retención igual y una área grande, pero diferente al estándar de referencia por lo que se puede deducir que estas cepas no produjeron gliotoxina.

De los resultados obtenidos en HPLC, se eligió la cepa 3 que fue la que presentó en el tiempo de retención muy similar al estándar, para subsecuentemente ser empleada en la caracterización de la molécula. Para este fin se hizo una replica del método de crecimiento de *Aspergillus fumigatus* para la producción de gliotoxina en un volumen de 30 lts. para así poder tener una cantidad de gliotoxina adecuada para su caracterización. Al concentrado obtenido de 5 ml y purificado se le realizó una prueba física representativa que ayuda a corroborar la identificación de un compuesto como es el punto de fusión teniendo un valor de 219–220°C que coincide con el reportado en trabajos anteriores (Johnson et al., (1943).

Con el afán de caracterizar a la molécula obtenida del extracto de la cepa 3, se llevo a cabo la técnica de espectrometría de masas basándose en los estudios hechos por Mullbacher, et al., (1985); Amitani et al., (1995), los cuales utilizaron esta técnica para llegar a la caracterización de gliotoxina, en esta técnica las moléculas que se someten a esta técnica son fragmentadas mediante un bombardeo de electrones, por lo que el análisis de las masas de los fragmentos resultantes permiten conocer el peso molecular y posiblemente la fórmula molecular. En la fig.9 se observa un pico de 326 m/z y corresponde al peso molecular reportado para la gliotoxina (Baver et al.,(1989) y un pico con mayor abundancia de 262 m/z llamado pico base por ser el más abundante, el patrón de fragmentación que se manifiesta en el espectro propuesto indica una pérdida de 64 unidades de m/z que correspondería a un puente de disulfuro, por lo que con esto se confirma que la molécula corresponde a la gliotoxina, además de que este espectro de masas obtenido de la cepa 3 es basado en la comparación de uno ya reportado por Baver et al., 1989. Se llevo a cabo la técnica de espectrometría de infrarrojo con el fin de caracterizar la presencia de gliotoxina en donde se encontraron grupos funcionales que pertenecen a gliotoxina, con este resultado se puede asegurar que el compuesto en estudio es gliotoxina.

Con respecto a los estudios que se han realizado para conocer algunas de las propiedades de gliotoxina se ha encontrado que puede presentar dos formas, la oxidada y la forma reducida, de las cuales existe una gran diferencia, la forma reducida al parecer no tiene actividad biológica y la forma oxidada si presenta actividad puesto que se ha visto que inhibe la síntesis de RNA viral, no se sabe con certeza cual es la causa de este comportamiento, se cree que podría ser la presencia del puente disulfuro

en el anillo presente en la forma oxidada (Trown and Bilello, 1972). De lo anterior se deduce que existe poca información al respecto, por lo que este hallazgo influyó para llevar a cabo un estudio sobre la estructura espacial de la molécula, para ello se empleó el programa computacional UNICHEM (AM1) que se basan en cálculos de mecánica cuántica, con ello se calculó el orbital molecular más alto ocupado que corresponde al HOMO y el orbital molecular más bajo desocupado que concierne al LUMO, con esto se puede establecer la parte más reactiva de la molécula. En la fig. 11 y 12 se aprecia el HOMO y LUMO de gliotoxina de la cual se puede apreciar que la parte más reactiva es el puente disulfuro, también se realizó el estudio a la gliotoxina cuando ha perdido su puente disulfuro y se observó diferencia significativa en la distribución electrónica tanto en HOMO como LUMO con esto nos ayuda a corroborar lo indicado por Trown and Bilello.,(1972), Waring, et al., (1995) y a confirmar que el puente disulfuro es de gran importancia en la actividad biológica.

