

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**EFFECTOS TÓXICOS DE ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS DE
LUPINOS (FABACEAE) SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL DE LA RATA**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**P R E S E N T A
JACHIN ASCENCIO MONTEÓN**

ZAPOPAN, JAL., NOVIEMBRE 2000



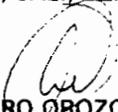
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

C. JACHIN ASCENCIO MONTEON
P R E S E N T E .

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "EFECTOS TOXICOS DE ALCALOIDES QUINOLIZIDINICOS DE DOS ESPECIES SILVESTRES DE LUPINOS (*Fabaceae*) SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al M.C. PEDRO MACEDONIO GARCIA LOPEZ y como asesor al DR. JACINTO BAÑUELOS PINEDA.

A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., SEPTIEMBRE 17 DE 1998


M. EN C. ARTURO OROZCO BAROCIO
PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION

COMITE DE
TITULACION




M. EN C. MARTHA GEORGINA OROZCO MEDINA
SECRETARIO DEL COMITE DE TITULACION

c.c.p. M.C. PEDRO MACEDONIO GARCIA LOPEZ.- Director del Trabajo.
c.c.p. DR. JACINTO BAÑUELOS PINEDA.- Asesor del Trabajo.
c.c.p. Expediente del alumno

AOB/MGOM/bacg*

DRA. Mónica Riojas López
Presidente del Comité de Titulación
de la Lic. en Biología del CUCBA.
P R E S E N T E.

Por medio de este conducto nos permitimos informar a usted, que una vez revisado el manuscrito de la Tesis que realizó el pasante Jachin Ascencio Monteón, con código 090625624, cuyo título fue **Efectos Tóxicos de Alcaloides Quinolizidínicos de Lupinos (Fabaceae) Sobre el Sistema Nervioso Central de la Rata**. Consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para su autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Zapopan, Jal., a 16 de noviembre de 2000.

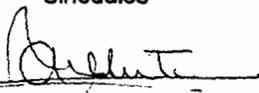
P.A. 

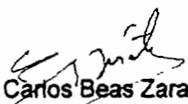
M. en C. Pedro Macedonio García López
Director



DR. Jacinto Bañuelos Pineda
Asesor

Sinodales


DR. Alberto Morales Villagran


DR. Carlos Beas Zarate


M. en C. Laura Gpe. Medina Ceja

Agradecimientos:

Son muchos los caminos que pude haber recorrido, ahora se que sólo las huellas que he trazado me han podido traer hasta aquí. Por eso mi más profundo agradecimiento a todos aquellos familiares, allegados, maestros, instituciones, alumnos y amigos, que han coincidido en esta parte de nuestros caminos y han brindado su guía y apoyo en la creación y formación de este trabajo. Ya que sin sus invaluable aportaciones jamás hubiera sido posible intentar este desafío llamado biología.

Jacinto Acuña A.
Sinceramente Gracias.

CONTENIDO

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Historia e importancia del género.....	4
2.2. Los <i>Lupinus</i> del Viejo Mundo.....	5
2.3. Los <i>Lupinus</i> de América.....	7
2.4. El desarrollo de <i>Lupinus</i> en la era moderna.....	8
2.5. Taxonomía y sistemática.....	11
2.6. Descripción botánica y morfología del género <i>Lupinus</i>	11
2.7. Ecología del género.....	12
2.8. Distribución geográfica de los <i>Lupinus</i>	13
2.9. Los <i>Lupinus</i> de México	13
2.10. Características alimenticias.....	14
2.11. Alcaloides. Definición y clasificación estructural.....	16
2.12. Alcaloides. Distribución natural.....	17
2.13. Alcaloides quinolizidínicos AQ.....	18
2.14. Distribución natural de AQ.....	19
2.15. Biosíntesis y metabolismo de AQ en <i>Lupinus</i>	21
2.16. Toxicidad y actividad biológica de los AQ de <i>Lupinus</i>	24
2.17. Rojo de <i>trifeniltetrazolium</i>	30

III. HIPÓTESIS	32
IV. OBJETIVOS	32
V. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Colecta e identificación de <i>Lupinus</i>	34
5.2. Extracción de alcaloides.....	35
5.3. Detección de alcaloides. Modificación de la técnica de Hultin y Torssell (1965).....	35
5.4. Cromatografía de gas capilar.....	36
5.5. Metodología para la implantación de cánulas vía intracerebroventricular.....	37
5.6. Prueba toxicológica.....	39
5.7. Perfusión intracardiaca.....	39
5.8. Método <i>trifeniltetrazolium</i> (CTT).....	40
5.9. Método Nissl.....	42
VI. RESULTADOS	44
6.1. Detección de alcaloides a partir de dos reactivos específicos.....	44
6.2. Cromatografía de gas capilar.....	45
6.3. Descripción de los hallazgos clínicos encontrados en los animales posteriormente a la aplicación de los AQ y mediante el método CTT.....	49
6.4. Tinción de Nissl.....	62
6.5 Observación clínica de los animales.....	84
VII. DISCUSIÓN	85

VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	99
ANEXO 1 Lista general de abreviaturas.....	115
ANEXO 2 Lista de abreviaturas de estructuras cerebrales.....	116

RESUMEN

Introducción. El género *Lupinus*, perteneciente a la familia Fabacea, cuenta con aproximadamente 400 especies reportadas en el mundo, 80 en la República Mexicana y 15 en el estado de Jalisco. Los lupinos silvestres son importantes por su alto contenido de proteína, aceite y carbohidratos, y se caracterizan por su elevada concentración de alcaloides quinolizidínicos (AQ), que son metabolitos secundarios que se encuentran como bases terciarias o bien como N-Oxidos. Entre los AQ más frecuentes se encuentran la lupanina y esparteina, sustancias que en diversas concentraciones pueden provocar toxicidad aguda o crónica en el sistema nervioso central (SNC). Por tal motivo es necesario conocer a detalle las zonas más sensibles del SNC que se ven afectadas por estas sustancias.

Objetivo. Determinar las áreas más sensibles a los efectos provocados por los extractos de alcaloides quinolizidínicos obtenidos de dos especies de *Lupinus* silvestres del occidente de México en el sistema nervioso central de la rata.

Metodología. Para valorar este efecto se utilizaron 15 ratas Wistar machos jóvenes, distribuidos al azar en 3 grupos de 5 animales cada uno. Durante 5 días consecutivos el primer grupo (M) se dosificó con 45 nanogramos del extracto crudo de AQ obtenidos de *L. montanus* mientras que el segundo grupo (E) recibió la misma cantidad AQ obtenidos de *L. exaltatus* (ambos extractos fueron sometidos a cromatografía de gas capilar para la identificación de los AQ mayoritarios, se utilizó cafeína como estándar interno), el tercer grupo (T) correspondió al grupo testigo, el cual solo recibió el vehículo de dilución (aceite de sésamo). La vía de administración para los tres grupos fue intracerebroventricular depositando las sustancias en el ventrículo derecho del cerebro a través de una cánula de .36 mm de diámetro insertada en el cráneo. Al término de la prueba los animales fueron anestesiados y sometidos a una perfusión intracardiaca para la fijación del cerebro y posteriormente se practicó una craneotomía para extraer el encéfalo completo. Dos cerebros de cada grupo se colocaron en una solución PBS a 0.1 M en punto de congelación, para posteriormente colocarlos en un vibrotomo con el cual se realizaron cortes coronales de 500 micras de espesor, posteriormente se dejaron en inmersión en una solución al 2% de cloruro de *trifeniltetrazolium* (CTT), con la finalidad de realizar una cuantificación del volumen parcial y total de área dañada (utilizando un analizador de imágenes). De manera paralela, 3 cerebros restantes de cada grupo fueron deshidratados en series crecientes de alcohol e inmersos en parafina para realizar cortes de 20 micras de espesor en un microtomo, con la finalidad de ser sometidos a tinción con el método de Nissl.

Resultados. La cromatografía de gas determinó la presencia de 4 alcaloides principales en ambas especies de *Lupinus*; esparteina, lupanina, 3-OH-lupanina y 13-OH-lupanina, siendo detectadas variaciones en la concentración de los AQ interespecie. Los resultados obtenidos de la observación mediante microscopía óptica (Nissl) mostraron cambios morfológicos en las neuronas, causados por AQ consistentes en hinchamiento celular, deformación de la membrana plasmática, desintegración e hinchamiento del núcleo, compactación de la cromatina, gliosis, cariólisis, cariorexis, basofilia e hipertrofia del retículo endoplásmico. Al mismo tiempo el análisis mediante la técnica de CTT presentó sitios de reacción nula al colorante causados por AQ en regiones como: la corteza, los ganglios basales, el tálamo, el hipotálamo, el hipocampo, los núcleos del cerebro medio, el puente, la médula y el cerebelo.

Conclusiones. El alcaloide mayoritario encontrado en semillas de *L. montanus* fue esparteina, mientras que para *Lupinus exaltatus* fue lupanina. La reacción del tejido neural a la sal CTT, resultó eficiente para evidenciar el volumen de daño causado por alcaloides de *Lupinus* en el sistema nervioso central de la rata. Las zonas y núcleos dañados por alcaloides de *Lupinus*, y evidenciados a partir de la observación microscópica (Nissl), resultaron estar ampliamente dispersos a lo largo y ancho del encéfalo, estos daños se consideran como severos debido a la extensión, magnitud y ubicación de las regiones afectadas.

I. INTRODUCCIÓN

El género *Lupinus* perteneciente a la familia Fabaceae orden Fabales (Takhtajan, 1987), ha sido cultivado y usado durante siglos en amplias zonas geográficas, teniendo usos importantes, tanto en la alimentación animal como humana (Gladstones, 1974).

Las especies silvestres y domesticadas de lupinos; *L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius* y *L. mutabilis* son importantes en la agricultura debido a la asociación simbiótica de éstas con bacterias del género *Rhizobium* con capacidad para fijar nitrógeno atmosférico. De esta manera, se puede incorporar nitrógeno al suelo, el cual se aprovecha por otros cultivos en un sistema de producción en rotación (Haq, 1993). Así mismo, llama la atención que sus semillas poseen un elevado contenido de proteínas, aceite, fibra y carbohidratos (Bellido y García, 1991). Sin embargo, la elevada proporción de alcaloides (compuestos nitrogenados considerados como metabolitos secundarios) es mayor al 1 % en las semillas de los lupinos silvestres lo cual limita su aprovechamiento directo en la alimentación (Ruiz, 1994), ya que pueden provocar toxicidad aguda o crónica del sistema nervioso central (Agid y col., 1988).

Actualmente se han reportado más de 100 alcaloides del tipo quinolizidínico (AQ) presentes en las especies silvestres del género *Lupinus*. Sin embargo, existe una variación inter e intraespecie en el contenido y proporción de algunos de ellos (Muzquiz y col., 1982; Ruiz, 1997). Los AQ constituyen una defensa química de

los lupinos contra sus depredadores (insectos y mamíferos herbívoros) e individualmente muestran propiedades toxicológicas y farmacológicas importantes como neurotóxicos, antipiréticos, antiinflamatorios, depresores del sistema nervioso central (SNC) y antiarrítmico cardíaco, entre otros (Schmeller y col., 1994). Los síntomas del envenenamiento agudo en animales puede resumirse en fallo respiratorio, convulsiones y coma, lo que puede conducir a la muerte del animal o provocar graves trastornos en las neuronas de áreas motoras del SNC (Agid y col., 1988).

De las 400 especies de lupinos reportadas en el mundo (Dunn, 1984), alrededor de 80 se distribuyen en 26 estados de la República Mexicana. En Jalisco, se han reportado 15 especies entre las cuales *L. exaltatus* es de las más abundantes (McVaugh, 1987); mientras que *L. montanus* se encuentra ampliamente distribuido en la zona norte (McVaugh, 1987; Ruiz, 1995).

Debido a lo anterior, es importante describir y cuantificar mediante técnicas histoquímicas y morfométricas las áreas del SNC afectadas por los diferentes extractos de alcaloides obtenidos a partir de semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus*.

II. ANTECEDENTES

2.1. Historia e importancia del género

El origen remoto del nombre botánico de este género (*Lupinus*), se desconoce. Parece ser que es una derivación de la palabra latina "Lupus" que significa lobo, probablemente por que esta planta se daba en terrenos difíciles y salvajes teniendo así por compañeros a los lobos (Gladstones, 1974). Sin embargo, el nombre Griego de *Lupinus* fue Thermos, presumiblemente por el sabor amargo-caliente de las semillas, en donde al parecer todos los nombres esparcidos en el área del mediterráneo se generan de este vocablo, por ejemplo Termis (Egipto), Turmus (Arabia), Altramuz (España) y Turmusa en Siria y Palestina.

Una de las referencias más antiguas es la del famoso médico griego Hipócrates (400-356 a. C. citado por Gladstones en 1974) quien menciona el uso medicinal, nutricional y cosmético de las semillas de *Lupinus*. Otra referencia, que data del siglo XV, es la que aparece en el libro Arabe-Persa, "Las Mil y Una Noches". En la noche 947 se menciona a varias mujeres asociadas con esta leguminosa. Así como Teofrasto (372-288 a. C.), filósofo griego pupilo de Aristóteles que en su tratado "Historia Natural de las Plantas" escribió extensamente sobre *Lupinus albus*, mencionando el tipo de suelos que necesita y como debe ser sembrado.

En Roma y Grecia el cultivo de lupino blanco (*L. albus*), se llevó a cabo ampliamente y fue descrito por tratadistas romanos, quienes frecuentemente hacen referencia de éste como una planta que crece en terrenos pobres e infértiles.

Así mismo, consideraban la importancia de desamargar la semilla artificialmente para que pudiera ser utilizada en la alimentación del ganado y de manera moderada para el consumo humano, sobre todo en las clases más pobres y en casos de fuerte necesidad. De hecho, la semilla de esta planta tuvo una importancia tal que fueron utilizados en la antigua Roma como unidad de cuenta o moneda de baja denominación cuyo nombre fue "Nummus Lupinus" (Gladstones, 1974).

2.2. Los *Lupinus* del Viejo Mundo

De las aproximadamente 400 especies de *Lupinus* existentes en el mundo, sólo doce se encuentran en el viejo mundo, desde los alrededores del mediterráneo hasta el este de África, la mayor parte del resto se distribuyen en el continente americano (Dunn, 1984). Las especies del viejo mundo son: *L. albus* (lupino blanco, llamado así por el color de su flor), *L. luteus* (lupino amarillo), *L. angustifolius* (lupino de hoja angosta), *L. consentinii*, *L. atlanticus*, *L. pilosus*, *L. micranthus*, *L. hispanicus*, *L. palestinus*, *L. digitatus*, *L. princei*, *L. somaliensis* (Gladstones, 1974).

La historia moderna del cultivo de los lupinos amargos (llamados así por el sabor característico de estas plantas el cual se debe a su contenido de alcaloides, en oposición a las especies dulces o con baja proporción alcaloidea) en el norte de Europa, pudo haber empezado en 1781 cuando el rey Federico II de Prusia, también conocido como Federico el Grande, mandó a manera de experimento semillas de *L. albus* de Italia con el objeto de mejorar los suelos pobres del norte de Alemania, donde persistió el cultivo durante las seis décadas siguientes. Sin embargo, el cultivo no fue exitoso debido a la maduración tardía de las plantas y a la pobreza de los suelos (Hondelmann, 1996).

Mas tarde, en 1841, un granjero llamado Brochard cultivó exitosamente lupino amarillo (*L. luteus*), el cual tuvo una mejor adaptación que *Lupinus albus* en esta zona de Alemania y lo mostró por primera vez en el mercado de Brademburgo en ese mismo año, de tal manera que veinte años mas tarde *L. luteus* se convirtió en una parte esencial de la agricultura de la zona costera Báltica, siendo utilizado en los suelos ácidos y arenosos (Hondelmann, 1996; Gladstones, 1974).

Sin embargo la aparición de lupinosis (enfermedad causada por una micotoxina, producida por el hongo *Diaporthe toxica*, el cual coloniza a las plantas de *Lupinus*) provocó una baja producción del cultivo en las décadas siguientes.

2.3. Los *Lupinus* de América

Un desarrollo paralelo a los *Lupinus* del viejo mundo fue el que aconteció en América, la especie con mayor importancia agrícola y cultural es *L. mutabilis* que crece en las tierras altas andinas de Sudamérica. Este fue importante en la alimentación de los pueblos andinos, de hecho existen hallazgos arqueológicos del siglo VI ó VII a. C. que evidencian su cultivo. También se encontraron semillas en las tumbas de la cultura Nazca (100-800 d. C.), en civilizaciones posteriores se utilizó en rotación de cultivos (Hondelmann, 1996).

Durante la existencia del imperio Inca, ésta planta alcanzó su último y mayor auge, en donde el cultivo se expandió desde Venezuela hasta el norte de Argentina. Actualmente todavía se encuentran parcelas de *L. mutabilis* conocido con el nombre de "chocho" (español) o "tarwi" (aymara), éstas existen entre los 2,500-4,000 msnm, o de manera silvestre en las orillas de los caminos. Usualmente el agricultor andino lo utiliza en rotación de cultivo en la alternativa papa-cebada-lupino (Gross y Baer, 1977). Así mismo, se usaba para dos fines; religiosos en ritos, festivales, y medicinales para enfermedades del corazón, reumatismo, malaria y parasitosis (López-Bellido y Fuentes, 1986). Sin embargo, la llegada de los conquistadores españoles provocó una pérdida progresiva de la agricultura tradicional andina, la cual no retomó interés hasta hace un par de décadas (Gladstones, 1974).

2.4. El desarrollo de *Lupinus* en la era moderna

No fue sino hasta la primera guerra mundial (1914-18), donde se retomó el interés en el cultivo de *Lupinus* dada la desesperada necesidad de una fuente proteica de bajo costo, siendo los años de posguerra los de mayor desarrollo.

Como resultado de la posguerra, se tuvieron nuevas variedades de *L. luteus* y *L. angustifolius*. En la década de los veinte, estas variedades amargas tenían ventajas en maduración y ablandamiento de la semilla. De tal forma que, para finales de la década existía ya una fuerte línea de investigación de *Lupinus* que empezó en Polonia bajo el mando del profesor Stefan Barbacki (Gladstones, 1974).

La idea de hacer un cultivo libre de alcaloides surgió en el presente siglo, cuando en 1913 Von Rùmker, sugiere la primera posibilidad teórica de eliminar los alcaloides presentes en la planta, mediante métodos genéticos (Hondelmann, 1996). Sin embargo, la idea no tomó importancia debido a que los lupinos utilizan los alcaloides como defensa ante sus depredadores; insectos y mamíferos herbívoros, así como los hacen resistentes a algunas enfermedades debido a las propiedades antibacteriales, antifúngicas y antivirales (Schmeller y col., 1994).

En 1928 Von Sengbusch (1898-1986) investigador del "Instituto Wilhem para la Investigación Genética en Berlin" seleccionó el primer cultivo de lupino bajo en alcaloides, surgiendo la mejora moderna del lupino (Gladstones, 1974).

Esto representó una de las primeras aplicaciones en cultivos de la genética Mendeliana (Putnam, 1991).

Al inicio del nuevo milenio, siete especies de *Lupinus* han sido totalmente domesticadas; *L. mutabilis*, *L. consentinii*, *L. atlanticus*, *L. pilosus*, *L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius*. De éstas, sólo una es de origen americano *L. mutabilis*. Actualmente y mediante técnicas modernas de ingeniería genética como la tecnología recombinante del DNA, se han desarrollado un gran número de variedades dulces (Gladstones, 1974).

La resultante de los pioneros responsables del desarrollo actual (después de 1945) de los lupinos es, haber formado un nuevo banco de genes de lupinos dulces, logrando un cultivo de importancia en muchos países.

En la actualidad se siembran más de un millón de hectáreas anualmente en Australia, que es primer productor mundial de *Lupinus* (Cowling, 1984). El lupino representa el 1% de la producción mundial de granos, y también ha sido reconocido internacionalmente como una fuente importante de proteína de origen vegetal.

Además del avance en materia de reducción en contenido alcaloideo, se han desarrollado variedades resistentes a ciertas enfermedades que atacan a la planta, sobre todo a las especies dulces, debido a que los alcaloides son una defensa natural.

En la década de los sesenta y setenta, se desarrolló resistencia al hongo *Fusarium* spp. Mediante el gen *Fus1* que ha mantenido una resistencia efectiva contra la parasitosis de este hongo en *L. luteus* y *L. angustifolius* (Troll, 1964).

Durante los años ochenta en Australia, se lograron cultivos resistentes a *Diaporthe toxica*, hongo que parasita los lupinos, produciendo una micotoxina causante de lupinosis en vertebrados, enfermedad que causa una mitosis anormal de los hepatocitos (Warren y col., 1989). Además, se establecieron barreras genéticas contra otros organismos como: *Stemphylium vesicarium*, *Glomerella cingulata*, *Pleiochaeta setosa*, Bean Yellow Mosaic Virus (BYMB), Cucumber Mosaic Virus (CMV), entre otros (Gladstones, 1974).

2.5. Taxonomía y sistemática

Takhtajan, en 1987, clasificó al género *Lupinus* de la siguiente manera:

1. División: Magnoliophyta (Angiospermae).
2. Clase: Magnoliopsida (Dicotyledone).
3. Subclase: Rosidae.
4. Superorden: Fabanae.
5. Orden: Fabales.
6. Familia: Leguminosae (Fabaceae).
7. Subfamilia: Papilionoideae.
8. Tribu: Genistea.
9. Género: *Lupinus*.

Los datos serológicos y la secuenciación de los genes, RbcL e ITS, le han permitido la clasificación como taxón monofilético dándole las características propias del género *Lupinus* (Wink y col., 1995).

