

# Evaluación de la producción de gliotoxina en 10 cepas de *Aspergillus fumigatus* obtenidas de aislamientos clínicos

## Gliotoxin production in 10 strains of *Aspergillus fumigatus* isolated from clinical cases

Carolina Moreno Ramos<sup>a</sup>, Sara Esther Valdés Martínez<sup>a</sup>, Roberto Arnulfo Cervantes Olivares<sup>b</sup>

### RESUMEN

Se evaluó la producción de gliotoxina en 10 cepas obtenidas de aislamientos clínicos de *Aspergillus fumigatus*. Ocho (C-2, C-3, C-4, C-5, C-7, C-8, C-9 y C-10) presentaron la producción de un compuesto que se comportó similar al estándar de gliotoxina. Se aplicó cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) obteniendo que las cepas C-3 y C-8 presentaron un compuesto con un tiempo de retención similar al de la gliotoxina estándar. Posteriormente se realizó una caracterización del compuesto producido por la cepa C-3, encontrando en el espectro de masas un pico de 326 m/z (masa por intensidad) que corresponde al peso molecular reseñado para gliotoxina; en el de infrarrojo se obtuvieron algunos grupos funcionales de la molécula de gliotoxina, lo que confirmó su producción por estas cepas (C-3 y C-8); mientras que de las otras cepas nativas, cinco de ellas (C-2, C-5, C-7, C-9 y C-10) presentaron compuestos similares a gliotoxina; en el caso de la cepa C-4, no se pudo corroborar la presencia de compuestos similares a la gliotoxina, debido a la pérdida del extracto durante la determinación por CLAP, y las cepas C-1 y C-6 no presentaron la producción de este compuesto, lo cual mostró que la gliotoxina no es producida por todas las cepas de *A. fumigatus*. Si bien la gliotoxina es uno de los compuestos más estudiados asociado a la producción de aspergilosis aviar, se debe considerar la presencia de otros compuestos que sin lugar a dudas intervienen en la patología de la enfermedad.

**PALABRAS CLAVE:** *Aspergillus fumigatus*, Producción de gliotoxina, Cuantificación.

### ABSTRACT

In the present study, gliotoxin production from 10 different strains isolated from clinical cases of *Aspergillus fumigatus* was studied. It was found that two of them (C-3, and C-8) produced a compound similar to the gliotoxin standard. While another five strains (C-2, C-5, C-7, C-9, C-10) showed a similar behaviour to the gliotoxin standard. For strain C-4, no conclusions could be made as the extract was lost during the final High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) determination. The other two strains (C-1 and C-6) did not produced any compound similar to gliotoxina. HPLC was applied to the extracts in order to quantify their production of gliotoxin, finding that only strains C-3 and C-8 produced a compound with a similar retention time to that of the standard gliotoxin. After that, a characterization of the gliotoxin similar compound from strain C-3 was carried out using mass spectrometry and infrared spectrometry, finding that the mass spectrum presented a peak at 326 m/z (mass by intensity) that corresponds to the molecular weight found for gliotoxin, in the infrared spectrometry some functional groups corresponding to gliotoxin were found. These findings confirm the production of gliotoxin by strains C-3 and C-8, while the rest of the native strains studied did not showed production of these particular compounds, which suggest that gliotoxin is not produced by all the strains of *A. fumigatus* and might therefore not be the only compound associated with the presence of avian aspergillosis due to this fungus.

**KEY WORDS:** *Aspergillus fumigatus*, Gliotoxin production, Quantification.

---

Recibido el 21 de agosto de 2001 y aceptado para su publicación el 15 de enero de 2002.

a Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

b Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Departamento de Microbiología e Inmunología. Av. Universidad # 3000 Copilco-Coyoacán, 04510, México D.F. Tel-5622-5896, raco@servidor.unam.mx Correspondencia y solicitud de separatas.

## INTRODUCCIÓN

El género *Aspergillus* está ampliamente distribuido en la naturaleza y sus miembros frecuentemente son causantes de infecciones oportunistas; ocasionan diferentes tipos de enfermedades, dependiendo del estado fisiológico general o local del huésped y del agente causal que puede ser alérgico, toxigénico o patogénico<sup>(1)</sup>. La aspergilosis se define como cualquier padecimiento producido por un miembro del género *Aspergillus*, sin embargo cuando se menciona aspergilosis aviar, generalmente se refiere a aspergilosis pulmonar, que es causada principalmente por *Aspergillus fumigatus*, en el momento en que se exponen animales susceptibles a altas concentraciones de conidias aéreas y se produce la invasión de los tejidos por el hongo<sup>(2,3)</sup>.

La aspergilosis aviar, se presenta principalmente de dos formas en las aves domésticas: la aspergilosis aguda que se caracteriza por brotes agudos en aves jóvenes con alta morbilidad y mortalidad y aspergilosis crónica, que se presenta en aves reproductoras y en ocasiones en parvadas adultas o aviarios<sup>(4,5,6)</sup>.

