

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



“EFECTOS TÓXICOS POR LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL E INTRACRANEAL DE ESPARTEÍNA EN EL CEREBRO DE LA RATA”

TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

P.M.V.Z. TZINTLI MERAZ MEDINA

DIRECTOR

DR. JACINTO BAÑUELOS PINEDA

ASESORES:

BIOL. CARMEN CECILIA GÓMEZ RODILES

M.V.Z. RACHEL SARABIA ESTRADA

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO, DICIEMBRE 2003

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN.....	X
INTRODUCCIÓN.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	16
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por apoyarme, a mi madre que ha estado siempre conmigo en todos mis proyectos que he realizado y los que he de realizar, a mis hermanos por animarme a seguir adelante y a mi padre por estar siempre tan cerca de mí.

A mis amigos, Alva, Felipe, Rachel, Toño, Carlos, Oscar y Juan por hacerme los días más sencillos y agradables.

A mi director, Dr. Jacinto y a mis asesoras Rachel y Carmen, por guiarme en mis estudios y por toda la ayuda que me brindaron para llegar hasta aquí y abrirme nuevos horizontes.

A esa persona que ha estado presente durante todo este proceso ayudándome en cualquier situación, a él, que le brindó una frase especial a mi vida, al hombre que amo. David.

*Y el final
vuelve a ser
principio.*

RESUMEN

La esparteína es un alcaloide de tipo quinolizidínico que se encuentra ampliamente distribuido en las leguminosas del género *Lupinus*. La esparteína tiene numerosas propiedades farmacológicas en el tratamiento de problemas cardiovasculares y como antihipertensivo, sus efectos sobre sistema nervioso autónomo (SNA) incluyen bloqueo ganglionar y efectos antimuscarínicos, en el SNC actúa como calmante, es oxiótico, diurético, así como anestésico local. El mayor riesgo por la intoxicación con esparteína es el desarrollo de crisis convulsivas precedidas por parálisis del músculo cardíaco y coma. Se ha propuesto que su vía de acción en el tejido nervioso es a través del receptor muscarínico, inhibiendo el paso de K⁺ y Na⁺. El objetivo del estudio fue el de describir topográficamente la magnitud y el tipo de daño sobre las neuronas del SNC de la rata por efecto de aplicación intracraneal e intraperitoneal de esparteína. En el estudio se utilizaron 32 ratas Wistar adultas, divididas en cuatro grupos de ocho animales. Un grupo se canuló vía intra ventricular y cada animal recibió diariamente 10 ng de sulfato de esparteína (SE) diluida en agua destilada, durante cinco días consecutivos, al segundo grupo se le aplicó, vía intraperitoneal, 90 mg de SE diluida en 15 ml del mismo vehículo. A los restantes dos grupos solo se les administró la solución vehículo por ambas vías de administración. 48 horas después de la última aplicación se extrajeron los cerebros para obtener cortes y teñirlos con HE para su observación microscópica. Resultados Los principales daños encontrados fueron eosinofilia y basofilia citoplasmática, y picnosis en neuronas. Presencia de neuronas fantasmas y gliosis, y deformación de la membrana neuronal. Estos hallazgos fueron observados en corteza entorrinal, bulbo olfatorio, corteza cerebral, giro dentado, hipocampo (CA1 y CA4) y células de Purkinje en cerebelo. La diferencia observada entre las dos vías de administración fue el daño circunscrito a la zona canulada. La cuantificación de células rojas en las zonas estudiadas mostró una magnitud de daño muy severo, ya que en todas las zonas cerebrales analizadas se encontró un número significativo de células con daño por la acción de la esparteína. De los resultados de este estudio se concluye que la esparteína causa degeneración neuronal manifestada por eosinofilia, cavitación y vacualización, principalmente en la corteza frontal, frontoparietal, estriada, CA1, CA4, giro dentado (hipocampo), células de Purkinje en cerebelo, área amigdalea y área olfatoria.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos secundarios son producidos por las plantas a partir de los productos primarios que aparecen en el citoplasma de todas las células vegetales y cuyas diferencias entre plantas son únicamente de índole cuantitativa (*Straburger y col., 1994*), muchos compuestos secundarios son empleados por la planta para distintos propósitos. Intervienen en relaciones de competencia con otras plantas, como agentes alelopáticos y como protección contra invasiones como hongos, bacterias y virus (*Herborne, 1993*); protección a radiación ultravioleta y por moléculas portadoras de información relacionada con posibles funciones defensivas contra sus depredadores (*Poulton, 1990*). Existen diversos metabolitos secundarios en las plantas, dentro de ellos se encuentra la categoría de los alcaloides, que consisten en compuestos alcalinos que contienen nitrógeno, que al reaccionar con ácido forman sales. En condiciones normales tienen un sabor amargo, son biológicamente activas y tóxicas. A estas sustancias se agrupan elementos no relacionados entre si, de las que se conocen más de 2000 diferentes y cuyos precursores pueden ser aminoácidos (*Hagerman, 1991*). Se han encontrado en hongos, algas y vegetales inferiores (organismos que carecen de un sistema vascular bien desarrollado). Sin embargo, la principal fuente de alcaloides la proporcionan las plantas superiores (organismos con sistema vascular bien desarrollado), dentro de este grupo las dicotiledóneas son el grupo de plantas en donde se han localizado más alcaloides, seguido por la monocotiledóneas (*Domínguez, 1973*).

En las plantas existe una enorme diversidad bioquímica de compuestos secundarios (*Wink, 19881; 1992*) y que le confieren resistencia al ataque de herbívoros y microorganismos patógenos fruto de la imposibilidad de huida ante sus agresores (*Cheeke, 1995*). En general frente a condiciones severas las plantas tienden a aumentar sus defensas, sobre todo alcaloides y glucósidos cianogénéticos (*Lundberg y Palo, 1993*). Por ello, el consumo de éstas puede producir intoxicación, especialmente en el ganado doméstico cuando su manejo en pastoreo no es el adecuado o cuando se enfrenta a la escasez de otros recursos vegetales (*James y Molyneux, 1992*). En estas plantas la distribución de alcaloides varía en cuanto a su

concentración y distribución en los diferentes tejidos durante su desarrollo fenológico (Makkar y Singh, 1991).

Las yemas en crecimiento de arbustos, las hojas jóvenes, los órganos reproductores y de dispersión, y en general todas las partes en crecimiento anual muestran una mayor concentración que los tejidos viejos en compuestos secundarios (Rhoades, 1979).

Los compuestos secundarios suelen ser agrupados según las sustancias químicas que les constituyen: *Compuestos fenólicos* (taninos, fitoestrógenos y cumarinas), *terpenos* (lactonas sesquiterpénicas, glicósidos cardiacos, saponinas) *hidrocarburos poliacetilénicos*, *oxalatos* y *toxinas nitrogenadas* (glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, aminoácidos tóxicos, lecitinas, inhibidores de las proteasas y alcaloides) (Hagerman, 1991). Según el estado químico del nitrógeno, se definen cuatro grupos:

1. Aminas secundarias,
2. Aminas terciarias,
3. Aminas cuaternarias
4. N-óxidos

Un subgrupo importante dentro de los compuestos secundarios son los alcaloides ya mencionados y dentro de estos son de sumo interés los del grupo de alcaloides quinolizidínicos (AQ) los cuales se derivan de la Lisina en complejidad variables, aunque en su mayoría son bicíclicos o tetracíclicos (2 a 4 anillos de nitrógeno) y aparecen como aminas terciarias y como N-óxidos (Hagerman, 1991).

Estos alcaloides se distinguen de otros debido a la presencia de por lo menos un sistema de anillo quinolizidínico (Wink, 1993). De acuerdo al grado de sustitución, por lo menos ocho grupos de AQ pueden ser distinguidos en los siguientes tipos estructurales:

1. Lupanina
2. Leontidina
3. Esparteína/lupanina/multiflorina
4. Piperidínicos y dipiperidínicos
5. α -piridonico
6. Matrína
7. Osmina y
8. Estructuras misceláneas

La mayor fuente de obtención de los AQ son las leguminosas *Papilonoideae* (Fabaceae). Así mismo existen otras familias que se caracterizan por la producción de estos alcaloides como son: *Berberidáceas*, *Ranunculácea*, *Solanácea*, *Chenopodiceae* y *Rubiceae* (Wink, 1993). Diferentes tipos de AQ no se distribuyen homogéneamente en las leguminosas, por ejemplo la lupanina, esparteína y multiflorina, así como lupinina y derivados están presentes en el género *Lupinus* (Wink, 1993).

Las especies del género *Lupinus* son leguminosas que pertenecen a la familia Fabacea del orden Fabales, subfamilia Papilanoideae. Algunas de sus especies han sido cultivados y usados durante siglos en amplias zonas geográficas teniendo usos importantes tanto en la alimentación animal como humana (Gladstone, 1974).

Las especies silvestres domesticadas de lupinos; *L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius* y *L. mutabilis* son importantes en la agricultura debido a la asociación simbiótica de estas con bacterias del género *Rhizobium* con capacidad para fijar nitrógeno atmosférico. De esta manera se puede incorporar nitrógeno al suelo, el cual es aprovechado 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 col., 1991). Sin embargo, la elevada proporción de AQ (mayor al 1.0%) en las semillas de los lupinos silvestres limitan su aprovechamiento directo en la alimentación (Ruíz y Sotelo 2001), ya que pueden provocar toxicidad aguda o crónica en el sistema nervioso central (Agid y col., 1988).

Actualmente se han reportado más de 100 alcaloides (compuestos nitrogenados) del tipo quinolizidinco (AQ) presentes en las especies silvestres del género *Lupinus*.

Biosíntesis de los AQ.

La biosíntesis de los AQ se realiza en las partes más verdes de la planta y en el cloroplasto (Wink y Hartmann, 1982). La biosíntesis de AQ es regulada por la luz, de esta manera las concentraciones de AQ disminuyen diurnamente y la síntesis es estimulada durante el día y son transportados por el floema a otras partes de la planta (Wink y Witte, 1991) Los AQ se acumulan predominantemente en la subepidermis de las semillas y pueden contener hasta el 8% de su peso seco en alcaloides. Los alcaloides son movilizados a partir de las hojas senescentes durante el periodo vegetativo a otras partes de la planta (Wink, 1993).

Los AQ se sintetizan a partir del aminoácido L-lisina, a través de una serie de descarboxilaciones mediados por enzimas (descarboxilasas de la lisina, presentes en los cloroplastos) De éste se obtiene la cadaverina, precursor intermediario entre lisina y los AQ. Así, los dos átomos de nitrógeno del esqueleto quinolizidinico de los alcaloides son derivados de lisina o cadaverina (Wink, 1993; Wink y Hartmann, 1982).

Toxicidad y actividad biológica de los alcaloides quinolizidínicos de lupinus.

Los AQ son el principal elemento antinutritivo que limita el consumo directo de la planta de *Lupinus*, que se caracteriza por una alta calidad alimenticia. Los AQ tienen una función biológica activa al repeler a los predadores naturales de Lupinos, como herbívoros o fitopatógenos, debido a su acción mutagénica y tóxica (Keeler, 1976), además constituyen una defensa química contra los mismos (Wink 1993 a y b).

Las consecuencias del consumo de las semillas de algunas especies de *Lupinus* incorporadas experimentalmente en la dieta animal, van desde la reducción en la ganancia de peso y deficiencia en índices de transformación del alimento en masa corporal en pollos, disminución en el consumo en cerdos y vacas y disminución

en la producción de leche en estas, alteraciones respiratorias e incluso hasta la muerte del animal (*Ballester y col., 1980; Díaz y cols., 1990; Wink y Witte, 1991*).