2.6. Descripción botánica y morfología del género *Lupinus*

Los integrantes de este género, son plantas herbáceas o arbustivas, anuales o perennes; tallos solitarios, cespitosos o abundantemente ramificados de 0.5 a 3.0 m de altura; hojas alternas, estipuladas, palmadamente compuestas, rara vez simples, de 4 a 12 folíolos; flores en racimos terminales pedunculados

que normalmente sobresalen del follaje, racimos de 0.3 a 0.5 m o más largos; brácteas florales caducas o persistentes, usualmente deciduas en antesis de largo variable, flores con pedicelos de 2 a 12 mm de largo; bractéolas comúnmente presentes, adnates a la base del cáliz, linear-subuladas; cáliz fuertemente bilabiado, labios enteros o dentados, el superior (adaxial), bifido, el inferior (abaxial), tridentado; corolas zigomorfas, generalmente azules o azul-moradas con una mancha blanca a amarilla en el centro del estandarte por encima del ángulo producido por su mitad exterior que es refleja, ocasionalmente las flores son rosadas, rojas, blancas o amarillas; corolas glabras, excepto en la quilla; quilla glabra o ciliada a lo largo de los bordes superiores, falcadas o bien el margen superior casi recto, ángulo del margen inferior de 80° a 120°; 10 estambres, monadelfos, anteras dimórficas, alternando las más largas con las más cortas; fruto dehiscente más o menos compreso lateralmente, con diversos tipos de pubescencia, a menudo torulosa entre las semillas; óvulos de 4 a 12; semillas de tamaño y color variable, generalmente semejando el color del suelo del área en que viven (Rzedowski y Calderón, 1979).

2.7. Ecología del género

Como todas las leguminosas, los lupinos están en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* o *Bradirhizobium*, lo que le otorga relevancia desde un punto de vista económico, ya que mejora la fertilidad de los suelos debido a la fijación biológica de importantes cantidades de nitrógeno, logrando así su aprovechamiento en caso de utilizarlo con otros cultivos en rotación, lo cual

disminuiría los costos de cultivo al reducir el uso de fertilizantes nitrogenados (Jambrina, 1980).

2.8. Distribución geográfica de los *Lupinus*

Un gran número de especies de lupinos se ubican en la costa y en las regiones montañosas del oeste de Norteamérica, desde Alaska hasta la frontera mexicana; en México, en las regiones superiores a los 1500 msnm. En las tierras altas de los Andes en Perú y regiones vecinas; en Brasil, Uruguay y Argentina. Algunas especies se encuentran en el este y sureste de las costas de Estados Unidos, así como en la región del Mediterráneo, incluyendo; Grecia, Turquía, España y Portugal. También existen en tierras montañosas tropicales de África (Gladstones, 1974; McVaugh, 1987; Putnam, 1991).

2.9. Los *Lupinus* de México

México es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, albergándose aquí un gran número de animales y plantas, el género *lupinus* no es la excepción, en nuestro país existen, aproximadamente, 80 especies de lupinos distribuidos en 26 estados (McVaugh, 1987).

En Jalisco existen alrededor de 15 especies de lupinos distribuidos en su mayoría en la Sierra Madre Occidental y Sierra Volcánica Transversal; localizadas en los municipios de Tapalpa y Chiquilistlán (Sierra del Halo), Mezquitic (San Juan Peyotán y San Andrés Cohamiata), Tequila (Volcán de Tequila), Mascota (Cerro del Molcajete y Lago de Juanacatlán), Autlán (Sierra de Manatlán), San Martín de Bolaños (San Miguel de la Sierra), Mazamitla (Sierra del Tigre), Cuquío (cerca del Río Aguacaliente), Jocotepec (Sierra de Tecuán), Tonila (Volcán de Fuego), Talpa (cumbre del Cerro Tejamanil y Sierra de la Campana), Ciudad Guzmán y Ojuelos (McVaugh, 1987).

L. montanus H.B.K. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en Jalisco, usualmente en suelos pobres, arenosos y poco fértiles, sobre praderas montañosas en zonas abiertas de bosque de *Pinus hartwegii*, o como maleza en habitats perturbados a una altitud de 2500-4000 msnm. Su floración es en Diciembre y Junio (McVaugh, 1987).

L. exaltatus Zucc. Se localiza en zonas abiertas en bosques de pino-encino, y ésta es la especie más abundante en Jalisco, comúnmente se encuentra como maleza en zonas perturbadas o cultivadas, así como al borde de los caminos, en las montañas de la Sierra Volcánica Transversal, entre los 1800-2800 msnm. Su época de floración es en Agosto y Enero (McVaugh, 1987).

2.10. Características alimenticias

Las semillas de varias especies de *Lupinus* se han utilizado como alimento por más de 3,000 años en el área del Mediterráneo (Gladstones, 1974), y por más de 6,000 años en las tierras altas Andinas (Uauy y col., 1995). Sin embargo, nunca se les ha dado la misma importancia que otras plantas de cultivo como; la soya o el frijol. Los consumidores de esta semilla solían ponerla en agua corriente para remover la mayor parte de los amargos y tóxicos alcaloides y después guisaban o tostaban las semillas para darle mejor sabor. No obstante, el descubrimiento moderno de especies mutantes bajas en alcaloides ha impulsado su desarrollo como planta de cultivo (Gladstones, 1974).

El análisis químico proximal de semillas de lupinos demuestra que éstas tienen una elevada cantidad de proteína entre 36 y 40 %, carbohidratos 40 a 50 %, fibra cruda de 10 a 15 %, grasa cruda 6 a 12%, humedad de 85 a 90 %, estos rangos nos muestran valores promedios típicos de lupinos europeos (Gladstones, 1974), o americanos incluyendo algunas especies mexicanas (Ruiz y col., 2000). Los principales carbohidratos que muestran son: galactosa, arabinosa, ácido urónico, glucosa, manosa, xilosa y ramnosa. La mayoría de las proteínas que contienen son de un grupo de globulinas llamadas conglutinas, que contienen en su mayoría tres tipos de proteína conglutina α , conglutina β y una proteína específica de los lupinos llamada conglutina δ (Blagrove y Gillespie, 1975), aunque, el perfil de aminoácidos nos muestran que son deficientes en lisina, treonina y metionina (Gladstones, 1974).

Cuadro1
Contenido típico de minerales para
la mayoría de las especies de lupinos.

Minerales	
Calcio	Hierro
Magnesio	Manganeso
Fósforo	Molibdeno
Potasio	Zinc
Sodio	Cobalto
Azufre	Selenio
Cobre	

*Gross (1990).

2.11. Alcaloides. Definición y clasificación estructural

Una definición simple y general de alcaloide es la que sugiere Pelletier (1983); "un alcaloide es un compuesto cíclico que contiene nitrógeno en un estado de oxidación negativa, cuya distribución es limitada en organismos vivos." El carácter básico, no es un requisito para un alcaloide y la química de los átomos de nitrógeno admite por lo menos cuatro grupos de compuestos nitrogenados (Roberts y Wink, 1998):

a) Aminas secundarias y terciarias; son mas o menos protónicas debido a lo cual tienen propiedades hidrofílicas a $\text{pH} < 7.0$ ó en la mayoría de los casos son lipofílicas y no protónicas a $\text{pH} > 8.0$. Este es el clásico tipo de alcaloide.

b) Compuestos amino cuaternarios; son muy polares, cargados a todos los valores de pH, por sus características tienen que ser aislados como sales.

- c) Compuestos amino neutros; los que incluyen los alcaloides tipo amida.
- d) N-Óxidos; que son por lo general altamente solubles en agua y frecuentemente encontrados en muchas clases de alcaloides.

2.12. Alcaloides. Distribución natural

La distribución de los alcaloides es muy amplia, en el reino animal se han encontrado en diferentes grupos de artrópodos (Coleoptera, Myriapoda, Arachnida e Hymenoptera), vertebrados (Amphibia, Dendrobatide) y animales marinos de los grupos Bryozoa y Ascidiars (Roberts y Wink, 1998). También se encuentran en hongos, algas y vegetales inferiores. Sin embargo, la principal fuente de alcaloides son las plantas superiores; las dicotiledóneas son el grupo de plantas donde más alcaloides se han encontrado, seguido por las monocotiledóneas (Dominguez, 1973).

2.13. Alcaloides quinolizidínicos

Los alcaloides quinolizidínicos son derivados de la quinolizidina en complejidad variable, aunque en su mayoría son bicíclicos ó tetracíclicos (2 ó 4 anillos de nitrógeno), aparecen como aminas terciarias y como N-óxidos (Muzquiz y col., 1982 ; Ruiz, 1997).

Se distinguen de otros alcaloides, por la presencia de por lo menos, un sistema de anillo quinolizidínico (Wink, 1993; Salatino y Gottlieb, 1980; Kinghorn y Balandrin, 1984). De acuerdo al grado de sustitución, por lo menos ocho grupos de AQ pueden ser distinguidos en los siguientes tipos estructurales; (1) lupinina, (2) leontidina, (3) esparteína/lupanina/multiflorina, (4) α -piridonico, (5) matrina, (6) Ormosia, (7) piperidínicos y dipiperidínicos y (8) estructuras misceláneas (La fig. 1, muestra diferentes estructuras de AQ y la cafeína) (Wink, 1993).

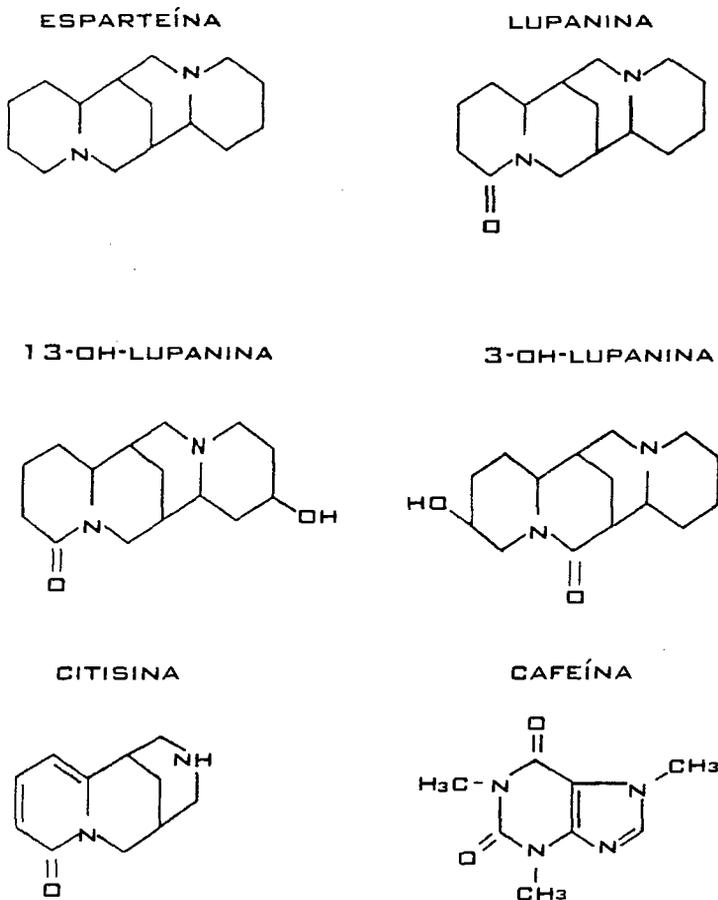


Fig.1 Estructuras de algunos alcaloides quinolizidínicos y de la cafeína.
Fuente: Wink (1993).

2.14. Distribución natural de los AQ

Los AQ están distribuidos principalmente en las leguminosas (Fabaceae). Esta es la tercer familia mas grande de plantas con flores, después de Compositae y Orchidaceae, contiene 650 géneros y, 18,000 especies aproximadamente.

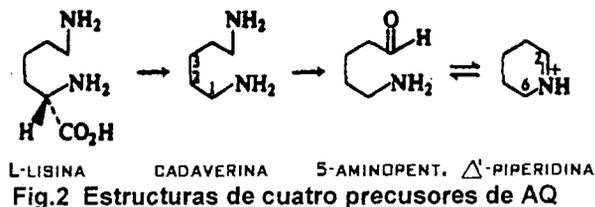
Los AQ se producen y acumulan en las llamadas leguminosas primitivas como son las tribus: Genisteeae (*Lupinus*), Sophoreae, Dalbergieae, Euchresteeae, Thermopsidae, Bossiaeeae, Brongniartieae, Podalyrieae, Liparieae y Crotalarieae (Kinghorn y Balandrin, 1984). La transferencia de AQ a plantas hospederas de especies productoras de AQ es posible, como en el caso de especies pertenecientes a Scrophulariaceae (Wink, 1993a). Los diferentes tipos estructurales de AQ, no estan homoganeamente distribuidos en las leguminosas, por ejemplo; los del tipo lupanina/esparteína/multiflorina, asi como los del tipo lupinina y derivados (ésteres y formas hidroxiladas) están presentes en unos cuantos géneros, principalmente en *Lupinus* (Wink, 1993).

Por otro lado, algunos insectos especializados en parasitar plantas que contienen AQ (ej. *Macrosiphum albifrons*, *Aphis genistae* y *A. cytisorum*) pueden almacenar de manera activa los AQ y utilizarlos como una defensa contra sus predadores (Wink y col., 1992a; Wink y Witte, 1985,1991; Wink y Römer, 1986). Sin embargo, sólo Fabaceae posee los genes necesarios para la biosíntesis, transporte y almacenamiento de AQ (Wink, 1993).

2.15. Biosíntesis y metabolismo de los AQ en *Lupinus*.

La biosíntesis de los AQ, se realiza en las partes aéreas verdes de la planta y su sitio intracelular es el cloroplasto (Wink y Hartmann, 1982). La biosíntesis se regula por la luz, de esta manera las concentraciones de AQ poseen un ritmo diurno, con una producción estimulada durante el día. Además, los AQ son transportados por el floema a otras partes de la planta (Wink y Witte, 1991) y son acumulados predominantemente en estratos celulares subepidérmicos. Especialmente, las semillas son ricas, ya que pueden guardar hasta 8% de su peso seco como alcaloides, además éstos desaparecen de hojas senescentes durante el período vegetativo y son movilizados a otras partes de la planta (Wink, 1993).

Los AQ se sintetizan a partir del aminoácido L-lisina (C₆N₂), la cual sufre un proceso de descarboxilación, debido a la presencia de la descarboxilasa de la lisina, una enzima presente en cloroplastos de *Lupinus*. Esto da como producto a la cadaverina (C₅N₂), un precursor e intermediario entre lisina y los AQ (Wink y Hartmann, 1982). Así, los 2 átomos de nitrógeno del esqueleto quinolizidinico (C₁₅N₂) de los alcaloides son derivados de lisina o cadaverina (Ver fig.2) (Rana y Robins, 1986; citados por Golebiewski y Spenser, 1988).



La lisina sufre una unidad intermediaria de carbono-nitrógeno (C5N2), transformándose en cadaverina por pérdida de un carbono. La cadaverina a su vez, sufre a las dos cadenas C5N de los alcaloides (Golebiewski y Spenser, 1988).

Con el uso de indicadores radioactivos, se sugiere una distribución equitativa de los 3 segmentos C5 sobre el esqueleto C15N2 de los alcaloides, que puede explicarse en función de que éstos son derivados de Δ¹-piperidina (Golebiewski y Spenser, 1988). Este modelo biogénico, también evidencia la estereoquímica de los alcaloides y define la región de la biosíntesis, además de que es enteramente consistente con los resultados más recientes de incorporación de substratos marcados con ¹³C, y ²H (Golebiewski y Spenser, 1988). La piedra angular de este modelo, es la incorporación equitativa de ¹⁴C ó ¹³C dentro de tres segmentos C5 de los alcaloides (Golebiewski y Spenser, 1988). En efecto, los datos apuntan a otros intermediarios entre cadaverina y los AQ como el 5-aminopentanal; aldehído derivado por la pérdida de un átomo de hidrógeno en la cadaverina ó a la base (Schiff) cíclica del 5-aminopentanal, la Δ¹-piperidina (Schütte y col., 1961, 1962; citados por Golebiewski y Spenser, 1988), resultado de

una deaminación oxidativa ó transaminación del 5-aminopentanal y catalizada por las enzimas diaminoxidasa (Richards y Spenser, 1983; citados por Golebiewski y Spenser, 1988) ó diaminoaminotransferasa, respectivamente (Hasse y Schmid, 1963; citados por Golebiewski y Spenser, 1988).

Debido a esto Δ^1 -piperidina también sirve como intermediario en la biosíntesis de los alcaloides de *Lupinus* y suple las dos cadenas C5N que producen unidades N-1,C-2,-3,-4-5,-6 y N-16,C-15,-14,-13,-12,-11, así como a las cadenas C5 que forman la unidad central C5 de los alcaloides (Schütte y col.,1961, 1962; citados por Golebiewski y Spenser, 1988).

Los experimentos realizados con isotopos radioactivos, revelan que el carbono derivado de Δ^1 -piperidina, se incorpora a lupanina de manera específica (Golebiewski y Spenser, 1988). De manera similar, los substratos con ^{14}C ; a partir de lisina y cadaverina se conducen dentro de algunos tipos de alcaloides que poseen unidades C15N2 (Schüte y Steelig, 1968; Nowakci y Byerrum, 1964; citados por Golebiewski y Spenser, 1988). Además la incorporación de ^{13}C derivado de cadaverina y/o lisina, produjo alcaloides casi equitativamente enriquecidos en cada uno de los seis sitios de carbono adyacentes al átomo de nitrógeno en los alcaloides de lupinos (Golebiewski y Spenser, 1988).

En resumen, los átomos de carbono C-2,C-6,C-10,C-11,C-15 y C17 dentro de lupanina, 13α -hidroxilupanina (Robins y Sheldrake, 1987a; citados por

Golebiewski y Spenser, 1988) y esparteína (Rana y Robins, 1986; citados por Golebiewski y Spenser, 1988) son derivados de lisina, (Golebiewski y Spenser, 1988) ó cadaverina (Ver fig. 3)((Robins y Sheldrake, 1987a; citados por Golebiewski y Spenser, 1988).

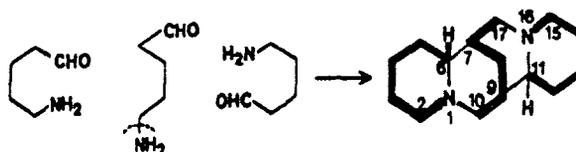


Fig. 3 Incorporación de tres unidades C₅N derivadas de L-lisina o cadaverina dentro de el esqueleto bisquinolizidínico de los AQ.

Esta distribución en los indicadores, junto con la evidencia presentada con anterioridad sobre la retención de enlaces intactos de C—N de cadaverina en los alcaloides (Rana y Robins, 1985, 1986; citados por Golebiewski y Spenser, 1988) y la especificidad de entrada de la Δ^1 -piperidina, indica que el esqueleto de los alcaloides se genera desde tres unidades C₅N de cadaverina idénticas (Golebiewski y Spenser, 1988).

2.16. Toxicidad y actividad biológica de los alcaloides quinolizidínicos de

Lupinus

Los AQ son el principal factor antinutritivo que impide la alimentación directa con esta planta, que se caracteriza por una alta cantidad de proteína (en promedio un 40%), además de poseer carbohidratos, lípidos y fibra dietética. Los AQ tienen una función biológica activa al repeler a los predadores naturales de

Lupinus, sean herbívoros o fitopatógenos, ya que los AQ son directamente mutagénicos (Keeler, 1976) y tóxicos a una amplia gama de organismos y constituyen una defensa química contra los mismos (Wink, 1985, 1987, 1988, 1992a, 1993a,b). Así, se han estudiado diversas actividades aleloquímicas de los alcaloides de *Lupinus* como son:

Actividad en microorganismos

*Inhibición de multiplicación viral por esparteína (Wink, 1992b).

*Inhibición de crecimiento bacterial por esparteína, (Wink, 1992b), lupanina, angustifolina y 13-hydroxylupanina (Tyski y col., 1998).

*Actividad fungistática y fungicida por una mezcla sinérgica de AQ en *Fusarium spp.* (Árias y col., 1999).

Actividad alelopática

*Inhibición en germinación de semillas por esparteína, lupanina, citisina (Wink, 1985; Muzquiz y col., 1994).

*Inhibición del crecimiento radicular por esparteína y citisina (Wink, 1985).

Actividad en animales

*Reducción de movilidad en nemátodos y helmintos por N-metilcitisina y matrina (Wink, 1992a).

*Acción repelente y toxicidad en diversas especies de insectos por esparteína, lupanina, 13-Tigloiloxilupanina, citisina y lupinina (Wink, 1992a).

Así mismo, existen datos que reiteran la toxicidad de los AQ en diversas especies de vertebrados como son:

- En el pato, se presentó una disminución en la eclosión, biomasa y producción de huevo, así como un bajo conteo de eritrocitos y contenido hemático en embriones (Bednarczyk y col., 1987).
- Se ha comprobado que la anagirina, otro AQ, posee propiedades teratogénicas para el ganado, provocando malformaciones en becerros, trastorno llamado "enfermedad del becerro encorvado", que ocurre cuando la vaca consume lupinos ricos en anagirina (*L. caudatus* y *L. senceus*) entre los 40 y 75 días de gestación (Keeler, 1973, I, II; Keeler, 1976; Keeler y Cronin, 1975; Panter y Keeler, 1993).
- En vacas productoras de leche alimentadas con lupinos amargos, se encontró una disminución de la ingesta alimenticia, pérdida de peso, así como una menor producción de leche y menos cantidad de grasa en ella (Mukisirat y col., 1995). De la misma manera, se observó una menor ganancia de peso en ratas y pollos sometidos a dietas de lupinos amargos (Pastuszewska y col., 1988).

- En ratones, se han encontrado lo siguiente; la dosis máxima no letal (DL0) de esparteína y lupanina es de 30.7 mg/kg y 150 mg/kg, vía intraperitoneal, respectivamente. La DL100 (dosis mínima a la cual muere el 100% de los animales) es de 150 mg/kg, para esparteína y 225 mg/kg, para lupanina (Yovo, 1982). La DL50 (dosis que mata a la mitad de los animales de prueba) para esparteína y lupanina es de 36 y 175 mg/kg, vía intraperitoneal, y de 220 y 410 mg/kg, mediante administración oral, respectivamente (Yovo y col., 1984). En rata la DL50 para lupanina equivale a 177 mg/kg, vía intraperitoneal y 1664 mg/kg, vía oral (Petterson y col., 1987).

De manera paralela a los efectos tóxicos antes mencionados, los AQ, poseen propiedades farmacológicas y medicinales. Actúan como antipiréticos, antiinflamatorios, antiarrítmico cardiaco e hipotensivos, estimulantes y depresores respiratorios, uterotónicos, diuréticos, hipoglicemicos, alucinógenos, antidiabéticos, anestésicos, relajante muscular y (Kinghorn y Balandrin, 1984) oxicocicos, entre otros (Schmitt, 1980; Cohen, 1981).

