



## Nota

# Evaluación de la toxicidad de *Psilocybe cubensis* (Agaricales, Basidiomycota) sobre *Artemia franciscana* (Crustacea, Anostraca)

Fernando Vega-Villasante<sup>a,\*</sup>, Luis Eduardo Ruiz-González<sup>a</sup>, Saúl Rogelio Guerrero-Galván<sup>a</sup>  
y Laura Guzmán-Dávalos<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Acuicultura Experimental, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario de la Costa, Universidad de Guadalajara, Puerto Vallarta, Jalisco, México

<sup>b</sup> Departamento de Botánica y Zoología, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

### Historia del artículo:

Recibido el 29 de abril de 2011

Aceptado el 11 de junio de 2012

On-line el 21 de junio de 2012

### Palabras clave:

Concentración letal media

Hongos alucinógenos

Psicodisléptico

## R E S U M E N

**Antecedentes:** *Psilocybe cubensis* es una especie de acción psicodisléptica, que crece sobre estiércol vacuno en praderas de zonas tropicales y subtropicales, consumido en México desde épocas ancestrales tanto con fines ceremoniales y rituales como curativos o medicinales. *Artemia franciscana* es un crustáceo utilizado con frecuencia como organismo modelo para pruebas de toxicidad.

**Objetivos:** Conocer la toxicidad de *P. cubensis*, a través de un extracto de esta especie, sobre nauplios y adultos de *A. franciscana*.

**Métodos:** Los especímenes se recolectaron en la región de Bahía de Banderas, Jalisco, México, se secaron y homogeneizaron en agua de mar artificial. Los bioensayos se realizaron en tubos de ensayo con diferentes concentraciones del extracto de *P. cubensis* (EAP) y con dicromato de potasio como sustancia tóxica de referencia. Para conocer la toxicidad se calculó la concentración letal media (CL50) en nauplios y adultos y el porcentaje de inhibición de la eclosión de los quistes de *A. franciscana*.

**Resultados:** Los nauplios presentaron una CL50 = 135 µg/ml, mientras que la de los adultos fue CL50 = 172 µg/ml. El EAP inhibió la eclosión de los quistes en un 100% en todas las concentraciones.

**Conclusiones:** Bajo las condiciones de este estudio, el extracto de *P. cubensis* resultó tóxico para nauplios y adultos de *A. franciscana*.

© 2011 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Evaluation of *Psilocybe cubensis* (Agaricales, Basidiomycota) toxicity over *Artemia franciscana* (Crustacea, Anostraca)

## A B S T R A C T

**Background:** *Psilocybe cubensis* is a species with psychodysleptic action that grows on cattle dung in pastures in the tropics and subtropics. This fungus has been widely used in Mexico since ancient times both for ceremonies and rituals, as well as for healing or medicinal purposes. *Artemia franciscana* is a crustacean frequently used as a model organism for toxicity testing.

**Aims:** With the objective of determining the toxicity of *P. cubensis*, the results of a study with the extract of *P. cubensis* on nauplii and adults of the brine shrimp *A. franciscana* are presented.

**Methods:** Specimens were collected at Bahía de Banderas, Jalisco, Mexico, and were dried and homogenized in artificial sea water. Bioassays were carried out on crystal vials filled with different concentrations of the extract of *P. cubensis* (EAP), and with potassium dichromate as reference toxic compound. The median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) in nauplii and adults and the inhibition of cysts hatching in *A. franciscana* were calculated.

**Results:** Nauplii showed a LC<sub>50</sub> = 135 µg/ml, while adults a LC<sub>50</sub> = 172 µg/ml. Cysts' hatching was inhibited by the EAP at all tested concentrations.

**Conclusions:** Under the conditions of this study, the extract of *P. cubensis* was toxic for nauplii and adults of *A. franciscana*.

© 2011 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

### Keywords:

Median lethal concentration

Hallucinogenic fungi

Psychodysleptic

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [fernandovega.villasante@gmail.com](mailto:fernandovega.villasante@gmail.com) (F. Vega-Villasante).