CONCLUSIONES

- 1.- Con base en los diferentes medios de cultivo probados para llevar cabo el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y producción de gliotoxina el óptimo fue medio con extracto de malta.
- 2.- Al desarrollar la cromatografía de capa fina se encontró que las cepas 2, 3, 4, 5, 7, 9 y 10, presentaron un compuesto que se comportó de forma en forma similar al estándar de gliotoxina, sin embargo no fue la de la gliotoxina.
- 3.- La Cromatografía Líquida Alta Presión (HPLC) nos ayudó para determinar la presencia y cantidad de gliotoxina en las cepas aisladas de casos clínicos de la enfermedad como las cepas 3 y 8 que fueron las que presentaron un tiempo de retención similar al estándar. Sin embargo las cepas 9, 10 y 11 tuvieron un comportamiento muy similar entre ellas puesto que presentaron un compuesto con tiempo de retención igual y un área grande, pero diferente a gliotoxina.
- 4.- De los resultados obtenidos en HPLC, se eligió a la cepa 3 para posteriormente llevar a cabo la caracterización de la molécula.
- 5.- Tanto la cromatografía de Capa Fina como Cromatografía de Alta presión fueron eficientes para la identificación y cuantificación de la gliotoxina
- 6.- Al realizar la espectrometría de masas se obtuvo un pico de 326 m/z que correspondió al peso molecular ya reportado para gliotoxina.
- 7.- El análisis computacional UNICHEM (AM1) nos permitió calcular el HOMO y LUMO e inferir que la parte más reactiva de la molécula es el puente disulfuro, que fue comparado con la estructura cuando esta ha perdido su puente disulfuro por lo que este de gran importancia en la actividad biológica.

ANEXO 1

TABLA 1
RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PESO SECO ANOVA

Medio de cultivo	Media	Varianza	N
Arroz	0.37889	0.06826	9
Maiz	0.36889	0.03044	9
Malta	0.43889	0.06116	9

TABLA 2
RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE PROTEÍNAS ANOVA

Medio de cultivo	Media	Varianza	N
Arroz	0.07269	0.00635	9
Maiz	0.17872	0.08418	9
Malta	0.1369	0.01979	9

TABLA 3
RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CARBOHIDRATOS ANOVA

Medio de cultivo	Media	Varianza	N
Arroz	0.17383	0.01051	9
Maiz	0.22150	0.01145	9
Malta	0.12472	0.00679	9

DEVICE 01 SAMPLE 068 METHOD METHOD1 TIME 02: 21: 40 DATE 00: 00: 00

~~AUTZ 1. 21~~

~~2. 39 2. 53 2. 70 3. 08 4. 36~~

~~5. 27~~

~~9. 12~~

~~16. 14~~

RUN TIME 19. 33

Cepa
C3

DEFAULT 0

NORMALIZATION METHOD USING AREA

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
1. 21	5205	0. 393684409	
2. 39	1001	0. 075711449	
2. 53	12880	P 0. 974189278	
2. 70	32321	P 2. 444625130	
3. 08	48343	3. 656386499	
4. 36	18625	1. 408717027	
5. 27	37725	2. 853285430	
9. 12	954154	72. 16821404	
16. 14	211871	16. 02473291	

TOTAL 1322125 99. 99954618

DEVICE 01 SAMPLE 072 METHOD METHOD1 TIME 00: 38: 05 DATE 00: 00: 00

~~AUTZ 1. 18 1. 91~~

~~2. 38 2. 54 2. 68 3. 58 4. 41~~

~~9. 23~~

~~15. 62 16. 63~~

RUN TIME 17. 24

Cepa
C5

DEFAULT 0

NORMALIZATION METHOD USING AREA

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
1. 18	14201	P 0. 469341593	
1. 91	28086	P 0. 928239418	
2. 38	4902	P 0. 162010597	
2. 54	18507	P 0. 611654451	
2. 68	92157	P 3. 045779396	
3. 58	44961	P 1. 485923387	
4. 41	108199	P 3. 575899750	
5. 35	296675	P 9. 805078315	
9. 23	2183887	72. 17512611	
15. 62	12831	P 0. 424063233	
16. 63	221322	7. 314669395	

TOTAL 3025728 99. 99778565

DEVICE 01 SAMPLE 079 METHOD METHOD01 TIME 02: 29: 31 DATE 00: 00: 00

~~2.46 2.58 4.28 5.23~~ ~~OUTZ 1.04 1.74~~

RUN TIME 7.16

Cepa
C7

DEFAULT 0
NORMALIZATION METHOD USING AREA

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
1.04	32509	P 16.38368535	
1.74	21720	P 10.94631166	
2.46	24002	P 12.09637995	
2.58	37177	18.73573124	
4.28	29260	P 14.74627437	
5.23	53755	27.09060945	
TOTAL	198423	99.99899205	