El mecanismo molecular por el cual el hongo se establece y causa la infección aún no ha sido totalmente elucidado, aunque se han realizado estudios *in vitro*, en donde se ha demostrado que al emplear filtrados de cultivo de *A. fumigatus* se producen daños en el epitelio respiratorio humano. Se considera que este daño está asociado a la existencia de un compuesto de bajo peso molecular identificado como gliotoxina<sup>(7)</sup>, el cual puede tener una importante relación en la patogenia de la aspergilosis aviar<sup>(6)</sup>.

La capacidad de *A. fumigatus* para producir el metabolito extracelular gliotoxina ha recibido atención en años recientes; se ha demostrado que este compuesto tiene una potente actividad inmunosupresora *in vitro* e *in vivo*, inhibe la adherencia de macrófagos peritoneales y pulmonares a superficies plásticas, además de inducir apoptosis en estas células y algunas otras de la línea hematopoyética. La producción de gliotoxina *in vivo* por *A. fumigatus* fue informada por Bauer *et al.* en 1989<sup>(8)</sup> quienes recobraron la toxina de una ubre bovina infectada por el hongo, encontrando una

## INTRODUCTION

The genus *Aspergillus* is broadly distributed in nature, being its members frequently the cause of opportunistic infections. They produce different types of diseases, which can be allergenic, toxigenic or pathogenic<sup>(1)</sup> depending on the host, on general and local physiologic conditions and also on the causal agent. Aspergilosis can be defined as a process which takes place through the action of a member of the genus *Aspergillus*. However, it generally referred to lung aspergilosis, which is caused mainly by *Aspergillus fumigatus*. When susceptible animals are exposed to high concentrations of air conidia, tissue invasion by the fungus takes place<sup>(2,3)</sup>.

Avian aspergilosis can present itself in domestic birds mainly in two types: acute aspergilosis, characterized by sharp outbreaks in young birds showing high morbidity and mortality, and chronic aspergilosis which is more common in breeder birds and occasionally in mature flocks<sup>(4,5,6)</sup>.

The molecular mechanism through which the fungus enters and causes the infection has not still been completely explained, although *in vitro* studies have established that filtrates of *A. fumigatus* cultures damage the human respiratory epithelium, in association to a low weight molecular compound identified as gliotoxin<sup>(7)</sup>, a relationship which could be of importance in avian aspergilosis pathogenesis<sup>(6)</sup>.

In recent years, a lot of attention has been paid to the ability of *A. fumigatus* to produce the extracelullar metabolite gliotoxin. This compound displays a strong immunosuppressor activity *in vitro* and inhibits the adherence of peritoneal and lung macrophages to plastic surfaces *in vivo*, as well as the induction of apoptosis in these cells and in some other belonging to the hematopoietic process. *In vivo* gliotoxin production by *A. fumigatus* was reported by Bauer *et al.*<sup>(8)</sup> who recovered this toxin from a bovine udder infected by this fungus, finding a concentration of 9.2 mg/udder kg, some 100 times higher than the one which produces morphological changes in *in vitro* cells. It has also been shown that a concentration of 0.2 µg of gliotoxin reduces ciliary movements and damages the respiratory

concentración de 9.2 mg/kg de ubre, siendo esta concentración 100 veces mayor que la informada de producir cambios morfológicos en células *in vitro*; asimismo se ha mostrado que una concentración de 0.2 mg de gliotoxina disminuye el movimiento ciliar y daña el epitelio de la mucosa respiratoria; por esta razón se considera que al ser producida *in vivo*, ayuda al hongo a lesionar a las vías respiratorias, pero es importante señalar que la producción de la toxina tiene como condición la infección activa del hongo<sup>(9)</sup>.

El objetivo del presente estudio fue el de evaluar la producción de gliotoxina por cepas nativas de *A. fumigatus* aisladas de casos clínicos, utilizando crecimiento en medio líquido, extracción con cloroformo, cromatografía en capa fina, cromatografía de líquidos de alta presión y confirmación por espectrometría de masas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 10 cepas de *A. fumigatus*, obtenidas de aislamientos clínicos de aspergilosis aviar colectados en un periodo de tres meses (C-1 a C-10), conformando parte de la colección de cultivos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, y una cepa control (productora de gliotoxina) donada por la micoteca de la Universidad de Glasgow; las cepas se mantuvieron en medio de agar dextrosa papa Sabouraud a 28°C, para su crecimiento; previo a la fase experimental fueron identificadas por medio de los procedimientos rutinarios de microcultivo y comparadas con los manuales de identificación de Raper y Fenell<sup>(10)</sup>; no se utilizaron procedimientos de diferenciación genética por no contar con estos elementos en el laboratorio. Se sabe que el almacenamiento de los aislados en refrigeración no afecta la producción de gliotoxina, la cepa donada por la Universidad de Glasgow ha sido mantenida por lo menos los últimos 20 años a 4°C.

