

Producción de beauvericina por *Beauveria bassiana* 9401 aislado sobre *Lutzomyia* sp. (Diptera: Psychodidae) vectores de Leishmaniosis

.....

Production of beauvericina by *Beauveria bassiana* 9401 isolated from *Lutzomyia* sp. (Diptera: Psychodidae) vectors of Leishmaniosis

.....

Sandra Uribe Soto¹
Yamile Saldarriaga²
Fabio Pineda³
Gabriel Jaime Arango⁴
Iván Darío Vélez⁵

Resumen

En el presente estudio se implementó una metodología que permitió determinar la producción de la micotoxina beauvericina por el aislamiento 9401 del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, realizado sobre *Lutzomyia* sp. (Diptera: Psychodidae) insecto potencialmente transmisor de Leishmaniosis. La micotoxina fue detectada en fracciones provenientes de extractos crudos en acetato de etilo obtenidos a partir del micelio seco del hongo. La identificación final fue realizada mediante cromatografía líquida de alta performance HPLC determinándose la cantidad de micotoxina obtenida como 2.7% del extracto crudo del hongo. La acción de la beauvericina fue evaluada sobre la línea celu-

lar C6/36 de *Aedes albopictus* en términos de alteraciones morfológicas y dosis letal 50 DL50: 25ng.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*, Micotoxina, Beauvericina, *Aedes albopictus*, Línea celular.

Summary

The *in vitro* production of the mycotoxin beauvericin by *Beauveria bassiana* 9401 originally isolated from *Lutzomyia* sp. (Diptera: Psychodidae) potential vector of Leishmaniosis was determined. The mycotoxin was detected in fractions obtained from crude extracts of dry mycelia. The identification and quantification of the mycotoxin was done by Liquid Chromatography High Performance HPLC; approximately 2.7% of crude extract was beauvericin. The cytotoxic effects of beauvericin in *Aedes albopictus* C6/36 cell line defined as morphological alterations and diminution in cellular viability was demonstrated, the CL50 value of an fraction with 10% of beauvericin for cells was estimated as 25 ng/ml.

Key words: *Beauveria bassiana*, Micotoxin, Beauvericina, *Aedes albopictus*, Cellular line.

Introducción

El hongo *Beauveria bassiana* es uno de los entomopatógenos más ampliamente estudiados por su potencial como agente de control biológico; debido a su frecuente utilización y a las grandes cantidades de esporas que se aplican en el campo, aspectos como su patogenicidad y su seguridad para organismos no blanco, están siendo constantemente reevaluados.

En cuanto a la patogenicidad la producción de micotoxinas como la beauvericina ha generado gran interés, ya que al parecer estas sustancias son responsables en buena parte del grado de patogenicidad de este hongo y se constituyen en la forma principal para bloquear los mecanismos de respuesta inmune del insecto (Vey *et al.* 1985; Khachatourians 1991; Eyal *et al.* 1994).

Adicionalmente, estudios recientes realizados por la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA) con beauvericina producida por aislamientos de *B. bassiana*, utilizados en ecosistemas acuáticos para controlar larvas de mosquitos, mostraron alto grado de citotoxicidad en camarones, peces y cangrejos de estuario, lo cual ha generado importantes controversias en cuanto al papel de esta micotoxina en relación con la inocuidad del hongo para otros organismos (Hamil *et al.* 1969; Genthner y Middaugh 1992; Genthner *et al.* 1994; Middaugh *et al.* 1994).

A pesar de que *B. bassiana* es un entomopatógeno ampliamente utilizado en programas de biocontrol y a la importancia que revisten micotoxinas como la beauvericina producida por este hongo, en países como Colombia se han realizado pocos estudios sobre el mecanismo de acción de la misma o sobre su producción por los aislamientos del hongo y se carece de una metodología estándar que permita caracterizar los diferentes aislamientos en cuanto a tal producción. Estos estudios son necesarios si se considera que, de acuerdo con algunos autores, tanto la producción como la toxicidad de la beauvericina varían dependiendo de la procedencia del aislamiento (West y Briggs 1968; Susuki *et al.* 1977; Quiot *et al.* 1993; Roberts 1986; Kchachatourians 1991).