DEVICE 01 SAMPLE 080 METHOD METHOD01 TIME 02: 54: 07 DATE 00: 00: 00

~~OUTZ 1.23 1.54 1.80~~
~~2.55 3.93 4.33~~
~~5.29 5.59 6.54~~

RUN TIME 6.65

Cepa
C8

DEFAULT 0
NORMALIZATION METHOD USING AREA

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
1.23	148865	P 16.77015764	
1.54	7174	SP 0.808173937	
1.80	3413	S 0.384486266	
2.55	2866	S 0.322864822	
2.98	627330	70.67089642	
3.93	5187	SP 0.584333508	
4.33	1377	S 0.155123817	
5.29	37589	SP 4.234418336	
5.59	43101	S 4.855364220	
6.54	10776	S 1.213953708	
TOTAL	887678	99.99977469	

**ESTA TABLA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

DEVICE 01 SAMPLE 083 METHOD METHOD01 TIME 03:57:21 DATE 00:00:00

AUTZ 1.15 1.23 1.97 2.53 7.35 8.83 22.14

22.14

RUN TIME 57.31

Cepa
C9

DEFAULT 0

TIME	AREA	METHOD	USING	%AREA	PK NAME
1.15	11842	P		1.977754025	
1.23	6993			1.167913688	
1.97	8698			1.452668849	
2.53	66940			11.17977152	
5.17	284547			47.52271360	
7.35	7578			1.265615605	
8.83	194998			32.56630369	
22.14	17164			2.866590954	
TOTAL	598760			99.99933195	

DEVICE 01 SAMPLE 084 METHOD METHOD01 TIME 05:00:45 DATE 00:00:00

AUTZ 1.14 1.23 1.98 2.53 3.32 5.16

RUN TIME 5.64

Cepa
C10

DEFAULT 0

TIME	AREA	METHOD	USING	%AREA	PK NAME
1.14	18798	P		3.858160570	
1.23	13041			2.676575805	
1.98	16129	P		3.310366625	
2.53	34614			7.104286092	
3.32	740			0.151879924	
5.16	403905			82.89873090	
TOTAL	487227			100.0000000	

DEVICE 01 SAMPLE 085 METHOD METHOD01 TIME 05:11:31 DATE 00:00:00

AUTZ 1.14 1.23 1.93 2.53

5.24 6.65

RUN TIME 6.94 Cepa C 11

DEFAULT 0
NORMALIZATION METHOD USING AREA

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
1.14	12373	P 5.853827011	
1.23	11392	5.389703169	
1.93	21228	P 10.04324252	
2.53	56296	26.63436882	
5.24	109133	51.63223981	
6.65	944	0.446618661	
TOTAL	211366	100.0000000	

DEVICE 01 SAMPLE 067 METHOD METHOD01 TIME 01:02:37 DATE 00:00:00

AUTZ 1.22

2.54 2.69 3.03 3.74

Cepa Estándar

RUN TIME 18.44

DEFAULT 0
NORMALIZATION METHOD USING AREA

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
1.22	1797	0.348006274	
2.54	7928	P 1.535333191	
2.69	94008	18.20555028	
3.03	411965	79.77942173	
3.74	672	S 0.130139241	
TOTAL	516370	99.99845072	

