

## ASPECTOS TAXONOMICOS, QUIMICOS Y FARMACOLOGICOS DE *Amanita verna* (AGARICALES)\*

Por Eduardo Fco. Chinchilla\*\*  
Regla Ma. Aroche\*\*  
Evangelina Pérez-Silva\*\*  
y Pablo Fuentes\*\*\*

## TAXONOMIC, CHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS OF *Amanita verna* (AGARICALES)\*

### SUMMARY

The objective of the present survey was to confirm the taxonomic position of several Mexican collections of *Amanita verna* and establish their toxicity. Presence of amanotoxins was used as a taxonomic marker. Results obtained by means of chromatographic analysis and bioassay revealed that toxic properties of Mexican samples of *A. verna* displayed similar behavior to that showed by fungi from Europe and the United States. We found that significant variability in toxic effects of each sample was present, as previously reported for species in the phalloides group. (*A. phalloides*, *A. bisporigera*, *A. verna*, *A. virosa*). In this case, we found a range from non-toxicity to true toxicity in different samples of *A. verna*.

### RESUMEN

Con el objeto de confirmar la posición taxonómica de diversas recolecciones mexicanas de *Amanita verna* y de establecer su toxicidad, se utilizó como marcador taxonómico la presencia de amanotoxinas. La integración de los resultados obtenidos mediante el análisis cromatográfico y de bioensayo, reveló que *A. verna* de México se comportó de forma similar a la de Europa y Estados Unidos, respecto a la variabilidad de su toxicidad, dato que se consideró importante, ya que de las especies que forman el grupo phalloides (*A. phalloides*, *A. bisporigera*, *A. verna* y *A. virosa*), es *A. verna* en donde se acentúa más este problema e incluso en este estudio hubo ejemplares no tóxicos.

- \* Modificación al trabajo de tesis de licenciatura, presentado por el primer autor en octubre de 1981.
- \*\* Laboratorio de Micología, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- \*\*\* Laboratorio de Patología de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Iztacala, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## INTRODUCCION

*Amanita verna* (Bull. ex Fr.) Roques, es un basidiomicete completamente blanco, que taxonómicamente se ubica dentro de la sección *Phalloidae* del género *Amanita*, junto con otras especies afines a ella, como son *A. phalloides* (Fr.) Secr. y *A. virosa* Secr. Estas especies forman parte de un grupo de hongos conocidos comúnmente como amanitas mortales, las cuales son responsables de aproximadamente el 90% de las muertes ocasionadas en el hombre por envenenamientos con hongos, como lo señalan los trabajos de Block *et al.* (1955) y Bussi y Fiume (1977).

Desde el punto de vista químico, pueden presentar diversas sustancias ciclopeptídicas, las cuales son conocidas con los nombres de amanotoxinas y falotoxinas, cuya estructura química ha sido investigada por Wieland (1968 y 1973), Wieland y Wieland (1972) y Wieland y Faulstich (1978). Las amanotoxinas son octapéptidos bicíclicos, entre las cuales se distinguen por la potencia de su toxicidad, las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ , habiendo sido probadas tanto en condiciones *in vivo* (Tyler *et al.*, 1963 y Brady *et al.*, 1975) como *in vitro* (Preston *et al.*, 1975 y Johnson *et al.*, 1976).

Las falotoxinas son heptapéptidos bicíclicos, de las cuales la que más se ha estudiado por sus propiedades tóxicas es la faloidina, habiendo sido objeto de estudios que principalmente se han realizado en condiciones *in vivo*, en donde actúa específicamente sobre las membranas de los hepatocitos y de algunos organelos como lisosomas y retículo endoplásmico (Litten, 1975).

Aunque ambas familias de compuestos tóxicos, de hecho pueden presentarse en los hongos involucrados en los envenenamientos ocasionados por el grupo faloides, es importante señalar que la toxicidad producida por la faloidina es insignificante, comparada con la causada por la  $\alpha$ -amanotoxina, la cual de acuerdo con Lampe (1979), en la especie humana, por vía digestiva, puede provocar tres fases sintomatológicas. La primera se caracteriza por provocar trastornos gastrointestinales que se manifiestan entre las 10 y 14 horas; la segunda fase presenta una aparente calma pasajera que puede durar hasta tres días; en la tercera fase los daños inducidos por la toxina se localizan en el hígado y en los riñones pudiendo ocurrir la muerte entre 48 y 96 horas después de haber ingerido el hongo.