De cada cepa se preparó una suspensión de esporas a una concentración de  $3.1 \times 10^6$  /ml en solución salina fisiológica al 0.9 % y tween 80 al 1 % estéril<sup>(11)</sup>, llevando a cabo el recuento de esporas en

epithelium of the mucous membrane, which explains why it is considered that when produced *in vivo*, it can help the fungus injure the respiratory tract. However, it is important to point out that *in vivo* production of the toxin helps the fungus to damage the respiratory tract, but an active infection by the fungus<sup>(9)</sup> is a prerequisite for this circumstance.

The objective of this study was to evaluate gliotoxin production by native *A. fumigatus* strains isolated from clinical cases, cultured in liquid media, extracted with chloroform, using thin layer chromatography, then high pressure liquid chromatography and confirmation through mass spectrometry.

## MATERIALS AND METHODS

Ten strains of *A. fumigatus* obtained from clinical isolations of avian aspergillosis collected in a period of three months (C-1 to C-10), which form part of the culture collection of the Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México and a control strain (A-20) (gliotoxin producer) donated by the University of Glasgow from its fungi collection were studied. The strains were cultured in agar dextrose potato Sabouraud medium at 28°C, and previous to the experimental phase were identified by means of micro culture routine procedures, and checked with Raper and Fenell<sup>(10)</sup> identification manuals. Genetic differentiation procedures were not carried out because of lack of equipment. It is a known fact that storage of isolated strains in freezing conditions does not affect their ability to produce gliotoxin, the strain donated by the University of Glasgow has been maintained at 4°C for at least 20 years.

A suspension containing  $3.1 \times 10^6$  spores/ml was prepared for each strain in 0.9% physiological saline solution and a 1% sterile tween 80<sup>(11)</sup>. The number of spores was determined in a Neubauer camera, and inoculated in a malt extract media, previously cited as the most appropriate for gliotoxin production<sup>(12)</sup>.

The fungus culture was carried out in 4,000 ml Erlenmeyer flasks, containing 2,200 ml of base media with tampon solution of sodium phosphate 0.1

una cámara de Neubauer; se inoculó en un medio de extracto de malta, previamente referenciado como el más adecuado para la producción de gliotoxina<sup>(12)</sup>.

El cultivo del hongo se realizó en matraces Erlenmeyer, a los que se les agregó la base común (2,200 ml) con solución tampón de fosfato de sodio 0.1 M con pH de 5.8 y se añadieron 600 ml de extracto de malta. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 lb durante 15 min; después de llevar a temperatura ambiente, se adicionaron 1,050 ml de Asparagina resuspendida en solución tampón de fosfatos 0.1 M a pH de 5.8 y esterilizada por filtración Millipore (0.22 mm) y 150 ml del inóculo (inóculo total de  $4.6 \times 10^8$  esporas), teniendo el medio un volumen final de medio de 4 l. Los matraces fueron incubados a 28 °C durante ocho días en una estufa bacteriológica. Durante la incubación, y con el fin de favorecer el desarrollo del hongo, se empleó un sistema de suministro de aire estéril, mediante una bomba Elite 802 utilizando filtros con membrana Millipore (0.22 mm).

#### *Extracción de gliotoxina*

Finalizada la incubación, se separó la biomasa del medio de cultivo de cada uno de los matraces, primero por filtración en papel filtro Whatman No. 1 y posteriormente aplicando vacío. Los filtrados recolectados se colocaron en embudos de separación de 500 ml, realizando tres extracciones secuenciales con 70 ml de cloroformo por cada 140 ml de filtrado. Se recolectaron las fases clorofórmicas y se evaporaron a sequedad en un rotavapor (Buchi R-124); los residuos se suspendieron en éter de petróleo y se guardaron a 4 °C por 24 horas, después de lo cual se separó el éter, y el residuo se llevó a sequedad en el rotavapor, resuspendiéndose en un volumen final de 10 ml de etanol, y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su análisis.

#### *Determinación de la presencia de gliotoxina en las diferentes cepas*

Se determinó la posible presencia de gliotoxina producida por las 10 cepas estudiadas, empleando cromatografía en capa fina utilizando cromatoplasmas Whatman, de sílica gel fluorescencia uv 254, de 0.25 mm de grosor. Las placas fueron desarrolladas

M and a pH of 5.8 and added with 600 ml of malt. The media was sterilized in autoclave at 121°C and 15 lb/sq in pressure for 15 min. After being allowed to cool to room temperature, 1,050 ml of Asparagine suspension in a 0.1M 5.8 pH phosphate tampon solution sterilized through Millipore filtration (0.22 mm) and 150 ml of the inocula (total inocula  $4.6 \times 10^8$  spores), were added for a final volume of 4 liters. These flasks were kept in a bacteriological oven at 28 °C for eight days. During the incubation period, and in order to help development of the fungus, sterile air was supplied by means of an Elite bomb 802 provided with Millipore 0.22 mm membrane filters.