En la presente investigación, modificando algunas metodologías previamente descritas que aparecen en la literatura, se estandarizó una metodología de laboratorio que permitió determinar la presencia de beauvericina en extractos procedentes del micelio del aislamiento 9401 de *B. bassiana*, un aislamiento que reviste especial interés por su patogenicidad, comprobada hacia insectos de importancia médica como *Aedes* sp. y *Lutzomyia* sp.

Se pretende que esta metodología pueda ser utilizada para detectar la producción de beauvericina por otros aislamientos de este hongo y que a su vez facilite el aislamiento y purificación para posteriores estudios sobre el mecanismo de acción.

Con el objeto de verificar el efecto citotóxico de la beauvericina, se realizaron algunas pruebas *in vitro* con la línea celular C6/36 de *Aedes albopictus* evaluando la citotoxicidad en términos de alteraciones morfológicas y dis-

¹ Ingeniera Agrónoma MSc. Investigador asociado PECET Universidad de Antioquia A.A. 1226 Medellín, Colombia.

² Licenciada en Biología MSc. Profesora de Micología Dpto. Biología, Fac. Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Antioquia A.A. 1226 Medellín, Colombia.

³ Licenciado en Biología y Química MSc. Profesor de Micología Dpto. Biología, Fac. Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Antioquia A.A. 1226 Medellín, Colombia.

⁴ Químico PhD. Coordinador Laboratorio de Productos Naturales, Fac. Química Farmacéutica Universidad de Antioquia A.A. 1226 Medellín Colombia.

⁵ Médico tropicalista. Coordinador Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

minución en la viabilidad celular. La citotoxicidad encontrada en esta línea celular vislumbra la posibilidad de estudiar y entender el mecanismo de acción de la micotoxina a nivel molecular usando esta línea como modelo *in vitro* para las pruebas.

Materiales y Métodos

Cultivo y preservación del hongo *Beauveria bassiana*

El hongo se mantuvo por cultivo en medio sólido Sabouraud Dextrosa Agar (SDA); para la obtención de conidias se utilizó la técnica de Rombach (1988) inoculándose el hongo durante dos semanas al cabo de las cuales se retiró el hongo con la ayuda de un bisturí estéril y se preparó una solución madre de esporas con agua destilada estéril (10 ml) más Tween 80 al 0,1%, se realizaron diluciones de 10^3 y conteo en la cámara de Neubauer para obtener la concentración de esporas deseada.

Las conidias fueron sembradas en caldo Sabouraud a una concentración de 140×10^6 , en erlenmeyers que contenían 250 ml de medio que fueron dejados en agitación durante diez días al cabo de los cuales el hongo se cosechó al vacío mediante un embudo de filtración determinándose el peso en mg después de secarse a 35°C durante 2 horas; antes de secarse la masa micelial fue lavada tres veces con agua destilada estéril.

Obtención de extractos y determinación de la beauvericina

Para la obtención de los extractos el micelio seco fue suspendido en metanol durante una semana, posteriormente éste fue separado mediante filtración y el metanol fue eliminado por rotaevaporación, los extractos metanólicos fueron resuspendidos en acetato de etilo durante un día y finalmente, después de eliminar el acetato de etilo por rotaevaporación se determinó el peso de extracto en mg por gramo de micelio seco.

El fraccionamiento de los extractos se realizó mediante columnas de cromatografía utilizando como soporte inerte sílica gel, previa determinación de la fase o eluyente por cromatografía de capa fina.

Las fracciones más puras, con migración similar a la beauvericina en capa fina y que en infrarojo presentaron las señales características de beauvericina C=O(éster) 1745 y C=O(amida) 1660, fueron llevadas a cromatografía líquida de alta performance HPLC para verificar, mediante comparación con el estándar, la presencia de la micotoxina (Zocher y Kleinhauff 1982).

Para la separación en el HPLC se utilizó una columna C18 octadecilsilano fase reversa, con una longitud de 30 cm, diámetro interno 4 y tamaño de partícula 5 micras; como diluyente se usó metanol y como fase móvil acetonitrilo - agua en un gradiente lineal de 0 a 20 minutos iniciando 70:30 y terminando 90:10. A partir de 21 minutos acetonitrilo 100% hasta los 25 minutos.