Son varios los investigadores que han registrado algunos daños acerca de los efectos tóxicos, causados por  $\alpha$ -amanotoxina en el ratón, por vía intraperitoneal, como Tyler *et al.* (1963), Panner y Hanss. (1969) y Brady *et al.* (1975). Por otro lado, Block *et al.* (1955), Tyler *et al.* (1966), Benedict *et al.* (1970), Preston *et al.* (1975) y Yocum y Simons (1977), han demostrado que es posible encontrar cantidades variables o ausencia de  $\alpha$  y  $\beta$ -amanotoxina en ejemplares de *A. verna*. En México los trabajos taxonómicos de Pérez-Silva (1969), Pascoe (1970), Manzi (1976) y Guzmán (1977), registran por un lado, la distribución de la especie y por otro la toxicidad y el dato de que la ingestión de ejemplares de *A. verna* causó la muerte a tres menores (Pérez-Silva *et al.*, 1970). De acuerdo con lo citado anteriormente, este estudio tiene el objeto de confirmar por un lado, la presencia de ciclopeptidos tóxicos en esta especie, dato que podría corroborar su ubicación taxonómica dentro de la sección *Phalloidae* del género *Amanita*; y por otro, comparar los resultados registrados por otros trabajos en relación a la variabilidad de la presencia de estos compuestos.

## MATERIAL Y METODOS

Se analizaron las características tanto macroscópicas como microscópicas de los carpóforos. Se observaron las reacciones químicas en material fresco con KOH al 5% y en material herborizado con H<sup>2</sup>SO<sup>4</sup>. La identificación del material se realizó con base en los criterios establecidos por Marchand (1973), Trimbach (1973) y Singer (1975).

Para el registro de las sustancias ciclopeptídicas se realizó por un lado, la prueba de Meixner de acuerdo con Beutler y Vergeer (1980), y por otro, la metodología utilizada por Pérez-Silva y Aroche (1980), la cual incluye los procedimientos de extracción metanólica en un aparato Soxhlet, concentración en baño maría, cromatografía en placa delgada de gel de sílice G, revelando con cinamaldehído y vapores de ácido clorhídrico. Asimismo, para la confirmación de la presencia de estas sustancias evaluadas químicamente, se realizó el protocolo farmacológico de Malone y Robichaud (1962), en el cual se formaron lotes de cinco ratones cada uno para probar intraperitonealmente en cada lote, dos dosis máximas (DM) y dos dosis mínimas (Dm) de los extractos (carentes de metanol) obtenidos con cada recolección investigada; se utilizó un ratón como testigo. Los ratones que se inocularon con dosis máxima y dosis mínima fueron marcados con ácido pícrico al 0.5% en etanol al 70%; los ratones testigo no se marcaron y fueron inoculados con una solución acuosa de agar (Difco 0140-01) al 0.25%, la cual se utilizó como vehículo; una constante de 5 ml/kg fue utilizada como volumen de la dosis. Las observaciones se realizaron a los 5, 10, 15, 30 y 60 minutos; 2, 12 y 24 horas; y 2, 4 y 7 días después de la inoculación.

Después del séptimo día de observaciones se procedió con el estudio histopatológico, sacrificando a los animales por decerebración, extirpándose los siguientes órganos: hígado, riñones, estómago, intestinos, bazo y pulmones.

## RESULTADOS

El análisis taxonómico realizado, tanto en el aspecto macroscópico como microscópico de los ejemplares estudiados en este trabajo, permitió determinar la identidad de estos como *A. verna* (Fig. 1).

Con el análisis cromatográfico preliminar (Fig. 2) se observó que el extracto de *A. verna* (MEXU 7487) presentó una banda con una coloración similar al del estándar con  $\alpha$  y  $\beta$ -amanotoxinas, y que en los siete extractos restantes de *A. verna* (MEXU 5792, 1550, 12282, 16798, 16799, 16800 y 7505) no se presentó. Utilizando los procedimientos de Sullivan *et al.* (1965), se confirmó que la banda aislada de este extracto coincidió con el estándar de  $\alpha$ -amanotoxina. (Fig. 3). La prueba de Meixner realizada tanto con los extractos crudos de los ejemplares de *A. verna* como con algunas de las partes de los ejemplares secos, confirmó la presencia de  $\alpha$ -amanotoxina en el ejemplar MEXU 7487, al coincidir el color presentado en las manchas del extracto y de las partes del ejemplar, con el color obtenido en la mancha del estándar de  $\alpha$ -amanotoxina.