Se han descrito cuadros tóxicos en humanos y en animales. La sintomatología consiste en manifestaciones cardiovasculares (arritmias y taquicardia), neurológicas (debilidad, astenia, visión borrosa e incoordinación) náuseas y vómitos. Se ha descrito que tras el consumo crónico se desencadena daño a motoneuronas (latirismo). Se han reportado dos casos en los que un enema con líquido obtenido por la cocción de 5 onzas de lupino (*Lupinus albus*) produjo síntomas tóxicos; malestar general, visión borrosa, mareo, debilidad palpebral, cansancio, alucinaciones, constricción laríngea y faríngea (*Agid y col., 1988, Márquez y col., 1991*).

La toxicidad de la planta depende de su contenido en alcaloides, en particular de las especies amargas de lupinus (no domesticadas) que principalmente contienen esparteína y lupanina. Estos contienen α -piridoxina, n-metilcisticina y cisticina, con afinidad por los receptores nicotínico, mientras que los alcaloides tipo quinolizidínicos tiene mayor afinidad por receptores muscarínicos (*Pothier, 1998*).

Existen reportes sobre la toxicidad de los AQ en diversas especies de vertebrados :

1. En el pato, los AQ provocan una disminución en la eclosión, biomasa y en la producción de huevos, así, como un bajo conteo de eritrocitos y contenido hemático en embriones (*Wink, 1993*).
2. La anagirina, posee propiedades teratogénicas para el ganado, provocando malformaciones en becerros (*Bednarczyk y col., 1987*).
3. En vacas productoras de leche alimentadas con lupinus amargos, se reporta una disminución en el consumo de alimento, pérdida de peso, disminución de la leche y grasa (*Panter y Keeler, 1993*).

En la rata la DL_0 (máxima dosis no letal) para esparteína por vía intraperitoneal (ip) es de 30.7 mg/kg. La DL_{50} (dosis letal media) es de 36 mg/kg/ip y

de 220 mg/Kg/oral. La DL_{100} (dosis letal máxima) es de 150 mg/kg/ip y de 75 mg/Kg/subcutánea (sc) (Yovo 1982; Yovo y cols., 1984).

La máxima DL_{50} ip en el ratón es de 25 mg/kg y la DL_{100} fue de 100 mg/kg (Photier, 1998).

Sistema nervioso central.

Se denomina sistema nervioso central (SNC) al encéfalo y la médula espinal, compuestos de células nerviosas y neuroglía o tejido de sostén (Ardila, 2001).

El cerebro está dividido en 5 vesículas secundarias de las que parten otras estructuras. El telencéfalo está compuesto por los hemisferios cerebrales, los cuales son: corteza cerebral, núcleos caudado, lenticular, amigdalino y claustrum y las comisuras correspondientes al cuerpo caloso y a la comisura anterior, el diencefalo se divide en epitélamo del que derivan la epífisis y la habénula, el tálamo, subtálamo, quiasma y el hipotálamo donde se encuentran el tuber cinereum, tallo hipofisiario, neurohipófisis y cuerpos mamilares, el mesencéfalo o cerebro medio compuesto por el tectum y los pedúnculos cerebrales, el metencéfalo con la protuberancia anular y el cerebelo; por último el mielencéfalo que corresponde al bulbo raquídeo (Antúnez, 1997).

El SNC posee dos funciones primordiales:

1. Conecta los receptores sensoriales y los efectores motores, que a menudo se encuentran situados en partes muy diferentes del organismo.
2. Permite integrar los diversos impulsos sensoriales y las resultantes motoras, lo cual capacita la coordinación y organización de la conducta.

En los organismos superiores esta organización es sumamente compleja e incluye refinados mecanismos para almacenar información, y maneras de comparar esta información almacenada con los impulsos sensoriales que llegan al cerebro. Estas funciones se reflejan en la estructura del SNC, que está compuesto de vías sensoriales, cuya función es traer información al SNC y distribuirlo por sus diferentes

partes; y vías motoras, que llevan la información de las diferentes partes del cerebro y la médula espinal a músculos y glándulas (Antúnez, 1997).

La médula espinal está situada en el conducto vertebral. Comienza al nivel del borde superior del atlas y termina en el borde inferior de la primera vértebra lumbar (Morzov y Romasenko, 1985). La médula espinal está compuesta por dos partes: una porción exterior blanca, que contiene las vías ascendentes y descendentes que conectan los nervios periféricos con el cerebro; y una porción gris interior en forma de mariposa o letra H, que contiene las neuronas que permiten cierta integración local de las funciones sensoriales y motoras. La sustancia blanca se organiza en grandes columnas que forman tractos de fibras que suben y bajan, la colocación de las raíces dorsales y ventrales que separan cada mitad de la médula espinal en regiones dorsales, laterales y ventrales. La región dorsal de materia blanca está formada por fibras ascendentes que llevan información sensorial a los núcleos subcorticales del cerebro, la mitad dorsal de la porción lateral está compuesta casi únicamente por sistemas de fibras descendentes (eferentes o motoras) también por fibras de asociación que conectan varias regiones de la médula espinal. Los nervios periféricos contienen fibras aferentes y eferentes y se denominan nervios mixtos.

Una de las principales funciones de la médula espinal es conducir los impulsos de y hacia el encéfalo. La otra función básica de la médula espinal se relaciona con los reflejos espinales, que son respuestas musculares y autónomas a estímulos corporales.

El tallo cerebral se refiere a todo lo que se encuentra entre la médula espinal, los hemisferios cerebrales y la corteza del cerebro, las cuatro regiones principales del tallo cerebral son: bulbo raquídeo, protuberancia anular, cerebro medio o mesencéfalo y diencefalo.

El bulbo raquídeo es la continuación de la médula espinal, contiene todos los tractos de fibras ascendentes y descendentes que conectan el cerebro y la médula espinal. La mayor parte de los nervios craneales entran y salen por el bulbo raquídeo y la región vecina, también posee regiones vitales como los núcleos autónomos relacionados con la función intestinal, la respiración y la función cardíaca.

La protuberancia anular contiene tractos de fibras ascendentes y descendentes y núcleos adicionales. En él, se encuentran grupos de células que conectan los núcleos subcorticales con el cerebelo y fibras piramidales que van de la corteza a la médula espinal. El cerebro medio o mesencéfalo se une con el tálamo y el hipotálamo. La porción dorsal del cerebro medio contiene dos pares de núcleos de relevo para el sistema visual y el auditivo, que se denominan colículos superior e inferior. La porción ventral del cerebro medio contiene núcleos para los III, IV y VI pares de nervios craneales, que controlan los movimientos oculares.

El diencefalo se integra de dos estructuras principales, el tálamo y el hipotálamo. El tálamo es una estación de relevo en el camino del cerebro. Consta de muchos núcleos conectados entre si y con los hemisferios cerebrales. Los núcleos del tálamo se dividen en tres grupos principales: núcleos de relevo sensorial, núcleos de asociación y núcleos con conexiones subcorticales solamente.

Los principales núcleos de relevo sensorial son, el cuerpo geniculado lateral y medial. El hipotálamo es un grupo de núcleos que se encuentran en la porción ventral del cerebro, en la unión del cerebro medio y el tálamo. El hipotálamo se relaciona con el comportamiento sexual, el hambre, sed, conducta emocional, regulación de la temperatura y con el sistema nervioso autónomo.

Además de las anteriores estructuras, en el cerebro se encuentra el cerebelo que es una estructura filogenéticamente antigua, especializada en coordinación sensoriomotora, recibe conexiones procedentes del sistema vestibular, fibras espinales sensoriales, sistemas visual y auditivo, la formación reticular y varias regiones de la corteza cerebral. Envía fibras al tálamo, formación reticular y otras estructuras de los núcleos grises de la base. La función primordial es la coordinación motora (Ardila, 2001).

El cerebelo está dividido en cuatro porciones:

La ventral que recibe fibras que provienen de los órganos del equilibrio (canales semicirculares, utrículo y sáculo); una porción anterior y otra posterior, a las cuales convergen fibras sensoriales a través de la médula espinal; y una porción dorsal o neocerebelo, que posee numerosas conexiones con el puente y con los lóbulos frontales de la corteza cerebral (Ardila, 2001).

Así mismo en la región central de los hemisferios cerebrales hay un grupo de núcleos, estos núcleos se encuentran rodeados por la corteza cerebral y la materia blanca del cerebro y en parte rodean al tálamo. Los ganglios basales están conformados por la amígdala, globus pallidus, putamen, el núcleo caudado y el cuerpo estriado. El putamen y el globus pallidus forman el núcleo lenticular. Por último se incluye al sistema límbico que consta de cuatro estructuras:

1. Giro cingulado
2. Área septal
3. Amígdala
4. Hipocampo

Los elementos del sistema límbico están interconectados entre sí, con el hipocampo y los cuerpos mamilares, que a su vez se conectan con la corteza cerebral (Ardila, 2001).

Actividad de la esparteína a nivel de SNC.

Una de las vías en que los AQ pueden provocar efectos en el tejido nervioso es a nivel de los ganglios nerviosos, en ellos inhiben la transmisión del influjo ganglionar simpático del sistema nervioso autónomo (Mukisiart y col., 1995). Debido a estas propiedades ganglioplégicas, dosis altas de lupanina y esparteína reducen el flujo del seno carotídeo, así como también el flujo coronario, la contracción, amplitud y velocidad cardíaca (Agid, y col., 1988). Estudios recientes han demostrado que la lupanina es menos tóxica que la esparteína debido a que la primera tiene una capacidad de difusión mayor y puede metabolizarse más rápidamente que la esparteína (Ascencio, 2000).

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

1. Activación de receptores muscarínicos para acetilcolina (Schmeller y col., 1994).
2. Activación receptores nicotínico para acetilcolina (Schmeller y col., 1994).

3. Inactivación de canales para Na^+ (Körper y col., 1998).
4. Inactivación de canales para K^+ (Köper y col., 1998, Shauf y col., 1976).

Actividad de la esparteína a nivel de SNC.

Una de las vías en que los AQ pueden provocar efectos en el tejido nervioso es a nivel de los ganglios nerviosos, en ellos inhiben la transmisión del influjo ganglionar simpático del sistema nervioso autónomo (Mukisiart y col., 1995). Debido a estas propiedades ganglioplégicas, dosis altas de lupanina y esparteína reducen el flujo del seno caotideo, así como también el flujo coronario, la contracción, amplitud y velocidad cardiaca (Agid, y col., 1988). Estudios recientes han demostrado que la lupanina es menos tóxica que la esparteína debido a que la primera tiene una capacidad de difusión mayor y puede metabolizarse más rápidamente que la esparteína (Ascencio, 2000).

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

1. Activación de receptores muscarínicos para acetilcolina (Schmeller y col., 1994).
2. Activación receptores nicotínico para acetilcolina (Schmeller y col., 1994).
3. Inactivación de canales para Na^+ (Körper y col., 1998).
4. Inactivación de canales para K^+ (Köper y col., 1998, Shauf y col., 1976).

Con base a esto se conoce que los AQ actúan como agonista de los receptores colinérgicos (Ach) (Kinghorn y Balandrin, 1984). Los AQ afines a receptores nicotínicos son menos activos en los muscarínicos y viceversa (Schmeller y col., 1994).

Efectos de extractos de AQ en el SNC han demostrado que los AQ de extractos de *Lupinus montanus* y *Lupinus. exaltatus*, provocan una severa lesión en neuronas de varias regiones del SNC de la rata, siendo las más susceptibles el tálamo, hipotálamo, hipocampo, así como diferentes áreas de la corteza cerebral. Así mismo se ha utilizado cloruro de trifeniltetrazolium (CTT) como un indicador histoquímico de la actividad de enzimas respiratorias, demostrando que los AQ

afectan la función mitocondrial, aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual ocurre este daño (Ascencio, 2000).

En herbívoros la esparteína actúa en los canales de Na^+ , inhibiendo la transmisión neuronal también se comprobó que inhibe los canales de Na^+ en el músculo esquelético (Schmeller y Wink, 1988; 1994).

Usos farmacológicos de la esparteína.