El volumen de inyección fue 100 μ lts y el flujo constante de 1 mililitro por minuto; este procedimiento fue realizado de acuerdo con las metodologías modificadas de Genthner *et al.* (1994) y Gupta *et al.* (1995).

La cantidad de micotoxina detectada en las muestras fue expresada como mg de toxina por mg de fracción.

La proporción en porcentaje de micotoxina en el extracto crudo fue calculada teniendo en cuenta la cantidad de muestra en miligramos obtenida del extracto.

Pruebas en la línea celular

La línea celular C6/36 de *Aedes albopictus* K.R.P Singh (1967) fue mantenida en medio esencial mínimo MEM con sales más suplementos: suero fetal bovino SFB, L-glutamina 0,1% y mezcla de vitaminas 1%.

Las células fueron cultivadas a una concentración inicial de 6×10^5 en botellas para cultivo celular e incubadas a 33°C en medio de crecimiento con SFB al 10%, posteriormente fueron desprendidas con un policía de caucho y resuspendidas durante dos días en medio MEM con SFB al 2%.

Al momento de las pruebas se verificó la viabilidad de las células mediante dilución 1:10 con colorante vital eosina al 0,1% contando las células viables con la ayuda de un hemocitómetro; se realizaron las pruebas con poblaciones celulares cuya viabilidad fue igual o superior al 90%, de acuerdo con lo establecido por Phillips (1973).

Para las pruebas, las células fueron dispensadas en placas para cultivo celular de 25 pozos a una concentración de $7,5 \times 10^4$ células por pozo e incubadas con SFB al 10% durante cuatro horas, posteriormente el medio de cultivo de las células fue reemplazado por medio fresco en el cual había sido diluida una fracción con 10% de beauvericina detectada por HPLC.

Las diluciones de la fracción con la micotoxina en el medio de cultivo celular fueron 1/2, 1/10, 1/100 y 1/1000, cada una de las cuales fue considerada como un tratamiento. Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento y se utilizaron como controles células sin tratar y células tratadas con una fracción en la

cual no se detectó beauvericina mediante HPLC.

Las células se incubaron y se realizó recuento y determinación de viabilidad a las 24 horas. La citotoxicidad fue evaluada en términos de disminución en la viabilidad medida con colorante vital eosina, alteraciones morfológicas y dosis letal 50 DL50, este valor fue determinado mediante el modelo de regresión lineal, curva sigmoidea dosis-respuesta con pendiente fija (prisma).

Resultados y Discusión

Obtención de los extractos y detección de la beauvericina

El peso de extracto final en acetato de etilo fue 36.4 mg/g de micelio seco; al comparar los tiempos de retención y los cromatogramas del estándar con las fracciones obtenidas a partir de los extractos del hongo se verificó la presencia de la micotoxina en las fracciones obtenidas utilizando como eluentes hexano, diclorometano, acetato de etilo, en proporción: 8: 1,5: 0,5 y diclorometano: hexano 9,8: 2,0. Los picos con tiempos de retención de 12,8 y 12,6 corresponden a la beauvericina, el tiempo de retención del estándar fue 12.8 (Fig 1).

La cantidad de beauvericina fue determinada como 0,1 y 0.0038 mg/mg de fracción llevada al HPLC, el porcentaje de la micotoxina en el extracto crudo fue 2.7% y la producción estimada de la micotoxina por gramo de micelio seco 0.72 mg.

Estos resultados comparados con los obtenidos por Genthner *et al.* (1994) y Gupta *et al.* (1995), en estudios similares con otros aislamientos de *B. bassiana*, confirman la variabilidad en la producción de la beauvericina por los diferentes aislamientos del hongo; es decir, en cuanto al rendimiento o cantidad obtenida por gramo de micelio seco; sin embargo, debe considerarse que las diferencias en las técnicas utilizadas para la extracción y cuantificación de la toxina pueden constituir en sí mismas una fuente de variación.

Igualmente, el crecimiento, la producción de micelio y de esporas y por lo tanto de micotoxinas, como resultado del metabolismo del hongo, están seguramente influenciados por aspectos como el medio de cultivo utilizado así como el tiempo y la forma de incubación del mismo: estacionaria o en agitación (Rombach 1988).