Los ratones tratados *in vivo* con los extractos crudos de los ocho ejemplares de *A. verna* presentaron a los pocos minutos de haber sido inoculados una notable baja de su actividad motora, la cual permaneció constante durante los siete días que duró el tratamiento; en algunos casos se mostró pérdida de peso y diarrea, y solamente en un caso se ob-

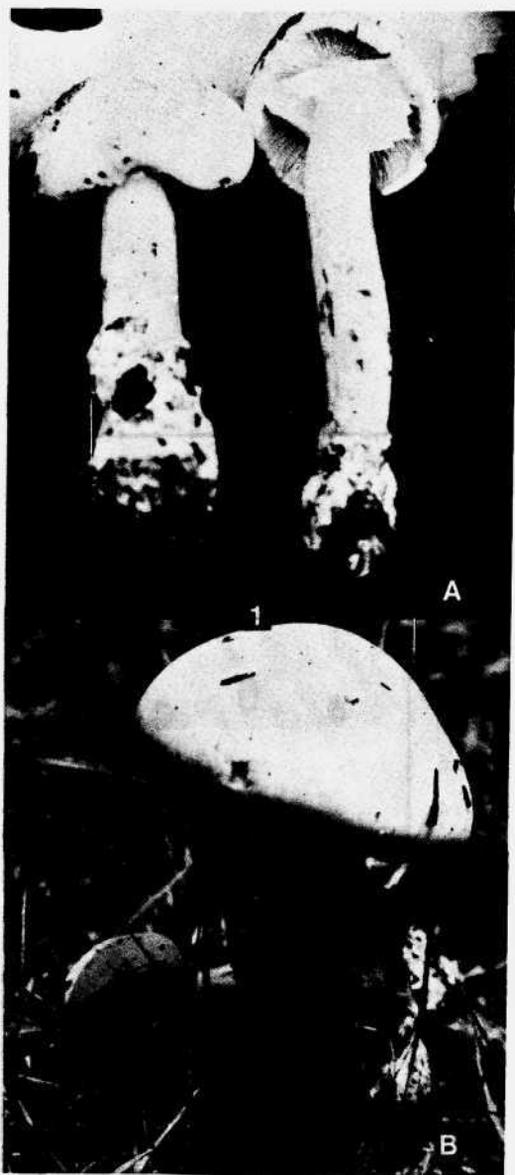
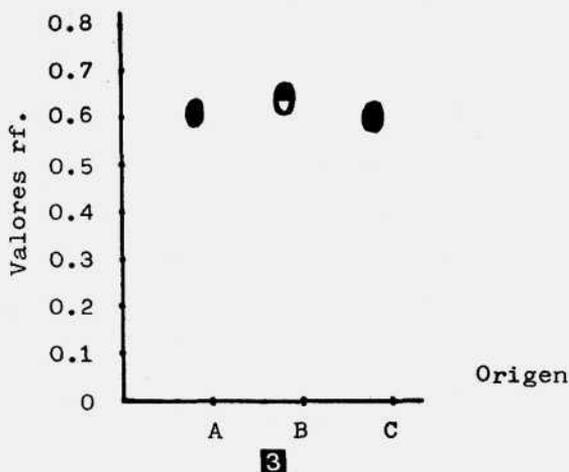
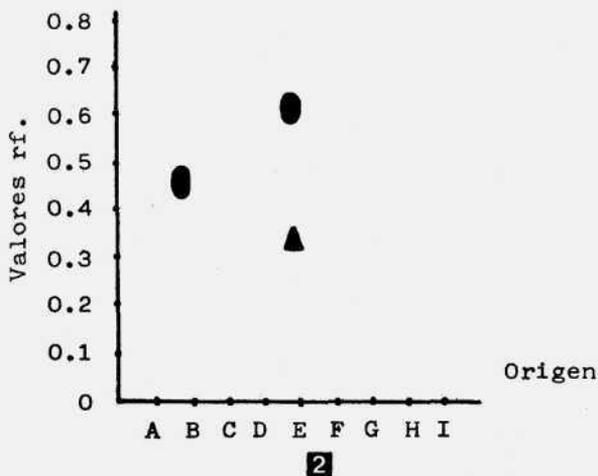


Fig. 1. Carpóforos de *Amanita verna*. (A) MEXU 16800, procedentes de Puebla. (B) MEXU 16799, procedente de Hidalgo.