#### *Gliotoxin extraction*

At the end of the incubation period, the biomass in each flask was separated from the culture media, starting with filtration through Whatman #1 filter paper and applying vacuum. The filtrates were placed in 500 ml separation funnels, carrying out three sequential extractions with 70 ml of chloroform for every 140 ml of filtrate. The chlorophormic phases were collected and evaporated to dryness in a Buchi R-124 evaporator, the residues were suspended in petroleum ether and kept at 4°C for 24 hours. Afterwards the ether was separated, and the residue was evaporated to dryness in the evaporator. Then the dry residue was suspended in 10 ml of ethanol, the extracts were stored at 4°C until the moment of its analysis.

#### *Determination of gliotoxin in the strains*

The possible presence of gliotoxin in each of the 10 studied strains was determined using thin layer chromatography by means of Whatman chromatoplates, possessing 254 uv silic gel fluorescence, 0.25 mm thick. The plates were developed using ethyl-hexane acetate (70:30 v/v) and revealed under short wave ultraviolet light and later on with iodine. The determination of gliotoxin in the culture media was carried out through visual comparison with standard gliotoxin (Sigma G9893) as a reference. All determinations for each strain were carried out in triplicate.

#### *Gliotoxin quantification*

To confirm the presence and quantity of gliotoxin produced by each strain, High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) was used in accordance to

empleando acetato de etilo-hexano (70:30 v/v) y reveladas bajo luz ultravioleta de onda corta y posteriormente con yodo. La determinación de la presencia de gliotoxina en los medios de cultivo se realizó por comparación visual con gliotoxina estándar (Sigma G9893) como referencia. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

#### Cuantificación de gliotoxina

Con el propósito de confirmar la presencia y cantidad de gliotoxina producida por las diferentes cepas se empleó Cromatografía de líquidos de alta resolución, (CLAP) de acuerdo al método recomendado por Richard *et al*<sup>(13)</sup>, empleando un cromatógrafo de líquidos marca LDC analytical. La fase móvil fue metanol al 50 % (v/v): agua desionizada-distilada 50 % (v/v). La concentración de gliotoxina producida por las cepas estudiadas, fue cuantificada frente al estándar de referencia de gliotoxina, sólo en el caso de aquellas cepas que presentaron un compuesto con un tiempo de retención igual o similar estadísticamente al del estándar. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

#### Caracterización del compuesto de interés

Para corroborar la presencia de gliotoxina, se empleó una de las cepas productoras. Después de haber realizado la extracción del compuesto producido por la cepa y con el fin de purificar, se le realizó una cromatografía preparativa empleando cromatoplaques de 0.5 mm de grosor (E.Merck, Darmstadt, Alemania), con acetato de etilo-hexano 70:30 v/v como solvente de desarrollo. La caracterización del compuesto se llevó a cabo por espectrometría de masas en un Espectro de masas Jeol-SX-100 y la espectrometría de infrarrojo en un equipo Perkin Elmer 283.

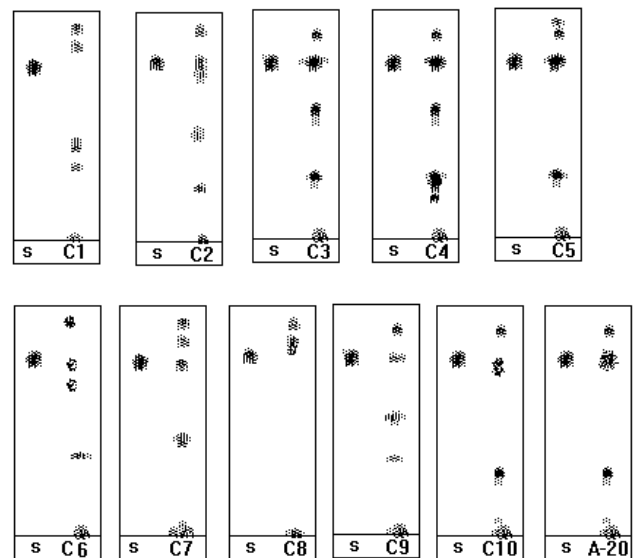
## RESULTADOS

#### Determinación de gliotoxina en las diferentes cepas

En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos del estudio de cromatografía en capa fina de los extractos de las 10 cepas en estudio, de donde se puede observar que las cepas C-2, C-3, C-4, C-5, C-7, C-9 y C-10 presentaron un compuesto con un tiempo de retención (Rf) igual al estándar de

Figura 1. Representación esquemática de las cromatoplaques obtenidas de las 10 cepas de aislamiento clínico de aspergilosis aviar, la cepa control (A-20) y el estándar de gliotoxina (s)

Figure 1. Schematic representation of chromatoplaques obtained from clinical cases of avian aspergillosis, the control strain (A-20) and the gliotoxin standard (s)



the method recommended by Richard *et al*<sup>(13)</sup>, by means of an LDC analytical liquid chromatograph. The mobile phase used was 50 % methanol (v/v): 50 % deionized-distilled water (v/v). Gliotoxin produced by each strain was established through comparison to standard gliotoxin used as a reference, for those strains that showed a compound with a similar retention time to that of the standard. All determinations were carried out in triplicate.

