



Hongo *Trametes versicolor* como fuente de fármacos potenciales contra la enfermedad tropical leishmaniasis

ENTIDADES EJECUTORAS PRINCIPALES: Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química (FQ); Universidad de La Habana (UH), Cuba. Laboratorio de Parasitología; Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. La Habana, Cuba

Entidades ejecutoras participantes: Instituto de Farmacia y Farmacognosia de la Universidad Karl Franzens; Graz, Austria. Instituto de Farmacia y Farmacognosia. Centro de Química y Biomedicina. Universidad Leopold Franzens; Innsbruck, Austria

AUTORES PRINCIPALES: Vivian Leliebre Lara¹, Lianet Monzote Fidalgo², Clara Nogueiras Lima³

Colaboradores: Eva María Pferschy-Wenzig³, Rudolf Bauer³, Veronika Temml⁴, Hermann Stuppner⁴

Filiación: ¹Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química (FQ); Universidad de La Habana (UH), Cuba. ²Laboratorio de Parasitología; Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. La Habana, Cuba. ³Instituto de Farmacia y Farmacognosia de la Universidad Karl Franzens. Graz, Austria. ⁴Instituto de Farmacia y Farmacognosia. Centro de Química y Biomedicina. Universidad Leopold Franzens, Innsbruck, Austria

RESUMEN

Palabras clave

Trametes versicolor; fármaco; leishmaniasis

Desde el año 2010 se comenzó a trabajar por primera vez en nuestro país, en la temática de identificación quimiotaxonómica de los hongos basidiomicetos cubanos. Es conocido que estos organismos, se apoyan en la síntesis de metabolitos secundarios como mecanismo de defensa para sobrevivir en su entorno. Como los humanos y los hongos comparten microbios antagonistas comunes, tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, el hombre se beneficia de la producción natural de antibióticos que realizan los hongos, para defenderse de la infección producida por agentes patógenos similares. De modo que no es sorpresa que los principales antibióticos antibacterianos sean compuestos derivados de hongos, que poseen una gran diversidad estructural y que exhiben una gran variedad de actividades farmacológicas. En esta propuesta se determinó por primera vez a nivel internacional la composición química del hongo basidiomiceto *Trametes versicolor* (Bres. Rivarden) cubano y la actividad antileishmania de sus extractos mediante un estudio biodirigido. Los extractos del hongo, tanto los activos como los no activos, se fraccionaron mediante el uso de numerosas técnicas de aislamiento y caracterización modernas. Se aislaron y caracterizaron 12 metabolitos secundarios, tres de ellos triterpenos con núcleo de lanostano, los cuales se aíslan por primera vez a nivel internacional en este hongo. Además, se identificaron 51 compuestos mediante sus espectros de masas. Este hecho contribuyó significativamente a la identificación quimiotaxonómica de estos organismos en Cuba, la cual se realiza por primera vez con este trabajo. Como otro resultado relevante, se pudo confirmar (mediante ensayos *in vitro*) que el ácido

trametenólico B, compuesto más abundante en el hongo cubano, mostró la mejor actividad anti-leishmania ($1,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$) frente al parásito *Leishmania amazonensis*, a menor concentración que la sustancia de control (Pentamidina®), por lo que resulta un compuesto potencial para estudios avanzados frente a esta enfermedad. Adicionalmente, se realizó por primera vez, un estudio teórico de acoplamiento molecular de los metabolitos aislados de característica esterooidal a la enzima arginasa del parásito *Leishmania*, la cual ha emergido como blanco de estudio debido a que su inhibición conduce a la muerte del parásito. El acoplamiento molecular de los compuestos aislados a esta enzima fue consistente con los resultados biológicos obtenidos. Los resultados están avalados con la publicación de 4 artículos científicos, dos de ellos indexados en la Web of Science, 5 trabajos presentados en eventos científicos; además, es parte de una tesis de doctorado en Ciencias Químicas, defendida exitosamente en el 2017.