Figs. 2-3.- 2: Cromatograma de los extractos crudos de *Amanita verna*. (A) MEXU 5782; (B) MEXU 7487; (C) MEXU 7505; (D) MEXU 16798; (E) Estándar con  $\alpha$  y  $\beta$ -amanotoxinas; (F) MEXU 12282; (G) MEXU 16800; (H) MEXU 16799; (I) MEXU 1550. 3: Banda aislada del extracto de *Amanita verna* (MEXU 7487), después de ser cromatografiada, reextraída y recromatografiada, y del estándar de  $\alpha$ -amanotoxina, ajustados a la concentración de 0.08 mg/5  $\mu$ l. (A) Banda aislada del extracto MEXU 7487; (B) estándar  $\alpha$ -amanotoxina; (C) banda aislada del extracto MEXU 7487 con el estándar de  $\alpha$ -amanotoxina.

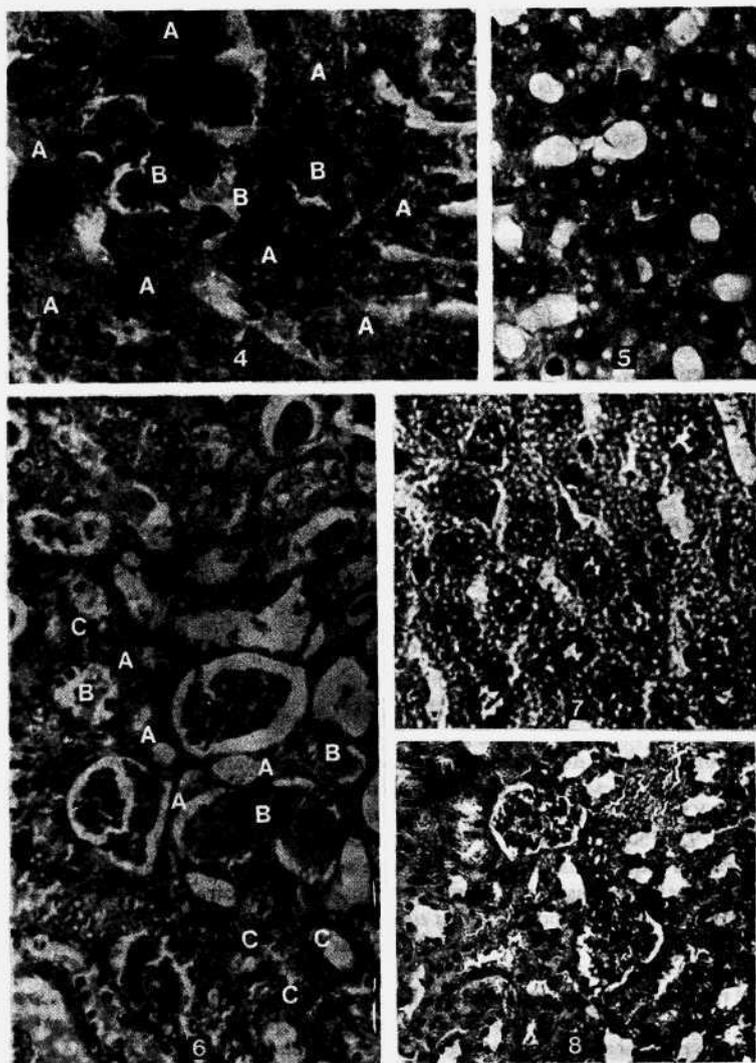
servó erección pilomotorá; mientras que los ratones testigo solo mostraron baja de actividad motora. Todos los ratones sobrevivieron al tratamiento.