*Psilocybe cubensis* (Earle) Singer es una especie coprófila que fructifica en el estiércol vacuno de las praderas de zonas tropicales y subtropicales<sup>8</sup>. Tiene una amplia distribución, se conoce en América, desde Estados Unidos hasta Argentina, en Asia en Camboya, Filipinas, India, Tailandia y Vietnam, y en Oceanía tanto en Australia, como en Tasmania, Nueva Zelanda, o las islas Fiji<sup>10</sup>. Desde la época prehispánica se ha consumido en México, tanto en ceremonias y rituales como con fines medicinales. Al igual que todas las especies alucinógenas del género *Psilocybe*, su cuerpo fructífero, a excepción de las laminillas, se torna azul-verdoso al tocarse o manipularse y presenta un olor y sabor semejantes a los de la harina fermentada<sup>9</sup>. En la actualidad es consumido como droga recreativa, por algunos sectores de la población mexicana (principalmente adolescentes), aunque su posesión es considerada delito. A pesar de que en México no se han llevado a cabo estudios sobre su toxicidad, existen evidencias que permiten considerarlo como tóxico para el hombre<sup>1-3,16</sup>, pues su ingestión provoca desviación o perturbación del mecanismo psíquico (debido a las toxinas indólicas denominadas psilocibina y psilocina) que se manifiesta con alucinaciones visuales y auditivas (efecto psicodisléptico)<sup>9,19</sup>. También puede causar trastornos de ansiedad, ataxia, convulsiones severas, desorientación, hipotensión, hipertensión, parestesia, disforia, espasmos musculares, midriasis, náuseas, salivación, sudoración, taquicardia, inconsciencia, hiperventilación, agresividad, suicidio e incluso la muerte como consecuencia de reacciones alérgicas graves<sup>1,16</sup>.

*Artemia franciscana* Kellog es un crustáceo utilizado como organismo modelo en pruebas de toxicidad<sup>20</sup>, incluida la detección de toxinas fúngicas<sup>11,22</sup>, debido a su adaptabilidad a diferentes condiciones abióticas y fuentes nutricionales, ciclo de vida corto, baja variabilidad genética y disponibilidad continua de quistes y organismos a bajo coste en comparación con otros organismos modelo<sup>15</sup>. Se ha utilizado en la evaluación de la toxicidad de extractos de plantas<sup>5</sup>, detección de citotoxicidad de productos naturales marinos<sup>4</sup>, metabolitos fúngicos<sup>6,7,14</sup> y compuestos químicos como el dióxido de cloro en agua de mar<sup>17</sup>.

El objetivo de este estudio fue determinar la toxicidad de *P. cubensis* mediante el cálculo de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) utilizando para ello *A. franciscana* como organismo modelo, con la intención de iniciar los estudios que permitan establecer la toxicidad de las poblaciones de esta especie en México.

Los cuerpos fructíferos de *P. cubensis* se recolectaron en la región de Bahía de Banderas (costa norte del estado de Jalisco, México, 20°39'18" N y 105°11'42" W) durante la temporada de lluvias, que abarca de finales de junio a finales de octubre. Para la obtención de su extracto acuoso (EAP) se utilizó la metodología modificada de Kirsten y Bernardi<sup>12</sup>, que consiste en tomar 8 g de ejemplares secos y molidos, y mezclarlos con 80 ml de agua de mar artificial (Coral Reef®) para obtener metabolitos totalmente solubles. De esta forma se evitaron variaciones en la salinidad derivadas de una extracción con agua destilada y sus posteriores diluciones en el medio acuoso experimental, que pudieran ocasionar estrés y posible muerte a las artemias (debido al súbito choque osmótico). La mezcla se calentó a 80 °C durante 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 1.500 G durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a 4 °C hasta su utilización (tiempo de almacenamiento menor a 15 días). El bioensayo de toxicidad se llevó a cabo utilizando dicromato de potasio (DP) como sustancia de referencia (testigo positivo tóxico)<sup>14</sup>, diluido a diferentes concentraciones en el mismo medio salino.

Los quistes de *A. franciscana* (INVE®, Salt Lake City, Utah, EE. UU.) (1 g) se colocaron en 100 ml de agua de mar artificial (40 ups) para su hidratación; posteriormente se trasladaron a una cámara de eclosión de 15 l con agua ajustada a la misma salinidad, manteniendo una temperatura de 28 °C, aireación e iluminación constante

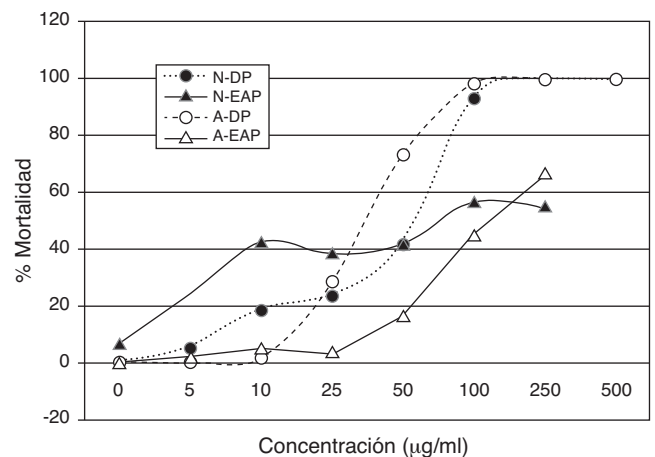
hasta su eclosión. Para el bioensayo con nauplios (larvas de *A. franciscana*) se realizó la cosecha de los mismos el tercer día de la eclosión. El resto de los organismos se trasladaron a un acuario (20 l), manteniendo los parámetros anteriores, añadiendo *Spirulina maxima* Bernard deshidratada como nutriente, hasta alcanzar la edad adulta a los 15 días<sup>21</sup>.