Además de sus efectos tóxicos los AQ poseen propiedades farmacológicas y medicinales. La fórmula comercial de la esparteína es $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_2$, se obtiene, a partir de la destilación de una infusión concentrada de las hojas de *Cytisus scoparius*. Comercialmente se les encuentra como solución inyectable, aplicables por vía intramuscular y subcutánea (AnxoralTM, AriveTM, CardipaxTM, DespanTM, DiffucordTM, GelsadonTM, HypolindTM, HypotoninTM, JatamansinTM, KanovenolTM, MorfinTM, NormotinTM, PerivarTM, entre otras) (Roberts y Wink, 1998). Aunque un 10% de los pacientes son incapaces de metabolizar la esparteína y esto les ha causado intoxicación y algunos efectos secundarios como: problemas digestivos y vértigo. Por ello el uso de la esparteína en la medicina se ha restringido (Schmeller y Wink, 1988).

El sulfato de esparteína es el producto cristalizado tras la acción del ácido sulfúrico sobre esparteína. Es un cristal o un polvo blando, con pH neutro, con sabor amargo, soluble en compuestos polares (De la Cuadra y col, 1994).

La esparteína fue el primer AQ extraído a partir de *Cytisus scoparius*, pero esta ampliamente distribuido en las especies del género *Lupinus* (Kingham y Balandrin, 1984).

La esparteína produce un efecto competitivo de bloqueo sobre R-ACh (receptores de acetilcolina), además de bloquear canales abiertos. Tiene una influencia sobre el SNC y desde aquí sobre el corazón, acelera el pulso en la rata, incrementa la tensión arterial, aumenta la fuerza de la contracción muscular del ventrículo e incrementa el movimiento de la sangre a través de las arteriolas, estimula la acción de los riñones y produce una suave diaforesis. En dosis excesivas

produce temblor muscular, incoordinación, emesis, catarsis y finalmente parálisis respiratoria y del centro vaso motor y paro cardiaco en sístole (*De la Cuadra, 1994*).

de problemas cardiovasculares y como antihipertensivo (*Cohen, 1981, Corraz y Corraz, 1985; Faucon y Ollagnier, 1987; Pieri y Kirkiacharian, 1986; Schmitt, 1980*); sus efectos sobre sistema nervioso autónomo (SNA) incluyen bloqueo ganglionar y efectos antimuscarínicos (*Cohen, 1981; Lechat, 1978; Pieri y Kirkiacharian, 1986, Schmitt, 1980*) el SNC actúa como calmante (*Pieri y Kirkiacharian, 1986 Schmitt, 1980*), es oxiótico (*Cohen 1981; Lechat, 1978; Pieri y col., 1986*), diurético (*Cohen, 1981; Schmitt, 1980*), así como anestésico local (*Cohen, 1981; Schmitt, 1980*).

El sulfato de esparteína es una de las variadas preparaciones usadas para inducir la labor de parto al término de la gestación o aumentar la labor en progreso, pero su uso ha sido abandonado; la duración y los efectos de estimulación en el útero son imprevisibles, los efectos colaterales de esta droga al feto y la madre incluyen; hipoxia fetal o asfixia por estimulación uterina, el cual puede provocar daño cerebral o muerte (*Petrie y Danilo, 1981*). Se ha utilizado en el tratamiento de arritmias cardiacas. Es un remedio para el corazón con músculo debilitado; es usado en la palpitación de corazón exhausto. También se ha empleado en la enfermedad de Grave's (enfermedad del ojo tiroideo, la cual produce una proptosis del globo ocular), en el simple bocio ha sido beneficioso. Es un diurético, removiendo la fusión hídrica que se produce por la débil circulación, mas no es un remedio para todos estos casos (*De la Cuadra y col., 1994*), aunque existen efectos secundarios como la bradicardia, colapso cardiovascular (sólo cuando se aplica por vía intravenosa), anorexia, dolor abdominal, diarrea en algunos casos y tensión uterina, problemas digestivos y vértigo (*Chaix y Dumaris, 1998*).

Los efectos clínicos de la ingestión de esparteína pueden revelarse después de una hora de la ingestión, aparece una suave irritación de mucosa oral y salivación, seguida de vómitos violentos, a veces con sangre; confusión y delirio pueden ocurrir, convulsiones tónico-clónicas, parálisis del músculo y coma (*Laborde, 1994*).

La DL₅₀ de esparteína reduce la actividad locomotora, cuando se utiliza con drogas estimulantes del SNC desencadena retraso en el inicio de convulsiones e

incrementa el tiempo de sobrevivencia del animal. Después de una dosis de anfetaminas, también se probó la protección contra la mortalidad inducida por el *pentetrazol* en el ratón (Strubelt, 1982).

La esparteína a altas dosis cerca de la DL_{100} , tiene efectos parecidos a los de la nicotina mientras que a más bajas dosis ($<DL_{50}$) tiene efectos sedativos debido a su acción de bloqueo ganglionar (Schmitt, 1980).

En las intoxicaciones por esparteína (10mg/Kg por minuto vía intravenosa) se ha comprobado el efecto antagonista que el *PrenalteroI*TM y la *Isaprenaline*TM tienen con la esparteína, por lo que contrarrestan la intoxicación por ésta; con el defecto de bajar la presión sanguínea del organismo (Strubelt, 1982).

Tras intoxicación con esparteína se puede utilizar la *dopamina* como antídoto cuando se presenta severa caída de la presión sanguínea cuando el prenalterol o la isoprenalina no funcionan (Strublet, 1982).

El mayor riesgo por la intoxicación con esparteína es el desarrollo de crisis convulsivas precedidas por parálisis del músculo cardíaco y coma. A partir de diversos estudios la esparteína no solo ha sido utilizada como medicamento sino que en unión con otras sustancias o compuestos funciona en diversas actividades aleloquímicas como:

Actividad antimicrobiana de la esparteína.

1. Inhibición de crecimiento bacterial por esparteína, (Wink, 1992b), lupanina, angustifolina y 13-hydroxilupanina (Tiski y col., 1998).
2. Actividad fungistática y fungicida por una mezcla sinérgica de AQ en *Fusarium spp.* (Arias y col., 1999).
3. Inhibición de multiplicación viral (Wink, 1992b).

Actividad alelopática de los alcaloides.

1. Inhibición en germinación de semillas por esparteína, lupanina, cistina (Muzquiz y col., 1994; Wink, 1985).
2. Inhibición del crecimiento radicular por esparteína y cistina (Wink y Witte, 1985).

Actividad en Animales.

Reducción de movilidad en nemátodos y helmintos por N-metilcistina y matrina. Acción repelente y toxicidad en diversas especies de insectos por esparteína, lupaniana, 13-tigloiloxilupanina, cistina y lupaniana (Wink, 1992a)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La esparteína es un compuesto secundario tetracíclico perteneciente al grupo de los alcaloides quinolizidínicos (derivados de la quinolizidina). Estos alcaloides tienen una función biológica activa al repeler a los depredadores naturales de leguminosas silvestres, (herbívoros o fitopatógenos), mediante su actividad mutagénica y tóxica para una amplia gama de organismos, por lo que constituyen una defensa química importante para estas plantas. Así mismo muestran propiedades toxicológicas y farmacológicas; en el caso de la esparteína se encuentran efectos neurotóxicos, depresores del SNC, antiarrítmicos cardiacos, oxitóxicos, entre otros. Hasta el momento se sabe que su mecanismo de acción es a través del receptor muscarínico, como resultado se tiene la actividad del músculo cardiaco modulado por la dosis que puede estimular o paralizar el ganglio autónomo. También inhibe el paso de K^+ y Na^+ ; lo que modifica el transporte a través de la membrana celular, bloqueando así la transducción de señales en células nerviosas y musculares. Algunos trabajos con extractos de alcaloides de *Lupinus montanus*; en el que se encuentra en mayor porcentaje la esparteína; señalan severos daños en varias regiones cerebrales del SNC de la rata, siendo los más susceptibles el tálamo, hipotálamo, hipocampo, así como a diferentes áreas de la corteza cerebral. Sin embargo, la ausencia de estudios descriptivos de los daños causados en neuronas del SNC por el uso específico de la esparteína invita a realizar estudios sobre el tema.

JUSTIFICACIÓN

La esparteína se ha aislado con facilidad de *Cystisus escoparius* o de diferentes especies de lupinus, y es el único AQ comercial disponible, ya que se ha utilizado ampliamente en medicina humana por sus propiedades antiarrítmicas y oxitóxicas. Sin embargo más de un 10% de los pacientes tratados son incapaces de metabolizar la esparteína y existen reportes sobre la toxicidad de los AQ en diferentes especies.

Por lo antes expresado y debido a la ausencia de estudios sobre los daños producidos por la esparteína en tejido nervioso central, el presente estudio pretende describir en forma topográfica la magnitud y el daño sobre SNC de la rata por acción de la esparteína aplicada por vía intracraneal e intraperitoneal.

HIPÓTESIS.

La esparteína tiene como órgano blanco el tejido nervioso de los vertebrados por lo que su aplicación a nivel cerebro ventricular o intraperitoneal podrá indicar la magnitud, localización y características de las lesiones en el SNC de la rata.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las áreas más sensibles a los efectos provocados por la aplicación intraperitoneal e intracraneal de esparteína en el SNC de la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Describir los principales hallazgos anatomopatológicos en las neuronas dañadas por la esparteína.
2. Describir topográficamente los daños en el cerebro de la rata.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de morfofisiología del Departamento de Medicina Veterinaria de la División de Ciencias Veterinarias del CUCBA de la Universidad de Guadalajara.

Se utilizaron 32 ratas adultas, hembras de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 120 a 160 gramos bajo condiciones controladas de bioterio, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas instaladas en jaulas individuales; con alimentación y agua *ad libitum*. A los dos grupos restantes se aplicó solución salina por las dos vías ya descritas, para ser tomados como grupos control.

La esparteína que se utilizó para el experimento se designó como (-)-*sparteine sulfate salt* (C₁₅H₂₆N₂•H₂SO₄) (Sigma: No. de catálogo S2251) con un peso molecular de 332.5.

Metodología para la instalación de cánulas.

Las ratas utilizadas fueron sometidas a anestesia mediante inyección intraperitoneal con pentobarbital sódico (50mg/Kg. de peso). Una vez anestesiadas se sometieron a la instalación de la cánula; para esto se rasuró el dorso de la cabeza del animal antes de colocarlos en un aparato esterotáxico David-Koppf, colocando las barras auditivas y los incisivos (-3.3 mm) para fijar la cabeza (para asegurarse de que la cabeza está correctamente colocada debe quedar totalmente horizontal y escuchar la perforación de las membranas timpánicas al fijar las barras auditivas).

Con el animal inmovilizado, se hizo un corte en la piel del cráneo por la línea media empezando por detrás de la comisura posterior de los ojos y se prolongó hasta el nivel donde se encuentran las orejas, con un raspador de periostio de bordes romos se separara lateralmente el tejido conectivo subcutáneo y el periostio, partiendo de la línea media hacia los lados para observar la sutura de bregma (anterior) y lambda (posterior). Se secó la sangre y se obtuvo los registros iniciales de posición; anterior-posterior, medio lateral y dorso-ventral.

A partir de éstos se definió la ubicación del sitio donde se instaló la cánula; 1.4 medio lateral, 8.2 anterior a lambda y -4.0 dorsoventral. Estas coordenadas corresponden a la ubicación del tercer ventrículo lateral derecho.

Una vez definida la posición de la cánula se hizo un orificio a baja velocidad con un taladro, inundando constantemente la zona de penetración con solución salina isotónica a punto de congelación (para evitar necrosis secundaria resultante del calor que se genera al taladrar el cráneo), se practicó un orificio que permite la fijación de una cánula con las siguientes dimensiones: 0.36 mm de diámetro externo, 0.5 cm de longitud y ajustada mediante un anillo para introducirse hasta una profundidad de -4.0 mm. En posición contralateral a la cánula, se fijó un tornillo de 1 mm de diámetro y 3mm de largo, anclado en el espesor del cráneo, sin atravesarlo, para lograr una cementación adecuada de la cánula con cemento dental.