La necropsia realizada con todos los ratones reveló que los que fueron inoculados con dos de los ocho extractos de *A. verna* (MEXU 7487 y 5792), mostraron los riñones decolorados y el estómago colapsado, el hígado también decolorado y también un poco moteado, el bazo colapsado y los pulmones congestionados, daño que también fue causado en los ratones por el resto de los extractos (MEXU 7505, 16798, 16799, 16800 y 1550), con excepción del extracto de *A. verna* (MEXU 12282). La necropsia de los ratones testigo no mostró síntomas parecidos a los anteriores.

El estudio histopatológico realizado en varios órganos de cada ratón tratado, mostró para todos los ratones que fueron inoculados con extractos de los ocho ejemplares de *A. verna*, el estómago, el intestino y el bazo no presentaron alteraciones histológicas de importancia. El hígado fue dañado en todos los casos, presentando necrosis zonales de células hepáticas, hiperplasia de células de Kupffer (Fig. 4) y gotas finas de grasa en zonas periportales (Fig. 5); daños que no fueron ocasionados por el extracto del ejemplar de *A. verna* (MEXU 12282). El daño en los riñones de los ratones tratados fue solamente causado por cuatro de los ocho extractos de *A. verna* (MEXU 7487, 5792, 16799 y 1550), observándose tumefacción turbia en el epitelio de los túbulos contorneados proximales, material proteico en túbulos colectores distales y áreas de necrosis tubular aguda (Fig. 6). En los pulmones los daños fueron menos severos, observándose para todos los casos congestión venosa, con excepción de los ratones inoculados con el extracto del ejemplar de *A. verna* (MEXU 12282). El hígado (Fig. 7), los riñones (Fig. 8) y los pulmones de los ratones testigos no mostraron ningún daño.

## DISCUSION

Con el análisis cromatográfico realizado con los ejemplares de *A. verna* en este trabajo, se demostró la presencia de  $\alpha$ -amanotoxina en uno solo de los ejemplares de esta especie (MEXU 7487), estando aparentemente ausente en el resto de los ejemplares (MEXU 5792, 7505, 16798, 12282, 16799, 16800 y 1550), lo cual posiblemente tenga que ver con la variabilidad intrínseca en que se encuentra la toxina en *A. verna* y que aparentemente en esta especie está más acentuada que en otras, como se ha observado en los estudios realizados por Benedict *et al.* (1970), Preston *et al.* (1975) y Yocum y Simons (1977). También es importante considerar en este punto la distribución de la toxina en los ejemplares, es decir que además de encontrarse en el píleo, pudiera estar presente en otras estructuras del hongo. Este fue uno de los puntos que nos llevó a realizar la prueba de Meixner en diferentes partes de los ejemplares estudiados, además de confirmar la presencia de  $\alpha$ -amanotoxina en el ejemplar de *A. verna* (MEXU 7487) y en el extracto obtenido de él; de esta manera con excepción de este ejemplar y de *A. verna* (MEXU 12282) que fue negativo en este ensayo, los resultados obtenidos con las partes del píleo y del estípite del resto de los ejemplares (MEXU 5792, 7505, 16798, 16799, 16800 y 1550) no fueron claros, debido a que los colores de las manchas de las diferentes partes de estos ejemplares no dieron la coloración característica de las amanotoxinas, ni el color característico de la mancha control de HCL concentrado. Sin embargo, el color de las manchas que presentaron se acercó más al color azul-verde del estándar



Figs. 4-8.- 4: Daños ocasionados por extractos de *Amanita verna* a nivel histológico en hígado de ratones. (A) zonas de células hepáticas en necrosis. (B) incremento de células reticulo-endoteliales y de Kupffer. 5: Gotas finas de grasa en tejido hepático de ratones, alteración ocasionada por extractos de *Amanita verna*. 6: Alteraciones ocasionadas por extractos de *Amanita verna* a nivel histológico en riñón de ratones. (A) tumefacción turbia del epitelio del túbulo contorneado proximal. (B) material proteínico en túbulos colectores distales. (C) necrosis tubular. 7: Tejido hepático normal de un ratón testigo. 8: Tejido renal normal de un ratón testigo.

de  $\alpha$ -amanotoxina, que el color verde olivo mostrado por la mancha control de HCL concentrado.

Se debe considerar también que otros factores intervengan en la presencia o ausencia de metabolitos secundarios en los hongos, como podrían ser la madurez de los carpóforos, su relación con el medio ambiente (tipo de vegetación, tipo y componentes del suelo, temperatura ambiental, humedad relativa, etc.), o que tal vez estén involucrados factores genéticos (Preston *et al.*, 1975).