Se prepararon soluciones stock tanto del EAP como del DP, a partir de las cuales se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 250, 100, 50, 25 y 10 µg/ml para el EAP y de 500, 250, 100, 50, 25, 10 y 5 µg/ml para el DP. Se colocaron 5 o 10 ml de cada dilución en tubos de ensayo, y se introdujeron 10 nauplios o 10 adultos por tubo, respectivamente. Como testigos se utilizaron las mismas cantidades de nauplios y adultos, en los mismos volúmenes de agua, pero sin agregar EAP ni DP. Los bioensayos se realizaron por sextuplicado. Al término de 24 h de exposición se contaron los organismos muertos en cada tubo de ensayo, los cuales se consideraron sin vida al no presentar movimiento de sus apéndices durante 10 segundos. El cálculo de la CL<sub>50</sub> se realizó de acuerdo con Reed y Muench<sup>18</sup>.

Para el bioensayo de la inhibición de la eclosión, se colocaron 40 quistes de *A. franciscana* por tubo de ensayo, se hidrataron y posteriormente se aplicó el mismo patrón de concentraciones de DP y EAP, con 3 réplicas. Se contaron los organismos eclosionados en cada concentración en un tiempo de 24 y 48 h, teniendo en cuenta los que se encontraban en estado de *umbrella* (estadio en el cual el nauplio comienza a emerger del quiste y su apariencia es similar a un paraguas), así como los que alcanzaron el estadio naupliar, y se calculó el porcentaje de inhibición de la eclosión.

El resultado de este estudio fue que el EAP en concentraciones de 10 a 50 µg/ml provoca alrededor del 40% de mortalidad de los nauplios, mientras que en concentración mayor provocó aproximadamente el 55% de mortalidad (fig. 1). La CL<sub>50</sub> fue de 135 µg/ml para el EAP, y de 53 µg/ml para el DP. En los organismos adultos se observó que el EAP en concentraciones de 10 a 25 µg/ml ocasiona mortalidad muy baja, que se incrementa en concentraciones mayores hasta alcanzar un máximo cercano al 70%. La CL<sub>50</sub> para organismos adultos resultó de 172 µg/ml para el EAP y de 46 µg/ml para el DP.

En estudios similares en especies comestibles como *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. y *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quéil. se obtuvo una CL<sub>50</sub> superior a los 1.000 µg/ml en *A. franciscana*, mientras que *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. presentó una CL<sub>50</sub> de 94,4 µg/ml, por lo que se consideró como poco seguro para el



**Figura 1.** Porcentaje de mortalidad de nauplios y adultos de *A. franciscana* causada por las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *P. cubensis* (EAP) y dicromato de potasio (DP). A-DP: adultos con tratamiento DP; A-EAP: adultos con tratamiento EAP; N-DP: nauplios con tratamiento DP; N-EAP: nauplios con tratamiento EAP.

consumo humano<sup>14</sup>. Lo anterior sugiere que, bajo las condiciones establecidas en el presente protocolo, los especímenes de *P. cubensis* recolectados en la región costa norte de Jalisco, México, podrían considerarse poco recomendables para su consumo, aunque su toxicidad es mucho menor a la de micotoxinas, como la aflatoxina G1, el diacetoxiscirpenol, la gliotoxina y la esterigmatocistina, que a bajas concentraciones (0,47-3,5 µg/ml) provocaron mortalidad del 50% de los nauplios de *Artemia salina* L.<sup>11</sup>. Kirsten y Bernardi<sup>12</sup> administraron a ratones (por vía interperitoneal) un extracto de *P. cubensis* con una concentración de 10 µg/ml, encontrando modificaciones importantes en su comportamiento normal. La concentración mencionada se corresponde con una de las utilizadas en este estudio, que causó efectos negativos en la supervivencia de *A. franciscana*, principalmente en nauplios.