Se limpió completamente la zona de implantación para eliminar restos de tejido y se seco con papel absorbente para agregar cemento dental directamente sobre el hueso que cubre totalmente el tornillo de anclaje y parte de la cánula, enseguida se aplicó aire caliente a una distancia no menor de 30 cm. para evitar quemaduras, una vez fraguado el cemento se cubrió totalmente con piel.

Prueba toxicológica.

Se utilizaron 32 ratas adultas (8 por cada grupo, 4 grupos en total) dos grupos fueron sometidos a la canulación cerebro-ventricular, mientras que los dos grupos restantes se sometieron a la administración de la sustancia vía intraperitoneal, los animales del grupo sometido a la canulación cerebro-ventricular fueron alojados en jaulas individuales bajo condiciones de bioterio hasta su recuperación (72 horas). Luego se procedió a la administración de esparteína, 5 µl, equivalentes a 10 ng por cada animal en el primer grupo y de 5 µl de agua destilada en el segundo grupo; por medio de una microjeringa de 50 microlitros, adaptando una manguera para conectarse a la cánula, asegurando así que la sustancia realmente penetrara en el hemisferio.

Todos los animales en prueba recibieron 5 días de tratamiento con dos aplicaciones cada 24 horas con un intervalo entre cada una de 30 minutos; al terminar el tratamiento hubo un período de descanso de 7 días.

La aplicación de la esparteína al tercer grupo y el agua destilada en el cuarto, se realizó por vía intraperitoneal. Se introdujo una aguja calibre 25 x 16 en la parte posterior del abdomen en dirección paramedial. Se sujetó a la rata rodeando su cabeza con los dedos índice y medio de la mano izquierda, acostando el cuerpo del animal en la palma de la mano y apretando ligeramente el cuerpo con los otros dedos del manipulador. Con un movimiento rápido se introdujo la aguja en la cavidad peritoneal a nivel de la línea media de la parte baja del abdomen. La aplicación fue de una cuarta parte correspondiente a la DL_{50} (37 mg/kg), utilizando una preparación de 90 mg en 15 ml. 72 horas después de la última aplicación, los animales fueron profundamente anestesiados con pentobarbital sódico (Sedal-Vet) a una dosis de 63 mg/ml vía intraperitoneal; según la NOM-062-200-1999, con el propósito de realizar una perfusión intracardiaca y fijar encéfalo. Para esto se practicó una toracotomía amplia para exponer el corazón y los pulmones. Se pinzó la arteria aorta torácica descendente con pinzas de mosquito y se introdujo una aguja biselada calibre 22 en el vértice del ventrículo izquierdo, inmediatamente después se seccionó la aurícula derecha y se hizo pasar una solución lavadora de suero fisiológico durante, aproximadamente, 15 minutos, bajo presión de 120 cm³ de columna de agua, hasta ver fluir líquido sin restos de sangre por la aurícula derecha con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de ésta. Inmediatamente después se procedió a perfundir con la solución fijadora de Bouin, que contiene 15 partes de ácido pícrico en solución saturada, cinco partes de formol y una parte de ácido Acético concentrado. Al término de la perfusión se practicó una craneotomía y se extrajo el encéfalo completo, al mismo tiempo se registro que la cánula haya estado en el ventrículo derecho del cerebro mediante observación directa.

Los cerebros fueron posfijados por inmersión durante 24 hrs en la misma solución fijadora. Se deshidrataron en series crecientes de alcohol; 70, 80, 90, 96 y 100% durante 24 hrs en cada uno; posteriormente se colocaron en pases de xilol por 3 hr. Luego se llevó a cabo la inmersión en parafina I y II (24 hrs.) a una temperatura

54-56 °C. Después se bloquearon en parafina y se hicieron cortes coronales y sagitales de 10 micras de espesor en un micrótopo rotatorio (Reichertô) para ser montadas en portaobjetos con albúmina.

Técnica de hematoxilina-eosina.

Para la tinción de los cortes de los cerebros, se utilizó la técnica de hematoxilina- eosina. El desparafinado se llevo a cabo con 3 pases de xilol de 5 minutos cada uno; la hidratación con nueve pases en alcohol a concentraciones de 100°, 96°, 90°, 80°, 70°, 40°, con una duración de 5 minutos, respectivamente. La tinción comenzó con un pase de hematoxilina de 2 minutos y 30 segundos, lavado con agua corriente por 5 minutos, un lavado en agua destilada por 5 minutos y una inmersión por 2 minutos 30 segundos en eosina. Para deshidratar, se sumergió en agua destilada durante 5 minutos, dos pases rápidos en alcohol a 96° y tres inmersiones de 5 minutos cada una por alcohol del 96°, 100° y 100°, por ultimo dos pases de xilol por 5 minutos cada uno.

La presencia de las neuronas con daño se determinó en base en los siguientes parámetros: células con citoplasma eosinofílico (*neuronas rojas*) presencia de núcleos picnóticos y de sumas neuronales con hipocromasia (*neuronas fantasmas*) (Li y col, 1998).

Para el análisis morfométrico se seleccionaron las zonas con daño más evidente. Para esto se realizó una semicuantificación de veinte campos diferentes de cada cerebro las zonas seleccionadas.

Los datos obtenidos de la cuantificación se analizaron mediante una prueba t student a un nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS.

Las dosis utilizadas en la aplicación de esparteína vía intraperitoneal se basó partiendo de la DL_{50} de la esparteína en la rata para esta vía de aplicación, llegando a una dosis correspondiente a la cuarta parte de ésta: (37 mg/kg) (cuadro 1). En el caso de la administración intracraneal la dosis se basó en reportes previos en que se utilizaron extractos de AQ aplicados por la misma vía. En estos trabajos se utilizó la cantidad de 10 ng de esparteína por animal, por día, en 5 ml del diluyente (Ascencio, 2000., Nolasco y col., 2002).

Cuadro 1. Dosis utilizada para la aplicación de esparteína vía intraperitoneal.

Rata Número	Peso/gr	Dosis/ml
1	221.00	0.34
2	225.00	0.35
3	240.00	0.37
4	245.00	0.36
5	198.00	0.31

Hallazgos Clínicos.

Las manifestaciones clínicas al primer minuto después de la administración de esparteína vía intracraneal fueron las siguientes: deambulación lenta, acicalamiento, pilorección y desorientación, además algunos animales presentaron conducta exploratoria. A partir de la segunda aplicación se observó movimiento de mandíbula, erección parcial de la cola o enroscamiento, temblor generalizado en algunos casos y movimiento lento dentro de la jaula. En las subsiguientes aplicaciones, las ratas se mostraron más lentas en sus desplazamientos, nulificaban sus movimientos o los hacían en el mismo lugar, el acicalamiento fue constante en todas las aplicaciones y se presentaron temblores continuos y ligeros.

El sacrificio de los animales se ejecutó al séptimo día, solo una rata al sacrificio presentó pérdida de peso, postración y encorvamiento.

Por otra parte, durante la administración intraperitoneal del alcaloide, al primer día las ratas manifestaron aletargamiento. Al segundo día de aplicación algunos animales presentaron: aletargamiento, autotomía de los miembros anteriores, temblor y pérdida del movimiento y sensibilidad del tren posterior, incoordinación, respiración lenta y dificultad de movimiento. La frecuencia cardíaca de los animales se aceleró después de la aplicación, algunas ratas tuvieron dificultad para respirar o presentaron cianosis.

Descripción de los hallazgos histopatológicos.

Al analizar microscópicamente los cortes cerebrales se observó una similitud de las zonas afectadas por ambos tipos de tratamiento con esparteína, las estructuras sensibles a ella fueron en: corteza cerebral, frontal, frontoparietal y estriada, área olfatoria, área amígdalea, células de Purkinje en cerebelo y CA4, CA1 y giro dentado en hipocampo. Los cambios celulares más evidentes fueron: gliosis, la presencia de células fantasmas y degeneración neuronal; manifestada con eosinofilia, cavitación y vacualización.

Al analizar la degeneración neuronal (necrosis coagulativa) las neuronas se tornaron contrahechas y angulares con picnosis del núcleo, la substancia de Nissl (retículo endoplásmico) en el citoplasma desapareció (cromatolisis) y el citoplasma adoptó aspecto homogéneo, vivamente eosinofílico. La mayoría de neuronas afectadas presentaron eosinofilia, trastorno intracitoplasmático que se caracteriza por que las células, a través de la eosina, adquirieron una gran afinidad tintoral de coloración rojiza y son llamadas células rojas. Los hallazgos que manifestaron estas células fueron: encogimiento agudo y angulación de las células, el citoplasma homogéneamente eosinofílico, el núcleo encogido, picnótico o hiperpicnótico. También fue posible observar la presencia de algunas células fantasmas; células muertas que no son eliminadas y puede advertirse que persisten, pero son poco visibles.

Así mismo se encontró cavitación o neuronas colapsadas con un espacio circundante y vacualización después de una necrosis licuefactiva donde el soma fue reabsorbido dejando cavidades vacías

De estas lesiones descritas, la más frecuente fue la eosinofilia o células rojas, que fue detectada en todas las regiones con daño.

En las zonas cerebrales analizadas, la corteza cerebral, tanto la frontal, frontoparietal y estriada mostraron una lesión más severa sobre todo en el estrato II de células granulares y en el estrato III de células piramidales, con la diferencia de que los cerebros canulados mostraron un daño más severo en el lugar de la canulación (perteneciente a la zona frontoparietal) en comparación de los tratados vía intraperitoneal. Las lesiones restantes se presentaron moderadamente (Figura 12).

En cerebelo el daño fue exclusivamente en las células de Purkinje, en estas células solo se observó la presencia de eosinofilia, las demás lesiones descritas en otras regiones no se manifestaron en el cerebelo (Figura 11). En tanto el área olfatoria (Figura 10) como amigdalea, presentaron las lesiones mencionadas en forma moderada, mientras que en el hipocampo las lesiones variaron de severas a moderadas en ambos tratamientos (Figura 13).

Cuantificación de células rojas.

A continuación se presentan los valores obtenidos de la cuantificación (media y desviación estándar) de células rojas realizada en cada una de las diferentes regiones analizadas.

Tratamiento intraperitoneal:

- *Células de Purkinje (cerebelo)*: los tejidos control mostraron un promedio 3.08 (\pm 3.52) de células rojas. Por el contrario en el grupo tratamiento con esparteina se localizaron en promedio 5.17 (\pm 3.89) de células rojas por campo observado, la diferencia entre ambos promedios resultó significativa ($p < 0.05$) (Figura 4).

- *Corteza estriada*: los tejidos control promediaron 9.44 (\pm 22.74) células rojas, mientras el grupo esparteina tuvo 66.84 (\pm 34.329) células rojas, la diferencia entre las medias resultaron significativas ($p < 0.05$) (Figura 3).
- *Corteza frontoparietal*: el grupo control no evidenció células rojas, mientras que el grupo esparteina se cuantificó un promedio de 57.88 (\pm 29.79) (Figura 5).
- *Corteza frontal*: los tejidos control no mostraron células rojas, por el contrario en el grupo esparteina presentó un promedio de 55.28 (\pm 25.18) células rojas (Figura 1).
- *CA4 (Hipocampo)*: los tejidos control tuvieron un promedio 2.17 (\pm 32.86) de células rojas, el grupo esparteina presentó 32.51 (\pm 32.86) células rojas, la diferencia resulto significativa ($p < 0.05$) (Figura 2).
- *CA1 (Hipocampo)*: los cortes control no mostraron células rojas, mientras en los cortes esparteina promedio 14.55 (\pm 15.94) células rojas (Figura 7).
- *Giro Dentado(hipocampo)*: los tejidos control no mostraron células rojas, mientras que en el grupo esparteina se localizaron 45.26 (\pm 34.14) células rojas (Figura 6).
- *Área Olfatoria*: los tejidos control no mostraron células rojas, por el contrario en los tejidos esparteina se localizaron 54.13 (\pm 38.35) células rojas en promedio (Figura 8).
- *Área amigdalea*: el grupo control no mostró células rojas, por otro lado el grupo esparteina promedió 29.79 (\pm 23.81) células rojas (Figura 9).

