

PRESENCIA DE CICLOPEPTIDOS TOXICOS EN ALGUNAS ESPECIES DE LA SECCION *PHALLOIDAE* DEL GENERO *AMANITA* EN MEXICO

Por Regla María Aroche*
y Pablo Fuentes**

TOXIC CYCLOPEPTIDES IN SOME SPECIES OF *AMANITA*, SECTION *PHALLOIDAE* IN MEXICO

SUMMARY

Results obtained on the record of toxic peptides of *Amanita phalloides* Fr., *A. virosa* Fr. (Section *Phalloidae*) and *A. bisporigera* Atk. (*Amidellae*) in Mexico are presented. We discuss the importance of this metabolites as chemotaxonomic markers, as well as the use of bioassay as a measure of toxicity of the species studied. This work is part of a general plan for developing criteria to know the properties of biological activity and the chemical register that support taxonomic confirmation of several Mexican species of Genus *Amanita*. Herbarium material and information to develop this study are kept in the Herbario Nacional (MEXU) at Instituto de Biología, Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME) UNAM and Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (ENCB).

RESUMEN

Se presentan los resultados obtenidos sobre el registro de ciclopéptidos tóxicos de *Amanita phalloides* Fr., *A. virosa* Fr. (Sección *Phalloidae*) y *A. bisporigera* Atk. (Sección *Amidellae*) en México. Se discute la importancia de estas sustancias como marcadores quimiotaxonómicos y se evalúa mediante bioensayo el potencial tóxico de las especies investigadas. Este trabajo forma parte de un proyecto en el cual el registro químico y la actividad biológica de diversas sustancias son utilizados como un criterio colateral que apoya la ubicación o confirmación taxonómica de las diversas especies del género *Ama-*

* Laboratorio de Micología, Depto. de Botánica, Instituto de Biología, U.N.A.M., Ap. Postal 70-233, C.P. 04510, México, D.F.

** Depto. Patología, E.N.E.P., Iztacala, U.N.A.M. Los Reyes Iztacala, Edo. de México.

nita en México. La información obtenida y el material herborizado se encuentran depositados en el Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología, en el Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME), UNAM, y en el Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (ENCB).

INTRODUCCION

Dentro del género *Amanita*, la presencia de ciclopéptidos tóxicos tipo aminitina caracterizan y apoyan la ubicación de diversas especies como representantes de la Sección *Phalloidae* (Singer, 1975); sin embargo, con base en otros criterios taxonómicos, algunas especies que poseen las mismas sustancias son ubicadas dentro de la Sección *Amidellae*. Por otro lado, no tiene discusión a la fecha la plasticidad morfológica y microscópica del complejo *Amanita phalloides*-*A. verna*-*A. virosa* (Tanghe y Simons, 1973; Litten, 1975; Yocum y Simons, 1977; Ammirati *et al.*, 1977 y Andary *et al.*, 1979). De esta forma, mientras se realizan estudios taxonómicos para caracterizar estas especies y precisar su variabilidad; se intenta asimismo conocer un poco más de su toxicidad, su distribución, su ecología, a la vez de conducir estudios químicos que retroalimentan dicha información en la taxonomía.

En el presente estudio se presentan los resultados preliminares obtenidos del estudio sobre la presencia de diversos ciclopéptidos tóxicos en *Amanita phalloides*, *A. virosa* y *A. bisporigera*.

MATERIALES Y METODOS

La metodología realizada en este trabajo es una modificación de los procedimientos utilizados por Pérez-Silva y Aroche (1980) para el registro preliminar de las amanotoxinas. La prueba de Meixner de acuerdo con Beutler y Vergeer (1980), la cromatografía en placa delgada de gel de sílice G, propuesta por Stijve y Seeger (1979) y el protocolo farmacológico preliminar de Malone y Robichaud (1962); fueron pruebas complementarias y de confirmación química.