Pruebas de citotoxicidad

La disminución en la viabilidad de las células de *Aedes albopictus* tratadas con la fracción con 10% de beauvericina aparece en la figura 2; se observó que los efectos fueron marcados con las concentraciones más altas y que

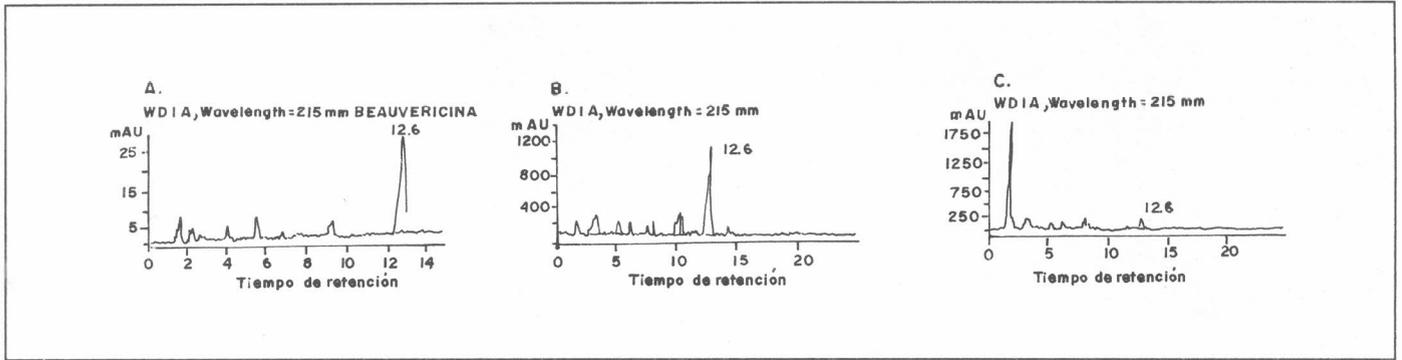


Figura 1. Perfil de separación HPLC para la beauvericina. A. Beauvericin (Sigma chemical Co.) B., C. Fracciones obtenidas a partir de extractos de Bb.9401.

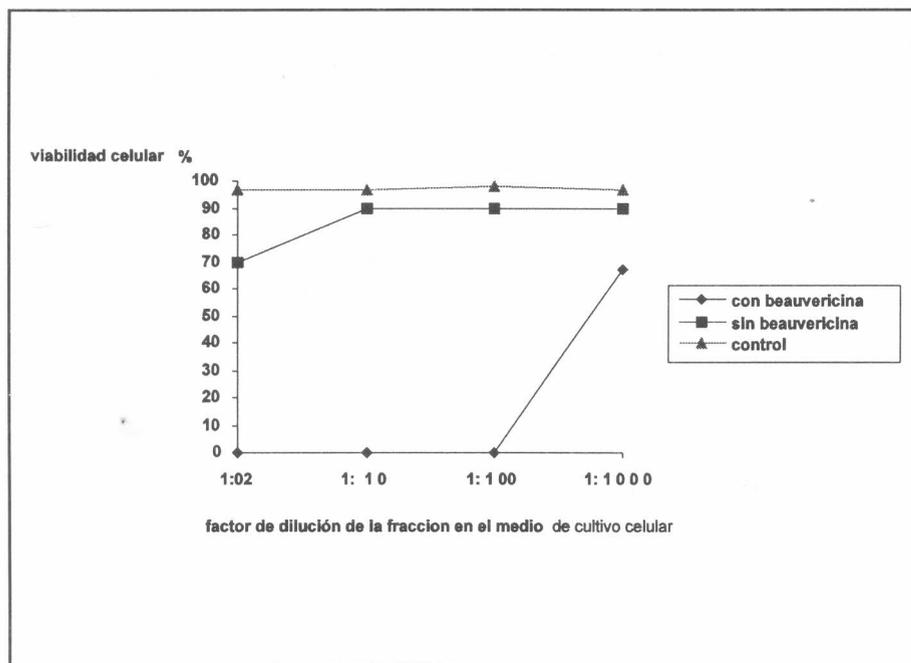


Figura 2. Efecto de la fracción con 10% de beauvericina detectada por HPLC sobre la línea celular C6/36 de *Aedes albopictus*.

disminuyeron a medida que aumentó el factor de dilución en el medio de cultivo celular.