Tratamiento craneal:

Por otra parte la cuantificación de células rojas en las diferentes regiones analizadas en los animales tratados intracranealmente mostraron los siguientes resultados:

- *Células de Purkinje*: los tejidos control promediaron 1.60 (± 3.39) células rojas, por el contrario en el grupo esparteína se cuantificaron 4.22 (± 3.45) células rojas, la diferencia existente resultó significativa ($p < 0.05$) (Figura 4).
- *Corteza frontoparietal*: el grupo control mostró 42.57 (± 37.39) células rojas, por otro lado el grupo esparteína reveló 61.06 (± 38.74) células rojas, esta diferencia entre los promedios resultó ser significativa ($p < 0.05$) (Figura 5).
- *Corteza estriada*: en los cortes control se localizaron en promedio 21.62 (± 41.15) células rojas, por el contrario los cortes esparteína mostraron 78.35 (± 41.15), por lo que la diferencia fue significativa ($p < 0.05$) (Figura 3).
- *Corteza frontal*: el grupo control no mostró daños; en el grupo esparteína se localizaron 52.911 (± 32.33) células rojas (Figura 1).
- *CA4 (Hipocampo)*: los grupo control mostraron en promedio 1.91 (± 7.48) células rojas, en el grupo esparteína se localizaron 13.28 (± 14.83) células rojas, por lo que la diferencia fue significativa ($p < 0.05$) (Figura 2).
- *Giro Dentado (Hipocampo)*: los grupos control no mostraron daño, mientras el grupo esparteína promedió 28.57 (± 43.43) células rojas (Figura 6).

- *CA1 (Hipocampo)*: en los cortes control no se visualizaron células rojas, mientras que en los cortes esparteína $6.93(\pm 16.02)$ (Figura 7).
- *Área olfatoria* : en los grupos control no se encontraron células rojas, en los grupos esparteína se visualizaron $54.97(\pm 34.33)$ (Figura 8).
- *Área amigdalea*: el grupo control no mostró daños, mientras el grupo esparteína mostró $17.15(\pm 31.76)$ células rojas (Figura 9).

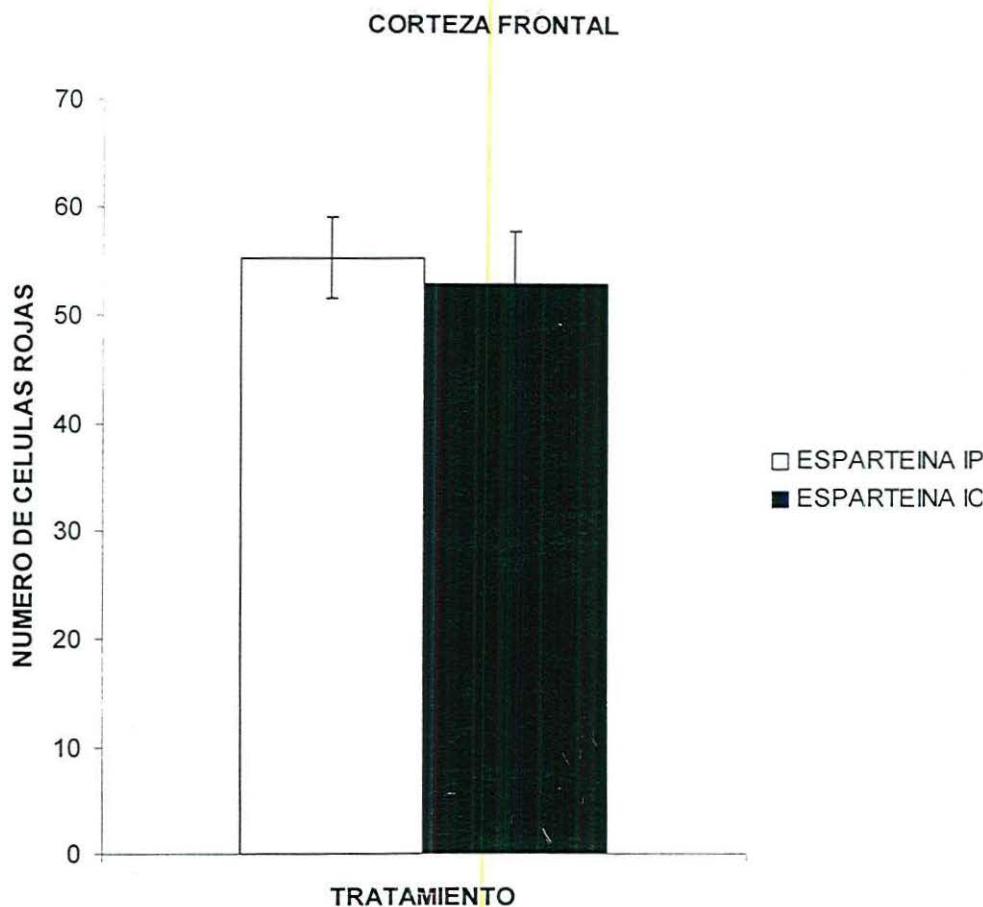


Figura 1. Muestra las medias y error estándar de células rojas en la corteza frontal. La cuantificación indico ausencia de estas células en ambos grupos control, no así en los grupos correspondientes a esparteína, donde el grupo esparteína IC mostró un número considerable de estas células ($p < 0.05$)

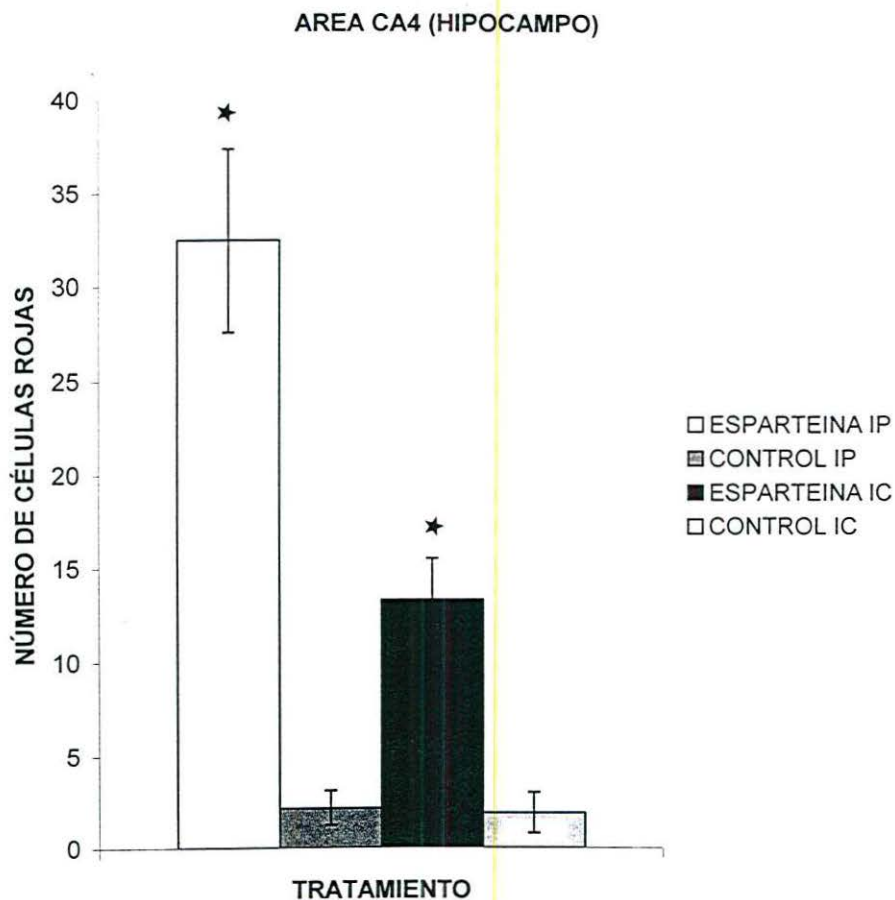


Figura 2. Muestra las medias y error estándar de células rojas en el hipocampo área CA4. La cuantificación indica mayor cantidad de estas células en el grupo de esparteína IP y una considerable disminución de células rojas en los grupos control ($p < 0.05$).

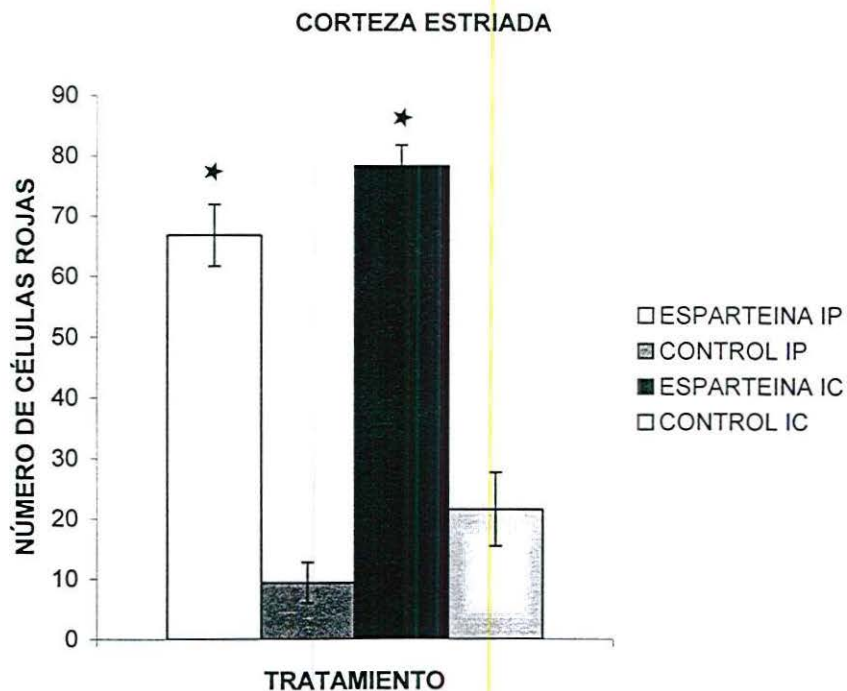


Figura 3. Muestra las medias y error estándar de células rojas en corteza estriada. La cuantificación indica mayor cantidad de células rojas en el grupo esparteína IC y en menor grado en el grupo esparteína IP. Mientras los grupos control muestran una cantidad menor de estas células ($p < 0.05$).

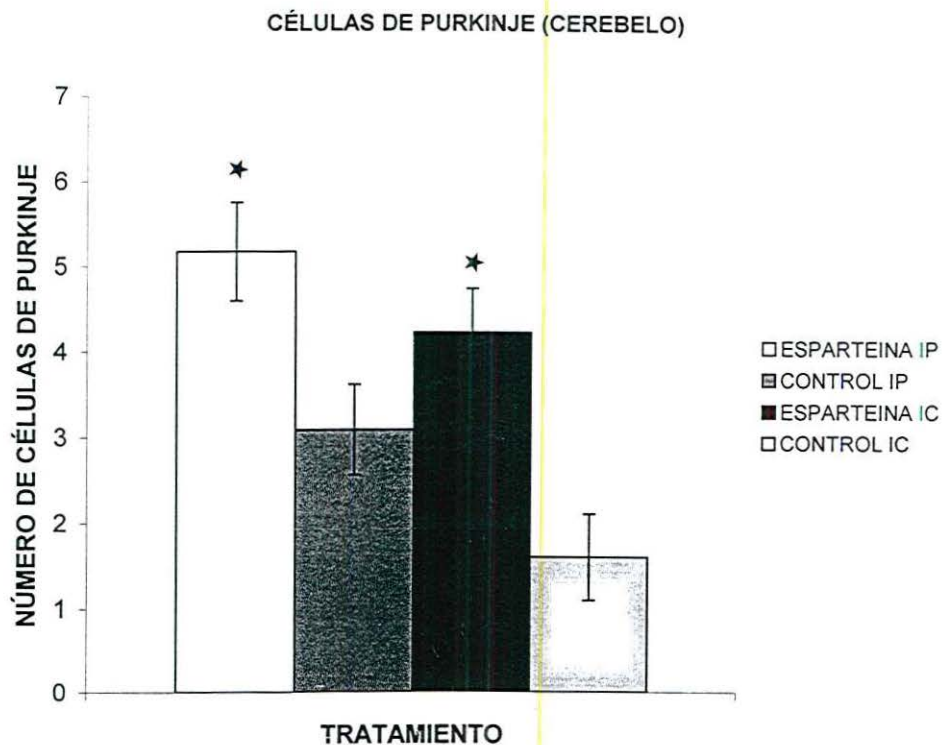


Figura 4. Muestra las medias y error estándar de células rojas en células de Purkinje en Cerebelo. La cuantificación indica mayor cantidad de células rojas en el grupo esparteína IC y en menor grado en el grupo esparteína IP. Mientras los grupos control muestran una cantidad menor de estas células ($p < 0.05$).