REFERENCIAS CITADAS

- Alexopoulos.C.J. (1985). *Introducción a la Micología*. Edit.omega.
- Amitani.R., Taylor.G., Elezis.E.N., Llewellyn.C.J., Mitchell.J., Kuze.F., Cole.P.J., Wilson.R. (1995). Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infection and Immunity*. 3266 - 3271.
- Bahena.G.M.L. (1993). Establecimiento del Método de Obtención del Extracto Crudo de la Enzima Glucosa Oxidasa a Partir de una Cepa Silvestre de *Aspergillus niger*. TESIS de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. FES-Cuautitlán.
- Baver.J., Abott.M.G., Gedek.B. (1989). Isolation of a mycotoxin (gliotoxin) from a bovine udder infected with *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 27: 45 -50.
- Bennett.J.W., Klich.M.A. (1992) *Aspergillus Biology and Industrial Applications*. Butterwort - Heinemann.
- Bell.M.R., Johnson.J.R., Wildi.B.S., Woodward.R.B.. (1958). The structure of gliotoxin. *J.am.chem.soc.* 80: 1001.
- Betina V. (1984). *Mycotoxins. Production, Isolation, Separation and Purification. Cap.16. Gliotoxin and Epipolythiodioxopiperazines*. Elsevier Science Publishers. B.V. Amsterdam.
- Bose.A.J., Das.K.G., Funke.P.T., Kugajevsky.I., Shukla.O.P., Khanchandani.K.S., Suhadolnik.R.J. (1968). Biosynthetic studies on gliotoxin using stable isotopes and mass spectral methods. *Journal of the American Chemical Society*. 90(4) February: 1038-1041.
- Bradford.M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248 - 256.
- Cavallito.C.J., Bailey.J.H., Warner.W.F. (1946). The reversible inactivation of gliotoxin by thiols. 715 - 716.
- Chaudhary.S.K., Sadana.J.R. (1992). Serum protein and certain immune responses in japanese quail experimentally infected with *Aspergillus fumigatus*. *Indian Journal of Poultry Science*. 27(3). September. 148 - 152.

- Coulot.P., Bouchara.J.P., Renier.G. (1994). Specific interaction of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. *Infect Immun.* 62: 2169 – 2177.
- Darshana.T.Shah. and Larsen.B. (1991). Clinical isolates of yeast produce a gliotoxin-like substance. *Mycopathologia.* 116: 203 - 208.
- Larone.D.H. (1987). *Medically Important Fungi a Guide to Identification.*Edit. Elsevier.
- Dexter.H.Howard. (1985). *Fungi pathogenic for humans and animals. Part.B. Pathogenicity and detection. Vol.3* Edit. Marcel Dekker.
- Dubois.M., Gilles.K.A., Hamilton.J.K., Rebers.P.A., Smith.F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal.Chem.* 28: 350 - 356.
- Eichner.R.D. and Müllbacher.A. (1984). Hypothesis: Fungal toxins are involved in Aspergillosis and AIDS. *Aust. J.Exp.Biol.Med.Sci.* 62: 479 - 484.
- Evans. E.G.V. and Richardson.M.D. (1991). *Medical Mycology a Practical Approach.* Edit. I.R.L. Press.
- Frame.R. and Carton. W.W. (1988). Acute toxicity of gliotoxin in hamsters. *Toxicology. Letters.* 40: 269 - 273.
- Henrich.A.T. (1939). An endotoxin from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Immunology.* 36: 319 - 338.
- Johnson.J.R., Bruce.W.F., Dutcher.J.D. (1943). Gliotoxin the antibiotic principle of *Gliocladium fimbriatum*. I. Production, physical and biological properties. *J. Am.Chem.Soc.* 65:- 2009.
- Jones.R.W. and Hancock.J.G. (1988). Mechanism of gliotoxin action and factors mediating gliotoxin sensitivity. *J. of General Microbiology.* 134:. 2067 - 2075.
- Jordan.T.W. and Pedersen. J.S. (1986). Sporidesmin and gliotoxin induce cell detachment and perturb microfilament structure in cultured liver cells. *J.Cell Sci.* 85: 33 -46.
- Jurado R.C. (1989). *Toxicología Veterinaria.* Edit. Salvat. 2º. Edic.
- Kwon – Chung.K.J. and Bennett. J.E. (1992). *Medical Mycology.* Edit. Lea and Febiger. 1a. Edic.
- López.M.R., Ovejero.M.C., Calera.J.A., Puente.P., Leal.F. (1995). *Aspergillus fumigatus* antigens. *Microbiology.* 141:. 2699 - 2704.