Bajo condiciones ambientales adversas, las hembras de *A. franciscana* liberan embriones en la etapa de gastrulación rodeados por una cápsula (quistes). Estos quistes se encuentran en estado de diapausa, por lo que su metabolismo se reduce al máximo y su resistencia a factores de estrés es muy alta<sup>13</sup>. Una vez que las condiciones ambientales son apropiadas, la diapausa se rompe, el embrión se activa y retoma su desarrollo hasta ser liberado como nauplio<sup>23</sup>. En el presente estudio se observó un porcentaje de inhibición de la eclosión del 100% a todas las concentraciones de EAP; sin embargo, bajo el efecto de un tóxico conocido (DP), la eclosión fue del 32%. Lo anterior sugiere que el EAP produjo el mantenimiento de la diapausa del embrión en desarrollo, o bien la muerte del mismo. Determinar las causas de la alta inhibición de la eclosión demostrada por el EAP es el objetivo de estudios en proceso.

### Agradecimientos

Se agradecen los recursos aportados por el proyecto COECYTJAL 066-2009-661 para el desarrollo de esta investigación.

### Bibliografía

- Asselborn G, Wennig R, Yegles M. Tragic flying attempt under the influence of "magic mushrooms". *Probl Forensic Sci.* 2000;42:41–6.
- Berger KJ, Guss DA. Mycotoxins revisited: Part I. *J Emerg Med.* 2005;28:53–62.
- Beug MW, Shaw M, Cochran KW. Thirty-plus years of mushroom poisoning: summary of the approximately 2,000 reports in the NAMA case registry. *McIlvainea.* 2006;16:47–68.
- Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* 2002;2:17–21.
- Fernández-Calientes A, Mendiola Martínez J, Monzote Fidalgo L, García Parra M, Sariago Ramos I, Acuña Rodríguez D, et al. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Rev Cubana Med Trop.* 2009;61:254–8.
- González AM, Presa M, Latorre MG, Lurá MC. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Rev Iberoam Micol.* 2007;24:59–61.
- González AM, Presa MF, Lurá MC. Ensayo de toxicidad a *Artemia salina*: puesta a punto y aplicación a micotoxinas. *FABICIB.* 2003;7:117–22.
- Guzmán G. The genus *Psilocybe*: a systematic revision of the known species including the history, distribution and chemistry of the hallucinogenic species. Cramer, Vaduz, Germany: Beihefte zur Nova Hedwigia Heft 74; 1983.
- Guzmán G. Las especies de *Psilocybe* (Fungi, Basidiomycotina Agaricales) conocidas de Jalisco (México) y descripción de dos nuevas para la ciencia. *Acta Bot Mex.* 1998;43:23–32.
- Guzmán G, Allen JW, Gartz J. A worldwide geographical distribution of the neurotropic fungi, an analysis and discussion. *Ann Mus Civ Rovereto.* 2000;14:189–280.
- Harwig J, Scott PM. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Appl Microbiol.* 1971;21:1011–6.
- Kirsten TB, Bernardi MM. Acute toxicity of *Psilocybe cubensis* (Ear.) Sing., Strophariaceae, aqueous extract in mice. *Rev Bras Farmacogn.* 2010;20:397–402.
- MacRae TH. Diapause diverse states of developmental and metabolic arrest. *J Biol Res.* 2005;3:3–14.
- Nieto IJ, Salama AM, Cataño JE, Chegwin C. Determinación de la toxicidad de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Paxillus involutus* sobre *Artemia salina*. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25:186–7.
- Nunes BS, Carvalho FD, Guilhermino LM, Stappen GV. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ Pollut.* 2006;144:453–62.
- Peden NR, Pringle SD, Crooks J. The problem of psilocybin mushroom abuse. *Hum Exp Toxicol.* 1982;1:417–24.
- Puente ME, Vega-Villasante F, Holguin G, Bashan Y. Susceptibility of the brine shrimp *Artemia* and its pathogen *Vibrio parahaemolyticus* to chlorine dioxide in contaminated sea-water. *J Appl Bacteriol.* 1992;73:465–71.
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg.* 1938;27:493–7.
- Schultes RE, Hofman A. Plantas de los dioses. México D.F.: Fondo de Cultura Económica; 2000.
- Sorgeloos P, Remiche-Van Der Wielen C, Persoone G. The use of *Artemia* nauplii for toxicity test—a critical analysis. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1978;2:249–55.
- Soundarapandian P, Saravanakumar G. Effect of different salinities on the survival and growth of *Artemia* spp. *Curr Res J Biol Sci.* 2009;1:20–2.
- Wijnands LM, van Leusden FM. An overview of adverse health effects caused by mycotoxins and bioassays for their detection. RIVM report 257852-004. Bilthoven, The Netherlands: National Institute of Public Health and the Environment; 2000.
- Zhou Q, Wu C, Dong B, Liu F, Xiang J. The encysted dormant embryo proteome of *Artemia sinica*. *Mar Biotechnol (NY).* 2008;10:438–46.