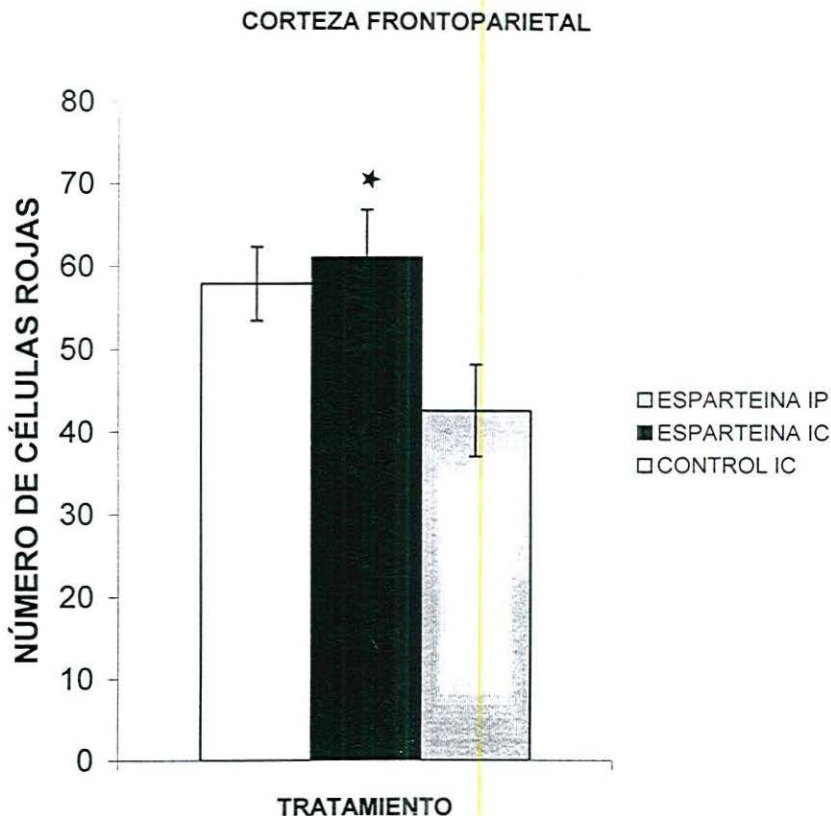


Figura 5. Muestra las medias y error estándar de la corteza frontoparietal. La cuantificación indica mayor cantidad de células rojas en el grupo esparteina IC. Mientras el grupo control IC muestran una cantidad menor de estas células. Los grupos IP tanto esparteina como control mostraron ausencia de daño. ($p < 0.05$).

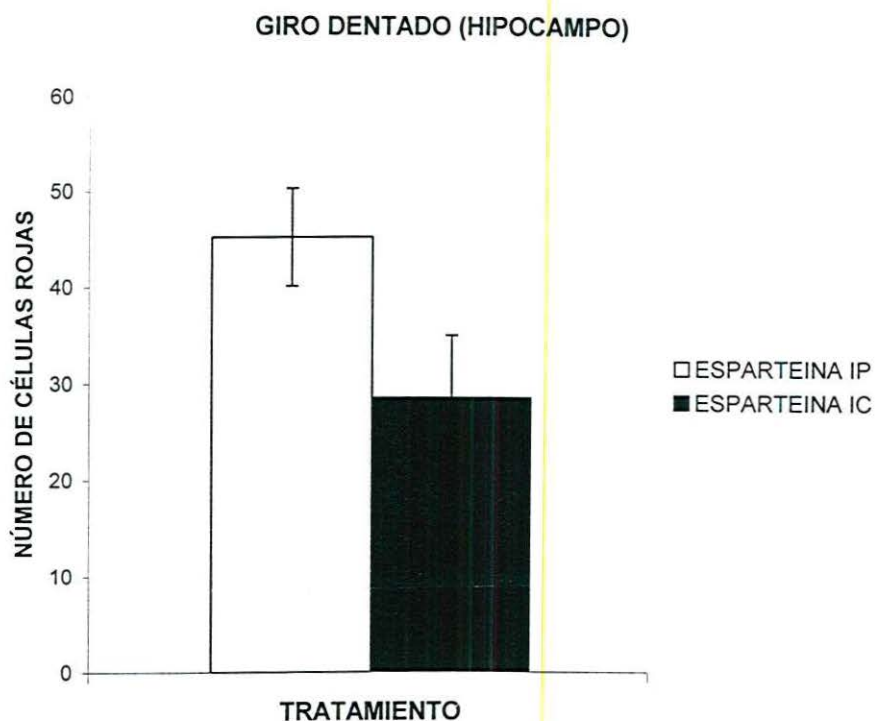


Figura 6. Muestra las medias y error estándar de células rojas en el giro dentado correspondiente a Hipocampo. La cuantificación indicó ausencia de estas células en ambos grupos control, no así en los grupos correspondientes a esparteína, donde el grupo IP mostró un número considerable de estas células ($p < 0.05$)

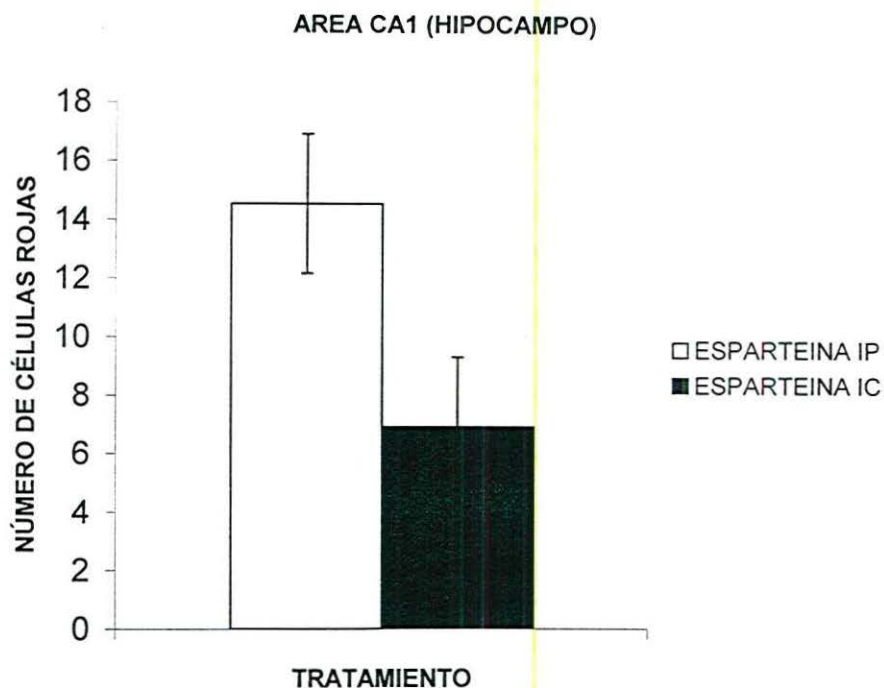


Figura 7. Muestra las medias y error estándar de células rojas en CA1 correspondiente a Hipocampo. La cuantificación indico ausencia de estas células en ambos grupos control, no así en los grupos correspondientes a esparteína, donde el grupo IP mostró un número considerable de estas células ($p < 0.05$)

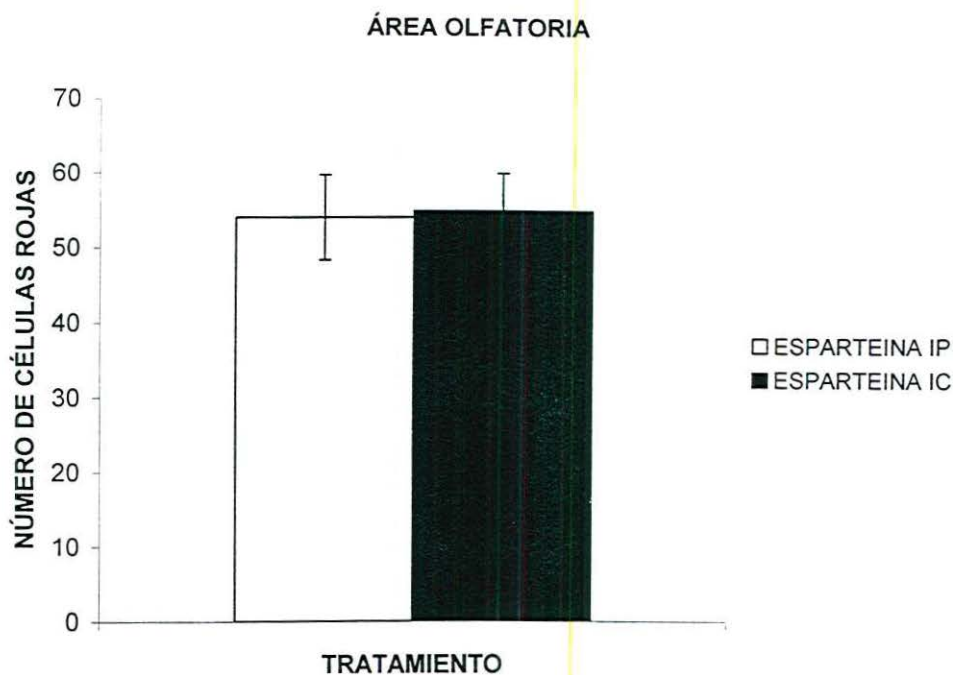


Figura 8. Muestra las medias y error estándar de células rojas en el Área Olfatoria. La cuantificación indicó ausencia de estas células en ambos grupos control, no así en los grupos correspondientes a esparteína, donde el grupo IC mostró un número considerable de estas células ($p < 0.05$).

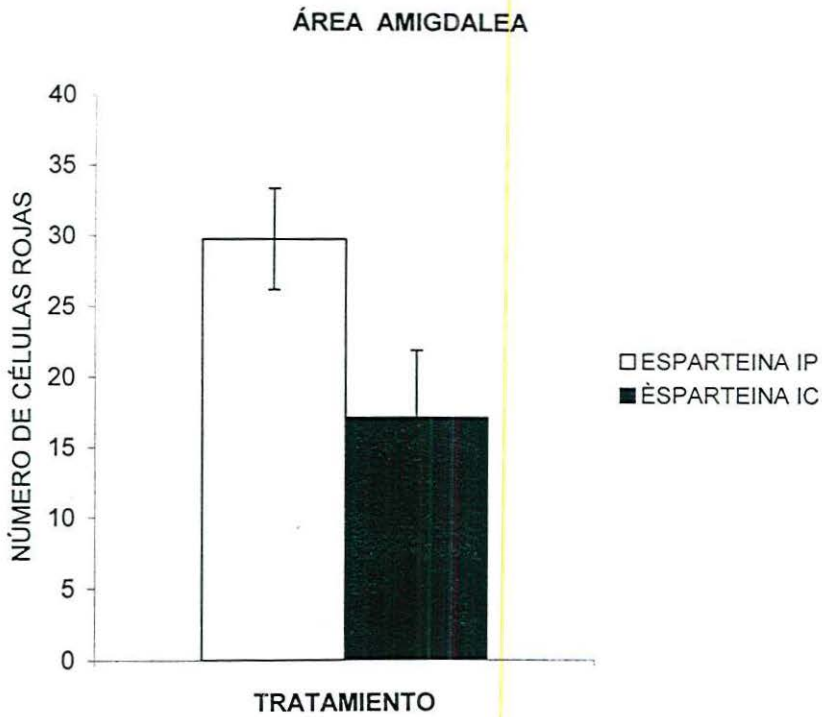


Figura 9. Muestra las medias y error estándar de células rojas en el Área amigdalea. La cuantificación indicó ausencia de estas células en ambos grupos control, no así en los grupos correspondientes a esparteína, donde el grupo IP mostró un número considerable de estas células ($p < 0.05$).