- Petrak.M.L.W.M.D. (1982). *Diseases of Cage and Aviary Birds*. Second Edition. Lea and Febiger. Philadelphia.
- McMinn.P.C., Halliday.G.M., Muller.H.K. (1990). Effects of gliotoxin on langerhans' cell function : contac hypersensitivity responses and skin graft survival. *Immunology* . 71:. 46 - 51.
- Miller.P.A., Milstrey.K.P., Trown. P.W. (1968). Specific inhibition of viral ribonucleic acid replication by gliotoxin. *Science*. 159: .431 – 432.
- Müllbacher.A. and Eichnner.R.D. (1984). Immunosuppression in vitro by a metabolite of a human pathogenic fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. Immunology*. 81:. 3835 - 3837.
- Müllbacher.A., Waring.P., Eichner.R.D. (1985). Identification of an agent in cultures of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immunomodulating activity in vitro. *Journal of General Microbiology*. 131:.1251 - 1258.
- Peden.W.M., Rhoades.K.R. (1992). Pathogenicity differences of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* in turkeys. *Avian Diseases*. 36: .537 - 542.
- Peñalver.M.C., Casanova.M., Martínez.J.P., Gil.M.L. (1996). Cell wall protein and glycoprotein constituents of *Aspergillus fumigatus* that bind to polystyrene may be responsible for the cell superface hydrophobicity of the mycelium. *Microbiology*. 14: 1597 - 1604.
- Primo Y. E. (1994). *Química Orgánica Básica y Aplicada de la Molécula a la Industria*. Tomo II. Edit. Reverte,S.A. 1ª. Edic.
- Richard.J.L., Debey.M.C., Chermette.R., Pier.A.C., Hasegawa.A., Lund.A., Bratberg.A.M., Padhye.A.A., Connole.M.D. (1994). Advances in veterinary mycology. *J. of Medical and Veterinary Mycology*. 32. Supplement 1. 169- 187.
- Richard.J.L., Lyon.R.L., Fichtner.R.E., Ross.P.F. (1989). Use of thin layer chromatography for detection and high performance liquid chromatography for quantitating gliotoxin from rice cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Mycopathologia*. 107: 145 -151.
- Richard.J.L., Peden.W.M., Williams.PP (1994). Gliotoxin inhibit transformation and its cytotoxic to turkey peripheral blood lymphocytes. *Mycopathologia*. 126:. 109- 114.

- Richard.J.L., Thurston.J.R. (). Rapid hematogenous dissemination of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* spores in turkey poultts following aerosol exposure. *Avian Diseases*. 27(4):1025 - 1033.
- Rippon.J.W. (1988). *Tratado de Micología Médica*. 3ª. Edic. Edit. Interamericana.
- Sarfati.J., Boucias.D.G., Latgé.J.P. (1995). Antigens of *Aspergillus fumigatus* produced in vivo. *J. of Medical and Veterinary Mycology*. 33: 9 -14.
- Seigle.F.M., Krivobok.S., Steiman.R., Marzin.D. (1990). Production, mutagenicity and immunotoxicity of gliotoxin. *J. Agric. Food Chem.* .38:1854 - 1856.
- Skoog.D.A. and Leary.J.J. (1994). *Análisis Instrumental*. 4ª. Edic. Edit.McGraw-Hill.
- Smith.J.M.B. (1989). *Opportunistic mycoses of man and other animals*. Cap. 4. *Aspergillosis*. C.A.B. International Mycological Institute.
- Tilden. E.B., Hatton.E.H., Freeman.S., Williamson.W.M., Koenig.V.L. (1961). Preparation and properties of the endotoxins of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia. et, Mycologia Applicata*. .14: 325 - 346.
- Trown.P.W., Bilello.J.A. (1972). Mechanism of action of gliotoxin : elimination of activity by sulfhydryl compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. .2(4): 261 - 266.
- Tronchin.G.,Bouchara.J.P., Ferron.M, Larcher.G., Chabasse.D. (1995). Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia : correlation between adherence, agglutination and rearrangements of the cell wall. *Cand.J. Microbiol.* 41::714 – 721.
- Waring.P., Sjaarda.A., Qing.H.L. (1995). Gliotoxin inactivates alcohol dehydrogenase by either covalent modification or free radical damage mediate by redox cycling. *Biochemical Pharmacology*. .49 (9): 1195- 1201.