Experiencias en etnomedicina conjuntamente con conclusiones básicas de laboratorio han demostrado que los hongos desempeñan un papel importante en el tratamiento y prevención de diversas enfermedades.¹ La diversidad estructural de los compuestos aislados en ellos constituye una oportunidad única en el descubrimiento de nuevos fármacos.²

Los hongos basidiomicetos son una rama dominante de compuestos biológicamente activos dentro del reino de los hongos.³ *Trametes versicolor* (Bres. Rivarden) es uno de los hongos basidiomicetos no comestible más conocido, apreciado, estudiado y empleado en prácticas clínicas modernas debido a la presencia en su extracto acuoso y caliente del más trascendental agente antitumoral, el Krestin, polisacárido unido a una proteína efectiva contra varios modelos de cáncer.⁴

La notoriedad de los polisacáridos encontrados solo en extractos acuosos redujo el interés en el estudio de la composición del resto de los extractos de este hongo. En años recientes, este interés resurgió debido a la detección de otras propiedades farmacológicas, en extractos de diferente polaridad.⁵ Teniendo en cuenta que se ha incrementado el estudio de las propiedades de extractos de hongos basidiomicetos contra varios padecimientos y la colaboración entre el Centro de Estudio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad de La Habana, con el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, el cual tiene entre sus líneas de investigación la búsqueda de fármacos potenciales frente a enfermedades tropicales producidas por parásitos del género *Leishmania*, se decide como objetivo general determinar la composición química de los extractos con actividad antileishmniásica del hongo *Trametes versicolor* mediante un estudio biodirigido.

Resultados y discusión

La primera parte de este trabajo está dirigida a la obtención de los extractos de gradiente de polaridad de este hongo y a la evaluación de su actividad antileishmania.

Los extractos se obtuvieron mediante maceración durante 1 semana, con un disolvente cada vez (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, y etanol) y con agitación ocasional. Transcurrido el tiempo de maceración, la mezcla se filtró a presión reducida, la fase orgánica se evaporó a sequedad y el extracto así obtenido constituyó el crudo del disolvente en uso. El material fúngico seco se empleó en la próxima maceración con el disolvente que le continúa en polaridad y así sucesivamente hasta obtener cuatro diferentes extractos crudos (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol) de gradiente de polaridad. Estos extractos del hongo *Trametes versicolor* fueron utilizados en el ensayo de actividad antileishmania frente al estadio extracelular del parásito *Leishmania amazonensis*, promastigotes.

La mayoría de los extractos mostró un 50 % de inhibición de crecimiento del parásito, a concentraciones superiores a los 100 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, los crudos de TV-EtOAc y TV- EtOH (I) mostraron el mismo porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito a concentraciones menores, alrededor de los 100 g/mL ; concentración que comienza a considerarse aceptable cuando se trata de ensayos con extractos crudos.⁶ Este resultado sugiere que ambos extractos podrían poseer la sustancia responsable de dicho efecto, aunque no se descarta la posibilidad de que el efecto sinérgico de sus constituyentes produzca la actividad observada. A pesar de que el extracto TV- EtOH (I) fue activo a menor concentración, mostró una toxicidad elevada; indicando una acción inespecífica debido al bajo índice de selectividad (IS) obtenido.

Una vez identificados los extractos activos frente a la actividad antileishmania, se procedió al fraccionamiento mediante técnicas cromatográficas (GC-MS, HPLC, CC, TLC, etc.) y extractivas. De igual manera se procedió con los extractos menos activos cuya composición química contribuyó a la identificación quimiotaxonómica del hongo *Trametes versicolor*. La caracterización química se llevó a cabo me-

dianete técnicas espectroscópicas de RMN D¹ y D². Como resultado de lo anterior se aislaron y caracterizaron 12 metabolitos secundarios (figura 1), de los cuales tres de ellos (5-7) se aíslan por primera vez en este hongo y se identificaron 51 constituyentes volátiles, mediante sus espectros de masas, empleando como técnica CG-MS.