La dificultad que existe en registrar a las falotoxinas químicamente, planteó su búsqueda mediante bioensayo, vía inyección intraperitoneal de los extractos crudos de cada especie investigada, comparando los resultados obtenidos de la inoculación de los compuestos utilizados como patrón de referencia amanitina y faloidina a una dosis letal (D_L) 50 y 100, respectivamente. A partir de pruebas preliminares, se programó la decebración craneovertebral para el caso de faloidina, a las 5 horas de la inoculación; y para las amanotoxinas, a las 72 horas de la misma. Este planteamiento aprovecha la rápida toxicidad de faloidina cuando es inoculada intraperitonealmente en ratones machos de la cepa Winster y en el caso de las amanitinas, su hepatotoxicidad a dosis altas en las primeras 48 horas y su acción en los riñones durante las primeras 72 horas a dosis bajas (Lampe, 1979). El estudio histopatológico debería registrar para cada caso los daños característicos producidos por cada una de las familias químicas que se deseaba investigar.

Cuando se trabajó con los extractos de *A. phalloides* (recolectada en México, Villegas *et al.*, 1982) a una dosis máxima de 100 mg/kg el experimental funcionó para búsqueda

de amanitinas, con muerte espontánea de los ratones inoculados en un periodo de 48 horas. Una dosis de 200 mg/kg produjo la muerte de todos los ratones en un periodo de 4 horas a partir de la inyección. Los animales inoculados con el compuesto de referencia faloidina a una D_L 100, sucumbieron a las dos horas de la inyección y los inoculados a una D_L 50 a las 4 horas de iniciado el tratamiento; los ratones inoculados a una D_L 100 de amanitina sucumbieron a las 48 horas.

A partir de estos resultados y considerando que la dosis de faloidina en el extracto crudo de *A. phalloides* debía ser equivalente a una D_L 50 (aproximadamente 2 mg/kg de faloidina) y para las amanotoxinas 0.1 de mg/kg, se establecieron los valores de 200 mg/kg y de 100 mg/kg de extracto crudo para la búsqueda de letalidad producida por faloidinas y por amanitinas respectivamente para los extractos de *A. virosa* y de *A. bisporigera*.

Cuando se trabajaron esas dosis de extracto crudo en *A. virosa*, la muerte espontánea se produjo a las 24 horas de la inoculación de 200 mg/kg de extracto crudo; momento en el cual, todos los ratones sobrevivientes sucumbieron por decerebración craneovertebral. A la dosis de 100 mg/kg el 50% sucumbieron al séptimo día de la inoculación. Los extractos de *A. bisporigera* fueron tratados igual que *A. virosa*. En este trabajo, los ejemplares de *A. virosa* (MEXU 11642; 13351 y 13632) fueron recolectados e identificados por Pérez-Silva; los ejemplares de *A. bisporigera* (MEXU 7327) fueron recolectados e identificados por Herrera y Singer; los ejemplares de la misma especie (MEXU 16856 y 16857) fueron recolectados e identificados por el primer autor de este trabajo; los de *A. phalloides* (FCME 1152, con duplicado en MEXU 16913 y en ENCB) fueron recolectados por Madariaga e identificados y confirmados por Villegas *et al.* (1982).

RESULTADOS

La prueba de Meixner realizada en los 7 extractos metanólicos estudiados, registró un gradiente de colores del azul-verde al gris; correspondiente a la presencia de las amanotoxinas. En la cromatografía de capa delgada de gel de sílice G desarrollada con una mezcla de metanol-metil etil cetona (1:1); revelando con cinamaldehído al 1% en metanol y vapores de ácido clorhídrico concentrado, fueron registradas en *A. phalloides* (FCME 1152) las amanitinas α y β ; y débilmente la γ . En *A. virosa* (MEXU 13351 y 13632) se registraron las tres amanitinas. En *A. bisporigera* (MEXU 7327, 16856 y 16857) y en *A. virosa* (MEXU 11642), se registraron únicamente la α y β amanitinas, respectivamente (Fig. 1).