Una de las vías en que los AQ provocan sus efectos es mediante los ganglios nerviosos, al inhibir la transmisión del influjo ganglionar simpático del sistema nervioso autónomo (Agid y col., 1988). Debido a estas propiedades ganglioplegicas, dosis altas de lupanina y esparteína reducen el reflejo del seno carotideo, así como, el flujo coronario, la contracción, la amplitud y la velocidad cardiaca (Duke, 1987; Bruneton, 1993). También reducen la actividad locomotora,

poseen un ligero efecto anestésico y sedativo (Pothier y col., 1998). Estudios recientes demuestran que la lupanina es menos tóxica que la esparteína debido a que la primera tiene una capacidad de difusión mayor y puede desecharse más rápidamente (Yovo y col., 1984; Pothier y col., 1998; Duke, 1987; Bruneton, 1993).

La esparteína se aisló con facilidad de *Cytisus scoparius* (Fabaceae), y es el único AQ que está comercialmente disponible y que se ha utilizado ampliamente en medicina humana por sus propiedades antiarrítmicas y oxitocicas; algunas presentaciones comerciales son: Anxoral™, Ariven™, Cardiopax™, Depasan™, Diffucord™, Gelsadon™, Hypolind™, Hypotonin™, Jatamansin™, Kanovenol™, Morfi™, Normotin™, Palpilax™, Perivar™, Pulsnorma™, RR-plus™, Sedol™, Tachynerg™, entre otras (Roberts y Wink, 1998). De cualquier manera, un 10% de los pacientes son incapaces de metabolizar la esparteína y esto les ha causado intoxicación. Por éste efecto colateral, el uso de la esparteína en la medicina moderna se ha restringido (Schmeller y Wink, 1988).

Tanto los efectos tóxicos como farmacológicos de los AQ, pueden explicarse por cuatro diferentes vías de acción a nivel molecular en el sistema nervioso:

*Actividad en receptores muscarínicos para acetilcolina (mACh)
(Schmeller y col., 1994).

*Actividad en receptores nicotínicos para acetilcolina (nACh)
(Schmeller y col., 1994).

*Inactivación de canales de Sodio Na⁺ (Körper y col., 1998).

* Inactivación de canales de Potasio K⁺ (Körper y col., 1998).

De esta manera los efectos secundarios y/o farmacológicos son inherentes a las características de la molécula.

Con base a esto, se conoce que los AQ actúan como agonistas en los receptores colinérgicos (ACh) (Kinghorn y Balandrin, 1984). Así, en un extracto alcaloideo de lupinos, se encontró una mezcla de diversos AQ. Sin embargo, éstos son afines de manera específica a receptores nACh ó mACh. Los AQ afines a receptores nicotínicos son menos activos en los muscarínicos y viceversa (ver cuadro 2) (Schmeller y col., 1994). Como ejemplo, la esparteína, activa al receptor muscarínico, como resultado se tiene una actividad del músculo cardiaco modulada a partir de dosis que estimulan o paralizan ganglios simpáticos (Agid y col., 1988). Debido a que los receptores colinérgicos están distribuidos ampliamente en el cuerpo, distintos tipos de tejidos y órganos pueden ser afectados, en diferente grado por AQ (Schmeller y col., 1994).

Cuadro 2. Afinidad de Alcaloides Quinolizidinicos a receptores Nicotínicos y Muscarínicos ACh.

Compuesto	Receptor Nicotínico (μM)	Receptor Muscarínico (μM)
Albina	193	33
Anagirina.....	2096	132
Angustifolina.....	500	25
Cytisina.....	0.14	400
3 α -Hidroxilupanina.....	190	74
13 β - Hidroxilupanina.....	490	140
Lupanina.....	5	114
Lupinina	500	190
N-Metilcitisina.....	0.05	417
Multiflorina.....	500	47
17-Oxosparteína.....	155	118
Esparteína.....	331	21
Tetrahidrorhombifolina.....	310	129
13 α -Tigloiloxilupanina.....	160	11

Los valores IC50 en μM indican la concentración de un AQ particular que muestra el 50% de especificidad del ligando marcado radioactivamente (Schmeller y col., 1994).

Las células controlan cuidadosamente la homeostasis mediante la regulación de los canales iónicos; como lo son los canales de sodio y potasio. Los gradientes iónicos modulados por estos canales, son elementos primordiales en el proceso de transporte activo, así como en la ejecución de las señales muscular y neuromuscular. Así la esparteína inhibe el paso de K^+ , Na^+ y modifica el transporte a través de la membrana celular, bloqueando así la transducción de la señal en células nerviosas (Schmeller y Wink, 1998) y musculares (Körper y col., 1998).

2.17. Rojo de *trifeniltetrazolium*

La sal de cloruro de 2,3,5-*trifeniltetrazolium* es un reactivo que actúa como indicador histoquímico de la actividad de las enzimas en la cadena respiratoria mitocondrial (Cole y col., 1990).

La actividad de este organelo, puede observarse hasta de forma automática en las células del cerebro, aunque otros organelos como el núcleo fueran destruidos (Liszczak y col., 1984). Este reactivo se utiliza por los patólogos, para detectar áreas de infarto en órganos como el corazón (Bederson y col., 1986; Bednar y col., 1994) y el cerebro (Dettmers y col., 1994) y su reacción es comparable al método de tinción con hematoxilina y eosina (Bederson y col., 1986), y junto con el yoduro de propidio, tiñe muerte celular (Ito y col., 1997) en diferentes organismos como; animales de laboratorio, (Holmbom y col., 1993)

especies productivas y animales salvajes (Bederson y col., 1986; Baskaya y col., 2000).

Por su elevada capacidad de marcación también se puede introducir por perfusión intracardiaca o por inmersión del tejido nervioso (Isamaya y col., 1991). Esta sustancia, usualmente se utilizada en gatos y roedores como un marcador de daño temprano de tejido (Dettmers y col., 1994), para detectar isquemia en roedores (Park y col., 1988) o bien para medir el volumen del trauma provocado a los animales por daño cerebral causado por la perfusión de un fluido y medir de esta manera el impacto cortical cerebral (Baskaya y col., 2000), así como para medir la extensión del daño histoquímico causado por la oclusión de la arteria cerebral media (Cole y col., 1990; Hatfield y col., 1991).

II. HIPÓTESIS

Los alcaloides quinolizidínicos de *Lupinus montanus* y *exaltatus* producen daño en el SNC de vertebrados, por lo que su aplicación a nivel cerebroventricular podrá indicar la magnitud, localización y características de la lesión en el SNC de la rata.

IV. OBJETIVOS

Generales

- a) Conocer y analizar el perfil alcaloideo de semillas de *L. montanus* y *L. exaltatus*.
- b) Evaluar el efecto provocado por los extractos crudos de alcaloides quinolizidínicos obtenidos de *L. montanus* y *L. exaltatus* en el SNC de la rata mediante administración intracerebroventricular.

Particulares

- a) Analizar de manera cualitativa y cuantitativa los alcaloides presentes en semillas de *L. montanus* y *L. exaltatus* mediante cromatografía de gas capilar.

- b) Evidenciar la magnitud de las áreas en el SNC más sensibles a los efectos tóxicos de los alcaloides de *L. montanus* y *L. exaltatus*, mediante marcaje con rojo *trifeniltetrazolium*.

- c) Evaluar el daño neuronal producido en el SNC de la rata por la fracción alcaloidea inyectada en el tercer ventrículo del cerebro mediante la descripción microscópica del tejido nervioso sometido al método de tinción de Nissl (violeta de cresilo).

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Departamento de Botánica y Zoología así como en el Departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad de Guadalajara, durante el periodo comprendido de Noviembre de 1998 a Octubre de 1999.

5.1 Colecta e identificación de *Lupinus*

El estudio se llevó acabo con semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc y *L. montanus* H.B.K del estado de Jalisco. Para esto, se colectaron plantas completas con el propósito de herborizar algunos ejemplares para su identificación mediante comparación de sus características morfológicas con los ejemplares depositados en el herbario del Instituto de Botánica (IBUG), con la utilización de claves taxonómicas y asesorados por especialistas. Una vez confirmada la identificación de la especie, se realizaron varias colectas en los lugares reportados por McVaugh (1987) en los siguientes municipios; Zapotlán el Grande, Bolaños y Mezquitic. Se obtuvieron vainas con semillas de *Lupinus exaltatus* y *L. montanus* en estado óptimo de maduración.

5.2. Extracción de alcaloides

El método de extracción se basa en la técnica de Muzquiz y colaboradores (1993). Se pesan 0.6 g de harina y se homogeneizan con 6 ml de ácido tricloroacético al 6% durante 1 minuto a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó durante 6 min. (700 g) y se decantó el sobrenadante. La extracción se repite dos veces más y los sobrenadantes se alcalinizan con 1 ml de hidróxido sodico 10 M en una pera de decantación. Se extrae con cloruro de metileno (3 X 6 ml) y los extractos se evaporan hasta llegar a sequedad (26° C).

5.3. Detección de alcaloides. Modificación de la técnica de Hultin y Torsell (1965)

Cada fracción de alcaloides por especie de *Lupinus*, así como dos ensayos testigo; uno positivo con una solución con cafeína y uno negativo con extractos de soya (Muzquiz y col., 1993), se determinaron por triplicado con los siguientes dos reactivos sensibles a la presencia de alcaloides:

1) Reactivo Mayer; Se disolvieron 1.36g de $HgCl_2$ en 60 ml de agua y 5g de KI en 10 ml de agua, se mezclaron las dos soluciones y se aforaron a 100 ml. La solución no debe contener ácido acético o etanol porque disuelve el precipitado. Sólo se añadieron unas gotas de reactivo ya que los alcaloides son solubles en exceso a éste.

2) Reactivo de Dragendorff; Se disolvieron 8g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de HNO₃ al 30 % y 27.2g de KI en 50ml de agua , se mezclaron las dos soluciones y se dejó reposar 24 horas, se decantó la solución y se aforó a 100 ml. Resultaron precipitados anaranjado-marrón.

Cuando cualquiera de las dos fracciones (extractos de *L. montanus* o *L. exaltatus*) mostraron reacción positiva con los dos reactivos, se consideró la presencia de los alcaloides. Como patrones positivo y negativo se utilizó una muestra de cafeína y soya respectivamente.

5.4 Cromatografía de gas capilar

Las muestras se analizaron por triplicado según la técnica de Muzquiz y colaboradores (1993). Se utilizó un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer™, Sigma™ 1B) con detector de ionización de flama, y columna capilar (Teknokroma™) SPB-1 (30 m X 0.4 mm d.i.). 0.6 ml de alcaloides se disuelven en 1 ml de una solución de cafeína (usada como patrón interno) en metanol 2mg/ml. Después de filtrada la muestra (Millipore™ 0.46 µm), se inyectó (tipo splitless) 1 µl en un cromatógrafo de gases. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 240 y 300° C, respectivamente, y la temperatura del horno se programó de 150°C a 235°C a 20°C por minuto, ésta temperatura permaneció durante 15 min. El gas

portador fue helio con flujo de 1.1 ml/min.^{-1} Y presión de 5 psi. Los alcaloides individuales se identificaron mediante curvas patrón.

5.5. Metodología para implantación de cánulas vía intracerebroventricular (ICV)

Se utilizaron 15 ratas (*Rattus norvegicus*) machos jóvenes variedad albina de la cepa Wistar, entre 350 y 450 g de peso, a los cuales se les implantó una cánula en el ventrículo lateral derecho del cerebro de acuerdo a la siguiente técnica; los animales se rasuran en el dorso de la cabeza. Después se colocaron en un aparato estereotáxico David-Kopff, se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso), se colocaron las barras auditivas y los incisivos del aparato estereotáxico (-3.3 mm) para fijar la cabeza (cuidando que la cabeza quedara totalmente horizontal).

Con el animal inmovilizado, se realizó un corte en la piel del cráneo por la línea media, se inició por detrás de la comisura posterior de los ojos y se prolongó hasta el nivel occipital, con un raspador de periostio con bordes romos. Se separó lateralmente el tejido conectivo subcutáneo y el periostio, se partió de la línea media hacia los lados para observar la sutura de bregma (anterior) y lambda (posterior), se secó la sangre y se obtuvieron los registros iniciales de posición; antero-posterior, mediolateral y dorso-ventral, a partir de éstos se definió la ubicación del sitio donde se instaló la cánula; - 1.4 mediolateral, 8.2 anterior a

lambda y - 4.0 dorsoventral. Estas coordenadas corresponden a la ubicación del ventrículo lateral derecho (Paxinos y Watson, 1982).

Una vez definida la posición de la cánula, se realizó un orificio en hueso craneal a baja velocidad con un microtaladro (Moto Tool™). Se bañó constantemente con solución salina isotónica la zona de penetración a punto de congelación (para evitar necrosis secundaria resultante del calor que genera taladrar el cráneo), se practicó un orificio que permitiera la fijación de una cánula con las siguientes dimensiones: 0.36 mm de diámetro externo, 0.45 mm de longitud y ajustada mediante un anillo para introducirse hasta una profundidad de - 4.00 mm. En posición contralateral a la cánula, se fijó un tornillo de 1mm de diámetro y 3 mm de largo, anclado en el espesor del cráneo, sin atravesarlo, para lograr una cementación adecuada de la cánula con el cemento dental (Viarden™).

Se limpió completamente la zona de implantación para eliminar restos de tejidos y se secó con papel absorbente para agregar cemento dental directamente sobre el hueso para cubrir totalmente el tornillo de anclaje y parte de la cánula, después se aplicó aire ligeramente caliente a una distancia no menor de 30 cm para evitar quemaduras. Una vez fraguado el cemento, se cubrió totalmente con piel, para lo cual se suturó con seda trenzada fina de 4-000. Se separó la rata del aparato estereotáxico y se regresó a sus condiciones habituales de mantenimiento.

5.6. Prueba toxicológica

Los animales previamente cánulados fueron alojados en jaulas individuales bajo condiciones de bioterio hasta su recuperación (3 días). Luego se distribuyeron al azar en un grupo testigo (T) y dos experimentales (tratados con alcaloides obtenidos de *L. exaltatus* = grupo E y *L. montanus* = grupo M) de cinco animales cada uno. Al grupo T, se le administró sólo el vehículo de dilución (aceite de sésamo), mientras que, los grupos experimentales recibieron una dosis diaria de 45 nanogramos de alcaloides quinolizidínicos, durante 5 días. Por vía intracerebroventricular, la penetración de la sustancia fue lenta y en dos aplicaciones; la primera de 5 microlitros (5 min.) y 10 minutos después una segunda aplicación (5 min) con el resto del volumen. Esto evitó el daño por presión intracraneal. Durante el estudio todos los animales recibieron una dieta comercial para roedores y agua *ad libitum*.

Preparación de los tejidos para evaluación histológica (5.7- 5.9) mediante microscopía óptica (Nissl) y analizador de imágenes (CTT).

5.7. Perfusión intracardiaca

72 horas después del periodo de tratamiento, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (70 mg/kg de peso). Se realizó toracotomía amplia para exponer el corazón y los pulmones. Se pinzó la arteria aorta torácica descendente con pinzas de mosquito y se realizó una incisión en el vértice del ventrículo

izquierdo para introducir una cánula roma del número 18, inmediatamente después se seccionó la aurícula derecha y se pasó una solución al 4% de paraformaldehído con PBS 0.1 M y pH 7.4 durante ocho minutos (tejidos destinados a parafinar para aplicar la técnica de Nissl) ó una solución salina isotónica ajustada a pH 7.4 durante 4 minutos (tejidos destinados a reaccionar con *trifeniltetrazolium*), ambas a temperatura corporal y bajo presión de 120 cm³ de columna de agua, con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de sangre y fijar el encéfalo. Al término de la perfusión, se practicó craneotomía y se extrajo el encéfalo completo y al mismo tiempo se registró la posición de la cánula en el ventrículo derecho del cerebro mediante observación directa.

5.8. Método *trifeniltetrazolium* (Goldlust y col., 1996)

Inmediatamente después de la perfusión, dos cerebros de cada grupo, se colocaron en una solución 0.1 M de PBS a punto de congelación. Posteriormente, se realizaron cortes coronales a intervalos de 600 micras de espesor en un vibrotomo (Leica™). Después, se dejaron en inmersión en una solución al 2 % de la sal de cloruro de 2,3,5-*trifeniltetrazolium* en PBS 0.1 M (pH ajustado a 7.4) durante 10 minutos a 37°C en baño maría en completa oscuridad. Durante el baño, los tejidos se mantuvieron en constante movimiento de baja intensidad, para asegurar la inmersión simétrica de toda la superficie. Posteriormente, el exceso CTT se drenó y los tejidos estuvieron en una solución al 10 % de formalina a una temperatura de 4°C.

24 horas después, los cortes del encéfalo fueron separados y el tejido meningeal suelto se removió. Posteriormente, los tejidos fueron ordenados por grupos en una superficie plástica transparente y cubiertos con un fondo plástico blanco (las secciones de la parte anterior del cerebro fueron colocados con la superficie posterior hacia abajo, el resto se colocó con la superficie anterior hacia abajo, este procedimiento asegura que el área de cada corte sólo sea contada una vez). De esta manera, los tejidos se colocaron en la superficie de un escanner de cama plana a color (Primax™ modelo FB31ED) y se procedió a escanearlos.

El escanner se controló por computadora, PC-Compatible con ambientes Windows y procesador Pentium, el programa fue Primax™ Power TWAIN, versión 5.0. El escanner fue ajustado para obtener imágenes en tamaño y composición real, además de trabajar a 24 bit y resolución de 400 pixeles por imagen, los ajustes fueron los siguientes; brillo 7, contraste 7 y color 7. Las imágenes fueron guardadas en archivos no comprimidos en discos magnéticos para la determinación posterior de tejido dañado mediante un sistema automatizado de análisis para imágenes.

Los tejidos presentaron dos colores blanco (o blanquecino); el cual indica una reducción significativa en las enzimas funcionales de la mitocondria y por otro lado un rojo oscuro; que marca una correcta actividad mitocondrial (Goldlust y col., 1996). De esta manera, el área en color de las imágenes (blanco, rojo) y el área total se marcaron en el analizador (Leica™ modelo Q550) de manera semiautomática (las zonas mielínicas se excluyeron manualmente), por diferencia

en el volumen de área (en micras) de las regiones anatómicas dañadas, se obtuvieron las dimensiones de estas que se convirtieron a valores porcentuales. Posteriormente, se comprobó la efectividad del método mediante microscopía óptica clásica (Nissl).

5.9. Método Nissl (Estrada y col., 1982)

Los tres cerebros restantes de cada grupo se deshidrataron en series crecientes de alcohol; 70, 80, 90, 96 y 100 % durante 24 hrs. en cada uno. Posteriormente, se incluyeron en líquidos intermediarios (benzoato de metilo y alcohol bencílico). Se llevó a cabo la inmersión en parafina I y II (24 hrs cada una) a una temperatura de punto de fusión 54-56 °C. Con los bloques de parafina, se hicieron cortes coronales de 20 micras de espesor en un microtómo (REICHERT™) y se montaron en portaobjetos preparados con albúmina. Para su tinción, se desparafinaron con 2 pases de 15 min. en xilol y se hidrataron en series crecientes de alcohol; 100, 96, 90, 80, 70, 40 % cada una con duración de 5 min. De esta manera, la tinción fue mediante inmersión durante 5 min. en una solución al 0.5% de acetato de violeta de cresilo (colorante Nissl, Sigma™ 5042). Los tejidos fueron deshidratados mediante dos pases de alcohol; 96 y 100 % (5 min c/u) y montados en resina Entellan (Merck™ 1079610100). Lo anterior, permite evidenciar la topografía del daño en el SNC.

Mediante esta técnica, los tejidos cerebrales teñidos se cuantificaron mediante un equipo para análisis de imágenes Leica™ modelo Q550, las medidas

de superficie celular (superficie total de la célula en micras) y superficie nuclear se obtuvieron de manera manual (superficie del núcleo celular en micras) para los núcleos Darkschewitsch y subiculum, ubicados en las coordenadas: Interaural 3.2, Bregma -5.8 (Paxinos y Watson, 1982).

Análisis estadístico

Para determinar las diferencias estadísticas entre las medias de los grupos se utilizó el análisis unilateral de variancia por rangos de Kruskal-Walis, después de la prueba de Dunn's para comparaciones múltiples. Ambas pruebas se realizaron con un nivel de significancia estadística de $P < 0.05$ y en el programa Sigma Stat™ para Windows, versión 1.0, Jandel Corporation.

VI. RESULTADOS

6.1. Detección de alcaloides a partir de dos reactivos específicos

Los resultados mostraron la presencia de alcaloides en los extractos de *L. montanus*, como *L. exaltatus* y cafeína, (utilizado como un patrón positivo debido a que es un alcaloide) dando una reacción positiva en los dos reactivos específicos para alcaloides. Al mismo tiempo, el extracto de soya (utilizado como patrón negativo, debido a que carece de alcaloides) no mostró reacción alguna a los mismos reactivos (cuadro 3).

Cuadro 3. Se muestra la presencia de alcaloides contenidos en cada uno de los extractos de *Lupinus*, y la cafeína.

Muestra	<i>L. montanus</i>	<i>L. exaltatus</i>	Soya	Cafeína
Reactivo				
Mayer	++	++	—	++
Dragendorff	++	++	—	++

++ Reacción positiva: clara formación del precipitado.

— Ausencia de reacción.

6.2. Cromatografía de gas capilar

Los alcaloides detectados y su respectiva concentración en microgramos por microlitro para *L. exaltatus* fueron; la lupanina como alcaloide mayoritario a una concentración de: 1251.34 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, la 3-OH-lupanina 509.58 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, la esparteína 74.60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y en la 13-OH-lupanina 55.36 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Mientras que para el extracto de *L. montanus* los datos fueron los siguientes: el alcaloide mayoritario fue la esparteína a una concentración de; 3347.16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, la lupanina 2613.19 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, la 13-OH-lupanina 347.29 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y la 3-OH-lupanina 325.39 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La detección para el alcaloide citisina se realizó en ambos extractos de *Lupinus*. Sin embargo, no se encontró en ninguno de los casos.

Cuadro 4. Extractos obtenidos de *L. exaltatus*

Alcaloide	TR	DS	CV
Cafeína	8.01	0.0504	0.6283
Esparteína	7.55	0.0556	0.7361
Lupanina	21.56	0.2367	1.0978
3-OH-Lupanina	24.61	0.0401	0.1361
13-OH-Lupanina	29.78	0.1547	0.5194

Cuadro 5. Extractos obtenidos de *L. montanus*

Alcaloide	TR	DS	CV
Cafeína	7.98	0.0204	0.2555
Esparteína	7.52	0.0140	0.1862
Lupanina	21.93	0.0570	0.0136
3-OH-Lupanina	24.62	0.0034	0.0140
13-OH-Lupanina	29.73	0.0306	0.1028

En los cuadros 4 y 5 se muestran los siguientes valores: el promedio de los tiempos de retención de los alcaloides (TR), la desviación estándar (DS) de los TR, y el coeficiente de variación (CV) de los TR, para los extractos de *L. exaltatus* y *L. montanus* respectivamente.