Los extractos activos frente a la actividad antileishmania (EtOAc y EtOH), tuvieron como constituyentes mayoritarios los compuestos 5, 6 y 10 y para el caso del extracto de EtOH, además de estos compuestos; poseía entre sus constituyentes una mezcla de los endoperóxidos 3 y 4 (v. figura 1). Solo los compuestos aislados en cantidad suficiente (3, 5 y 1) fueron ensayados en la actividad objeto de estudio. Para evaluar la actividad *in vitro* de estos constituyentes, se emplearon cultivos extracelular (promastigotes) e intracelular (amastigotes) de *Leishmania amazonensis*, parásito que produce leishmaniasis cutánea en el nuevo mundo y que actualmente es el causante de un gran espectro de enfermedades que incluyen leishmaniasis mucocutánea, visceral, dérmica post kala-azar y una forma atípica de leishmaniasis visceral americana con hepatitis y linfadenopatía.⁷ Esto hace que *Leishmania amazonensis*, fuera el parásito seleccionado para este estudio. Los resultados del ensayo se muestran a continuación en la tabla 1.

El monitoreo de la actividad antileishmania preliminar se realizó en cultivos de promastigotes, y se acompañó de la evaluación del estadio intracelular en macrófagos (amastigotes) que es la forma de infección de *Leishmania*, relevante en hospederos mamíferos. La citotoxicidad de cada compuesto fue evaluada utilizando macrófagos no infestados, este valor fue comparado con la actividad en amastigotes para

evaluar si la respuesta positiva *in vitro* de los compuestos fue debida a sus toxicidades o a la actividad selectiva contra *Leishmania*. Luego de 72 h de exposición al parásito *Leishmania amazonensis*, solo los metabolitos peróxido de ergosterol (3) y el ácido trametenólico B (5) inhibieron el crecimiento del parásito a las concentraciones 13,9 ± 0,2 μM y 2,9 ± 0,1 μM, respectivamente.

Estos también mostraron efectos inhibitorios ante amastigotes, forma intracelular clínicamente relevante del parásito, con una concentración mínima inhibitoria de 4,0 ± 0,1 μM para (3) y 1,6 ± 0,1 μM para (5). El ácido trametenólico B (5) mostró la más potente actividad inhibitoria en ambos modelos usados extra (promastigotes) e intracelular (amastigotes), en este último fue estadísticamente más activo que el control positivo utilizado, Pentamidina. El 7,22-ergostadien-3β-ol resultó inactivo, para ambos estadios de este parásito. El ácido (5) mostró la mejor actividad antileishmania y la mejor selectividad, criterios importantes para seleccionar un buen agente leishmanicida. Todo esto hace pueda ser considerado para estudios futuros de dicha actividad *in vivo* y para elucidar el mecanismo de acción en este parásito.

Para el peróxido (3) ha sido descrita la actividad leishmanicida contra la forma amastigote en un modelo *in vitro*, ligeramente diferente. El mecanismo de acción propuesto por estos autores, involucra el reemplazo del ergosterol, componente estructural de la membrana celular del parásito, por peróxido de ergosterol, durante el proceso de replicación del parásito. La subsecuente ruptura del enlace peróxido pudo desencadenar una serie de reacciones de radicales libres que ocasionaran trastornos en la membrana del parásito y, en consecuencia, la muerte de este.