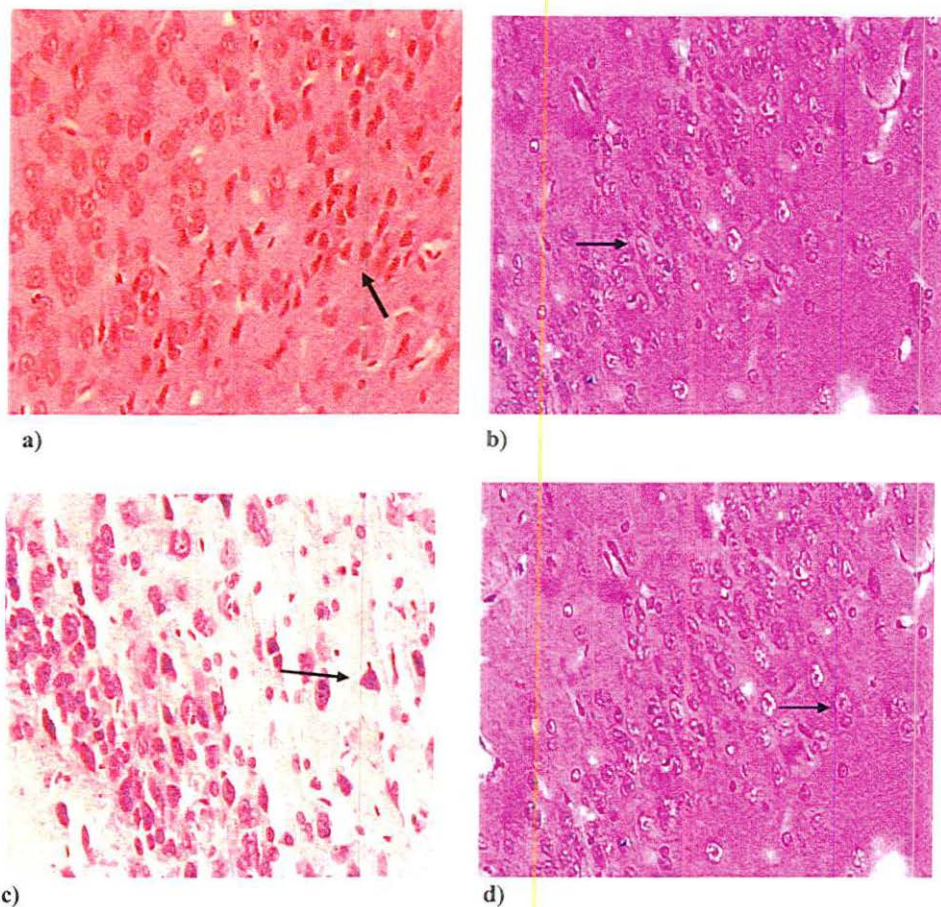
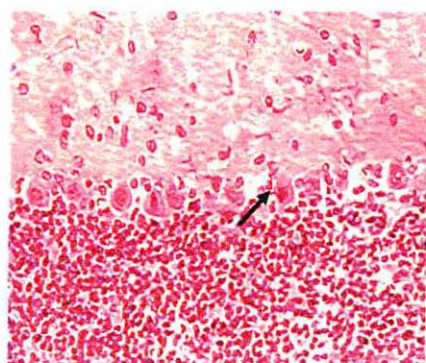
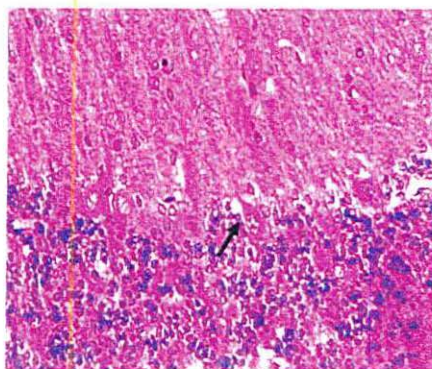


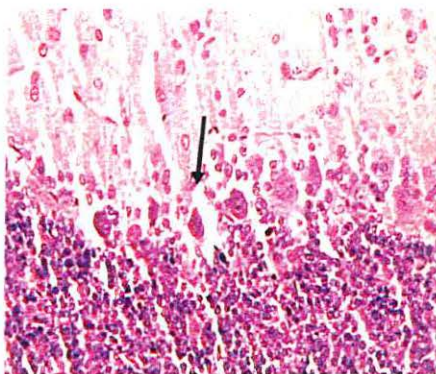
Figura 10. Cortes coronales correspondientes al Área Olfatoria de los grupos tratados intracranalmente a) espartea b) control y los grupos tratados intraperitonealmente c) espartea d) control; en los grupos control las flechas indican neuronas normales; en los grupos espartea las flechas indican neuronas eosinofílicas. Tinción con HE. Aumento 20x, la barra señala 30 μm .



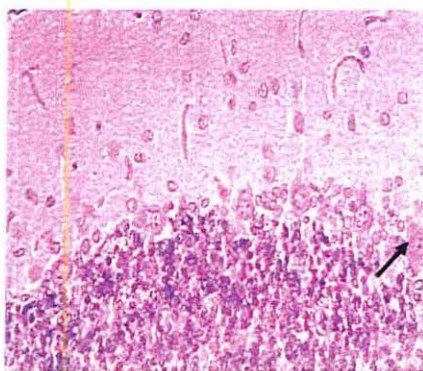
a)



b)

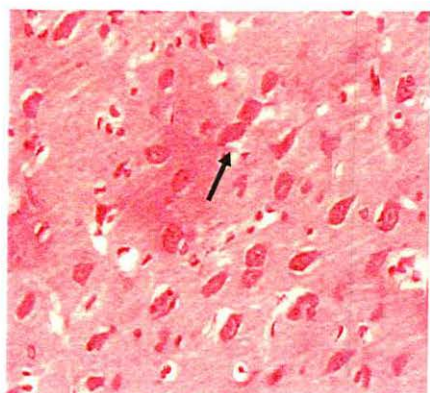


c)

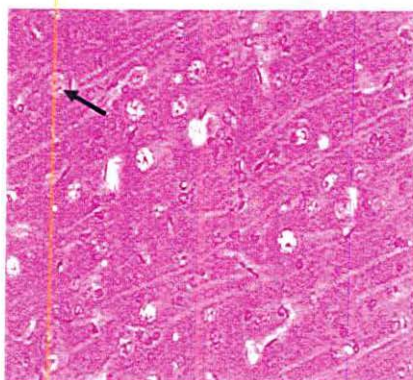


d)

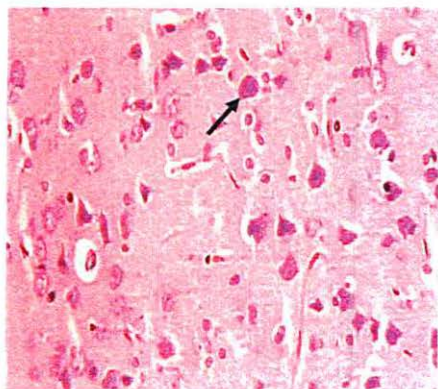
Figura 11. Cortes coronales correspondientes a las células de Purkinje en el cerebelo de los grupos tratados intracranalmente a) espareina, b) control; y los grupos tratados intraperitonealmente c) esparteina, d) control; en los grupos control las flechas indican neuronas en estado normal; en los grupos esparteina las flechas indican neuronas eosinofílicas. Tinción con HE. Aumento de 20x, la barra señala 30 μm .



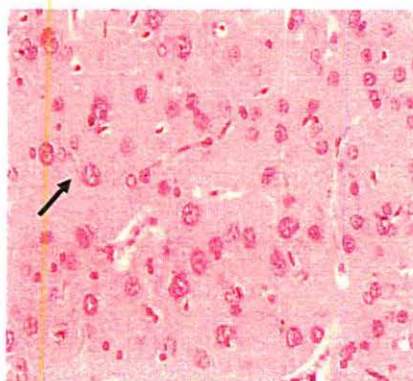
a)



b)

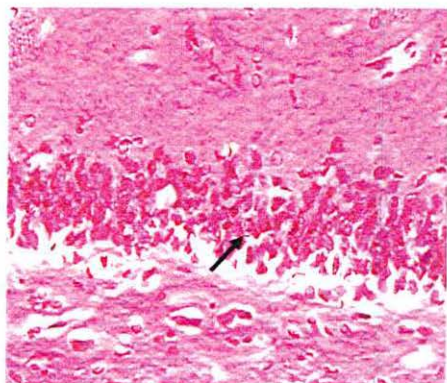


c)

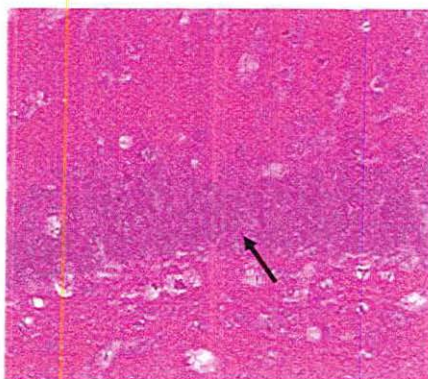


d)

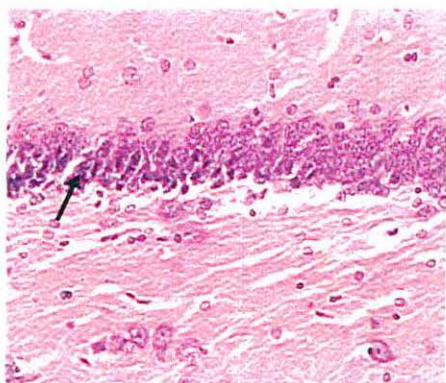
Figura 12. Cortes correspondientes al área de corteza estriada en los estratos III y IV, de los grupos tratados intracranalmente a) esparteina, b) control y los grupos tratados intraperitonealmente c) esparteina, d) control; en los grupos controles las flechas indican neuronas en estado normal con gliosis por efecto de la canulación, b) ; en los grupos esparteina las flechas indican neuronas eosinofílicas. Tinción con HE. Aumento 20x, la barra señala 30 μ m.



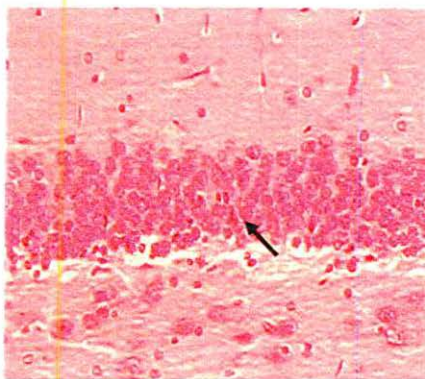
a)



b)



c)



d)

Figura 13. Cortes coronales correspondientes al área de Hipocampo, giro dentado de los grupos tratados intracranealmente a) esparteina, b) control y los grupos tratados intraperitonealmente c) esparteina, d) control; las flechas en los grupos control indican neuronas normales; en los grupos esparteina, las flechas indican neuronas eosinofílicas. Tinción con HE. Aumento 20x, la barra señala 30 μ m.