A continuación las Figuras 4 y 5 muestran los cromatogramas correspondientes a los extractos de *L. montanus* y *L. exaltatus* respectivamente. Así como la resolución y presencia de los cuatro alcaloides detectados y el estándar interno utilizado (cafeína). El tiempo de corrida fue de 35.2 min. en promedio para ambos ensayos.

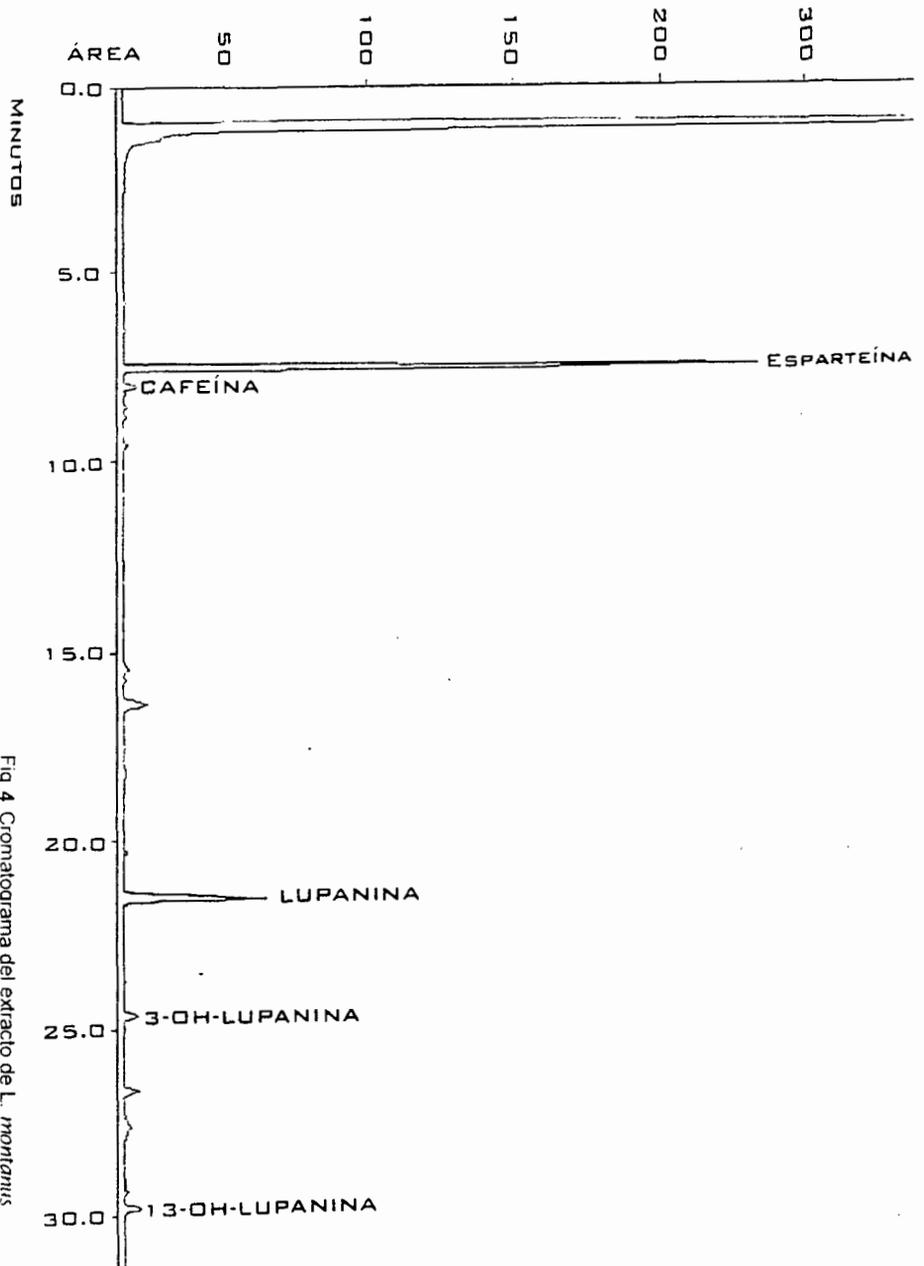
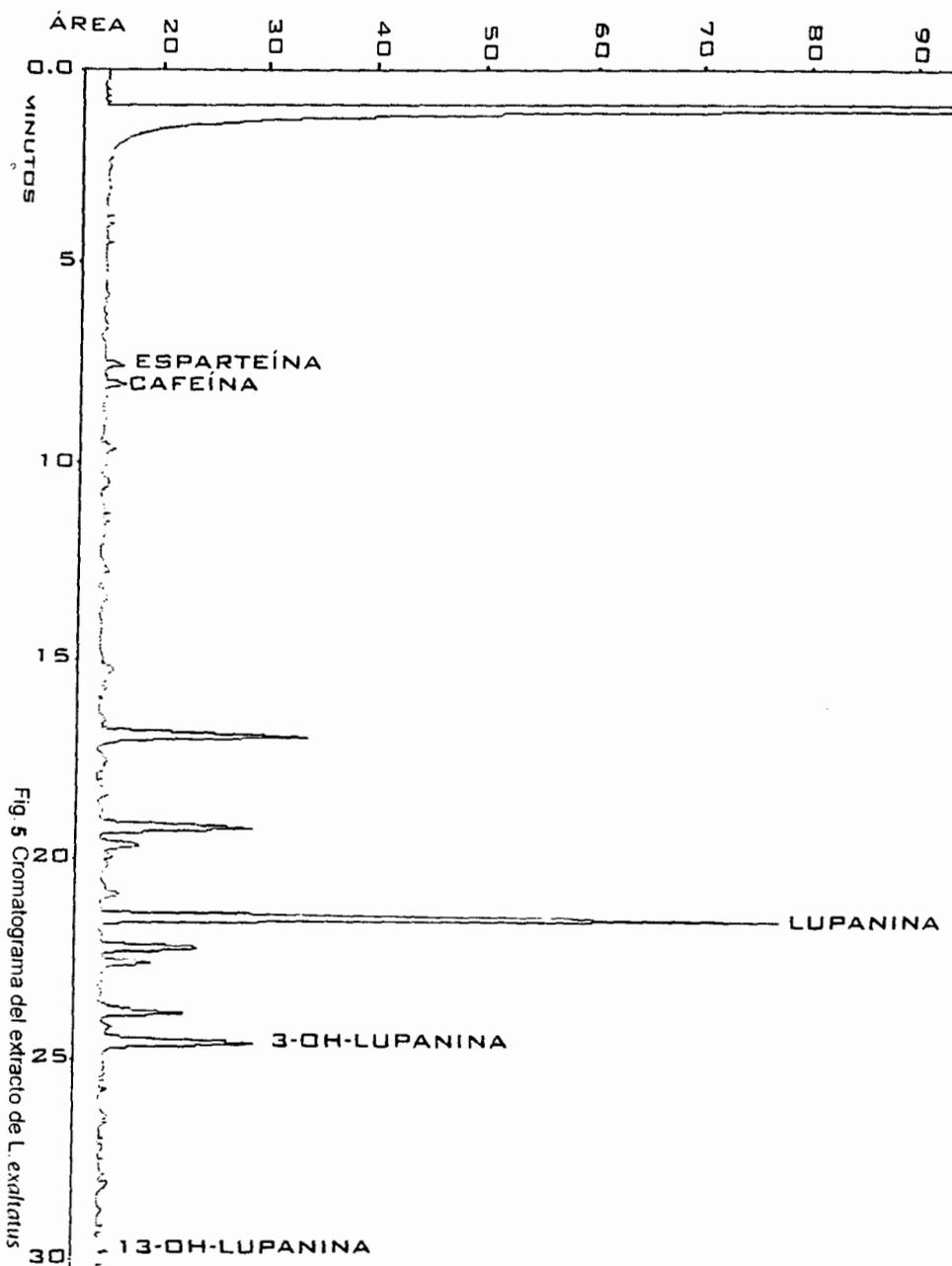


Fig 4 Cromatograma del extracto de *L. montanum*



6.3. Descripción de los hallazgos clínicos encontrados en los animales posterior a la aplicación de los AQ y mediante el método CTT

La ubicación de las regiones dañadas por los AQ se realizó según las coordenadas señaladas por Paxinos y Watson (1982). En las zonas afectadas se detectó una disminución significativa en la síntesis de las enzimas funcionales de la mitocondria (Goldlust y col., 1996).

A continuación los cuadros 6 y 7 presentan las áreas y núcleos afectados que corresponden a cortes de cerebros expuestos a los extractos de *L. montanus* y *L. exaltatus*, respectivamente, así como los valores porcentuales correspondientes a dicha zona de daño (calculados a partir de la diferencia de superficie por cada color, con respecto a la superficie total del corte). Las zonas carentes de reacción correspondientes a tractos fueron omitidas de la prueba con base a concatenación de las áreas intactas de los cortes testigo.

Cuadro 6

Tejido expuesto al extracto de *L. montanus* y sometido a la reacción de *trifeniltetrazolium*.

Ubicación del corte (mm)	Región	Núcleos afectados	%
• 1 Interaural 14.7	Corteza frontal y	AOB, GrA,	26.36
Bregma 5.7	Núcleos Olfatorios.	MiA, VN.	
• 2 Interaural 14.2	Corteza Frontal y	AOE, EPI,	18.27
Bregma 5.2	Núcleos Olfatorios	lo, Mi.	

• 3 Interaural 13.7 Bregma 4.7	Corteza Frontal y Núcleos Olfatorios.	Fr.	30.37
• 4 Interaural 13.2 Bregma 4.2	Corteza Frontal y Núcleos Olfatorios.	AOD, AOL, AOM.	13.52
• 5 Interaural 13.2 Bregma 4.2	Corteza Frontal y Núcleos Olfatorios.	Fr, TT.	10.04
• 6 Interaural 13.2 Bregma 4.2	Corteza Frontal y Núcleos Olfatorios.	lo.	6.58
• 7 Interaural 12.7 Bregma 3.7	Corteza Frontal y Taenia Tecta.	Fr, lo.	4.43
• 8 Interaural 11.7 Bregma 2.7	Corteza Frontoparietal Área Sensorial y Motora. Corteza Primaria Olfatoria.	fmi, FrPaM FrPaSS, RF, TuPI.	6.06
• 9 Interaural 10.7 Bregma 1.7	Corteza Frontoparietal Área Sensorial y Motora. Caudado Putamen.	ACg, FrPaM, FrPaSS, LV, PO, SHi.	17.88

•10 Interaural 9.2 Bregma 0.2	Corteza Frontoparietal Área Sensorial y Motora. Corteza Cingulada Anterior. Núcleo Lateral Septal.	mfb, VDBV.	19.42
•11 Interaural 9.2 Bregma 0.2	Corteza frontoparietal Área Sensorial y Motora. Corteza Cingulada anterior. Núcleo Lateral Septal.	cg, Cpu, FrPaSS, RF, Tu.	0.80
•12 Interaural 8.7 Bregma -0.3	Corteza Frontoparietal Área Sensorial y Motora. Corteza Cingulada Anterior. Núcleo Lateral Septal.	cg, Cpu, lo, RF.	2.60
• 13 Interaural 8.2 Bregma -0.8	Corteza Frontoparietal Área Sensorial y Motora. Área Preoptica Medial.	FrPaM, lo.	9.52
•14 Interaural 6.7 Bregma -2.3	Córtex Frontoparietal Área Sensorial y Motora. Hipocampo Rostral. Tálamo. Hipotálamo.	CA2, CA3, FrPaSS, iml, RF.	0.61
• 15 Interaural 4.7 Bregma -4.3	Corteza Frontoparietal Área Sensorial y Motora. Comisura Anterior.	alv, APT, CA1. CA2, CA3, CA4. cp, DG, DLG, F, fr, FrPaSS,	29.74

	Núcleo Lateral Postalamico.	IBI, LP, mfb, MHb, ml, mtg, OBI, opt, PF, PH, PLCo, PMCo, PO, Po, PP, PR, scp, str, SUM, sumx, VLGMC, VLGPC, VPL, VPM, ZI.	
•16 Interaural 2.7 Bregma -6.3	Corteza Estriada Áreas 17 y 18. Acueducto Cerebral. Colliculos Superior e Inferior.	Ent, RF, Str17, Str18, Str18a, TeAud.	13.35
•17 Interaural 1.2 Bregma -7.8	Corteza Eestriada. Áreas17 y 18. Lemniscos Laterales. Colliculos Superior e Inferior.	lfp, ml, Pn, Str17, Str18, Str18a, s5.	3.41
•18 Interaural 0.7 Bregma -8.3	Corteza Estriada Áreas17 y 18. Núcleos Pontinos Reticulares.	bic, RSpl, RtTg, scp.	13.56
•19 Interaural -0.3 Bregma -9.3	Cerebelo Anterior. Núcleos Tegmentales. Núcleos Parabraqueales. Área Posterior del Colliculus.	CICDM, CICVL, Ent, LSO, Mo5, tz.	12.26
•20 Interaural -0.8 Bregma -9.8	Cerebelo Anterior. Núcleos Parabracteales. Núcleo Pontino Caudal.	2, A5, CGPn, DPB, DR, DTg, FI, LC, LSO, mcp, me5, ml, mlf, Mo5,	28.41

MSO, MTz, ocb, PnC,
py, RPN, s5, VCoA, VPB.

• 21 Interaural -1.3	Cerebelo Medial.	C1, C2, F1,	4.18
Bregma -10.3	Núcleos Vestibulares. Núcleo del Nervio Facial.	GrCo, LTz, MSO, PFl, py, rs, Sim, tz.	
•22 Interaural -1.8	Cerebelo Medial.	LatC, C1, C2,	0.96
Bregma -10.8	Núcleo del Nervio Vestibulococlear.	PFL, py, rs, tz.	
•23 Interaural -4.8	Cerebelo Posterior.	PM, Sp5C.	4.39
Bregma -13.8	Raiz del Nervio Hipoglosal.		
•24 Interaural - 4.8	Cerebelo Posterior.	12n, Cop, PM.	6.74
Bregma -13.8	Tracto Solitario. Núcleos Reticulares.		

Cuadro 7

Tejido expuesto al extracto de *L. exaltatus* y sometido a la reacción de trifeniltetrazolium.

Ubicación del corte (mm)	Región	Núcleos afectados	%
• 1 Interaural 12.2	Corteza frontal Anterior.	Fr, TT.	13.41
Bregma 3.2	Capa Ependimal y Subependimal.		

• 2	Interaural 11.7 Bregma 2.7	Corteza Frontoparietal Área Sensorial y Motora. Corteza Primaria Olfatoria.	CI, FrPaM, FrPaSS.	19.17
• 3	Interaural 10.7 Bregma 1.7	Corteza Frontoparietal Áreas Sensorial y Motora. Caudado Putamen	fmi, FrPaM, FrPaSS, lo, RF, Tu, SHi, LV.	3.88
• 4	Interaural 10.2 Bregma 1.2	Corteza Frontoparietal Área Sensorial y Motora. Núcleos Septales.	Agran, FrPaM, FrPaSS, IG, RF.	2.28
• 5	Interaural 9.2 Bregma 0.2	Corteza Frontoparietal Área Sensorial Motora. Corteza Cingulada Anterior. Núcleo Lateral Septal.	cg, CPu, FrPaM, FrPaSS, lo.	2.91
• 6	Interaural 8.7 Bregma -0.3	Corteza Frontoparietal Área Sensorial y Motora. Núcleo Lateral Septal. Corteza Cingulada Anterior.	BSTL, CPu, df, LSV, LSD, mfb, VP.	5.55
• 7	Interaural 8.2 Bregma -0.8	Corteza Frontoparietal Área Sensorial y Motora.	AA, FrPaM, FrPaSS, HDB, I, lo, Tu.	8.17
• 8	Interaural 7.7 Bregma -1.3	Corteza Frontoparietal Áreas Motora y Sensorial.	B. BST, FrPaM, FrPaSS, ic, LOT,	0.40

	Corteza Cingulada Anterior.	RF, SFO, st, vhc.	
	Comisura Ventral Hipotalámica.		
• 9 Interaural 7.2	Corteza Frontoparietal	AM, B, cc,	10.65
Bregma -1.8	Área Sensorial y Motora.	cg, CPu, CxA, FrPaM,	
	Hipocampo Anterior.	FrPaSS, GP, LV, PT, RF.	
	Tálamo. Hipotálamo.		
• 10 Interaural 7.2	Corteza Frontoparietal	AM, B, cc, cg,	4.98
Bregma -1.8	Área Sensorial y Motora.	CPu, CxA, FrPaM,	
	Hipocampo Anterior.	FrPaSS, GP, LV, PT, RF.	
	Tálamo. Hipotálamo.		
• 11 Interaural 6.2	Corteza Frontoparietal	B, BL, BLV, BM, CA3, CeL,	4.12
Bregma -2.8	Área Motora y Sensorial.	CeM, cg, CL, eml, En, EP,	
	Tercer Ventrículo.	FrPaM, FrPaSS, FStr, l, La,	
	Corteza Cingulada	LD, Po, PO, Rt, VPL, VPM.	
	Posterior.		
• 12 Interaural 4.7	Corteza Frontoparietal	BL, BM, CA3, cg, DG,	3.81
Bregma -4.3	Área Motora y Sensorial.	ec, En, LP, mfb, PCg,	
	Comisura Anterior.	PLCo, RF, VLGMC, VLGPC.	
	Núcleo Lateral Postalámico.		

•13	Interaural 4.2	Corteza Frontoparietal	AHi, BL, cg, df,	9.49
	Bregma -4.8	Área Sensorial.	DG, dhc, Ent, FrPaSS,	
		Corteza Cingulada	InC, IntG, ML, MM, MP,	
		Posterior.	PCg, PMCo, PR, S, scc,	
		Núcleos Mamilares.	SNR, VTA, ZI.	
•14	Interaural 3.7	Corteza Estriada Área 18.	APT, bsc, CG, cg, csc,	6.97
	Bregma -5.3	Substancia Nigra.	dhc, Dk, ICPC, IMCPC,	
		Corteza Temporal Auditiva.	InC, ml, OPT, OT, pc,	
			Po, PPT, RF, RPC, SC,	
			scp, Str18, TeAud.	
•15	Interaural 3.2	Corteza Estriada	3n, alv, CA1, CA2, CA3,	8.10
	Bregma -5.8	Áreas 17 y 18.	CGD, cp, MGD, MGM, MGv,	
		Substancia Nigra.	PMCo, RSpl, S, SNC, SNR,	
		Substancia Gris	Str17, Str18, Str18a, TeAud.	
		Periacueductal.		
•16	Interaural 3.2	Corteza Estriada	AF, cg, IF, ml, R, RLi,	11.24
	Bregma -5.8	Áreas 17 y 18.	RSpl, SNC, Str18a, TeAud.	
		Sustancia Gris		
		Periacueductal.		
		Corteza Temporal Auditiva.		
• 17	Interaural 3.2	Corteza Estriada	CG, CGD, CGM, CLi,	15.34
	Bregma -5.8	Áreas 17 y 18.	DpG, DpWh, DR, Dsc, Ent,	
		Acueducto Cerebral.	InG, InWh, Me5, mlf, MnR,	
			Op, PaS, Pn, PnO, PrS, RF,	

		RR, S, Str17, Str18, Str18a, SuG, xscp, Zo.	
•18 Interaural 1.7	Corteza Estriada	bic, bp, CGD, CLi, DpG,	24.56
Bregma -7.3	Áreas 17 y 18. Núcleos Pontinos. Colliculos Superior e Inferior.	DpWh, Dsc, Ent, InG, InWh, LTz, ll, Me5, ml, mlf, MnR, Op, PaS, PBg, Pn, PnO, PrS, RF, RR, rs, RSpl, S, SOL, Str17, Str18a, SuG, VLL, xscp, Zo.	
• 19 Interaural 1.2	Corteza Estriada	bic, DpG, IC, InG, InWh,	5.93
Bregma -7.8	Áreas 17 y 18. Lemniscos Laterales. Colliculos Superior e Inferior.	ll, m5, mcp, ml, Op, PaS, PBg, PPTg, PrS, RSpl, s5, Str17, Str18a, SuG, VLL, xscp.	
•20 Interaural -0.3	Cerebelo Anterior.	2, 3, 4n, C1, C2, CICDM,	10.01
Bregma -9.3	Área Posterior del Colículo. Núcleos Tegmentales. Núcleos Parabraqueales.	CICVL, DTg, F1, KF, LC, mcp, Me5, Mo5, PFI, PnC, Pr5, py, RPn, rs, SubC, tz, VCoA, VPB, vsc.	
•21 Interaural -0.8	Cerebelo Anterior.	1, 2, 3, 4v, 7n, 8n, bas,	21.28
Bregma -9.8	Núcleos Parabracteales. Núcleo Reticular Pontino Caudal.	C2, C2Pr5, CGPn, DR, DTg, FL, LC, LSO, LTz, m5, mcp, me5, ml, Mo5, MSO, MTz, ocb, PFI, py, RMg, s5, scp, tz, VCoA, VPB, vsc.	

•22 Interaural -1.3	Cerebelo Medial.	FI, GrCo, PFL.	4.11
Bregma -10.3	Núcleos Vestibulares.		
<hr/>			
	Núcleo del Nervio Facial.		

Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir de las pruebas Kruskal-Wallis/ Dunn's, nos indican que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de los grupos experimentales. Sin embargo, éstos presentaron diferencias con respecto al grupo T.

El cuadro número 8 describe los resultados arrojados por el análisis estadístico en donde S = Diferencia estadística significativa, NS = Diferencia estadística no significativa, Vs = Comparado a, Grupo T = Grupo tratado con la sustancia vehículo, Grupo M = Grupo experimental tratado con alcaloides obtenidos de *L. montanus*, Grupo E = Grupo experimental tratado con alcaloides obtenidos de *L. exaltatus*.

Cuadro 8 Diferencias estadísticas (CTT)

Grupo T	Vs	Grupo E	S
Grupo T	Vs	Grupo M	S
Grupo E	Vs	Grupo M	NS

A continuación las figuras 6 y 7 (páginas siguientes) muestran y comparan los cortes coronales mas significativos de tejido impregnado con rojo de *trifeniltetrazolium*, en donde se muestran las zonas afectadas en los grupos M (tercera columna), E (segunda columna), en oposición al grupo T (primera columna).