Mediante la cromatografía propuesta por Stijve y Seeger (1979), se confirmó la presencia de las mismas substancias; sin embargo, la presencia de faloidinas débilmente pudo observarse en el extracto procedente de *A. phalloides* (Fig. 1B).

Del ensayo farmacológico preliminar de Malone y Robichaud (1962), se obtuvieron los siguientes resultados.

1- Los animales inoculados con 200 mg/kg de extracto crudo de *A. phalloides* y los inyectados con faloidina a una dosis letal de 2:5 mg/kg, presentaron muerte espontánea a las 3 y 4 horas a partir de la inyección. En la necropsia se observó la necrosis hemorrágica del hígado (Fig. 3-5). Los riñones se encontraron normales (Figs. 7-8). El estudio histopatológico reveló en el hígado, necrosis hemorrágica, degeneración vacuolar, abaloniamiento de los hepatocitos, devastación del parénquima en grados variables, in-

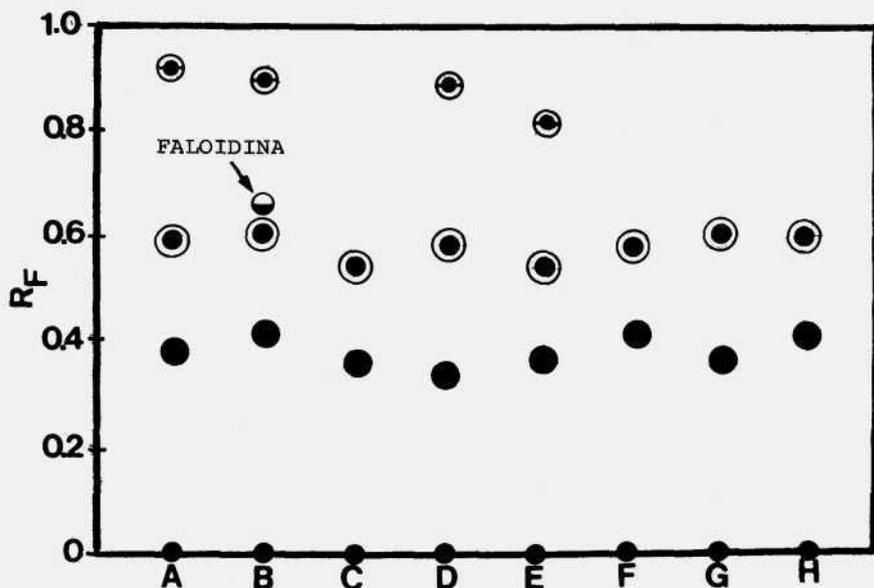


Fig. 1. Cromatografía en capa delgada de extractos metanólicos de *Amanita phalloides* (FCME 1152), *A. virosa* y de *A. bisporigera* (MEXU). (A) Compuestos de referencia α , β y γ amanitinas. (B) *A. phalloides* (FCME 1152, se indica la posición de faloidina). (C) *A. virosa* (MEXU 11642). (D) *A. virosa* (MEXU 13351). (E) *A. virosa* (MEXU 13632). (F) *A. bisporigera* (MEXU 7327). (G) *A. bisporigera* (MEXU 16856) y *A. bisporigera* (MEXU 16857) (G y H).

filtrado inflamatorio y eritrofagocitosis (Figs. 2-3). El incremento del volumen hepatocelular fue evidente (80-90%).

2- Los animales inoculados con 100 mg/kg de extracto crudo de la misma especie, presentaron muerte espontánea entre las 48 y las 72 horas a partir de la inyección. Los inyectados con faloidina a una dosis de 1 mg/kg, fueron sacrificados por decerebración craneovertebral entre las 48 y las 72 horas a partir de la inoculación. Durante las primeras 24 horas todos los animales tratados con el extracto y los tratados con el estándar, observaron una conducta agresiva con incremento de su actividad sexual, en algunos casos esta conducta se prolongó hasta las 48 horas. El estudio histopatológico reveló en el hígado, congestión centrolobulillar, degeneración facuolar, necrosis hemorrágica zonal e infiltrado inflamatorio en la mayoría de los animales (Figs. 7-8). En otros, se observan también daños en los riñones los cuales se observaron izquémicos (Figs. 15-16).