Ante lo ya discutido, el ensayo biológico realizado nos reveló en su primera fase (tratamiento *in vivo* y necropsia) que los ejemplares de *A. verna* (MEXU 7487, 5792, 16798 y 16800) causaron alteraciones como las señaladas por Tyler *et al.* (1963) y Brady *et al.* (1975), al inocular ratones con extractos crudos con amanotoxinas, por lo que se podría inferir parcialmente que los ejemplares estudiados en este trabajo que causaron dichas alteraciones, podrían tener amanotoxinas en muy pequeñas cantidades, ya que químicamente no fueron detectadas. Esto nos condujo a realizar el estudio histopatológico, el cual nos reveló daños en el hígado, en los riñones y en los pulmones; los daños en el hígado fueron similares a los ocasionados por un caso de envenenamiento con *A. verna* en E.U.A., al cual sobrevivieron dos personas (Panner y Hanss, 1969). Trabajo en el cual se registran algunas zonas con áreas necróticas en el tejido hepático, incremento de células reticuloendoteliales en sinusoides cerca de áreas portales, hiperplasia de células de Kupffer y gotas finas de grasa en zonas periportales. Estos daños son característicos de envenenamientos con amanotoxinas y son las mismas alteraciones que con mayor o menor frecuencia mostraron los hígados de los ratones tratados con los diferentes extractos de los ejemplares de *A. verna*. En el riñón el daño causado por los ejemplares de *A. verna* (MEXU 7487, 5792, 16799 y 1550) fue en el túbulo cotorneado proximal, alteración que coincide con lo reportado por Simons (1917), Hatfield y Brady (1975), Lincoff (1977) y Lampe (1979). El pulmón fue dañado por todos los extractos de *A. verna*, con excepción del ejemplar MEXU 12282 causando una congestión venosa, daño que coincidió con lo observado por uno de los autores (Aroche) y que podría ser consecuencia secundaria en los envenenamientos con amanotoxinas.

Lo ya expuesto nos sugiere que aunque químicamente la toxina no se registró en los ejemplares de *A. verna* (MEXU 5792, 7505, 16798, 16799, 16800 y 1550); ésta se encuentra presente en escasa cantidad, muy variable en los diferentes ejemplares estudiados, con excepción del ejemplar MEXU 12282 que mostró resultados negativos en todas las pruebas.

## CONCLUSIONES

Se registró y confirmó mediante los ensayos químicos y biológico la presencia de  $\alpha$ -amanotoxina en el ejemplar MEXU 7487. Con excepción del ejemplar MEXU 12282, los demás ejemplares (MEXU 5792, 7487, 7505, 16798, 16799, 16800 y 1550) son tóxicos, debido a que se demostró por bioensayo la presencia en ellos de amanotoxinas. Los ejemplares de esta especie en México, se comportan de forma similar a lo registrado para Europa y E.U.A., respecto a la variabilidad de su toxicidad. El registro de amanotoxinas en el material estudiado mediante los ensayos químico y biológico, es otro aspecto que se debe considerar junto con los caracteres macroscópicos y microscópicos para determinar con mayor precisión la identidad de *A. verna*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las autoridades de los Herbarios ENCB, FCME y MEXU; del Centro de Investigaciones en Fisiología Celular de la UNAM y al Dr. T. Wieland del Instituto Max Planck, Heidelberg, Alemania, las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