Fig. 6 Group T



Group F



Group M

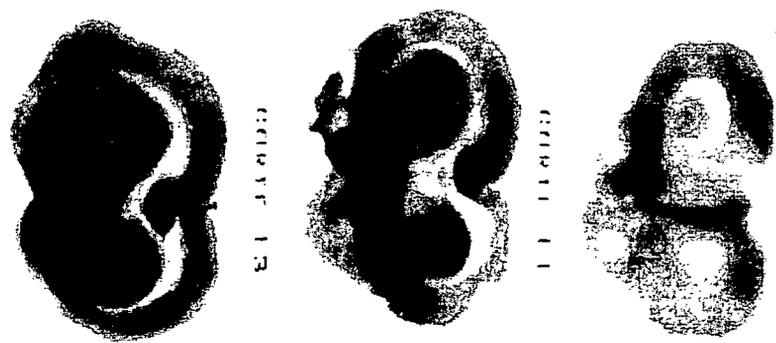


Fig. 7 Group T

GORTE TESTIGO



GORTE TESTIGO



GORTE TESTIGO



Group F

GORTE 9



GORTE 14



GORTE 21



Group M

GORTE 14



GORTE 15



GORTE 20



6.4 Tinción de Nissl

La observación mediante microscopía óptica realizada en tejidos con tinción de Nissl, mostró diversos cambios morfológicos degenerativos en las neuronas consistentes en: hinchamiento celular, gliosis, ondulación de la membrana plasmática, desintegración e hipertrofia del núcleo, fragmentación de la cromatina, compactación de la cromatina y basofilia e hipertrofia del retículo endoplásmico. Dichos cambios se presentaron en forma dispersa y con diferente intensidad según el área evaluada y el tipo de tratamiento (Fig. 7 Incisos a-h).

A continuación los cuadros 9 y 10 presentan cada uno de los núcleos y áreas afectados (localizados según las coordenadas señaladas por Paxinos y Watson, 1982), correspondientes a cortes de cerebros expuestos pertenecientes a los grupos M y E, respectivamente:

Cuadro 9

Tejido expuesto al extracto de *L. motanus* y sometido a la tinción de Nissl.

Ubicación del corte (mm)	Región	Núcleos afectados
• 1 Interaural 12.7 mm	Corteza Frontal Anterior.	aci, AOV, Fr.
Bregma mm 3.7	Capa Ependimal y Subependimal.	*
• 2 Interaural 12.2 mm	Corteza Frontal Anterior.	aca, AOP, Fr, lo, TT, Tu.
Bregma mm 3.2	Capa Ependimal y Subependimal.	

		SO, VL, VM, sm, sox, st, ZI.
• 13 Interaural 6.7 mm	Corteza Frontoparietal	ACo, al, Arc, B, BAOT, BL, BLV,
Bregma -2.3 mm	Áreas Sensorial y Motora.	BM, CA2, CA3, CA4, CC, Ce, CL,
	Hipocampo Rostral.	CM, CPu, CxA, DA, df, DHC, DG,
	Tálamo. Hipotálamo.	dhc, eml, En, EP, f, fi, FrPaM,
		FrPaSS, FStr, G, GP, I, IAM, ic,
		IG, IMD, iml, La, LD, LH, LHb, ME,
		Me, mfb, MD, MDL, MHb, ml, mt,
		PC, PCg, Pe, PO, PV, Re, RF, Rh, Rt,
		sm, SOR, sox, st, VL, VM, VMH, VPL, ZI.
• 14 Interaural 6.2 mm	Corteza Frontoparietal	Aco, AHi, al, Arc, B, BM, BLV, CA1,
Bregma -2.8 mm	Áreas Sensorial y Motora.	CA2, CA3, CA4, CeL, CeM, CL, CM,
	Tercer Ventriculo.	CPu, CxA, df, DA, DG, DM, dhc, eml,
	Corteza Cingulada	En, EP, f, fi, FrPaM, FrPaSS, FStr, G.
	Posterior.	GP, ic, IG, IMD, La, lab, LD, LH, LHb, MD,
		MDL, ME, Me, mfb, MHb, mt, PC, PCg,
		Pe, PLCo, PO, Po, PV, Re, RF, Rh,
		Rt, si, sm, SOP, SOR, sox, st,
		VL, VM, VMH, VPL, VPM, ZI.
• 15 Interaural 5.7 mm	Corteza Frontoparietal	AHi, al, Arc, BL, BLV, BM, c, CA1,
Bregma -3.3 mm	Áreas Sensorial y Motora.	CA2, CA3, CA4, Ce, CL, CM, CPu,
	Tercer Ventriculo.	CxA, DA, DG, dh, dhc, df, DM, DMC.
	Corteza Cingulada	eml, En, EP, f, FC, fi, FrPaM, FrPaSS,
	Posterior.	FStr, G, HiF, I, ic, IG, IMD, La, LD, LH,
		LHb, LP, MD, MDL, ME, Me, mfb, MHb, ml,

		mt, PC, PCg, PeF, PLCo, PO, Po, PVP, Re, RF, Rh, Rt, sm, sox, st, VLP, VM, VMHC, VMHDM, VMHVL, VMP, ZI.
• 16 Interaural 5.2 mm	Corteza Frontoparietal	AHi, Arc, CL, CM, CPu, CxA, df, dhc,
Bregma -3.8 mm	Áreas Sensorial y Motora.	DLG, emI, f, FF, fi, FrPaSS, GrDG, ic, IG,
	Tercer Ventrículo.	InfS, La, LG, LH, LHb, LMol, LP, MD, ME,
	Corteza Cingulada	mfb, MHb, ml, Or, PC, PCg, PF, PH,
	Posterior.	PLCo, PMCo, PMD, PMV, Po, POZI, PVP, Py, Rad, RF, Rt, sm, Smt, sox, SPF, st, TMCDM, VPL, VPM, VPPC, ZI.
• 17 Interaural 4.7 mm	Corteza Frontoparietal	AF, APT, CA1, CA2, CA3, CA4, CMC,
Bregma -4.3 mm	Áreas Sensorial.	cp, df, DG, dhc, DLG, F, f, fr, FrPaSS,
	Corteza Cingulada	Gem, hbc, HiF, lBI, ic, IG, LH, LP, mfb,
	Posterior.	MHb, ml, MM, MMn, MRe, mt, mtg,
	Núcleo Lateral	OBI, PCg, PF, PH, PMD, Po, PO, PP,
	Postalamico.	PR, RF, scp, SMT, sox, STh, str, SuM, sumx, VLGMC, VLGPC, VPL, VPM, ZI.
• 18 Interaural 4.2 mm	Corteza Frontoparietal	AF, AHi, APTD, APTV, BL, CA1, CA2,
Bregma -4.8 mm	Áreas Sensorial.	CA3, CA4, cp, df, DG, dhc, DK, Dk,
	Núcleos Mamilares.	DLG, Ent, fr, FrPaSS. Gem, hbc, HiF,
	Corteza Cingulada	IMCPC, IMPC, InC, IntG, LM, LP,
	Posterior.	mC, MG, ml, ML, MM, MP, mp, mt, mtg, OPT, OT, pc, PCg, PMCo, Po, PP, PR, RF, S. SCO, scp, SG, SNC, SNR, str, SuM, sumx, VLGMC,

		VLGPC, VTA, ZI.
• 19 Interaural 3.7 mm	Corteza Estriada Área 18.	AF, AHi, APT, CA1, CA2, CA3, CA4,
Bregma -5.3 mm	Substancia Nigra.	CG, cp, csc, DG, dhc, Dk, DLG, Ent,
	Corteza Temporal Auditiva.	FC, FCSC, fr, HiF, ICPC, IF, IMCPC,
		InC, LP, MG, ml, mp, MT, mtg, OPT,
		OT, PBP, pc, PMCo, PN, Po, PP, PPT,
		RF, RLi, RPC, S, SC, scp, SG, SNC,
		SNI, SNR, Str18, TeAud, VTA,
• 20 Interaural 3.2 mm	Corteza Estriada	AF, AHi, APT, CA1, CA2, CA3, CA4,
Bregma -5.8 mm	Áreas 17 y 18.	CG, CGD, CGD, cp, DG, Dk, eg, Ent,
	Substancia Nigra.	EW, HiF, IF, InC, InG, InWh, IPC, IPIP,
	Corteza Temporal Auditiva.	MGD, MGM, MGv, ml, mlf, mp, Op, OT,
		PBP, PMCo, PN, PP, PPT, R, RF, RLi,
		RSpl, S, scp, SNC, SNL, SNR, Str17,
		Str18, Str18a, SuG, TeAud. VTA, Zo.
• 21 Interaural 2.7 mm	Corteza Estriada	bic, CA1, CA4, CG, CGD, CLi,
Bregma -6.3 mm	Áreas 17 y 18.	cp, csc, DG, DpG, DpMe, dtgx,
	Acueducto Cerebral.	Ent, HiF, Hii, ifp, InG, InWh, IPC,
	Coliculo Superior e	IPC, IPIP, IPP, MGD, ml, mlf, Op,
	Inferior.	PaS, PrS, RF, RMC, RRF, RSpl,
		S, scp, SNC, SNR, Str17, Str18,
		Str18a, SuG, TeAud, tpf, VTA, Zo.
• 22 Interaural 2.2 mm	Corteza Estriada	bic, bp, CA1, CG, CGD, CGM, CLi,
Bregma -6.8 mm	Áreas 17 y 18.	cp, DG, DpG, DpMe, DR, dtgx, Ent,

	Acueducto Cerebral.	GrDG, HiF, InG, InWh, IPA, IPIP,	
	Coliculo Superior	IPOP, IPP, m5, MGD, ml, mlf, Op,	
	e Inferior.	PaS, Pn, PrS, RF, RRF, rs, RSpl, S,	
		s5, Str17, Str18, Str18a, SuG, Te, tfp,	
		ts, VTA, xsc, Zo.	
• 23	Interaural 1.7 mm	Corteza Estriada	bic, bp, CG, CGD, CGM, CLi, DpG,
	Bregma -7.3 mm	Áreas 17 y 18.	DpWh, DR, DR, Dsc, Ent, InG, InWh,
		Núcleos Pontinos.	lfp, ll, Me5, me5, ml, mlf, MnR, Op, Pas,
		Coliculo Superior e Inferior.	PBg, Pn, PnO, PrS, RF, RR, rs, RSpl,
			S, s5, Str17, Str18, Str18a, SuG, tfp,
			xscp, Zo.
• 24	Interaural 1.2 mm	Corteza Estriada	bic, bp, CG, CGD, CGM, DpG, DpWh,
	Bregma -7.8 mm	Áreas 17 y 18.	DR, Dsc, Ent, IC, InG, InWh, lfp, ll, m5,
		Lemniscos Laterales.	me5, Me5, ml, mlf, MnR, Op, PaS, PBg,
		Coliculo Superior e Inferior.	Pn, PnO, PPTg, PrS, rs, RSpl, RtTg, s5,
			Str17, Str18, Str18a, SuG, tfp, ts, VLL,
			xscp, Zo.
• 25	Interaural 0.7 mm	Corteza Estriada	bic, CG, CGD, cic, CICDM, CICVL, Cnf,
	Bregma -8.3 mm	Áreas 17 y 18.	DLL, DR, EIC, LDTg, ll, m5, Me5, me5,
		Núcleos Pontinos	ml, mlf, MnR, MTz, PnO, PPTg, py, rs,
		Reticulares.	RtTg, scp, SOI, LTz, ts, tz, VLL, Vtg.
• 26	Interaural -0.3 mm	Cerebelo Anterior.	2, 3, 4, 4V, Cb, CICDM, CICVL, DPB,
	Bregma -9.3 mm	Núcleos Tegmentales.	DR, DTg, Ent, FI, KF, LC, LDTg, LSO,

Núcleos Parabraqueales.	LTz, m5, mcp, me5, Me5, ml, mlf, Mo5,
Área Posterior del Colículo.	MSO, MTz, PFI, PnC, Pr5, py, RPn, rs, s5, scp, sm, smv, SubC, tz, VCoA, VPB, vsc.
• 27 Interaural -1.3 mm Cerebelo Medial.	1, 2, 3, 4, 4V, 5, 6, 7, C1, C2,
Bregma -10.3 mm Núcleos Vestibulares.	Fl, GrCo, icp, LC, LSO, LTz,
Núcleo del Nervio Facial.	LVe, mlf, ml, MSO, ocb, PFI, PnC, PrF, py, RMg, Rpa, RPn, rs, scp, SGe, Sim, sp5, Sp5O, SuVe, tz, VCoA, vsc.
• 28 Interaural -1.8 mm Cerebelo Medial.	2, 3, 4, 5, 6, 7, C1, C2, DCo, g7,
Bregma -10.8 mm Núcleo del Nervio Vestibulococlear.	Gi, GrCo, icp, Int, I, LatC, LVe, ml, mlf, MVe, PCRt, PFI, PGI, PrF, PrH, py, RMg, RPa, rs, scp, sp5, Sp5O, Su7, SuVe, tz, VCo.

Cuadro 10

Tejido expuesto al extracto de *L.exaltatus* y sometido a la tinción de Nissl.

Ubicación del corte (mm)	Región	Núcleos afectados
• 1 Interaural 14.2 mm	Corteza Frontal.	aci, AOB, AOD, AOE, AOL,
Bregma 5.2 mm	Núcleos Olfatorios.	AOV, E, EPI, Fr, IGR, IPI, lo, Mi, OV, RF, vn.

	Tálamo. Hipotálamo.	En, f, FrPaM, FrPaSS, FStr, GP, I, ic, IG, LH, lo, LOT, LOTD, mfb, MPO, ox, Pa, PC, Pe, PO, PT, PVA, Re, RF, Rn, Rt, SHc, SFO, SI, sm, SO, st, TS, vhc, VP.	
• 14	Interaural 7.2 mm	Corteza Frontoparietal	ACo, AD, AHy, al, AM, AV, B, BL,
	Bregma -1.8 mm	Áreas Sensorial y Motora.	BST, CA3, Ce, CL, CI, CM, CPu,
		Hipocampo anterior.	CxA, df, DG, dhc, En, f, fi, FrPaM,
		Tálamo. Hipotálamo.	FrPaSS, FStr, G, GP, I, IAM, ic, IG, La, LD, LH, LOT, MD, MDL, Me, mfb, MHb, mt, PaMC, PaPC, PC, PCg, Pe, PO, PT, PVA, RCh, Re, RF, Rh, Rt, sm, SO, sox, st, TS, VL, VM, ZI.
• 15	Interaural 6.7 mm	Corteza Frontoparietal	ACo, al, Arc, B, BAOT, PO, BL, BLV,
	Bregma - 2.3 mm	Áreas Sensorial y Motora.	BM, CA2, CA3, CA4, CL, CM, CPu,
		Hipocampo Rostral.	CxA, DA, df, DG, DHC, dhc, eml, En.
		Tálamo. Hipotálamo.	EP, f, fi, FrPaM, FrPaSS, FStr, G, GP, I, IAM, ic, IG, iml, La, LD, LH, LHb, MD, MDL, ME, Me, mfb, MHb, mt, PC, PCg, Pe, PV, Re, RF, Rh, Rt, sm, SOR, sox, st, VL, VM, VMH, VPL, ZI.
• 16	Interaural 6.2 mm	Corteza Frontoparietal	ACo, AHi, al, Arc, B, BL, BLV, BM,
	Bregma -2.8 mm	Áreas Sensorial y Motora.	CA1, CA2, CA3, CA4, CeL, CeM,
		Tercer Ventrículo.	CL, CM, CPu, CxA, DA, df, DG, dhc.
		Corteza Cingulada Posterior.	DM, eml, En, EP, f, fi, FrPaM, FrPaSS.

- FStr, G, GP, I, ic, IG, IMD, La, lab, LD,
LH, LHb, MD, MDL, ME, Me, mfb, MHb,
mt, PC, PCg, Pe, PLCo, Po, PO, PV, Re,
RF, Rh, Rt, sm, SOR, sox, st, st, VL, VM,
VMH, VPL, VPM, ZI.
- 17 Interaural 5.7 mm Corteza Frontoparietal AHi, al, Arc, BL, BLV, BM, CA1, CA2,
Bregma -3.3 mm Áreas Sensorial y Motora. CA3, CA4, Ce, CL, CM, CPu, CxA,
Tercer Ventriculo. DA, DG, DM, DMC, eml, En, EP, f,
Corteza Cingulada Posterior. FC, fi, FrPaM, FrPaSS, FStr, HiF,
ic, IMD, La, LD, LH, LHb, LP, MD,
MDL, Me, ME, mfb, MHb, ml, mt, PC,
PeF, PLCo, PMCo, PO, PoG, PVP,
Re, RF, Rh, Rt, sm, sox, st, VHMD, C,
VM, VMHC, VMHVL, VPL, VPM, ZI.
 - 18 Interaural 5.2 mm Corteza Frontoparietal AHi, Arc, BL, BM, CA1, CA2, CA3,
Bregma -3.8 mm Áreas Sensorial y Motora. CA4, CL, CM, CPu, CxA, df, DG,
Tercer Ventriculo. dhc, DLG, DM, eml, En, f, FF, fi,
Corteza Cingulada Posterior. fr, GrDG, HiF, ic, IG, InfS, La, LH,
LHb, LMol, LP, MD, Me, mfb, MHb,
ml, Mol, mt, Or, PC, PCg, RF, PH,
PLCo, PMCo, PMD, PMV, Po, PO,
PVP, Py, Rad, Rt, sox, SPF, st, STh,
TMC, VLP, VPM, VPPC, ZI.
 - 19 Interaural 4.7 mm Corteza Frontoparietal AF, AHi, APT, Arc, BL, BM, CA2,
Bregma -4.3 mm Área Sensorial. CA3, CA3, CA4, CMC, cp, df, DG,

	Núcleo Lateral Postalámico.	dhc, DLG, En, F, f, fr, FrPaSS, Gem,	
	Corteza Cingulada Posterior.	hbc, HiF, IBI, ic, IG, LH, LP, mfb, MHb, ml, MM, MMn, MRe, mt, mtg, OBI, PCg, PF, PH, PLCo, PMD, PO, Po, PP, PR, RF, scp, SMT, sox, STh, str, SuM, sumx, VLGMC, VLGPC, VLP, VPM, ZI.	
• 20	Interaural 4.2 mm	Corteza Frontoparietal	AF, AHi, APTD, APTV, BL, CA1, CA2,
	Bregma -4.8 mm	Área Sensorial.	CA3, CA4, cp, df, DG, dhc, Dk, DLG,
		Núcleos Mamilares	Ent, fr, FrPaSS, Gem, hbc, HiF,
		Corteza Cingulada Posterior.	IMCPC, InC, IntG, LM, LP, MG, ml, ML, MM, mp, MP, mt, mtg, OPT, OT, pc, PCg, PMCo, Po, PR, RF, S, SCO, scp, SG, SNC, SNR, str, SuM, sumx, VLGMC, VLGPC, VTA, ZI.
• 21	Interaural 3.7 mm	Corteza Estriada Área 18.	AF, AHi, APT, CA1, CA2, CA3, CA4,
	Bregma - 5.3 mm	Substancia Nigra.	CG, cp, csc, DG, dhc, Dk, DLG, Ent,
		Corteza Temporal Auditiva.	FC, fr, HiF, ICPC, IF, IMCPC, InC, IPF, LP, MG, ml, mp, MT, mtg, OPT, OT, PBP, pc, PMCo, PN, Po, PP, PPT, RF, RLi, RPC, S, SC, scp, SG, SNC, SNL, SNR, Str18, TeAud, VTA.
• 22	Interaural 2.7 mm	Corteza Estriada	bic. CA1, CA4, CG, CGD, CLi,
	Bregma -6.3 mm	Áreas 17 y 18	cp, csc, DG, DpG, DpMe, dtgx,
		Acueducto Cerebral.	Ent. HiF, Hil. ifp, InG, InWh, IPC.

	Colicula Superior e Inferior.	IPIP, IPP, MGD, ml, mlf, Op, PaS, PrS, RF, RMC, RRF, RSpl, S, scp, SNC, SNR, Str17, Str18, Str18a, SuG, TeAud, VTA, Zo.	
• 23	Interaural 2.2 mm	Corteza Estriada	bic, bp, CA1, CG, CGD, CGM,
	Bregma -6.8 mm	Áreas 17 y 18.	CLi, cp, DG, DpG, DpMe, DR,
		Acueducto Cerebral.	dtgx, Ent, GrDG, HiF, InG, InWh,
		Colicula Superior e Inferior.	IPA, IPIP, IPOP, IPP, MGD, ml, mlf, Op, PaS, Pn, PrS, RF, RRF, rs, RSpl, S, Str17, Str18, Str18a, SuG, Te, tfp, ts, VTA, xscp, Zo.
• 24	Interaural 1.7 mm	Corteza Estriada	bic, bp, CG, CGD, CGM, CLi, DpG,
	Bregma - 7.3 mm	Áreas 17 y 18.	DpWh, DR, Dsc, Ent, ifp, InG, InWh, Il,
		Núcleos Pontinos.	mcp, me5, Me5, ml, mlf, MnR, Op, PaS,
		Colicula Superior e Inferior.	PBg, Pn, PnO, PrS, RR, rs, RSpl, S, Str17, Str18, Str18a, SuG, tfp, xscp, Zo.
• 25	Interaural 1.2 mm	Corteza Estriada	bic, bp, CG, CGD, CGM, DpG,
	Bregma - 7.8 mm	Áreas 17 y 18.	DpWh, DR, Dsc, Ent, IC, ifp, InG,
		Lemniscos Laterales.	InWh, Il, m5, Me5, me5, ml, mlf,
		Colicula Superior e Inferior.	MnR, Op, PaS, PBg, Pn, PnO, PrS, rs, RSpl, RtTg, Str17, Str18, Str18a, SuG, tfp, VLL, xscp, Zo.

Fig. 7. Incisos: a, c, e. Muestran fotografías de tejido nervioso correspondientes a las coordenadas: Interaural 3.2, Bregma -5.8 (Paxinos y Watson, 1982). Las células pertenecen al subiculum y fueron obtenidas con aumentos de 20x, 40x, y 100x, respectivamente. Estas figuras corresponden a los animales testigo (aceite de sésamo). No se encontró algún indicio de degeneración celular.