3- Los animales inoculados con *A. virosa* (MEXU 11642) a una dosis de 200 mg/kg, presentaron muerte espontánea a las 24 horas. El estudio histopatológico reveló en el hígado, necrosis hepática masiva, incremento del volumen hepatocelular y necrosis cortical renal. En los extractos restantes de *A. virosa*, todos los animales inoculados a

esa misma dosis fueron sacrificados por decerebración craneovertebral. El estudio histopatológico registró daños iniciales y en progreso de congestión centrolobulillar, degeneración vacuolar, necrosis hemorrágica zonal e infiltrado inflamatorio en el hígado (Figs. 7-8). Los riñones presentaron congestión venosa cortical (Figs. 11-12).

4- Los animales inoculados con la misma especie a una dosis de 100 mg/kg, no presentaron muerte espontánea antes del séptimo día y en éstos el análisis histopatológico reveló daño principal en el riñón mediante la isquemia (Figs. 15-16).

5- Los animales inoculados con extractos de *A. bisporigera*, en ningún caso sucumbieron espontáneamente y los sacrificados por decerebración craneovertebral presentaron en el hígado congestión centrolobulillar inicial y en algunos casos no presentaron alteración alguna. Los riñones en todos los casos presentaron congestión venosa cortical (Figs. 11-12).

6- Los animales inoculados con esta misma especie a una dosis de 100 mg/kg, fueron sacrificados por decerebración y únicamente se observó trazas de alteraciones a nivel de los riñones (Figs. 15-16) mediante la isquemia.

En general los siguientes datos son significativos:

a) La muerte espontánea lleva consigo manifestaciones diferentes en los animales inoculados con *A. phalloides* y en los inoculados con *A. virosa*.

b) En *A. phalloides*, el periodo previo a la muerte presenta síntomas como adinamia, erección pilomotora marcada, temblores finos del cuerpo, lagrimeo, posición de las orejas totalmente horizontal y pérdida absoluta del Rigor Mortis.

c) En *A. virosa*, se presenta ligera erección pilomotora, alteraciones marcadas en el equilibrio, parálisis del tren posterior, hemorragia nasal, apetito, sed, ausencia de patrones conductuales de agresividad e incremento del Rigor Mortis.

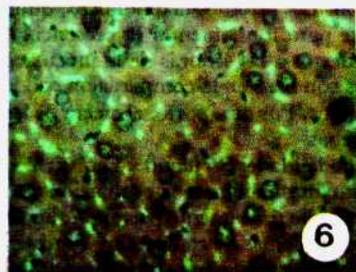
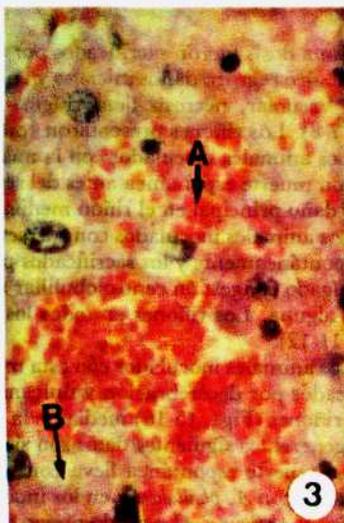
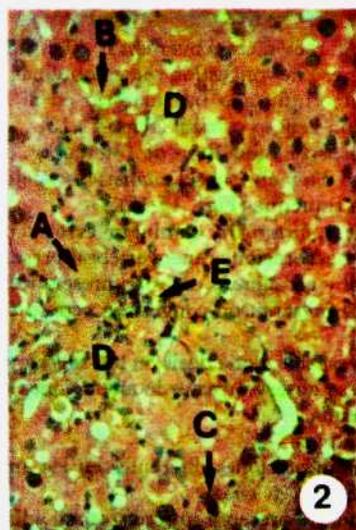
d) En *A. bisporigera*, las observaciones anteriormente citadas no se presentaron; por consiguiente, se considera que la aplicación de otros planteamientos podrán contribuir en el futuro a la obtención de datos más precisos acerca de la toxicidad de esta especie.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