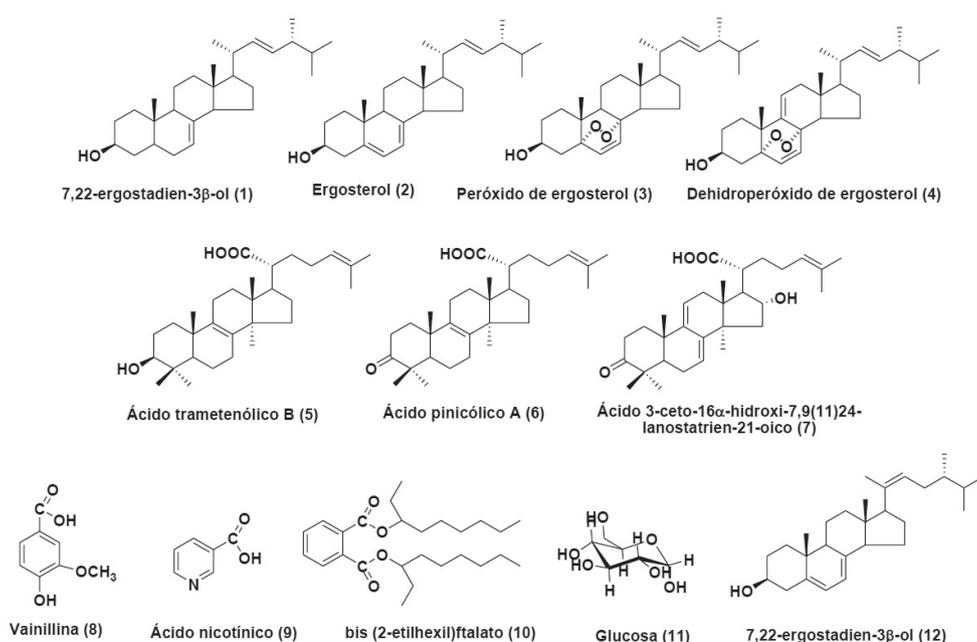


Fig.1. Metabolitos secundarios aislados de los extractos de gradiente de polaridad del hongo *Trametes versicolor*.

Tabla 1. Actividad antileishmania y citotoxicidad de los compuestos puros: peróxido de ergosterol (1), 7,22-ergostadien-3 β -ol(2) y ácido trametenólico B(3)

Sustanc.	CI ₅₀ ^a \pm DE ^b				CC ₅₀ ^c \pm DE ^b		IS ^d
	Promastigotes		Amastigotes		Macrófagos		
	μ g/mL	μ M	μ g/mL	μ M	μ g/mL	μ M	
3	5.9 \pm 0.1	13.9 \pm 0.2	1.7 \pm 0.1	4.0 \pm 0.1	18.4 \pm 0.9	42.9 \pm 2.2	11
1	> 20	> 50	> 5	> 12	14.9 \pm 4.9	37.5 \pm 6.2	-
5	1.3 \pm 0.03	2.9 \pm 0.1	0.7 \pm 0.03*	1.6 \pm 0.1*	18.0 \pm 2.8	39.4 \pm 4.8	25
Pentamidina	0.4 \pm 0.01	1.2 \pm 0.02	1.3 \pm 0.1	3.8 \pm 0.2	11.7 \pm 1.7	34.4 \pm 4.9	9

CI₅₀^a: Concentración inhibitoria media; concentración de extracto que causa un 50 % de inhibición del crecimiento. CC₅₀^c: Concentración citotóxica media; concentración de extracto que causa un 50 % de mortalidad. IS^d: Índice de selectividad (CC₅₀ de macrófagos/IC₅₀ de promastigotes). DE^b: Desviación estándar de tres réplicas. ePentamidina: Sustancia de referencia. *Actividad significativamente alta comparada con el control.

A pesar de que el ácido trametenólico (3) se aisló de todos los extractos, solamente los de EtOAc y EtOH I mostraron actividad leishmanicida aceptable. Este resultado puede ser debido a la baja concentración de este metabolito en los otros extractos o a un antagonismo entre este y los otros constituyentes. Es evidente que, a pesar de la similitud estructural entre los tres compuestos, existen otros requerimientos estructurales que determinan una buena actividad leishmanicida.

En la última etapa de este trabajo, se empleó la herramienta computacional acoplamiento molecular como un complemento teórico en la búsqueda de compuestos bioactivos. De esta forma se predice de manera aproximada las interacciones más probables de los compuestos esteroidales aislados (1-7 y 10), con el sitio activo la enzima arginasa de *Leishmania*, diana terapéutica que ha cobrado gran interés

debido a que es la primera involucrada en la síntesis de poliaminas, proceso esencial en la supervivencia y multiplicación del parásito. El resultado obtenido fue consistente con los experimentales. El ácido (5) mostró el mayor número de interacciones con los aminoácidos esenciales para la acción enzimática (figura 2), seguido por los endoperóxidos de ergosterol (3 y 4), a pesar de que se desconoce aún, si la actividad exhibida por estos compuestos se debe a la inhibición de la enzima arginasa.

A pesar de la similitud estructural entre estos metabolitos, la modelación no arrojó los resultados esperados. Los ácidos 6 y 7 se ubican en el sitio activo de la enzima preferentemente con la cadena lateral hacia adentro, dejando libre de interacción el grupo carbonilo del carbono tres. Lo anterior indica que las mayores interacciones de estos compuestos ocurren por la cadena lateral.