Fig. 7. Incisos: b, d, f. Muestran fotografías de tejido nervioso (correspondientes a organismos del grupo M) encontrado en las coordenadas: Interaural 3.2, Bregma -5.8 (Paxinos y Watson, 1982). Las células pertenecen al subiculum y fueron obtenidas con aumentos de 20x, 40x, y 100x, respectivamente. Hallazgos histopatológicos encontrados: hinchamiento celular y leve compactación de la cromatina, así como deformación de la membrana celular.

Fig. 7. Incisos g, h. Muestran fotografías de tejido nervioso correspondientes a las coordenadas: Interaural 3.2, Bregma -5.8 (Paxinos y Watson, 1982). Las células pertenecen al núcleo de Darkschewitsch y fueron obtenidas con aumento de 100x. El inciso g corresponde a tejido cerebral perteneciente al grupo T y muestra células de apariencia normal. Por su parte, el inciso h pertenece al grupo M, mostró neuronas con procesos degenerativos como: hinchamiento celular y nuclear, basofilia del retículo endoplasmico, además de leve compactación de la cromatina.

Fig 8. Ilustración que muestra la ubicación de los cortes utilizados en la figura 7(todos los incisos), mediante las coordenadas publicadas por Paxinos y Watson (1982). Estructuras prominentes: corteza estriada, corteza auditiva, *substantia nigra*, cuerno de Ammon y subiculum.

Fig. 7 Incisos a-f. Muestran fotografías de tejido nervioso sometido a la técnica de Nissl

a)



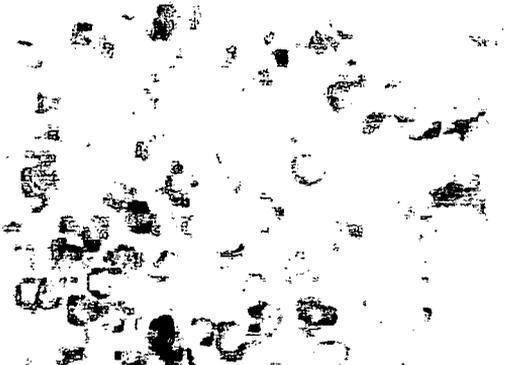
b)



c)



d)



e)



f)

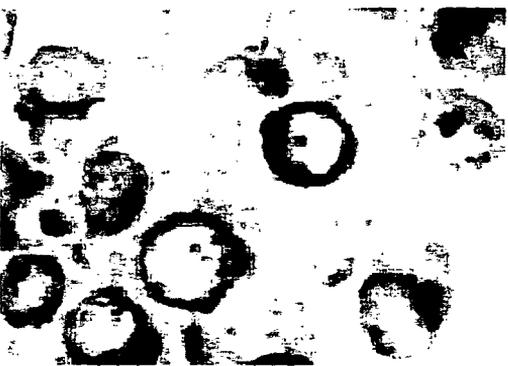


Fig. 7 Incisos g, h. Muestran fotografías de tejido nervioso sometido a la técnica de Nissl

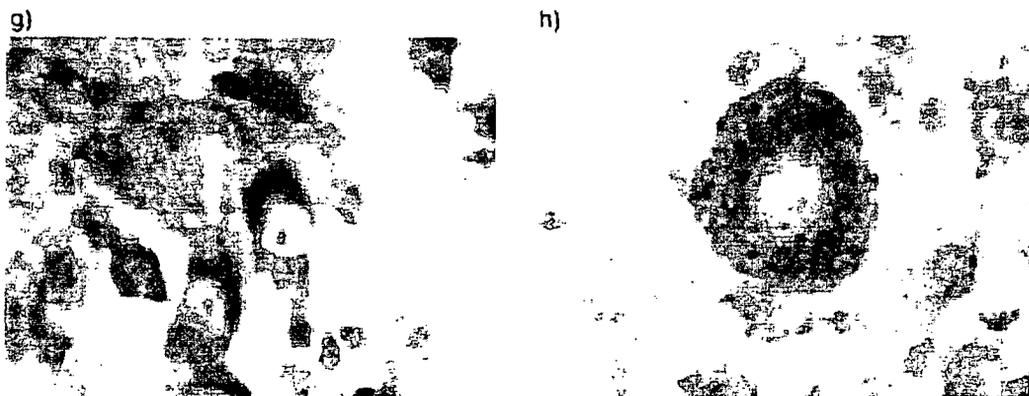
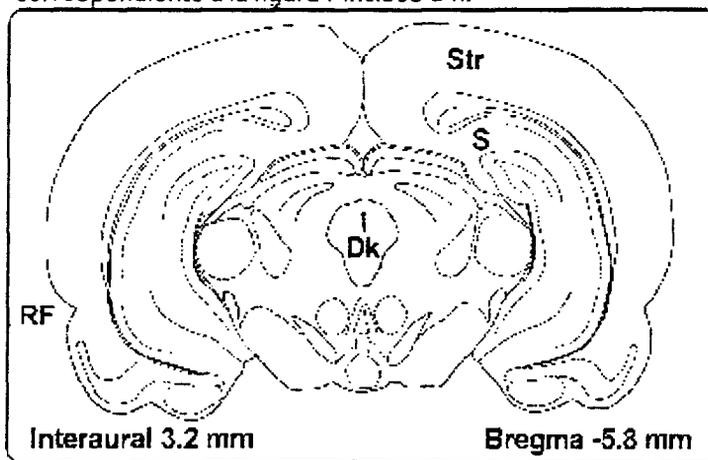


Fig. 8 Ilustración que ubica la región en el cerebro (Paxinos y Watson, 1982) correspondiente a la figura 7 incisos a-h.



Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir de las pruebas Kruskal-Wallis/ Dunn's, nos indican que hubo diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos, el grupo M presentó una afección mas severa. A continuación se desglosan los resultados obtenidos en superficie celular y superficie nuclear, en los núcleos de Darkschewitsch y subiculum.

Los cuadros 11 y 12 describen los resultados obtenidos por el análisis estadístico para superficie celular y superficie nuclear, respectivamente, en el núcleo de Darkschewitsch. El grupo M presentó mayor superficie celular y tuvo diferencias significativas respecto a los grupos restantes ($P < 0.05$). El grupo E presentó una superficie celular mayor con respecto al grupo T ($P < 0.05$). En lo que respecta a la superficie de núcleos, nuevamente el grupo M tuvo una mayor superficie nuclear que los grupos restantes ($P < 0.05$), mientras que el grupo E no presentó diferencias significativas al ser comparado con el grupo T.

Los cuadros 13 y 14 describen los resultados obtenidos por el análisis estadístico para superficie celular y superficie nuclear respectivamente en el Subiculum, en el cual el grupo M presentó la mayor superficie celular y tuvo diferencias significativas respecto a los otros grupos, mientras que el grupo E no presentó diferencias significativas respecto al grupo T. En lo que respecta a superficie nuclear, el grupo M fue mayor que los grupos restantes, mientras que el grupo E, nuevamente no presentó diferencias significativas.

Abreviaturas de los cuadros 11 a 14: S = Diferencia estadística significativa, NS = Diferencia estadística no significativa, Vs = Comparado al, Grupo T = Grupo tratado con la sustancia vehiculo, Grupo M = Grupo experimental tratado con alcaloides obtenidos de *L. montanus*, Grupo E = Grupo experimental tratado con alcaloides obtenidos de *L. exaltatus*.

Cuadro 11. Diferencias estadísticas entre tratamientos en células de Darkschewitsch

Grupo T	Vs	Grupo E	S
Grupo M	Vs	Grupo T	S
Grupo M	Vs	Grupo E	S

Cuadro 12. Diferencias estadísticas entre tratamientos en núcleos celulares de Darkschewitsch

Grupo T	Vs	Grupo E	NS
Grupo M	Vs	Grupo T	S
Grupo M	Vs	Grupo E	S

Cuadro 13. Diferencias estadísticas entre tratamientos en células de subiculum

Grupo T	Vs	Grupo E	NS
Grupo M	Vs	Grupo T	S
Grupo M	Vs	Grupo E	S

Cuadro 14. Diferencias estadísticas entre tratamientos en núcleos celulares de subiculum

Grupo T	Vs	Grupo E	NS
Grupo M	Vs	Grupo T	S
Grupo M	Vs	Grupo E	S

6.5 Observación clínica de los animales

Los resultados de la observación clínica de los animales mostraron los siguientes signos y síntomas: piloerección, erección caudal, midriasis, hipnolepsia, sedación y/o excitación, disminución del apetito, pérdida de peso, pérdida del equilibrio y ubicación, convulsiones, y automutilación de miembros.

VII. DISCUSIÓN

Previamente al análisis de los extractos de *Lupinus* por cromatografía de gas, fue necesario realizar la detección temprana de alcaloides en las fracciones extraídas de *L. montanus* y *L. exaltatus*, ésto debido a que la literatura disponible no señala de manera contundente la presencia de alcaloides en las especies de *Lupinus* colectadas en las regiones mencionadas del estado de Jalisco.

Los resultados mostraron reacciones positivas, tanto para las fracciones de *Lupinus* como para la muestra testigo positiva (cafeína), lo que indicó la presencia de alcaloides mediante el uso de los reactivos Mayer y Dragendorff, que son específicos para la determinación de estos compuestos (Hultin y Torssell, 1965). Mientras tanto, la muestra testigo negativa (extracto clorofórmico de soya) como se esperaba presentó reacción negativa debido a que carece de algún tipo de alcaloides (Dominguez, 1973). Este método en su forma original ha sido utilizado desde hace décadas para determinar alcaloides. Hultin y Torssell, en 1965, detectaron la presencia de alcaloides en plantas europeas pertenecientes a las familias: acanthaceae, adoxaceae, araceae, betulaceae, compositae, entre otras.

Sin embargo, el método utilizado para la detección de alcaloides no es del todo completo debido a que no señala cantidad ni tipo de alcaloides detectados, solo es aplicable como una prueba de detección previa a un análisis más certero y específico como son la cromatografía de gas capilar o cromatografía líquida de alta resolución.

En base a la literatura disponible, la cromatografía de gas capilar resulta ser una técnica eficiente para el análisis cuantitativo y cualitativo de los alcaloides quinolizidínicos individuales debido a su rapidez y alta sensibilidad (Priddis, 1983; Muzquiz y col., 1989), tal y como se ha mencionado por especialistas en eventos académicos internacionales, donde se ha elegido la cromatografía de gas con columnas capilares como método de cuantificación de alcaloides presentes en *Lupinus* (memorias del sexto congreso de internacional de lupino celebrado en Temuco, Chile en 1990).

En el presente trabajo, la cromatografía de gas mostró diferencias respecto a la cantidad presente de AQ detectados. Los cuatro estándares de AQ utilizados se encontraron presentes en ambas especies de *Lupinus* analizadas, no obstante la concentración fue variable para cada especie.

En *L. exaltatus* el alcaloide mayoritario fue la lupanina (1251.34 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), seguido por: la 3-OH-lupanina (509.58 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), la esparteína (74.60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), y la 13-OH-lupanina (55.36 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Mientras que en *L. montanus* se detectó la esparteína como alcaloide principal (3347.16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), seguido por, la lupanina (2613.19 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), la 13-OH-lupanina (347.29 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y la 3-OH-lupanina (325.39 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Los hallazgos encontrados en el presente trabajo concuerdan con los datos obtenidos de diversos autores para especies de *Lupinus* en todo el mundo. Como ejemplo de lupinos del viejo mundo (Europa, Asia y Africa) tenemos que *L. luteus*, *L. hispanicus* (Muzquiz y col., 1989; Wink y col., 1995), *L. consentinii*, *L. digitatus*, *L. pilosus*, y *L. princei* (Wink y col., 1995), poseen lupanina como uno de los alcaloides principales. Mientras que *L. angustifolius* además de presentar la lupanina, también presenta la 13-OH-lupanina como AQ mayoritarios (Priddis, 1983).

Por otro lado, algunos *Lupinus* de América como *L. linearis* y *L. gibertianus* poseen lupanina y 13-OH-lupanina como alcaloides principales (Planchuelo y col., 1993). *L. mutabilis* presenta como AQ mayoritario la esparteína, de la misma manera este alcaloide fue detectado en *L. elegans*, *L. hartwegii*, *L. caudatus*, *L. sericeus* y *L. nookatensis* (Wink y col., 1995).

De manera general los alcaloides bicíclicos como la lupanina y sus derivados son especialmente abundantes en especies de *Lupinus* del viejo mundo como: *L. luteus*, *L. hispanicus*, *L. consentinii*, *L. digitatus*, *L. pilosus* y *L. princei*. Aunque también se han encontrado en especies del nuevo mundo como *L. albifrons* y *L. bakeri* (Wink y col., 1995). Ligado a esto, otro tipo de AQ como la multiflorina y sus derivados poseen una distribución mas reducida y han sido detectados mediante cromatografía líquida de gas y espectometría de masas, (GLC-MS) en la siguientes especies del viejo mundo: *L. albus*, *L. atlanticus*, *L. consentinii*, *L. micranthus*, *L. palaestinus*, *L. princei* y *L. varius* (Wink y col., 1995).

Sin embargo, los AQ mayoritarios aparecen de manera diversa en las especies de lupinos del viejo mundo. Priddis encontró en 1983 mediante cromatografía de gas en *L. angustifolius*, los siguientes AQ en orden de concentración descendente: la lupanina, la 13-OH-lupanina, la angustifolina y la α -lupanina. Mientras que Muzquiz y colaboradores, en 1989, demostraron (mediante GC) que en especies de *L. luteus* y *L. hispanicus* el alcaloide dominante detectado fue la lupanina. Por su parte, la esparteína fue encontrada solo en algunas variedades y ecotipos de *L. luteus*. Además, los alcaloides epilupanina y gramina (alcaloide del tipo indólico) fueron encontrados en *L. hispanicus*. En *L. albus* se han encontrado: la lupanina, la 13 α -OH-lupanina, la multiflorina, la albina, la angustifolina, entre otros (Wink y col., 1995).

En cuanto al caso de lupinos sudamericanos, dos, *L. albescens* y *L. aureonitens* poseen alcaloides tipo multiflorina y sus derivados. De manera opuesta a los lupinos de Norteamérica que no acumulan estos alcaloides en cantidades substanciales. Alcaloides como la afilina, la 10-oxoesparteína y derivados, pueden presentarse de manera limitada en especies como: *L. argentinus*, *L. caudatus*, *L. cruckshanksii*, *L. holosericeus* y *L. leucophyllus* (Wink y col., 1995). Mientras tanto, dos *Lupinus* de Sudamérica; *L. linearis* y *L. gibertianus* (analizados mediante GLC-MS), comparten perfiles alcaloideos muy similares y presentan como alcaloides mayoritarios: la lupanina y la 13-OH-lupanina (Planchuelo y col., 1993), otro lupino sudamericano *L. albescens*, presentó

(mediante GLC-MS) amodendrina y lupanina como alcaloides mayoritarios (Planchuelo, 1993). Por otro lado el lupino mas importante de América, desde el punto de vista agrícola y cultural (Hondelmann, 1996) en parte porque es el único que ha sido domesticado (Gladstones, 1974), posee una cantidad de ácidos grasos (mayor al 16 % en semillas) superior al promedio de otras especies de *Lupinus* (Rodrigues y Martins, 1990)-*L. mutabilis*, ha mostrado la siguiente composición de alcaloides: (detectados mediante GLC-MS) la esparteina, la lupanina, la α -isolupanina, la 4-OH-lupanina, la 13-OH-lupanina, la angustifolina y la multiflorina, entre los principales (Hatzold y col., 1983).

Respecto a los lupinos nativos de Norteamérica tenemos especies de importancia en la salud animal, ya que han sido relacionados con la enfermedad del becerro encorvado, tal es el caso de *L. caudatus*, *L. sericeus* y *L. nookatensis*. Se ha concluido que la anagrina, un AQ presente en estas especies, es el alcaloide responsable de esta enfermedad, debido a sus propiedades tóxicas y teratogénicas (Panter y Keeler, 1993). Otros alcaloides detectados para estas especies son la esparteina, la lupanina y la 11,12-dehidrolupanina (Wink y col., 1995). En otros lupinos norteamericanos (presentes también en México), como es el caso de *L. elegans* se presentan los siguientes alcaloides mayoritarios; la lupanina, la esparteina, la amodendrina, la 3 β -OH-lupanina, la OH-tetrahidrorhobofilina, la 5,6-dehidrolupanina y la 17 oxoesparteína. Mientras que *L. hartwegii* presentó; la epiafilina, la afilina, la lupanina, la 0,17-dioxoesparteína, la gramina y la 3 β -OH-lupanina como alcaloides principales (Wink y col., 1995).

En 1999, García y colaboradores encontraron en variedades de las especies jaliscienses; *L. stipulatus*, *L. montanus* y *L. mexicanus*, los alcaloides esparteína y lupanina (ver cuadro 15), estos hallazgos concuerdan de manera general con los resultados obtenidos en el presente estudio. En particular, los alcaloides mayoritarios detectados en el presente trabajo en *L. montanus* y *L. exaltatus* coinciden de manera exacta con las determinaciones que realizaron García y colaboradores (1998) en estas mismas especies y que a continuación se describen: *L. exaltatus* presentó como alcaloide mayoritario la lupanina, además de detectarse la esparteína. De manera contraria, *L. montanus* presentó la esparteína como alcaloide mayoritario seguido de la lupanina (en ambos trabajos de García y col. el método utilizado para detección de AQ fue GC) .

Cuadro 15. Concentración de 2 alcaloides detectados en *Lupinus* de Jalisco.

Especie	Lupanina	Esparteína
<i>L. montanus</i>	.04 mg/100 mg	16 mg/100 mg
<i>L. mexicanus</i>	1.28 mg/100 mg	.0018 mg/100 mg
<i>L. stipulatus</i>	.01 mg/100 mg	.0035 mg/100 mg

Fuente: García y col., 1999.

Antes de la administración de los AQ a los organismos, se realizó la técnica de implantación de cánulas vía intracerebroventricular (ICV) con el fin de asegurar la permeabilidad de los alcaloides al tejido cerebral (distribuidos a partir del ventrículo derecho, lugar donde fue instalada la cánula), y así tener una respuesta directa y específica de la acción de cada uno de los extractos alcaloideos en los diversos núcleos y áreas del cerebro de la rata. Pese a las precauciones tomadas para realizar la técnica, este tipo de cirugía puede causar un leve daño en la zona de implante debido a la inserción de la cánula, zona que fue descartada mediante la comparación de los grupos experimentales (M y E) y testigo (T). Aunado a esto, se llevó a cabo una rigurosa verificación del sitio exacto de inserción, mediante dos vías: la primera se realizó por medio de la obtención de las coordenadas del sitio a canular mediante un aparato estereotáxico David-Koppf a partir de las coordenadas obtenidas por Paxinos y Watson en 1982, que son; -1.4 mediolateral, 8.2 anterior a lambda y -4.0 dorsoventral, y corresponden a la ubicación del ventrículo lateral derecho. Mientras que la segunda se realizó mediante comprobación visual directa después de la obtención de los encéfalos en cada uno de los animales.

La sal de cloruro 2,3,5-*trifeniltetrazolium* ha sido utilizada por patólogos para detectar las zonas de infarto en el corazón (Vivaldi y col., 1985; Holmbom y col., 1993), también se ha utilizado para medir el volumen de infarto cerebral, esto debido a que es un indicador histoquímico de la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria (Cole y col., 1990). Para esto se han llevado a cabo

experimentos con ratas, gatos (Liszczak y col., 1984) y primates (Dettmers y col., 1994) utilizando este reactivo. No obstante, algunos autores han encontrado limitantes al uso de esta sal. Liszczak y col. en 1984, encontraron que en ratas y gatos con isquemia producida mediante procedimientos quirúrgicos (oclusión de vasos del cerebro de manera temporal o permanente), la mitocondria estaba intacta, aunque otros organelos como el núcleo hayan sido destruidos.

Es decir, la reacción de CTT no pudo distinguir la situación que presentó la isquemia completa (oclusión permanente), sin embargo, el mismo autor menciona que la sal CTT puede detectar de manera eficiente el daño causado en el cerebro por una oclusión temporal (2.5 horas).

De cualquier manera, estudios mas recientes demuestran que el CTT es un método que permite cuantificar el volumen completo de los infartos cerebrales (causados por la oclusión de la arteria cerebral media) de manera confiable, rápida y conveniente en modelos examinados, por lo menos 24 horas después del daño producido por isquemia (Hatfield y col., 1991), y su reacción, bajo esta circunstancia, es comparable al método de tinción por hematoxilina y eosina (Bederson y col., 1986).

Actualmente la sal de cloruro de *trifeniltetrazolium* ha ganado una amplia aceptación debido a su confiabilidad y rapidez en la investigación de los procesos de cuantificación de zonas de infarto en cerebro o miocardio, además, recientemente esta técnica ha sido adaptada para medir volumen de trauma en

cerebro causado quirúrgicamente debido a un impacto cortical cerebral controlado o a la perfusión de un fluido en el cerebro (Baskaya y col., 2000). A pesar de la diversidad de usos que se le han dado ha este reactivo, no existe información disponible con respecto a la utilización del CTT como marcador de daño en el cerebro causado por alcaloides u otras sustancias químicas tóxicas. Estos antecedentes, además del conocimiento que se tiene sobre el daño causado por AQ en el SNC (Yovo y col., 1984; Pothier y col., 1998; Duke, 1987; Bruneton, 1993), y más específicamente en motoneuronas (Agid y col., 1988), fueron las bases por las que en el presente trabajo se resolvió aplicar el reactivo CTT con el fin de detectar y obtener el volumen de daño en el cerebro provocado por estos alcaloides de los *Lupinus*. Los hallazgos encontrados nos indican que la técnica es confiable para marcar las áreas de cerebro afectadas por los extractos crudos de alcaloides obtenidos de dos especies de *Lupinus*, esto se confirmó mediante la observación de los cortes obtenidos (microscopía clásica) y el cálculo volumétrico que se obtuvo en los cortes testigo y experimentales. Por otro lado, no se presentaron diferencias entre los cortes correspondientes a los grupos M y E. No obstante, la técnica no es definitiva para marcar con precisión el total del volumen afectado, esto en base a las comparaciones realizadas con los tejidos sometidos a la técnica de Nissl y analizados mediante microscopía óptica de luz (ver cuadros 6 a 9), en donde se observaron núcleos afectados de manera severa en zonas correspondientes a regiones del tálamo, hipotálamo, hipocampo, así como a diferentes áreas de la corteza: frontoparietal, sensorial, motora, auditiva, cingulada y estriada, entre las principales, las cuales fueron parcialmente detectadas con carencia de reacción al rojo de *trifeniltetrazolium*. Los resultados obtenidos en el

presente trabajo nos indican que los AQ afectaron la función mitocondrial, aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual ocurrió este daño.