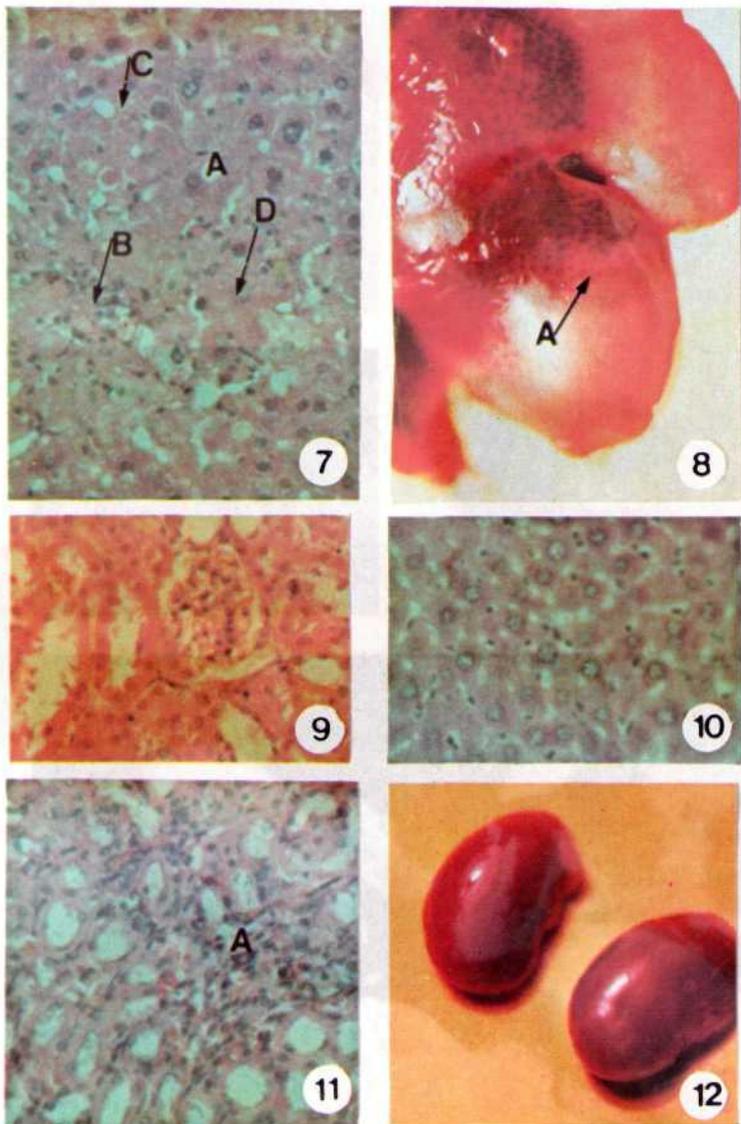
A. phalloides es una especie única en su acción. Los estudios taxonómicos, químicos y de bioensaye se correlacionan adecuadamente para fundamentar la presencia de ésta en México. Se considera que los animales muertos a las 4 horas de la inoculación del extracto, estuvieron intoxicados por faloidinas con base en la comparación con los animales inyectados con el estándar y con los testigos. Por otra parte, el efecto de las amanitininas pudo ser evidenciado en todas las pruebas.

A. virosa es una especie que presenta otras modalidades (Willand y Faulstich, 1980) y aún cuando se registró la presencia de amanotoxinas mediante la evaluación química e histopatológica, las pruebas emitidas en este estudio únicamente permiten suponer que la faloidina se encontró en escasa concentración; además de considerar, la presencia de amaninamida, una de las sustancias descubiertas hasta hace poco por Buku *et al.* (1980), con posibilidad de causar efectos que bien podrían junto con otras sustancias caracterizar la típica intoxicación producida por *A. virosa*.