#### Compound characterization

To confirm gliotoxin presence, one of the producing strains was used. After extraction of the compound produced by the strain and with the purpose of purification, a preparative chromatography was carried out using 0.5 mm thick chromatoplates (E.Merck, Darmstadt, Germany), with ethyl-hexane acetate 70:30 v/v as a developing solvent. Compound characterization was carried out through mass spectrometry in a Jeol-SX-100 Mass Spectrum and through infrared spectrometry with a Perkin Elmer 283 equipment.

gliotoxina, y al producido por la cepa control A-20. La cepa C-8, presentó un compuesto con un Rf ligeramente mayor que el del estándar y la cepa control A-20, mientras que las cepas C-1 y C-6 no presentaron la producción de un compuesto con un Rf similar al del estándar de gliotoxina o la cepa control A-20, presentando la producción de diversos compuestos con polaridad diferente. La cromatografía en capa fina, es una prueba presuntiva, razón por la cual se procedió a la aplicación de CLAP y gases masas, pruebas que permiten la identificación y caracterización de los compuestos<sup>(14,15)</sup>.

#### *Cuantificación de gliotoxina por CLAP*

En el Cuadro 1 se registran los picos más abundantes obtenidos de los extractos producidos por las cepas estudiadas, así como su tiempo de retención y el porcentaje de área de cada tipo, de lo cual resulta importante mencionar que las cepas que presentaron un compuesto con un tiempo de retención igual o similar al tiempo de retención de la gliotoxina fueron las cepas C-3 y C-8, mientras que las cepas C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-9 y C-10 no presentaron un compuesto con un Rf igual o similar al del estándar de gliotoxina.

#### *Caracterización del compuesto de interés*

De los resultados obtenidos en CLAP se seleccionó la cepa C-3 para la caracterización de la molécula. Para este fin, se hizo una réplica del método de crecimiento de *A. fumigatus* para la producción de gliotoxina en un volumen de 30 l, del cual se obtuvo un concentrado que posteriormente fue purificado por cromatografía preparativa, obteniendo 30 mg de un precipitado blanco, al cual se le realizó el punto de fusión, que presentó un valor de 219-220 °C. El punto de fusión encontrado para el estándar de gliotoxina es de 221 °C<sup>(16)</sup>, el punto de fusión obtenido para el compuesto considerado como gliotoxina, es muy cercano al del estándar, lo que indica que podría ser gliotoxina.

En la Figura 2 se muestra la espectrometría de masas por impacto electrónico del compuesto purificado, encontrando una señal masa/intensidad (m/z) de 326, que corresponde al ión molecular encontrado para la gliotoxina. También se obtuvo la señal referente a m/z de 262, que corresponde al tipo base.

Cuadro 1. Registro de los picos obtenidos en CLAP de los extractos de las 10 cepas aisladas de casos clínicos de aspergilosis aviar y del estándar de gliotoxina (S)

Table1. Responses obtained through HPLC from extracts of strains isolated from avian aspergillosis clinical cases and the gliotoxin standard (S)

Strain	Peaks (No)	Retention time (min)	Area (%)
S	1	3.03	79.77
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
C6	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
		9.12	16.38
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

HPLC= High pressure liquid chromatography.

## DISCUSIÓN

El estudio de cromatografía en capa fina de los extractos obtenidos de las 10 cepas estudiadas, permitieron evaluar por comparación visual frente al estándar y de la cepa control, la posible presencia de gliotoxina en los extractos. Tomando en cuenta que las cepas C-2, C-3, C-4, C-5, C-7, C-9 y C-10, presentaron un compuesto con el mismo Rf que el producido por el estándar de gliotoxina y la cepa control, se puede inferir que puede ser el mismo compuesto, y en el caso de la cepa C-8 que presentó un compuesto con un Rf ligeramente mayor al estándar y al control, se puede considerar también, que este compuesto podría ser gliotoxina, ya que las diferencias en el corrimiento de los compuestos fue mínima y podría deberse a aspectos del manejo técnico de las cámaras de desarrollo. Aunque los resultados obtenidos en la cromatografía en capa fina son de tipo cualitativo, permitieron diferenciar los compuestos producidos por las cepas estudiadas y seleccionar aquéllos que producen un compuesto parecido o igual a la gliotoxina.