Al someter los cortes cerebrales emparafinados de los diferentes grupos a la tinción de Nissl (violeta de cresilo), la prueba arrojó datos sobre la extensión y características del daño causado por los extractos crudos de alcaloides obtenidos a partir de las dos especies de *Lupinus*, además de corroborar la ausencia de zonas afectadas a consecuencia de la sustancia vehículo (aceite de sésamo) en los cortes del grupo T. Las zonas afectadas por efecto de los extractos alcaloideos presentaron una importante extensión que de manera general se presentó desde el cerebro anterior hasta el cerebelo posterior. Zonas pertenecientes al tálamo, hipotálamo, hipocampo y puente, resultaron especialmente afectados. Además las regiones de la corteza frontal, sensorial, estriada, cingulada y auditiva, también presentaron efectos adversos, al igual que la mayor parte de los lóbulos del cerebelo. Sin embargo, los daños causados difieren en cuanto a áreas y núcleos afectados por el tipo de extracto alcaloideo utilizado (*L. montanus* o *L. exaltatus*), de esta manera tenemos que en cerebro anterior del grupo E, en la ubicación: Interaural 14.2 mm, Bregma 5.2 e Interaural 13.2, Bregma 4.2 se presentó los siguientes núcleos o áreas afectados: núcleo accesorio olfatorio (parte lateral, externa, medial, y ventral), corteza frontal, estratos plexiforme, mitral y granular del bulbo olfatorio, capa ependimal y subependimal, nervio vomeronasal, comisura anterior y taenia tecta. De manera diferente, en el grupo M, los cortes de las mismas coordenadas no presentaron daños.

Cuantificaciones realizadas mediante el analizador de imágenes en las coordenadas; Interaural 3.2, Bregma -5.8, nos revelaron que los tejidos de los grupos M y E, presentaron células con hinchamiento significativo, con respecto al grupo T, en el núcleo de Darkschewitsch, como lo demostró el análisis estadístico. Por otro lado, la medición realizada en núcleos celulares (en este mismo campo) de los tres grupos, reveló que el grupo M tuvo un mayor hinchamiento nuclear, lo cual indica una alteración en la permeabilidad de la membrana nuclear y celular por efecto de los alcaloides.

El mismo tipo de análisis (superficie celular y superficie nuclear), aplicados para el subiculum (coordenadas; Interaural 3.2, Bregma -5.8), nos demuestra que respecto al hinchamiento celular, el grupo M de nuevo resultó ser significativamente mayor a los grupos E y T, siendo estos dos últimos estadísticamente similares. Mientras que la medición de núcleos indicó que los dos grupos M y E tuvieron una superficie nuclear mayor que el grupo T. Estos núcleos fueron elegidos para la cuantificación por la uniformidad del daño que presentaron sus neuronas.

Por otro lado, en el cerebelo y zonas adyacentes también se encontraron diferencias con respecto a la extensión del daño entre los grupos experimentales, de esta manera tenemos que en el grupo E las zonas afectadas tuvieron mayor extensión, llegando hasta las coordenadas, Interaural -4.3, Bregma -13.3, mientras que el grupo M solo abarcó hasta las coordenadas, Interaural -1.8, Bregma -10.8. Los núcleos afectados se presentaron solo en el grupo E y fueron

los siguientes; 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, C1, C2, Cop, I, PFI, PM, PrF, (ver lista de abreviaturas de estructuras cerebrales) y correspondieron a regiones del tracto solitario, cerebelo medial, núcleo del nervio trigemino y núcleo vestibular espinal.

De cualquier manera, pese a las diferencias entre las zonas afectadas citadas con anterioridad, la mayoría de las regiones y núcleos afectados se encuentran presentes en ambos grupos experimentales, se puede concluir que el tejido correspondiente al grupo E, presentó una área de afección mas extensa que el grupo M, sin embargo, este último mostró un daño mas severo (proceso degenerativo celular mas avanzado) en algunas estructuras cerebrales como el subiculum y el núcleo de Darkschewitsch. En ambos casos el daño es severo debido a su extensión y magnitud, provocando trastornos celulares como: hinchamiento celular, deformación de la membrana plasmática, desintegración e hinchamiento del núcleo, compactación de la cromatina, gliosis y basofilia del retículo endoplasmico.

Los resultados referentes a neurotoxicidad, obtenidos en el presente trabajo se pueden entender, mediante el mecanismo de acción que tienen los AQ, ya que por un lado son activos en receptores acetilcolínicos, tanto para muscarina como para nicotina (Schmeller y col., 1994), mientras que por el otro actúan a través de la inhibición de canales de sodio y potasio (Körper y col., 1998). Dando, mediante estas vías, un campo de acción amplio y disperso en el tejido cerebral. De igual forma las desigualdades encontradas entre los tratamientos experimentales, probablemente se deban a diferencias de concentración y contenido de los AQ

presentes en los extractos obtenidos a partir de *L. montanus* y *L. exaltatus* y su afinidad específica a cada uno de los receptores acetilcolinérgicos. Por ejemplo tenemos que la lupanina, el alcaloide mayoritario de *L. exaltatus* es más afin al receptor nicotínico, opuestamente a la esparteína, el alcaloide principal de *L. montanus* el cual es más afin al receptor muscarínico (Schmeller y col., 1994), además que es considerado de mayor toxicidad que la lupanina (Pothier y col., 1998).

De esta manera los hallazgos encontrados en el presente trabajo concuerdan con los de Schmeller y col. (1994) donde se encontraron núcleos y regiones afectados correspondientes a la distribución de las vías colinérgicas como son: el núcleo basal de Meynert (B), zonas del tálamo, lobullos del cerebelo, núcleos vestibulares (Brailowsky, 1995), sustancia inominata (SI), comisura anterior, globus palidus (GP), caudado putamen (CPu), cápsula interna (ic), núcleo septal medial (MS), zonas del hipocampo, fornix (f), cingulo (cg), cápsula externa (ec) y algunas zonas de la corteza (Martin, 1998), entre las más destacadas.

Aunque cabe hacer el señalamiento que fueron encontradas otras zonas no identificadas como colinérgicas, que pudieron ser afectadas en su permeabilidad membranal a través de los canales iónicos de sodio y potasio, y así provocar el hinchamiento celular observado.

Además, la literatura existente relativa a los efectos causados por los alcaloides de *Lupinus* en el sistema nervioso, es coherente con los hallazgos encontrados en el presente trabajo. Así Schmitt (1980), Lechat (1978), Cohen (1981), Piéri y Kirkiacharian (1986), describieron los efectos de la esparteína en el sistema nervioso autónomo, al actuar ésta mediante receptores muscarínicos y bloqueo ganglionar.

De manera paralela, varios autores han descrito los efectos de AQ en el sistema nervioso central, los que concuerdan de manera general con los resultados del presente trabajo. Agid y colaboradores en 1988, encontraron que los alcaloides de *Lupinus* pueden causar daño en motoneuronas, provocando un mecanismo de acción similar al postulado para la enfermedad de Parkinson (Agid y Blin, 1987).

Otros efectos clínicos reportados de los AQ son: depresión (Schmitt, 1980; Piéri y Kirkiacharian, 1986), estimulación de la musculatura uterina (Lechat, 1978; Cohen, 1981; Piéri y Kirkiacharian, 1986), diuresis y anestesia local (Schmitt, 1980; Cohen, 1981), además de disminuir la actividad locomotora y psicomotora, y actuar como analgésico (Pothier y col., 1988).

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

Agid, Y. y Blin, J. (1987) Nerve cell death in degenerative diseases of the central nervous system. *J. Selective neuronal death*. Vol. 1 pp.13-19

Agid, Y., Pertuiset., B. Dubois.(1988) Motoneuron disease as manifestation of lupin seed toxicity. *Lancet*. Vol. 1 p. 1347.

Árias, G., García, L., Ruíz, L., Bañuelos, P., Ascencio, M. (1999) Fungizide wirkung von alkaloidextrakten aus mexikanischen Lupinen. Memorias del noveno congreso internacional de Lupinus del 20 al 24 de Junio 1999. Klink Müriz. Alemania.

Baer, Von D., Hartmut R.E. and Feldheim W. (1979) Methoden zur bestimmung der chinolizidinalkaloide in *Lupinus mutabilis*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* Vol.169 pp. 27-31.

Baskaya, M.K., Dogan, A., Temiz, C., Dempsey, R.J. (2000) Application of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to evaluate injury volume after controlled cortical impact brain injury: role of brain edema in evolution of injury volume. *J. of Neurotrauma*. Vol.1 pp. 93-99.

Bederson, J.B., Pitts, L.H., Germano, S.M., Nishimura, M.C., Davis, R.L., Bartkowski, H.M. (1986) Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *J. Stroke*. Vol.6 pp. 1304-1308.

Bednar, M.M., Fanburg, J.C., Anderson, M.L., Raymond, S.J., Dooley, R.H., Gross, C.E. (1994) Comparison of triphenyltetrazolium dye with light microscopic evaluation in a rabbit model of acute cerebral ischaemia. *J. Neurol. Res.* Vol. 2 pp. 129-132.

Bednarczyk, M., Karasinki, D., Mazanowski, A., Gulewicz, K. (1987) Preliminary observations on the influence of alkaloids present in the seed extract of lupine (*L. angustifolius*) on the embryo-genesis and selected physiological indicators of duck embryonic blood. *Arch. Geflügelk.* Vol.51 pp. 185-189.

Bellido, L.L. y García, F.M. (1991) El Altramuz. Ed. Ministerio de agricultura pesca y alimentación. Córdoba. España. pp. 50-75.

Blagrove, R.J. y Gillespie, J.M. (1975) Isolation, purification and characterisation of the seed globulins of *Lupinus angustifolius*. *Australian J. Of Plant Physiology*. Vol.2 pp. 13-27.

Bruneton, J. (1993) Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Ed. Lavoisier-Tec et Doc. Paris. Francia. pp. 688-689.

Cohen, Y. (1981) Abrégé de pharmacologie. Ed. Masson. Paris. Francia. pp. 217-218.

Cole, D.J., Drummond, J.C., Ghazal, E.A. Shapiro, H.M. (1990) A reversible component of cerebral injury as identified by the histochemical stain 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). *Acta Neuropathol.* Vol. 2 pp.152- 155.

Cowling, W.A. (1984) Report of a Mission to Collect Wild *Lupinus* in Greece. Department of Agriculture, Western Australia. *Perth.* Vol. 3 p.14.

Gladstones, J.S. (1974) The mediterranean white lupin. Department of Agriculture, Western Australia. *Tech. Bull.* Vol. 26 pp. 70-74.

Dettmers, C., Hartmann, A., Rommel, T., Kramer, S., Pappata, S., Young, A., Hartmann, S., Zierz, S., MacKenzie, E.T., Baron, J.C. (1994) Inmersion and perfusion staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) compared to mitochondrial enzymes 6 hours after MCA-occlusion in primates. *Neurol. Res.* Vol. 3 pp. 205-208.

Dominguez, X.A. (1973) Metodos de investigación fitoquímica. Ed. Centro Regional de Ayuda Técnica. Agencia para el Desarrollo Internacional. Buenos Aires. Argentina. pp. 211-227

Duke, J.A. (1987) Handbook of medicinal herbs. Ed.CRC Press. Boca Raton. Florida. Estados Unidos de América. p. 155.

Dunn, D.B., (1984) Genetic resources, cytotaxonomy and distribution of New World lupin species. Proceedings of the Third International Lupin Conference, International Lupin Association. La Rochelle. Francia. pp. 68-85.

Estrada, F., Peralta, Z., Rivas, M., (1982) Manual de técnicas histológicas. Ed. AGT EDITOR, S.A. México D.F. pp. 97-100.

García, L.P.M., Muzquiz, M., Zamora, N.J.F., Burbano, C., Pedrosa, M.M., Cuadrado, C. (1999) Content of lupanine and sparteine of several wild Mexican lupins. Memorias del noveno congreso internacional de *Lupinus* del 20 al 24 de Junio 1999. Klink Müritz. Alemania.

García, L.P.M., Muzquiz, M., Ruiz, L.M.A., Zamora, N.J.F., Bañuelos, P.J., Ruiz, M.J. (1998) Determinación de alcaloides en semillas de tres especies de *Lupinus* silvestres del estado de Jalisco, Mexico. Memorias del VII congreso Latinoamericano de botánica. Y XIV congreso Mexicano de botánica. Del 18 al 24 de Octubre de 1998. Ciudad de México. México.

Goldlust, J., Paczynki, P., Yong, Y., Chung, Y., Goldberg, P. (1996) Automated measurement of infarct size with scanned images of Triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. *J. Stroke*. Vol. 9. pp. 1657-1661.

Golebiewski, M. y Spenser, D. (1988) Biosynthesis of the lupine alkaloids. II. Sparteine and lupanine. *Canadian J. of chemistry*. Vol. 66. pp.1734-1748.

Gross, R. (1990) Nutrients and anti-nutrient substances in lupins for human consumption. Ed. In Birk, Y., Douart, A., Waldman, M. And Uzureau, C. Proceedings of the Joint CEC-NCRD Workshop, *Israel*. pp. 164-176.

Gross, R. y Baer, E. (1977) Posibilidades del *Lupinus mutabilis* y *Lupinus albus* en los países andinos. *Arch.Latinoam.Nutr.* Vol. 2. pp. 451-467.

Haq, N. (1993) Underutilized crops. Pulses and vegetables. Ed. J.T. Williams. Published by Chapman & Hall. London. Reino Unido. pp. 77-90.

Hatfield, R.H., Mendelow, A.D. Perry, R.H., Alvarez, L.M., Modha, P. (1991) Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as a marker for ischaemic changes in rat brain following permanent middle cerebral artery occlusion. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* Vol. 1 pp. 61-67.

Hatzold, T., Elmadfa, I., Gross, R., Wink, M., Hartmann, T., Witte, L. (1983) Quinolizidine alkaloids in seeds of *Lupinus mutabilis*. *J. Agric. Food. Chem.* Vol. 31 pp. 934-938.

Holmbom, B., Naslund, U., Eriksson, A., Virtanen, I., Thornell, L.E. (1993) Comparison of triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining versus detection of fibronectin in experimental myocardial infarction. *J. of Histochemistry.* Vol. 4 pp. 265-275.

Hondelmann, W. (1996) Die Lupine: Geschichte und Evolution einer Kulturpflanze. Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL). *Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft.* Vol. 1. pp. 162-247.

Hultin, E. y Torssell, K. (1965) Alkaloid-sreening of Swedish plants. *J. Phytochemistry.* Vol. 4 pp. 425-433.

Isamaya, K., Pitts, L.H., Nishimura, M.C. (1991) Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarcts. *J. Stroke.* Vol. 11 pp. 1394-1398.

Ito, W.D., Schaarschmidt, S., Klask, R., Hansen, S., Schafer, H.J., Mathey, D., Bhakdi, S. (1997) Infarct size measurement by triphenyltetrazolium chloride staining versus in vivo injection of propidium iodide. *J. Mol. Cell. Cardiol.* Vol. 8 pp. 2169-2175.

Jambrina, A.J. (1980) Introducción al cultivo de *Lupinus* (Altramuz). Ed. comunicaciones I.N.I.A. *Serie de producción vegetal*. No.26 p.18. Madrid. España.

Keeler, R.F. (1973,I) Lupin alkaloids from teratogenic and nonteratogenic lupines. I-Correlation of crooked calf disease incidence with alkaloid distribution determined by gas chromatography. *Teratology*. Vol. 7 pp. 23-30.

Keeler, R.F. (1973,II) Lupin alkaloids from teratogenic and nonteratogenic lupines. II-Identification of the major alkaloids by tandem gas chromatography-mass spectrometry in plants producing crooked calf disease. *Teratology*. Vol. 7 pp. 31-36.

Keeler, R.F., Cronin, H. (1975) Lupin alkaloids from teratogenic and nonteratogenic lupines. IV-Concentration of total alkaloids, individual major alkaloids, and the teratogen anagrine as a function of plant part and stage of growth and their relationship to crooked calf disease. *J. Toxicol. Environ. Healt.* Vol. 1 pp. 899-908.

Keeler, R.F. (1976) Lupin alkaloids from teratogenic and nonteratogenic lupines. Identification of anagrine as the probable teratogen by feedig trials. *J. Toxicol. Environ. Healt.* Vol.1 pp. 887-1976.

Kinghorn, A.D., Balandrin, M.F. (1984) Quinolizidine alkaloids of the Leguminosae: Structural types, analysis, chemotaxonomy, and biological activities, in: *Alkaloids:*

Chemical and Biological Perspectives Ed. S.W. Pelletier. Wiley, New York. Estados Unidos de América. Vol. 2. pp. 105-148.

Körper, S., Wink, M., Fink, H.A. (1998) Differential effects of alkaloids on sodium currents of isolated single skeletal muscle fibers. *FEBS Letters* Vol. 436 pp. 251-255.

Lechat, P., (1978) *Pharmacologie Médicale*. Ed. Masson. Paris. Francia. p. 570.

Liszcak, T.M., Hedley-Whyte, E.T., Adams, J.F., Han, D.H., Kolluri, V.S., Vacanti, F.X., Heros, R.C., Zervas, N.T. (1984) Limitations of triphenyltetrazolium salts in delineating infarcted brain. *Acta Neuropathol.* Vol. 2 pp. 150-157.

Lopez-Bellido, L. y Fuentes, M. (1986) Lupin crop as an alternative source of protein. *Advances in agronomy*. Vol. 40 pp. 239-295.

McVaugh, R. (1987) *Flora novogaliciana. Leguminosae. A descriptive account of the vascular plants of western Mexico*. Ed. Ann Arbor The University of Michigan Press. Estados Unidos de América. Vol. 5. pp. 567-569.

Mukisirat, A.E., Phillip, E.L., Mitaru, N.B. (1995) The effect of feeding diets containing intact or partially detoxified lupin on voluntary intake and milk production by Friesian dairy cows. *J. Animal Science*. Vol. 60 pp. 169-175.

Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., De la Cuadra, C. (1993) Determinación de factores antinutritivos termorresistentes en leguminosas.I: Alcaloides. En Inves. Agr. Prod. Prot. Veg. Ed.V.A impresores. Madrid. España. Vol.8 (3) pp. 350-361.

Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Gorospe, M., Ródenas, I. (1989) A chemical study of *Lupinus hispanicus* seed-toxic and antinutritional components. *J. Sci. Food Agric.* Vol. 47 pp. 205-213.

Muzquiz, M., Cuadra, C., Cuadrado, C., Burbano, C., Calvo, R. (1994) Herbicide-like effect of *Lupinus* alkaloids. *J. Industrial Crops and Products.* Vol. 2 pp. 273-280.

Muzquiz, M., Ródenas, I., Villaverde, J., Casinello, M. (1982) Valoración cuantitativa de alcaloides en semillas del género *Lupinus* (L.). En : L. López - Bellido , M. Fuentes and D.A. Milne , Actas II Conf. Int. Lupino, May 1982, Torremolinos. España. pp. 196-206.

Panter, E. y Keeler, R.F. (1993) Qinolizidine and piperidine alkaloid teratogens from poisonous plants and their mechanism of action in animals. *J. Congenital Abnormal.* Vol. 9 pp. 33-40.

Park, C.K., Mendelow, A.D., Graham, D.I., McCulloch, J., Teasdale, G.M. (1988) Correlation of triphenyltetrazolium chloride perfusion staining with conventional neurohistology in the detection of early brain ischaemia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* Vol. 4 pp. 289-298.

Pastuszewska, B., Jach, K., Perkowski, W. (1988) The effect of lupin alkaloids on growth performance of rats and chicken. En el first international Workshop in legume seeds. Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. 23-25 de Nov de 1998. pp. 202-205.

Paxinos G. y Watson, C. (1982) The rat brain in stereotaxic coordinates. Ed. Academic press. Australia. pp. 9-60.

Petterson, D.S., Ellis, Z.L., Harris, D.J., Spadek, Z.E. (1987) Acute toxicity of the major alkaloids of cultivated *Lupinus angustifolius* seed to rats. *J. Appl. Toxicol.* Vol. 7 pp. 51-53.

Piéri, F. y Kirkiacharian, S. (1986) Pharmacologie et therapeutique. Ed. Ellipses. Paris. Francia. p.185.

Planchuelo-Ravelo, A.M. (1993) Alkaloid composition of *Lupinus albescens* (Fabaceae) from South América. *Z. Naturforsch.* Vol. 48c pp. 414-416.

Planchuelo-Ravelo, A.M., Witte, L., Wink, M. (1993) Quinolizidine alkaloid profiles of South American lupins: *Lupinus linearis* and the *Lupinus gibertianus* complex. *Z. Naturforsch.* Vol. 48c pp. 702-706.

Pothier, J., Cheav, L., Galand, N., Viel, C. (1998) A comparative study of the effects of sparteine, lupanine and lupin extract on the central nervous system of the mouse. *J. Pharm. Pharmacology.* Vol. 50. pp. 949-954.

Priddis, C.R. (1983) Capillary gas chromatography of lupin alkaloids. *J. Of Chromatography.* Vol. 261 pp. 95-101.

Putnam, D.H. (1991) An interdisciplinary approach to the development of lupin as an alternative crop. In: Proceedings of the Second National Symposium of New Crops, exploration, research and comercialization. Ed. Janick J. and Simon J.E. Purdue University. Indianapolis, Indiana. Estados Unidos de América. pp. 117-120.

Roberts, F. y Wink, M. (1998) Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications. Ed. Plenum Press, New York. Estados Unidos de América. pp. 32-453.

Rodrigues, P.M., Martins, J.M. (1990) *L. mutabilis* evaluation in Portugal. Memorias del sexto congreso internacional de Lupinus del 25 al 30 de Noviembre 1990. Temuco-Pucon. Chile. p. 9.

Ruiz, L.M.A. (1994) Disponibilidad nutricional de tres especies silvestres de *Lupinus* (Leguminosae) del estado de Jalisco. Tesis de maestría en ciencias de la nutrición animal. Universidad de Guadalajara. México. pp. 34-91

Ruiz, L.P. (1997) A rapid screening test for lupine alkaloid. *N.Z. Agric. Res.* Vol. 20 pp. 51-52.