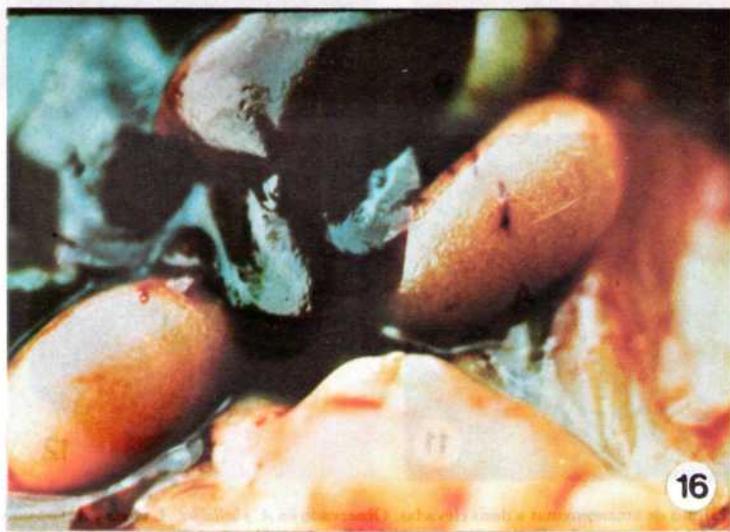
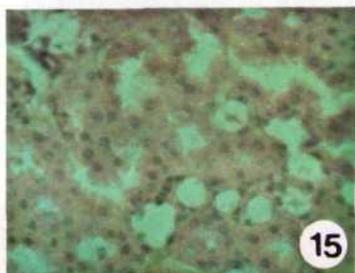
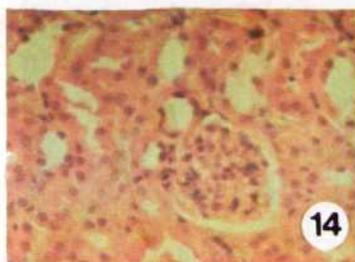
Desde el punto de vista del potencial tóxico de estas especies; incluyendo a *A. bisporigera*, podemos afirmar que en estos estudios, considerados preliminares, la toxicidad va en orden decreciente de *A. phalloides* a *A. virosa* a *A. bisporigera*. Por otra parte, *A. virosa* tie-



Figs. 2-6. Efectos de faloidinas. En los cortes se ilustra 2.- Zonas de necrosis hemorrágica A, que alternan con áreas de degeneración vacuolar B, abalónamiento de los hepatocitos C, devastación del parénquima en grados variables D, infiltrado inflamatorio E. $160 \times$. 3.- Acercamiento, eritrofagocitosis A y degeneración vacuolar B. $400 \times$. 4.- Aspecto macroscópico del hígado, acercamiento. 5.- Hígado completo. 6.- Hígado normal.



Figs. 7-12. Efectos de amanotoxinas a dosis elevadas. Observado en *A. phalloides*, *A. virosa* y *A. bisporigera*. El estudio del hígado muestra 7.- Congestión centrolobulillar A, infiltrado inflamatorio B, degeneración vacuolar C, necrosis hemorrágica zonal D. 160 \times . 8.- Aspecto macroscópico puntillado fino A. 9.- Riñón normal 160 \times . 10.- Hígado normal 160 \times . El análisis del riñón presenta 11.- Congestión venosa cortical. 160 \times . 12.- Macroscópicamente son normales. Efectos presentes en *A. virosa* y *A. bisporigera*.