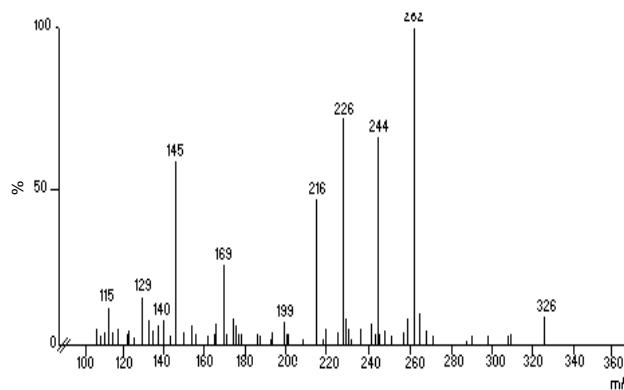
Las cepas C-1 y C-6 presentaron la producción de diversos compuestos, pero ninguno con un Rf similar o igual al del estándar, por lo que puede considerarse que estas cepas no son productoras de gliotoxina.

En relación a los estudios de CLAP, la gliotoxina estándar presentó un tiempo de retención de 3.03 min. En el Cuadro 1 se puede ver que todas las cepas estudiadas, presentaron la producción de por lo menos seis compuestos diferentes, las cepas que presentaron un compuesto con un tiempo de retención aproximadamente igual al estándar de gliotoxina, fueron las cepas C-3 y C-8, mientras que las cepas C-1, C-2, C-5, C-6, C-7, C-9 y C-10 presentaron compuestos con tiempo de retención menores y mayores al estándar, mas no iguales. En el caso de la cepa C-4, no se pudo corroborar la presencia de compuestos por CLAP, debido a la pérdida del extracto en la determinación final.

La cromatografía de líquidos de alta presión, permitió corroborar la producción de gliotoxina por parte de las cepas, así como cuantificar la producción de la toxina por parte de las cepas

Figura 2. Espectro de masas de gliotoxina aislada de la cepa C-3 de *A. fumigatus*

Figure 2. Mass spectrum of gliotoxin isolated from *A. fumigatus* strain C-3



## RESULTS

### *Gliotoxin determination in the strains*

In Figure 1 the results of the thin layer chromatography of the extracts of the 10 strains are shown. Strains C-2, C-3, C-4, C-5, C-7, C-9 and C-10 showed a compound with a retention time ( $R_t$ ) similar to that of standard gliotoxin, and to that of the control strain A-20. The strain C-8 presented a compound with a slightly higher  $R_t$  than that of the standard and the control strain A-20. Strains C-1 and C-6 did not show production of a compound with a  $R_t$  to similar gliotoxin standards or the control strain A-20, showing production of several compounds with different polarity. Since thin layer chromatography is a presumptive test, HPLC and mass spectrometry were applied, because these tests allow compound identification and characterization<sup>(14,15)</sup>.

### *Gliotoxin quantification through HPLC*

In Table 1 are shown the number of picks from extracts obtained from the strains being studied, as well as their retention time and the concentration percentage. It is important to mention that strains C-3 and C-8 showed a compound with a same or similar  $R_t$  to the gliotoxin standard. Strains C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-9 and C-10 did not show a compound with a same or similar  $R_t$  to the gliotoxin standard.

productoras, que fue de 5.28 mg en el extracto de 5 ml obtenidos a partir de los 4 l de medio original por parte de la cepa C-3 y 68.5 mg en el extracto de 5 ml por la cepa C-8.

Es importante hacer notar que aunque el estándar de gliotoxina empleado se consideraba 100 % gliotoxina, la cromatografía de líquidos de alta presión, mostró la presencia de otros compuestos diferentes a ésta y tan sólo un 79.7 % de gliotoxina, lo cual podría deberse a degradación del estándar.

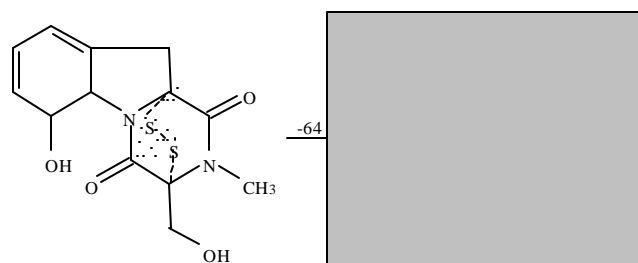
El estudio de espectrometría de masas confirmó que el compuesto con un Rf similar al de la gliotoxina, producido por las cepas C-3 y C-8 es gliotoxina. Se basó en el espectro de masas y en el resultado de una señal de 326 m/z que corresponde al ión molecular encontrado para este compuesto<sup>(8)</sup>. Se obtuvo la señal referente a 262 m/z, que representa el pico base. El patrón de fragmentación que se manifiesta en el espectro indica una pérdida de 64 unidades m/z, que corresponde a un puente de disulfuro (Figura 3). Los datos obtenidos confirman que la molécula corresponde a gliotoxina.

La técnica de espectrometría de infrarrojo muestra que los grupos funcionales grupo OH (3430.1), Csp<sup>2</sup>-H (3051.2) y el C=O (1467.091), están presentes y que estos compuestos pertenecen al compuesto en estudio.