Ruiz, M.J.J. (1995) Composición química y determinación de alcaloides en tres especies silvestres de *Lupinus L.* (Leguminosae) de Jalisco. Tesis profesional para obtener el título de ingeniero agrónomo. Universidad de Guadalajara. México. pp. 23-45.

Ruiz, M., García, P., Castañeda, H., Zamora, F., Garzón, P., Bañuelos, P., Burbano, C., Pedrosa, M., Cuadrado, C., Muzquiz, M. (2000) Chemical Composition and Antinutrient Content of three *Lupinus* species from Jalisco, México. *Journal of food composition and analysis*. Vol. 13 (En prensa).

Rzedowski, J. y Calderón R. G. (1979) Flora Fanerogámica del valle de México. Vol. I. Ed. C.E.C.S.A. pp. 326-338. México.

Salatino, A. y Gottlieb, O.R., (1980) Quinolizidine alkaloids as systematic markers of the Papilionideae. *Biochem.Syst.Ecol.* Vol. 8 pp. 133-147.

Schmeller, T., Sauerwein M., Sporer F., Wink M. (1994) Binding of quinolizidine alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *Journal of Natural Products*. Vol. 9 pp. 1316-1319.

Schmeller, T., Wink, M., (1988) *The Alkaloids*. Ed. Plenum Press. New York. Estados Unidos de América. pp. 305-319.

Schmitt, H. (1980) *Eléments de pharmacologie*. Ed. Flammarion. Paris. Francia. p. 356.

Takhtajan, A. (1987) *Systema magnoliophytorum*. Officina editora <Nauka>. Sectio Leninopolitana. Leninopoli., Rusia. pp.28-32.

Tyski, S., Markiewicz, M., Gulewicz, K., Twardowski, T. (1998) The effect of lupin alkaloids and ethanol extracts from seeds of *Lupinus angustifolius* on selected bacterial strains. *J. Plant Physiol*. Vol. 133 pp. 240-242.

Troll, H.-J. (1964) Cultivation, breeding and seed problems in large seeded legumes as contribution to the remedy of protein fodder-deficiency in particular in reference to cultivation – competition between lupins and field peas. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Karl-Marx-Universität*. Vol. 13 pp. 651-663.

Uauy, R., Gattas, V., Yañez, E. (1995) Sweet lupins in human nutrition. En Simopoulos, A.M. (ed.) *World Review of Nutrition and Dietetics* Vol. 77 pp. 75-88.

Vivaldi, M., Kloner, R., Schoen, F. (1985) Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *American J. of pathology*. Vol. 121 pp. 522-530

Warren, J., Allen, J.G., Cowling, W.A. (1989) Economic impact of growing Phomopsis-resistant lupins. *J. Agriculture Western Australia*. (4th Series) Vol. 30 pp. 8-10.

Wink, M. (1985) Metabolism of quinolizidine alkaloids in plants and cell suspension cultures, en: Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Ed. Reinhard, E. Spinger. Heidelberg. Alemania. pp. 107-116.

Wink, M. (1987) Chemical ecology of quinolizidine alkaloids. *ACS Symp. Ser.* Vol. 330 pp. 524-533.

Wink, M. (1988) Plant breeding: Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.* Vol. 75 pp. 225-233.

Wink, M. (1992a) Role of quinolizidine alkaloids in plant-insect interactions. *Focus and insect plant interactions*. Vol. 4. pp. 131-166.

Wink, M. (1992b) *Lupinus mutabilis*: Composition and potential applications of quinolizidine alkaloids. En: Agrimed Res. Programme: *Lupinus mutabilis*: its adaptation and production under European pedoclimatic conditions. Ed. EUR Vol. 14102 pp. 47-62.

Wink, M., (1993) In: Methods of Plant Biochemistry. Ed. *Academic Press*. Boca Ratón. Estados Unidos de América. Vol. 8 pp. 197-239.

Wink, M. (1993a) Allelochemical properties and the raison detre of alkalids. En: The Alkaloids. Ed. G Cordell. Alemania. Vol. 43 pp. 1-117.

Wink, M. (1993b) Quinolizidine alkaloids. In Methods in plant biochemistry. Ed. *Academic press*. Alemania. Vol. 8 pp. 197-239.

Wink, M. y Hartmann, T. (1982) Localization of the enzymes of quinolizidine alkaloid biosynthesis in leaf chloroplasts of *Lupinus polyphyllus*. *Plant Physiol*. Vol. 70 pp.74-77.

Wink, M., Meibner, C., Witte, L. (1995) Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry*. Vol. 38 pp.139-153.

Wink, M. y Witte, L., (1985) Quinolizidine alkaloids as nitrogen source for lupin seedlings and cell cultures. *Z. Naturforsch*. Vol. 40 pp. 767-775.

Wink, M. y Witte, L., (1991) Storage of quinolizidine alkaloids in *Macrosiphum albifrons* and *Aphis genistaea* (Homoptera: Aphididae). *Entomol. Gener.* Vol. 15 pp. 237-254.

Wink, M. y Römer, P., (1986) Acquired toxicity- The advantages of specializing on alkaloid-rich lupins to *Macrosiphum albifrons* (Aphidae). *Naturwissenschaften* Vol. 73 pp. 210-212.

Yovo, K.S (1982) Thèse Doct. 3ème cycle. Ed. Pharmacochimie pp. 47-58.

Yovo, K.S., Huguet, F., Pothier, J., Durand, M., Breteau, M., Narcisse, G. (1984) Comparative pharmacological study of sparteine and its ketonic derivate lupanine from seeds of *Lupinus albus*. *Planta Medica*. Vol. 50. pp. 420-424.

ANEXO 1

Lista General de Abreviaturas	
ACh	Receptores acetilcolínicos
AQ	Alcaloides quinolizidinícos
BYMB	Bean Yellow Mosaic Virus
CMV	Cucumber Mosaic Virus
CTT	Sal de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium
Grupo M, E ó T	Grupo de organismos tratados con alcaloides de <i>L. montanus</i> , <i>L. exaltatus</i> o aceite de sésamo respectivamente
ICV	Técnica de implantación de cánulas vía intracerebroventricular
GLC	Cromatografía líquida de gas
M	Molaridad
mACh	Receptores muscarínicos para acetilcolina
MS	Espectrometría de masas
msnm	Metros sobre el nivel del mar
nACh	Receptores nicotínicos para acetilcolina
SNC	Sistema Nervioso Central
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolaridad
µm	Micrometros

ANEXO 2

Lista de Abreviaturas de Estructuras Cerebrales.

1 a 10 Los diez lóbulos del cerebelo.	LV Ventrículo lateral.
12n Raíz del nervio hipoglo.	LVe Núcleo vestibular lateral.
3n Raíz del nervio oculomotor.	m5 Raíz motora del nervio trigeminal.
4n Raíz del nervio troclear.	mcp Pedúnculo cerebelar medial.
4v Cuarto ventrículo.	mch Tracto corticohipotalámico medial.
7n Raíz del nervio facial.	MD Núcleo talámico mediodorsal.
8n Nervio vestibulococlear	MDL Núcleo talámico mediodorsal, parte lateral.
A5 Núcleo accesorio trigeminal.	Me Núcleo amigdalóide medial.
AA Área anterior amigdalóide.	ME Eminencia media.
AC Núcleo de la comisura anterior.	me5 Tracto mesencefálico del nervio trigeminal.
ac Comisura anterior.	Me5 Núcleo del tracto mesencefálico del nervio trigeminal.
aca Parte anterior de la comisura anterior	mfb Haz medial del cerebro anterior.
Acb Núcleo Accumbens.	MG Núcleo geniculado medial.
ACg Corteza cingulada anterior.	MGD Núcleo geniculado medial, parte dorsal.
aci Parte intrabulbar de la comisura anterior.	MGM Núcleo geniculado medial, parte medial.
ACo Núcleo amigdalóide cortical anterior.	MGV Núcleo geniculado medial, parte ventral.
acp Parte posterior de la comisura anterior.	MHb Núcleo habenuar medial.
AD Núcleo talámico anterodorsal.	Mi Estrato celular mitral del bulbo olfatorio.
AF Fisura amigdalóide.	MiA Estrato celular mitral del bulbo olfatorio accesorio.
Agran Región agranular de la corteza frontoparietal, área motora.	ML Núcleo mamilar medial, parte lateral.
AHi Área amigdalohipocampal.	ml Lemnisco medial.
AHy Área anterior hipotalámica.	mlf Fascículo longitudinal medial.
al ansa lenticularis	MM Núcleo mamilar medial, parte medial.
alv alveus del hipocampo	

AM Núcleo talámico anteromedial.	MMn Núcleo mamilar medial, parte media.
AOB Bulbo olfatorio accesorio.	MnR Núcleo medio del rafe.
AOD Parte dorsal del núcleo anterior olfatorio.	Mo5 Núcleo trigeminal motor.
AOE Parte externa del núcleo anterior olfatorio.	MP Núcleo mamilar medial, parte posterior.
AOL Parte lateral del núcleo anterior olfatorio.	mp Pedúnculo mamilar.
AOM Parte medial del núcleo anterior olfatorio.	MPO Área preóptica media.
AOP Parte posterior del núcleo anterior olfatorio.	MRe Seno mamilar del tercer ventrículo.
AOV Parte ventral del núcleo anterior olfatorio.	MS Núcleo septal medial.
APT Área pretectal anterior.	MSO Oliva superior medial.
APTD Parte dorsal del área pretectal anterior.	MT Núcleo terminal medial del tracto óptico accesorio.
APTV Parte ventral del área pretectal anterior.	mt Tracto mamilotalámico.
Arc Núcleo hipotalámico arcuato.	mtg Tracto mamilotegmental.
AV Núcleo talámico anteroventral.	MTz Núcleo medial del cuerpo trapezoide.
B Células del núcleo basal de Meynert.	MVe Núcleo vestibular medial.
BAC Lecho del núcleo de la comisura anterior.	OBI Filo exterior del giro dentado.
BAOT Lecho del núcleo del tracto accesorio olfatorio.	ocb Haz olivococlear.
bas Arteria basilar.	Op Estrato del nervio óptico del colículo superior.
bic Núcleo del brachium del colículo inferior.	OPT Núcleo pretectal olivar.
BL Núcleo amigdalóide basolateral.	opt Tracto óptico.
BLV Parte ventral del núcleo amigdalóide basolateral.	Or Estrato oriens del hipocampo.
bp Brachium pontis.	OT Núcleo del tracto hipotalámico.
bsc Brachium del colículo superior.	Pa Núcleo hipotalámico paraventricular.
BST Lecho del núcleo de la estria terminal.	PaMC Núcleo hipotalámico paraventricular, parte magnocefalar.
BSTL Parte lateral del lecho del núcleo de la estria terminal.	PaPC Núcleo hipotalámico paraventricular, parte parvocefalar.
BSTM Parte medial del lecho del núcleo de la	

estria terminal.	PaS parasubiculum.
BSTPO Parte preóptica del lecho del núcleo de la estria terminal.	PBg Núcleo parabigesimal.
C1 Crus 1 del lóbulo ansiforme.	PBP Núcleo pigmentado parabracteal.
C2 Crus 2 del lóbulo ansiforme.	PC Núcleo talámico paracentral.
CA1 campo CA1 del cuerno de Ammon.	pc Comisura posterior.
CA2 campo CA2 del cuerno de Ammon.	PCg Corteza cingulada posterior.
CA3 campo CA3 del cuerno de Ammon.	PCRt Núcleo reticular parvocelular.
CA4 campo CA4 del cuerno de Ammon.	Pe Núcleo hipotalámico pariventricular.
CB Puente celular entre el caudado putamen y el tubérculo olfatorio.	PeF Núcleo hipotalámico perifornical.
Cb Cerebelo.	PF Núcleo talámico parafascicular.
CC Canal central.	PFI Paraflóculo.
cc Cuerpo caloso.	PGi Núcleo reticular paragigantocelular.
Ce Núcleo central amigdalóide.	PH Núcleo hipotalámico posterior.
CeL Parte lateral del Núcleo central amigdalóide.	PLCo Núcleo amigdalóide cortical posterolateral.
CeM Parte medial del Núcleo central amigdalóide.	PM Lóbulo paramedio.
CG Área gris central.	PMCo Núcleo amigdalóide cortical posteromedial.
cg Cíngulo.	PMD Núcleo premamilar, parte dorsal.
CGD Parte dorsal del área gris central.	PMV Núcleo premamilar, parte ventral.
CGM Parte medial del área gris central.	PN Núcleo paranigral.
CGPn Área gris central del pons.	Pn Núcleo pontino.
cic Comisura del colículo inferior.	PnC Núcleo reticular pontino, parte caudal.
CICDM Parte dorsomedial del núcleo central del colículo inferior.	PnO Núcleo reticular pontino, parte oral.
CICVL Parte ventrolateral del núcleo central del	PO Corteza primaria olfatoria.
	Po Grupo nuclear talámico posterior.
	PP Núcleo peripeduncular.
	PPT Núcleo pretectal posterior.
	PPTg Núcleo tegmental pedunculo pontino.

coliculus inferior.	PR Campo prerubral.
CL Núcleo talámico centrolateral.	Pr5 Núcleo trigeminal principal sensorial.
Cl Claustrum.	PrF Fisura primaria.
CLi Núcleo lineal caudal del rafe.	PrH Núcleo hipoglo prepositus.
CM Núcleo talámico medial central.	PrS presubiculum.
CMC Núcleo magnocelular caudal del hipotálamo.	PSCh Núcleo preóptico supraquiasmático.
Cnf Núcleo cuneiforme.	PT Núcleo talámico paratenial.
Cop Copula del pyramis.	PV Núcleo talámico paraventricular.
cp Parte basal del pedúnculo cerebral.	PVA Núcleo talámico paraventricular, parte anterior.
CPu Caudado putamen.	PVP Núcleo talámico paraventricular, parte posterior.
csc Comisura del coliculus superior.	Py Estrato celular piramidal del hipocampo.
CxA Zona de transición de la corteza de la amígdala.	py Tracto piramidal.
DA Área dorsal hipotalámica.	R Núcleo rojo.
DCo Núcleo coclear dorsal.	Rad Stratum radiatum del hipocampo.
df Fornix dorsal.	RCh Área retroquiasmática.
DG Giro dentado.	Re Núcleo talámico reuniens.
DHC Núcleo de la comisura hipocampal dorsal.	RF Fisura rinal.
dhc Comisura hipocampal dorsal.	Rh Núcleo talámico romboide.
Dk Núcleo Darkschewitsch.	RLi Núcleo lineal rostral del rafe.
DLG Núcleo geniculado lateral dorsal	RMC Núcleo rojo, parte magnocelular.
DLL Núcleo dorsal del lemnisco lateral.	RMg Núcleo raphe magnus.
DM Núcleo hipotalámico dorsomedial.	Rpa Núcleo raphe pallidus.
DMC Parte compacta del núcleo hipotalámico dorsomedial.	RPC Núcleo rojo, parte parvocelular.
DPB Núcleo parabraceal dorsal.	RPn Núcleo pontis raphe.
DpG Estrato gris profundo del coliculus superior.	RR Núcleo retrorubral.
	RRF Campo retrorubral.

DpMe Núcleo mesencefálico profundo.	rs Tracto rubroespinal.
DpWh Estrato blanco profundo del colículo superior.	RSpl Corteza retroespinal.
DR Núcleo del rafe dorsal.	Rt Núcleo talámico.
Dsc Lámina dissecans de la corteza entorinal.	RtTg Núcleo reticulotegmental del pons.
DTg Núcleo tegmental dorsal.	S Subiculum.
dtgx Decusación tegmental dorsal.	s5 Raíz sensorial del nervio trigeminal.
ec Cápsula externa.	SC Colículo superior.
EIC Núcleo externo del colliculus inferior.	scc Splenium del cuerpo caloso.
eml Lamina medular externa.	SCO Órgano subcomisural.
En Núcleo endopiriforme.	scp Pedúnculo cerebelar superior.
Ent Corteza entorinal.	SCh Núcleo supraquiasmático.
EP Núcleo entopeduncular.	SFi Núcleo septofimbrial.
EPI Estrato plexiforme externo del bulbo olfatorio.	SFO Órgano subfornical.
EW Núcleo oculomotor accesorio.	SG Núcleo talámico supragenículado.
F Núcleo del campo de Forel.	SGe Núcleo supragenículado del pons.
f Fornix.	SHi Núcleo septohipocámpal.
FC Fascicula cinereum.	SHy Núcleo septohipotalámico.
FF Campo de Forel.	SI Substancia innominata.
fi Fimbria del hipocampo.	Sim Lóbulo simple.
FI Floculo.	sm Estría medular del tálamo.
fmi Forceps menor del cuerpo caloso.	SMT Núcleo submamilotalámico.
fmj Forceps mayor del cuerpo caloso.	smv Velum medular superior.
Fr Corteza frontal.	SNC Substancia nigra, parte compacta.
fr Fascículo retroflexus.	SNL Substancia nigra, parte lateral.
FrPaM Corteza frontoparietal, área motora.	SNR Substancia nigra, parte reticular.
FrPaSS Corteza frontoparietal, área	SO Núcleo hipotalámico supraóptico.
	SOI Oliva Superior .
	SOR Núcleo hipotalámico supraóptico, parte

somatosensorial.	retroquiasmatica.
FStr Fundus striati.	sox Decusación supraóptica.
G Núcleo gelatinoso del tálamo.	sp5 Tracto espinal del nervio trigeminal.
g7 Genu del nervio facial.	Sp5C Núcleo del tracto espinal del nervio trigeminal, parte caudal.
Gem Gemini nuclei.	Sp5O Núcleo del tracto espinal del nervio trigeminal, parte oral.
Gi Núcleo reticular giganteocelular.	SPF Núcleo talámico subparafascicular.
GP Globus Pallidus	st Stria terminalis.
GrA Estrato granulado celular del bulbo olfatorio accesorio.	STh Núcleo subtalámico.
GrCo Estrato granulado celular del núcleo coclear.	str Radiación talámica superior.
GrDG Estrato granulado del giro dentado.	Str17 Corteza estriada, área 17.
hbc Comisura habenuar.	Str18 Corteza estriada, área 18
HDB Núcleo del limbo horizontal de la banda diagonal.	Str18a Corteza estriada, área 18a
HiF Fisura hipocampal.	Su7 Núcleo suprafacial.
HiI Hilus del giro dentado.	SubC Núcleo subcoeruleus.
I Núcleo intercalado de la amígdala.	SuG Estrato gris superficial del colliculus superior.
IAM Núcleo talámico interanteromedial.	Sum Núcleo supramamilar.
IBI Filo interno del giro dentado.	sumx Decusación supramamilar.
IC Colliculus inferior.	SuVe Núcleo vestibular superior.
ic Cápsula interna.	Te Corteza temporal.
iCj Isla de Calleja.	TeAud Corteza temporal área auditiva.
ICjM Islas de Calleja, Isla mayor.	tfp Fibras transversas del pons.
icp Pedúnculo cerebelar inferior.	TMC Núcleo hipotalámico magnocelular tuberal.
ICPC Núcleo intracomisural de la comisura posterior.	TS Núcleo septal triangular.
IF Núcleo interfascicular.	ts Tracto tectoespinal.
	TT Taenia tecta.

IG Indesum griseum.	Tu Tubérculo olfatorio.
IMCPC Núcleo magnocelular intersticial de la comisura posterior.	TuPI Tubérculo olfatorio, estrato plexiforme.
IMD Núcleo talámico intermediodorsal.	tz Cuerpo trapezoide.
imí Lámina medular interna.	VCo Núcleo ventral coclear.
InC Núcleo intersticial de Cajal.	VCoA Núcleo ventral coclear, parte anterior.
InfS Tronco infundibular.	VDB Núcleo del limbo vertical de la banda diagonal.
InG Estrato gris intermedio del colliculus superior.	VDBD Núcleo del limbo vertical de la banda diagonal parte dorsal.
Int Núcleo cerebelar interpositus.	VDBV Núcleo del limbo vertical de la banda diagonal parte ventral.
IntG Núcleo geniculado intermedio.	vhc Comisura hipocampal ventral.
InWh Estrato blanco intermedio del colliculus superior.	VL Núcleo talámico ventrolateral.
IPA Parte apical del núcleo interpeduncular.	VLGMC Núcleo geniculado lateral ventral, parte magnocelular.
IPC Parte central del núcleo interpeduncular.	VLGPC Núcleo geniculado lateral ventral, parte parvocelular.
IPIP Núcleo interpeduncular, parte interna del subnúcleo posterior.	VLL Núcleo ventral del lemnisco lateral.
IPOP Núcleo interpeduncular, parte externa del subnúcleo posterior.	VM Núcleo talámico ventromedial.
IPP Núcleo interpeduncular, parte paramedial.	VMH Núcleo hipotalámico ventromedial.
KF Núcleo Kölliker-Fuse.	VMHC Núcleo hipotalámico ventromedial, parte central.
La Núcleo amigdalóide lateral.	VMHDM Núcleo hipotalámico ventromedial, parte dorsomedial.
lab Haz de asociación longitudinal.	VMHVL Núcleo hipotalámico ventromedial, parte ventrolateral.
LatC Núcleo cervical lateral.	VN Estrato del nervio vomeronasal.
LC Locus coeruleus.	VP Pallidum ventral.
LD Núcleo talámico laterodorsal.	
LDTg Núcleo tegmental laterodorsal.	
lfp Fascículo longitudinal del pons.	

LH Área hipotalámica lateral.	VPB Núcleo parabracteal ventral.
LHb Núcleo habenular lateral.	VPL Núcleo talámico ventroposterior, parte lateral.
II Lemnisco lateral.	VPM Núcleo talámico ventroposterior, parte medial.
LM Núcleo mamilar lateral.	VPPC Núcleo talámico ventroposterior, parte parvocelular.
LMoI Estrato molecular lacunoso del hipocampo.	vsc Tracto espinocelular ventral.
Io Tracto olfatorio lateral.	VTA Área tegmental ventral.
LOT Núcleo del tracto olfatorio lateral.	Vtg Núcleo tegmental ventral.
LOTD Núcleo del tracto olfatorio lateral, parte dorsal.	xscp Decusación del pedúnculo cerebelar superior.
LP Núcleo talámico posterior lateral.	ZI Zona incierta.
LPO Área preóptica lateral.	Zo Estrato zonal del colículo superior.
LSD Núcleo lateral septal, parte dorsal.	
LSI Núcleo lateral septal, parte intermedia.	
LSO Oliva superior lateral.	
LSV Núcleo septal lateral, parte ventral.	
LTz Núcleo lateral del cuerpo trapezoide.	