Figs. 13-16. Se presenta riñón. 13.- Aspecto normal macroscópico. 14.- Aspecto microscópico. 15.- Isquémico microscópico. 16.- Isquemia macroscópico. Efecto de amanotoxinas a dosis bajas (acción a las 72 horas). Observados en *A. phalloides*.

ne una amplia distribución en México y se puede considerar la especie más peligrosa. Es importante en todo momento conocer la distribución de cada una de las especies trabajadas; así como también, prevenir al sector médico de esta distribución. Actualmente, otras especies pueden iniciar sus procesos adaptativos y por consecuencia se piensa que este tipo de estudios puede contribuir en parte, al conocimiento de dicho potencial tóxico; además, de su importancia biológica.

Con respecto a la importancia de la presencia de los compuestos analizados en el presente estudio, queda implícito su valor quimiotaxonómico en la ubicación de estas especies; el cual como en este caso, permitió confirmar la presencia de *A. phalloides* en México.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a los doctores E. Pérez-Silva y T. Herrera, por haberles permitido consultar la bibliografía, así como utilizar el material del Herbario MEXU y las facilidades brindadas para la realización de este trabajo. Al Dr. T. Wieland del Instituto Max Planck, en Heidelberg, Alemania, por el envío de las sustancias utilizadas como patrón de referencia. Al Dr. A. Peña, Director del Centro de Investigaciones en Fisiología Celular de la U.N.A.M., por las facilidades brindadas para la realización de los bioensayos. A los doctores G. Privat y C. Andary de la Facultad de Farmacia de Montpellier, Francia y al Dr. G. Guzmán, del Herbario ENCB, las facilidades brindadas para la consulta del material bibliográfico y de Herbario. De manera especial agradecemos la colaboración en el trabajo de laboratorio al pasante de Biología J. Bonavides.

LITERATURA CITADA

- Andary C., G. Privat, F. Enjalbert y B. Mandrou, 1979. Teneur comparative en amanitines de différentes Agaricales toxiques d'Europe. *Doc. Myc. 10 (37-38)*: 61-70.
- Ammirati J. F., H. D. Thiers y P. A. Horgen, 1977. Amatoxin containing mushrooms: *Amanita ocreata* and *A. phalloides* in California. *Mycologia 69*: 1095-1108.
- Beutler, A. J. and P. P. Vergeer. 1980. Amanotoxins in American mushrooms: Evaluation of the Meixner Test. *Mycologia 72*: 1142-1149.
- Buku, A., Th. Wieland, H. Bodenmuller y H. Faulstich. 1980. Amaninamide, a new toxin of *Amanita virosa* mushrooms. *Experientia 36*: 33-34.
- Lampe, K. F. 1979. Toxic fungi *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 19*: 85-104.
- Litten, W. 1975. The most poisonous mushrooms. *Sci. Ann. 232(3)*: 91-101.
- Malone, M. H. y R. C. Robichaud. 1962. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia 25*: 320-332.
- Pérez-Silva, E. y R. M. Aroche, 1982. Chromatographic and taxonomic evaluation of *Amanita citrina*. Abstract, VII Inter. Sym. Natural Products Chemistry, Monterrey, N.L.
- Singer, R. 1975. *The Agaricales in Modern Taxonomy*. Cramer, Vaduz. 412 p.
- Stijve, T. y R. Seeger, 1979. Determination of α -, β and γ - Amanitin by High Performance Thin-Layer Chromatography in *Amanita phalloides*. (Vaill. ex Fr.) Secr. from various origin. *Z. Naturforsch 34C*: 1133-1138.
- Tanghe L. y D. M. Simons, 1973. *Amanita phalloides* in the eastern United States. *Mycologia 65*: 99-108.
- Villegas, M., J. Cifuentes, R. M. Aroche y P. Fuentes, 1982. Primer registro de *Amanita phalloides* en México. *Bol. Soc. Mex. Mic. 17*.
- Yocum, R. R. y D. Simons, 1977. Amanotoxins and Phallotoxins in *Amanita* species of the northeaster United States. *Lloydia 40*: 179-190.
- Willand T. y H. Faulstich, 1978. Amatoxins phallotoxins, phallolysin and antamanide: The biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *C.R.C. Critical Reviews in Biochemistry 5(3)*, 185-260.