La espectrometría de masas y de infrarrojo son pruebas que permitieron caracterizar la molécula de gliotoxina y comprobar que los resultados de la cromatografía de líquidos de alta presión es una prueba adecuada para determinar la presencia de gliotoxina.

Figura 3. Representación de la pérdida de un puente disulfuro en gliotoxina

Figure 3. Loss of a disulphur bridge of gliotoxin



### Characterization of the compound of interest

From the results obtained with HPLC, strain C-3 was selected for molecule characterization. For this purpose a replica of the growth method of *A. fumigatus* was made for gliotoxin production in a 30 l volume. A concentrate was obtained that was later on purified by means of preparative chromatography, obtaining 30 mg of a white precipitate, with a 219-220 °C fusion point. The fusion point for standard gliotoxin is 221 °C<sup>(16)</sup>. The fusion point obtained for the compound being considered as gliotoxin, is very close to that of the gliotoxin standard, which indicates that it could be gliotoxin.

Figure 2 shows, the mass spectrometry results obtained by electronic impact of the purified compound, finding a sign mass/intensity (m/z) of 326 which corresponds to the opposite molecular ion for gliotoxin. A sign referred to m/z of 262, which corresponds to the base type was also obtained.

### DISCUSSION

Thin layer chromatography studies of the diverse extracts obtained from the 10 strains, allowed to compare through visual comparison, gliotoxin standard and the control strain, possible gliotoxin presence in the extracts. Taking into account that strains C-2, C-3, C-4, C-5, C-7, C-9 and C-10, produced a substance showing the same Rt than the gliotoxin standard and the control strain, it could be the same substance. In the case of strain C-8 that showed a compound with a slightly higher Rt than the standard and control strains, it could also be considered to be gliotoxin, since differences in compound Rt were minimal and could be due to technical handling of the developing chambers. Although results obtained through thin layer chromatography are only qualitative, they allow to differentiate the compounds produced by the strains being studied and to select those which produced a same or similar compound to gliotoxin.

Strains C-1 and C-6 produced several compounds, but none of them with a Rt similar or equal to that of the standard, these strains can be considered as non-gliotoxin producers.



Los resultados obtenidos de la cromatografía en capa fina, cuantificados de la cromatografía de líquidos de alta presión y corroborados por espectrometría de masas e infrarrojo, confirman que de las 10 cepas aisladas de casos clínicos de aspergilosis aviar, tan solo dos produjeron gliotoxina y seis más presentaron compuestos similares, lo que hace pensar que no sólo la gliotoxina, como toxina producida por *A. fumigatus*, es la causante de la patogenicidad, lo cual coincide con lo sugerido en la literatura por diversos autores<sup>(17,18,19)</sup> quienes han estudiado la relación que tienen las proteínas y las glicoproteínas en el proceso, actuando como ligandos de esporas de *A. fumigatus*, o actuando como promotores de adherencia del hongo.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

El presente estudio muestra que la producción de gliotoxina no se presenta en todas las cepas de *A. fumigatus* y que existen una serie de compuestos similares que pueden jugar un papel importante en el esclarecimiento de la patogenicidad de la enfermedad. Estos hallazgos están en contradicción a lo citado por otros grupos de investigación, quienes informan que la gliotoxina es producida por todas las cepas del hongo. De hecho la investigación aquí descrita nos lleva a entender que dentro de la especie *A. fumigatus* existen por lo menos tres diferentes grupos de cepas: a) no productoras, b) productoras de compuestos similares a la gliotoxina y c) productoras de gliotoxina.

## LITERATURA CITADA

1. Howard DH. Fungi pathogenic for humans and animals. Part B. Pathogenicity and detection . Nueva York: Marcel Dekker; 1985.
2. Henrich AT. An endotoxin from *Aspergillus fumigatus*. J Immunol 1939;36:319-338.
3. Petrak MLW. Diseases of cage and aviary birds. 2<sup>d</sup> ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1982.
4. Smith JMB. Opportunistic mycoses of man and other animals. C.A.B. International Mycological Institute. Kew, United Kingdom, 1989.
5. Peden WM, Rhoades KR. Pathogenicity differences of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* in turkeys. Avian Diseases 1992;36:537-542.
6. Richard JL, Debey MC, Chemette R, Pier AC, Hasegawa A, Lund A, Bratgerg AM, Padhye AA, Connole MD. Advances in veterinary mycology. J Med Vet Mycol 1994 (Suppl 1):169-187.

Regarding the HPLC studies, the gliotoxin standard showed a retention time of 3.03 min. All the studied strains presented the production of at least six different compounds (Table 1). The strains that showed a compound with a retention time approximately similar to the gliotoxin standard were C-3 and C-8, while strains C-1, C-2, C-5, C-6, C-7, C-9 and C-10 presented compounds with retention times smaller and bigger but not equal to that of the standard. In the case of strain C-4, the presence of compounds by means of HPLC could not be confirmed, due to a loss of extract in the final determination.