En las células tratadas con la fracción con beauvericina, diluida entre 1/2 - 1/100 en el medio de cultivo celular, se observó destrucción y desprendimiento celular a las pocas horas de exposición; por lo tanto, la viabilidad de las células fue cero cuando se estimó con colorante vital eosina observándose algunas células adheridas al fondo del plato y sólo con diluciones de 1/100.

Con dilución de la beauvericina a 1/1000 en el medio de cultivo celular, el contorno de las células se alteró y se presentó retracción de los pseudópodos, observándose

globulosas y con marcada granulación del citoplasma. (Figs. 3 y 4).

Estas células son procedentes del intestino del insecto y por lo tanto son una línea epitelial donde la adhesión de las células se da mediante pseudópodos, por ello la retracción de los mismos es considerada como importante señal de citotoxicidad cuando se utilizan este tipo de células como modelo *in vitro* para evaluar citotoxicidad (Quiot *et al.* 1993a; Kopeck y Jegorov 1992).

La dosis letal 50 (DL50) fue estimada como 25 ng/ml, valor que está de acuerdo con el encontrado en ensayos complementarios con la beauvericina estándar 18 ng/ml (datos no mostrados). Lo anterior, sumado a la ausen-

cia de alteraciones en las células usadas como control, permite concluir que la citotoxicidad encontrada en las células tratadas con la fracción seguramente es debida a la beauvericina.

Las alteraciones encontradas en las células tratadas corresponden a las descritas por otros autores como efectos de citotoxicidad causados *in vitro* por micotoxinas; en el caso de la beauvericina se ha sugerido que ésta actúa como un ionóforo que afecta el transporte de cationes a través de la membrana, lo cual explicaría la destrucción celular (Roberts 1986); las dosis letales 50 (DL 50) de 25 ng encontradas para las células C6/36 sugieren la potente acción de la micotoxina en especial si se tiene en cuenta que micotoxinas como las destruxinas producidas por *Metarhizium anisopliae*, las cuales poseen similar estructura molecular, solo causaron efectos citotóxicos en la misma línea celular a concentraciones de 50 µg/ml (Kopeck y Jegorov 1992).

Los resultados del presente trabajo donde se confirma la producción *in vitro* de la micotoxina beauvericina por el aislamiento 9401 de *Beauveria bassiana* cuya patogenicidad ha sido previamente evaluada *in vitro* para *Lutzomyia* sp., *Culex* sp. y *Aedes* sp. (Uribe *et al.* 1994). Sierra *et al.* (1995) sugieren que probablemente esta micotoxina juega un papel importante en el proceso de patogénesis del hongo hacia estos insectos.

Se ha sugerido que la producción de metabolitos tóxicos por *B. bassiana* y en especial de beauvericina, no ocurre en todos los aislamientos y que puede ser afectada por factores como la procedencia de los mismos. En el presente estudio la caracterización del aislamiento Bb.9401 como productor de la micotoxina constituye un avance en el proceso de búsqueda y selección de agentes de control microbiológico para disminución de insectos de importancia médica, actividad desarrollada por el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET

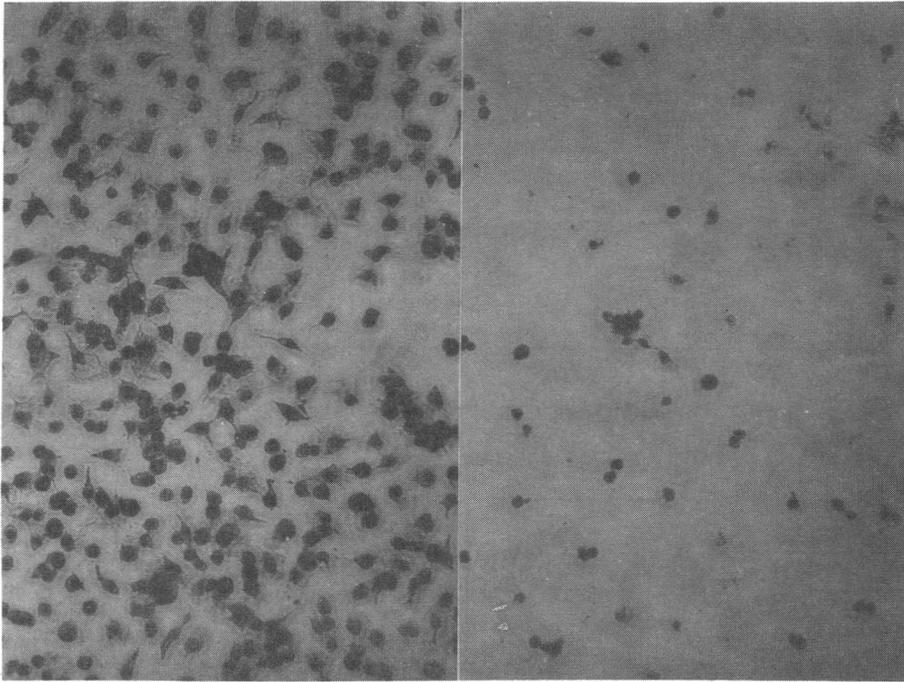


Figura 3. Células C6/36 *Aedes albopictus* sin tratar y tratadas con beauvericina (0.01 mg/ml) (40X) (microfotografía tomada por Gonzalo R., Laboratorio de Reproducción U. de A.).

de la Universidad de Antioquia; sin embargo, para su utilización en el campo deberán realizarse estudios adicionales.

Conclusiones

- La extracción de la beauvericina puede realizarse a partir del micelio seco de *B. bassiana* después de crecer el hongo en medio líquido durante diez días, tiempo que corresponde a la fase de crecimiento activo del hongo.
- La extracción de beauvericina a partir del micelio de *B. bassiana* puede realizarse como sigue:
 - a. Secado del micelio a 35°C durante dos horas.
 - b. Suspensión del micelio en metanol durante una semana.
 - c. Obtención del extracto crudo mediante filtración y eliminación del metanol por rotaevaporación.
 - d. Fraccionamiento del extracto seco por cromatografía de columna y elución de las fracciones con hexano, diclorometano, acetato de etilo en proporciones 8:1.5:0.5 y diclorometano hexano 9.8:2.
- La detección y cuantificación de la beauvericina (a partir de fracciones obtenidas de la forma anteriormente descrita) puede realizarse mediante cromatografía

líquida de alta performance HPLC bajo las siguientes condiciones: columna c18-fase reversa, diluyente metanol y fase móvil acetonitrilo-agua en un gradiente lineal de 20 minutos iniciando con 70:30 y terminando 90:10 con un flujo constante de 1 mililitro por minuto.

- Bb 9401 produce *in vitro* la beauvericina y bajo la técnica utilizada tal producción fue estimada como 0.72 mg/gr de micelio seco del hongo.
- La beauvericina posee un marcado efecto citotóxico sobre la línea celular de *Aedes albopictus* con una DL50 de 25ng/ml.

Recomendaciones

- Ya que la beauvericina parece ser una micotoxina potente, sería de gran importancia caracterizar los aislamientos utilizados en el campo de acuerdo con su producción y por consiguiente, el uso de aislamientos que la producen, como Bb.9401, deberá ser cuidadosamente evaluado en estudios toxicológicos y ambientales que permitan determinar los riesgos potenciales del hongo y la micotoxina para organismos no blanco incluyendo el hombre.
- Es necesario, dada la disponibilidad de una metodología para el aislamiento y purificación de la micotoxina, implementar es-

tudios que permitan entender y precisar su verdadero papel en la patogénesis del hongo.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias a la financiación otorgada por el Comité de Investigaciones de la Universidad de Antioquia (CODI). Al doctor Javier Díaz por el suministro de la línea celular C6/36. A Gustavo Rodríguez, Jhon Dickson, Diana Lorena Muñoz y Consuelo Jaramillo por su asistencia técnica. A los laboratorios especializados de análisis, Leishmaniosis, Virología y Micología de la Universidad de Antioquia por facilitar los equipos necesarios.