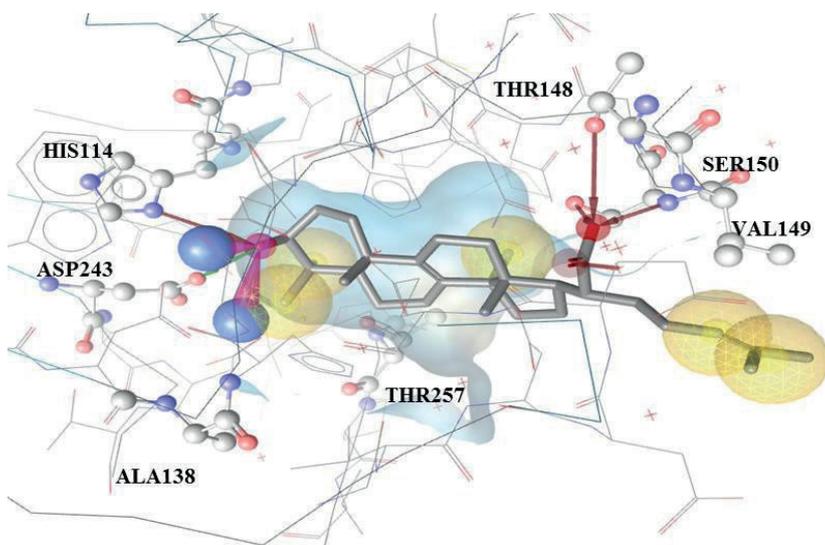


Fig. 2. Mejor resultado del complejo acoplado ácido trametenólico B-arginasa de *Leishmania* (esferas azules, Mn²⁺).

En este trabajo se describe la composición química del hongo *Trametes versicolor* cubano del cual se aíslan por primera vez, los triterpenos con núcleo de lanostano (5, 6 y 7), hecho que contribuye a la identificación quimiotaxonómica de este hongo. El ácido trametenólico B (7), componente mayoritario, fue el metabolito de mayor actividad antileishmaniana, superior a la del patrón empleado. Los estudios de acoplamiento molecular fueron consistentes con los resultados experimentales obtenidos.

Referencias bibliográficas

1. Duru, M.E.; Cayan, G.T. Biologically active Terpenoids from mushrooms origin: A review. *Rec. Nat. Prod.* 2015; 9:4 456-483.
2. Grienke, U.; Zöll, M.; Peintner, U.; Rollinger, J.M. European medicinal polypores: A modern view on traditional uses. *J.Ethnopharm.* 2014; 154(3) 564-583.
3. Zhang, M.; Cui, S.W.; Shueng, P.C.; Wang, K.Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Sci Technol.* 2007; 18, 4-19.
4. Kobayashi, H.; Matsunaga, K.; Oguchi, Y. Antimetastatic effects of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide obtained

from basidiomycetes: an overview. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1995; 4, 275-281.

5. Kamiyama, M.; Horiuchi, M.; Umamo, K.; Kondo, K.; Otsuka, Y.; Shibamoto, T. Antioxidant/anti-inflammatory activities and chemical composition of extracts from the mushroom *Trametes versicolor*. *Int. J. Nut. Food Sci.* 2013; 2(2):85-91.
6. Fernández-Calienes Valdés, A.; Cuesta Rubio, O.; Fuentes Fiallo, V. Actividad anti-plasmodial de especies de *Solanaceae* presentes en Cuba. *Rev. Cub. Med. Trop.* 2015; 3(67).
7. Aleixo, J.A.; Nascimento, E.T.; Monteiro, G.R.; Fernandes, M.Z.; Ramos, A.M.O.; Wilson, M.E.; Pearson, R.D.; Jeronimo, S.M.B. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2006, 100, 79-82.

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA

Dra. Vivian Leliebre Lara. Centro de Estudio de Productos Naturales. Facultad de Química, Universidad de La Habana, Zapata y G. CP 10400. La Habana. Correo electrónico: leliebre@fq.uh.cu