HPLC allowed to corroborate gliotoxin production for several strains, as well as to quantify the production of this toxin by producing strains. These were 5.28 µg in the 5 ml extract obtained from the 4 l original media by strain C-3, and 68.5 µg in the 5 ml extract for strain C-8.

It is important to remark that although the gliotoxin standard used was considered 100 % gliotoxin, HPLC tests showed the presence of other compounds different to this and only 79.7 % gliotoxin, possibly due to degradation.

The mass spectrometry study confirmed that the compounds with a similar Rt to gliotoxin, produced by strains C-3 and C-8 are gliotoxin. This data was based on the one obtained through mass spectrometry and in the result of a 326 m/z signal which corresponds to the opposite molecular ion for this compound<sup>(8)</sup>. A 262 m/z signal that represents the base was also obtained. The fragmentation pattern shown in the spectrum indicates a loss of 64 m/z units which corresponds to a disulphur bridge (Figure 3). The data obtained confirms that this molecule corresponds to gliotoxin.

The technique of infrared spectrometry shows that the functional groups OH (3430.1), Csp 2-H (3051.2) and the C=O (1467.091), are present and that these compounds belong to the compound under study.

Mass spectrometry and infrared tests allowed to characterize the gliotoxin molecule and to confirm

7. Amitani R, Taylor G, Elezis EN, Llewellyn CJ, Mitchell J, Kuze F, Cole PJ, Wilson R. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infection Immunity* 1995;3266-3271.
8. Bauer J, Abott M, Gedek B. Isolation of a Mycotoxin (gliotoxin) from a bovine udder infected with *Aspergillus fumigatus*. *J Med Vet Mycol* 1989;27:45-50.
9. Belkacemi L, Barton RC, Hopwood V, Evans EGV. Determination of optimum growth conditions for gliotoxin production by *Aspergillus fumigatus* and development of a novel method for gliotoxin detection. *Med Mycol* 1999;37(4):227-234.
10. Raper KB, Fennel DI. *The Genus Aspergillus*. Baltimore: William & Wilkins, Co.; 1965.
11. López MR, Méndez TLJ, Hernández HF, Castañón OR. *Micología médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. 1ª ed. México: Trillas; 1995.
12. Moreno RC. *Desarrollo y evaluación de un método para la producción de gliotoxina [tesis maestría]*. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 1998.
13. Richard JL, Lyon RL, Fichtner RE, Fichtner RE, Ross PF. Use of thin layer chromatography for detection and high performance liquid chromatography for quantitating gliotoxin from rice cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Mycopathologia* 1989;107:145-151.
14. Primo YE. *Química orgánica básica y aplicada de la molécula a la industria*. 1ª ed. Barcelona, España: Editorial Reverté; 1994.
15. Skoog DA, Leary JJ. *Análisis instrumental*. 4ª ed. España: Mac Graw Hill; 1994.
16. Johnson JR, Bruce WF, Dutchar JD. Gliotoxin. The antibiotic principle of *Gliocladium fimbriatum*. I Production, physical and biological properties. *J Am Chem Soc* 1943;65:2009.
17. Tronchin G, Bouchara JP, Ferron M, Larcher G, Chabasse D. Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* Conidia: Correlation between adherence, agglutination and rearrangements of the cell wall. *Cand J Microbiol* 1995;41:714-721.
18. Coulot P, Bouchara JP, Renier G. Specific interaction of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. *Infect Immun* 1994;62:2169-2177.
19. Chaudhary SK, Sadana JR. Serum protein and certain immune responses in Japanese quail experimentally infected with *Aspergillus fumigatus*. *Ind J Poultry Sci* 1992;27(3):148-152.

that HPLC is a test adequate to determine the presence of gliotoxin.

Results obtained in thin layer chromatography, quantified by HPLC and corroborated by mass and infrared spectrometry, confirm that only 2 out of the 10 strains isolated from clinical cases of avian aspergillosis produced gliotoxin, and six more showed a similar compound. This suggests that not only gliotoxin, being the toxin produced by *A. fumigatus*, is the cause for this pathogenesis, which agrees with other reports<sup>(17,18,19)</sup> in which the relationship that proteins and glycoproteins have in the process, have been studied acting as agglutinins of spores of *A. fumigatus*, or as promoters for the adherence of the fungus.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

This study shows that not every strain of *A. fumigatus* produces gliotoxin and also confirms the presence of a series of similar compounds which can play an important role in the clarification of the pathogenesis of the disease. These findings are in contradiction to what has been reported by other research groups, who inform that gliotoxin is produced by every strain of the fungus. In fact, the results described here help us to understand that *A. fumigatus* comprises at least three different groups of strains: a) non producers, b) producers of a compound similar to gliotoxin and c) gliotoxin producers.