## LITERATURA CITADA

- Benedict, R. G., L. R. Brandy, D. E. Stuntz y J. Spurr, 1970. Occurrence of the deadly *Amanita verna* in the Pacific North West. *Mycologia* 62:597-599.
- Beutler, A. J. y P. P. Vergeer, 1980. Amanotoxins in American mushrooms: Evaluation of the Meixner Test. *Mycologia* 72:1142-1149.
- Block, S. S., R. L. Stephens y W. A. Murrill, 1955. The *Amanita* toxins in Mushrooms. *J. Agr. Food Chem.* 3: 584-587.
- Brady, L. R., R. G. Benedict, V. E. Tyler, D. E. Stuntz y M. H. Malone, 1975. Identification of *Conocybe filaris* as a toxic basidiomycete. *Lloydia* 38: 172-173.
- Bussi, C. y L. Fiume, 1977. Identificación de piccoli pezzi di *Amanita phalloides* e *Amanita verna* mediante la misura del loro contenuto di amanitine. *Minerva Medicoleg.* 97 (2): 93-94.
- Guzmán, G., 1977. Identificación de los hongos comestibles, venenosos y alucinantes. Limusa, México, D. F. 235 p.
- Hatfield, G. M. y L. R. Brandy, 1975. Toxins of higher fungi. *Lloydia* 38: 36-55.
- Johnson, B. E., J. F. Preston y J. L. Kimbrough, 1976. Quantitation of amanitins in *Galerina autumnalis*. *Mycologia* 68:1248-1253.
- Lampe, K. F., 1979. Toxic fungi. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 19:85-104.
- Lincoff, G., 1977. Toxic and Hallucinogenic Mushrooms Poisoning. Va Nostrand Reinhold, Nueva York. 267 p.
- Litten, W., 1975. The most poisonous mushrooms. *Sci. Am.* 232 (3): 31-101.
- Malone, M. H. y R. C. Robichaud, 1962. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia* 25:320-332.
- Manzi, J., 1976. *Hongos Comestibles y Venenosos*. Ed. Combonianas. Guadalajara, 119 p.
- Marchand, A., 1973. *Amanita verna* (Bull. ex Fr.) Roques. *Rev. Mycol.* 37:9-13.
- Panner, B. J. y R. J. Hanss, 1969. Hepatic injury in mushrooms poisoning. *Arch. Path.* 87:35-45.
- Pascoe, A. M., 1970. Contribución al Conocimiento de las Especies de *Amanita* en México. (Fungi-Basidiomycetes). Tesis Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N., México, D. F.
- Pérez-Silva, E., 1969. Hongos de Guanajuato. *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. Méx.* 40, Serie Botánica :93-104.
- Pérez-Silva, E., T. Herrera y G. Guzmán, 1970. Introducción al estudio de los macromicetos tóxicos de México. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 4:49-53.
- Pérez-Silva, E. y R. M. Aroche, 1980. Chromatographic and taxonomic evaluation of *Amanita citrina*. Abstract, VII Int. Symp. of Nat. Products Chemistry.
- Preston, J. F., H. J. Stark y J. W. Kimbrough, 1975. Quantitation of amanitines in *Amanita verna* with calf thymus RNA polymerase B. *Lloydia* 38 :153-161.
- Simons, D., 1971. The mushrooms toxins. *Delaware Medical Journal* 43 :177-187.
- Singer, R., 1975. *The Agaricales in Modern Taxonomy*. Cramer, Vaduz 412 p.
- Sullivan, G., L. R. Brady y V. E. Tyler, 1965. Identification of amanitin by thin-layer chromatography. *J. Pharm. Sci.* 51 :921-922.
- Trimbach, J., 1973. Note sur *Amanita verna* (Bull. ex Fr.) ss. str. et sus varietes. *Ann. du Mus. d'Hist. Nat. Nat. de Nice* 1:83-86.
- Tyler, V. F., L. R. Brady, R. G. Benedict, J. M. Khanna y M. H. Malone, 1963. Chromatographic and pharmacologic evaluation of some toxic *Galerina* species. *Lloydia* 23: 154-157.
- Tyler, V. F., R. G. Benedict, L. R. Brady y J. E. Robbers, 1966. Occurrence of *Amanita* toxins in American collections of deadly Amanitas. *J. Pharm. Sci.* 55 :590-593.
- Wieland, T., 1968. Poisonous principles of mushrooms of genus *Amanita*. *Science* 159 (3818) :946-952.
- Wieland, T. y O. Wieland, 1972. The toxic peptides of *Amanita* species. *Microbial Toxins* 8: 244-279.

- Wieland, T., 1973. Über die giftstoffe du gattum *Amanita*. *Zeitschr* 39:103-112.
- Wieland, T. y H. Faulstich, 1978. Amanotoxins, phallotoxins, phallolysin and antamanide. The biologically components of poisonous *Amanita* mushrooms. *Crit. Rev: Biochem.* 5 :185-260.
- Yocum, R. R. y D. Simons, 1977. Amanotoxins and Phallotoxins in *Amanita* species of the north easter United States. *Lloydia* 40 :179-190.