Bibliografía

- EYAL, J. ; MABUD, K.J.; FISCHBEIN, J.F.; WALTER,J.F. ;OSBORNE,L.S.1994. Assesment of *Beauveria bassiana* ov.Eco-1 strain, wich produces a red pigment for microbial control. Applied Biochemistry and Biotechnology 44 : 65-79.
- GENTHNER,F.J. ; MIDDAUGH, D.P.1992. Effects of *Beauveria bassiana* embryos of the inland silverside fish(*Menidia berillina*). Applied and Environmental Microbiology 58 : 2840-2845.
- ; CRIPE,G.M.; CROSBY, D.J.1994. Effect of *Beauveria bassiana* and its toxins on *Mysidopsis bahia* (Mysidaceae). Archives of Environmental Contamination and Toxicology. (New York) 26 : 90-94.
- GUPTA,S.; MONTLOR,C.; HUANG,Y.S.1995. Isolation of novel beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. Journal of Natural Products 58 (5) : 733-738.
- HAMIL,R.L.; HIGGINS,C.E.; BOAZ,H.E.; GURMAN, M. 1969. The structure of beauvericin a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*.Tetrahedrom Letters.(Great Britain) 49 : 4255-4258.
- KHACHATOURIANS, G.G. 1991.Physiology and genetics of entomopathogenic fungi.En: Handbook of Mycology applied. Saskatoon (Canadá).p.613-663.
- KOPECKY, M.; JEGOROV, A. 1992. The inhibitory effect of destruxin a on the replication of arboviruses in *Aedes albopictus* C6/36 cell line. Compendium Biochemical Physioly. (Great Britain) 103 C (1): 23-25.
- MIDDAUGH,D.P. ; GENTHNER, F. ; CROSBY, A.1994. Infectivity and teratogenicity of *Beauveria bassiana* in *Menidia berillina* embryos. Archives of Environmental Contamination and Toxicological (New York) 27 : 95-102.
- PHILLIPS,H.J.1973. Dye exclusion tests for cell viability.En:Tissue Culture:Methods and Applications. (Kruse,P.F.and Patterson Jr M.K.Eds) Academic Press; New York, pp.406-408.

- QUIOT, J.M., VEY, A. VAGO, C, PAIS. 1993. Effects of mycotoxins on invertebrate cells. En: Cell culture 4 : 199- 212.
- , ———, ———, 1993a. Mise evidence et etude de la action de une micotoxine la beauvericina sur des cellules de insectes cultivees in vitro. C.R. Acad. Sc. (Paris). D.p. 2489-2492.
- ROBERTS, D.W. 1986. Toxins of entomopathogenic fungi. Microb.cont.pest. New YorK.Acad.Press, 22 : 441-464 .
- ROMBACH, M.C. 1988. Production of *Beauveria bassiana* (*Deuteromycotina*: Hyphomycetes) sympoduloconidia in submerged culture. Entomophaga 33 : 315-324.
- SIERRA, D; ARANGO, S.; VALDERRAMA R.; URIBE, S. 1995. Ensayo preliminar desusceptibilidad en dipteros adultos de *Culex pipiens* y *Aedes aegypti* con el hongo *B. bassiana*. En: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 22º Bogotá (Colombia). Resúmenes SOCOLEN. p.78.
- SUSUKI, A.; KANAOKA, M.; ISUGAI, A.; MURAKUSHI, A.; ICHINUE, M.; TAMURA S. 1977. Bassianolide a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* an *Verticillium lecanii*. Tetrahedron Letters (Great Britain) 25 : 2167-2170.
- URIBE, S.; VALLEJO, F.; VELEZ, I.D. 1994. Identificación de hongos entomopatógenos para *Lutzomyia spp.* (Diptera: Psychodidae), vectores de Leishmaniosis. En: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 21º Medellín (Colombia) Julio 27-29, 1994. Memorias SOCOLEN. p.39.
- VEY, A. QUIOT, J.M., VAGO, C., FARGUES, J. 1985 Effect imunodepresseur de toxines fongiques: inhibition de la reaction de encapsulement multicellulaire par les destruxines. C.R. Acad.Sci (Paris), ser. III 300: 47-651.
- WEST, E. BRIGGS, D. 1968. In vitro toxin production by the fungus *B. bassiana* and bioassay in greater wax moth larvae. Journal of Economical Entomology 6: 684-687.
- ZOCHER, R., KLEINHAUFF, H. 1982. Enyantín sintetase, a novel type of multifunctional enzyme catalyzing depsiptide synthesis in *Fusarium scirpi*. Biochemistry 21: 44-48.