DISCUSIÓN

La esparteína es un alcaloide quinolizidínico que ha sido utilizado en la industria farmacéutica como medicamento oxitóxico antiarrítmico y como fungizida durante muchos años. El medicamento cayó en desuso por sus efectos secundarios consistente en manifestaciones cardiovasculares (arritmia, taquicardia), neurológicas (debilidad, astenia, visión borrosa y descoordinación) y síntomas gastrointestinales (náuseas y vomito). Estos trastornos se presentaban en 10 % de los pacientes que la consumían, esto debido a su incapacidad de metabolizarla (*Schmeller, 1988*). De manera paralela se ha descrito que el uso crónico de esparteína afecta las motoneuronas en humanos (*Márquez y col., 1999*).

Por sus altos efectos neurotóxicos la esparteína es uno de los alcaloides más tóxicos del grupo de alcaloides quinolizidínicos (AQ) (*Schmeller y col., 1988*). En trabajos anteriores se han reportado los efectos de los extractos crudos de AQ (*Lupinus montanus* y *Lupinus reflexus*, especies que contienen esparteína como AQ mayoritario). Los hallazgos en estos trabajos reportaron daños en estructuras cerebrales como hipocampo y corteza cerebral, parte de las mismas estructuras a las encontradas con daño en este estudio. Asimismo otros estudios relacionados con los efectos causados por los alcaloides de *lupinus*, son similares a los hallazgos encontrados en el presente trabajo; por ejemplo, Schmitt (1980), Lechat (1978), Cohen (1981), Pierié y Kirkiacharian (1986) describieron los efectos de la esparteína en el Sistema Nervioso Autónomo, tales efectos fueron sedativos a dosis menores a la DL_0 (dosis mínima no letal) y efectos antimuscarínicos a dosis cercanas a DL_{100} siendo probablemente la consecuencia del bloqueo ganglionar. Otros estudios, como el realizado por Pothier, Cheav y Galand (1998) describen efectos tóxicos en el ratón; como reducción en la actividad locomotora y respiratoria, excitación y signos de intoxicación muy similares a los encontrados.

Los resultados obtenidos sobre la neurotoxicidad que produce la esparteína en el SNC, puede considerarse que ocurren mediante el mecanismo de acción que han sugerido algunos autores y que consiste en inhibir los canales de Na^+ o K^+ de la membrana neuronal, lo que modifica el transporte iónico a través de su membrana

(Schmeller y Wink; 1998). Sin embargo, el mecanismo de acción de la esparteína a nivel de sistema nervioso central es aún incierto ya que los datos obtenidos en el presente estudio muestran que el daño fue selectivo a cierto tipo de neuronas y que por el momento no se puede describir que característica química o funcional comparten estos grupos neuronales. A nivel del SNP, los estudios han mostrado que la esparteína activa el receptor acetilcolínico de tipo muscarínico atribuyéndole propiedades ganglioplégicas (Ajid y col; 1988).

Los hallazgos encontrados, por medio de observación microscopía de los cortes histológicos, nos indican que la esparteína produce daño severo en SNC. Después de haber sometido los animales al tratamiento intraperitoneal o intracraneal, las preparaciones histológicas del tejido nervioso, teñidas con Hematoxilina y Eosina mostraron datos sobre la extensión y las características morfológicas del daño causado por la esparteína. Las zonas afectadas por la esparteína (corteza frontal, frontoparietal y estriada, zonas CA1, CA4 y giro dentado en hipocampo, área olfatoria, área amigdalea y cerebelo) presentaron una importante extensión de daño. Aunque cabe señalar que los daños observados en la corteza estriada, solo se observaron en el grupo canulado, esto debido a la presencia de la cánula. A pesar de esto, solo se representaron pequeñas variaciones entre las dos vías de tratamiento. Lo anterior resulto muy similar a los estudios realizados con la utilización de extractos de alcaloides de diferentes especies de lupinus, en estos trabajos se mostró la presencia de células rojas y alteraciones en la membrana nuclear y celular con hinchamiento en corteza frontal, frontoparietal y estriada, hipocampo y área olfatoria en el cerebro de la rata (Asencio, 2000, Nolasco y col., 2002).

Al analizar si existe una relación entre el daño provocado por la esparteína y los signos clínicos manifestado por los animales puede decirse lo siguiente; las anomalías y deficiencia en el movimiento pueden tener relación con el daño observado en corteza frontal y frontoparietal sitios donde se encuentra el área motora; la desorientación y pérdida del equilibrio pudo haber sido producida por el daño en cerebelo, ya que éste funciona junto con otras áreas del cerebro para accionar una secuencia de actividades que modulan el equilibrio; el hipocampo y el área amigdalea estructuras importantes del sistema límbico, son zonas donde se

llevan acabo los procesos de la conducta emocional, Sin embargo, debido a que en este estudio no se realizaron pruebas de conducta no podemos determinar si se vieron afectadas las funciones en que participan. Así mismo el área olfatoria no fue posible relacionarla a algún déficit olfatorio de los animales con la zona y la actividad cerebral que realiza.

Con relación a la sensibilidad mostrada por ciertas estructuras cerebrales a la acción de tóxicos, otros estudios relacionados con neurotoxicidad han mostrado que las células piramidales y granulares, así como las células de Purkinje son los tipos neuronales más sensibles a procesos de intoxicación aguda con cobre (*Adogwa y col., 1999*)

En general el daño causado por la esparteína por ambos tipos de administración descritos en este estudio provee una sólida base para estudios más detallados en futuras investigaciones relacionadas con la neurotoxicidad de éste alcaloide.

Por ultimo se puede mencionar que la presencia de células rojas en el cerebelo de cortes del grupo control canulado, pueda deberse a un daño indirecto provocado por el proceso de la canulación, ya que existe una importante conexión entre neuronas de la corteza estriada con células de Purkinje y estas ultimas pudieron afectarse por la pérdida de esta conexión, ya que es conocido que una neurona deaferentada puede iniciar un proceso degenerativo (*Becher, 2003*) además de la conexión con otras zonas que también fueron afectadas en menor proporción. Mientras que la presencia de células rojas presentes en cerebelo de los animales control intraperitoneal no puede explicarse.

CONCLUSIONES

1. Los principales hallazgos anatomopatológicos por daño de esparteina fueron la degeneración neuronal manifestada por eosinofilia, cavitación y vacualización.
2. Las principales zonas dañadas en el cerebro de la rata fueron corteza frontal, frontoparietal, estriada, CA1, CA4, giro dentado (hipocampo), células de Purkinje en cerebelo, área amigdalea y área olfatoria.
3. La cuantificación de células rojas en las zonas estudiadas mostró una magnitud de daño muy severo, ya que en todas las zonas cerebrales analizadas se encontró un número significativo de células con daño por la acción de la esparteina.

BIBLIOGRAFIA

1. **Adogwa A. O., Alleyne T. y Mohammed A.** Degenerative changes in the cerebral cortex in swayback disease lambs., Faculty of Medical Sciences, University of West Indies, St. Augustine, Trinidad, *Alzheimer's Disease Reviews.*, 4:19-22 (1999).
2. **Agid, Y., Pertuiset., B. Dubois.** Motoneuron disease as manifestation of lupin seed toxicity, *Lancet*, 351:1347 (1988).
3. **Antúnez L.L.** Anatomía funcional del sistema nervioso, UTEHA, Noriega Editores, México D.F., pp.38-40, 249.276, 525-555 (1997).
4. **Ardila R.** Psicología fisiológica, Editorial Trillas, México, D.F., pp.40-52 (2001).
5. **Ascencio M.J.** Efectos tóxicos de los alcaloides quinolizidinicos de *Lupin* (fabacea) sobre el sistema nervioso central de la rata, Tesis (2000).
6. **Ballester D., Yañez E., García R., Erazo S., Lopez F., Haardt E., Correjo S., Lopez A., Pinkniak J. and Chichester C.** Chemical composition, nutritive value, and toxicological evaluation of two species of sweet lupine (*Lupinus albus* and *Lupinus luteus*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 28:721-405 (1980).
7. **Bellido L. y Fuentes M.** El Altramuz, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Cordoba, España., pp.48-78(1991).
8. **Bednarczyk, M., Karasinki, D., Mazanowski, A., Gulewicz, K.** Preliminary observations on the influence of alkaloids present in the seed extract of lupine (*L. angustifolius*) on the embryogenesis and selected physiological indicators of duck embryonic blood, *Arch Geflügelk*, 51 : 185-189 (1987).
9. **Chaix Dumaris.** Sparteine Sulfate Lavoiser., *Jo de L'AMM*, 750, 10 rue de la Croix, Paris, (1962).
10. **Cheeke P.R.** Endogenous toxins and mycotoxins infarge grasses and their effects on livestock., *Journal of animal science*, 73:909-18 (1995).
11. **Cohen Y.** Abrégé de Pharmacologie. Ed. Masson. Paris pp. 217-218 (1981).
12. **Corraz G., Corraz J.** Pharmacodynamie speciale., Ellipses., Paris., 3 : 41(1985).

13. **Díaz J., Durruty P., Tapia JC.** Efectos de una fibra dietaria (salvado de lupino dulce) en el tratamiento de la diabetes no insulino dependiente. *Rev Med Chile* 118:24-32 (1990).
14. **De la Cuadra C., Tello J.C., Muzquiz M., Calvo R.** Poder Fungicida «In Vitro» de Esparteína y Gramina, Alcaloides del Lupino Amargo. *Stidia Botánica*, 13: 99-101 (1994).
15. **Domínguez X.A.** Métodos de investigación fitoquímica., Ed. Centro regional de ayuda técnica., Agencia para el desarrollo internacional., Buenos Aires, Argentina., pp.211-227 (1973).
16. **Faucon G., Ollagnier M.** Vasodilatateurs. In Giroud; *Pharmacologic Clinique; Expansion cinétique Français*, 1: 503-504 (1987)
17. **García A., García L., Ruiz L., Bañuelos P., Ascencio M.** Fungizide wirkung von alkaloidextrakten aus mexikanischen Lupinen. Memorias del noveno congreso internacional de Lupinus del 20 al 24 de Junio. Klink Müritz. Alemania (1999).
18. **Gladstone J. S.** Lupinus of the Mediterranean region and Africa., West, Aust., Department of Agriculture Technology Bull., 56:1-48 (1974).
19. **Haq N.** Lupinus (Lupinus species) In: under utilized crops. Pulses and vegetablebles edited by William J., T. Published by Champan and Hall., London, U.K., (1993).
20. **Harbone B. Naslund U., Eriksson A., Virtanene I., Thornell L.E.,** Comparison of thiphenyltetrazolium chloride (TTC) staining versus detection of fibronectina in experimental myocardial infarction., *Journal of Histochemistry*, 4:246-273 (1993).
21. **Hagerman A.E., Butler L.G., Rosenthal M.R.** Herbivores: Their interactions with Secondary Plant Metabolites. The Chemical Participants., Academy press, New York., Vol I: pp. 355-388 (1991).
22. **James L.F. y Molineux R. J.** Impactin poisonous plants on the livestock industry., *Journal of Range Manoye*, 45:3-8 (1992).

23. **Keeler R.F.** Lupin alkaloids from teratogenic and nonteratogenic lupines III. Identification of anagryne as the probable teratogen by feeding trials, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1:887-898 (1976).
24. **Kinghorn A.D., Balandrin M.F.** 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. Vol. 2 pp. 105-148 (1984).
25. **Köper S., Wink M., Fink H.A.** Differential effects of alkaloids on sodium currents of isolated single skeletal muscle fibers. *FEBS Letters*, 436: 105-148 (1998).
26. **Laborde A.** Riesgo de intoxicación para el hombre., Universidad de la Republica Oriental del Uruguay., Montevideo, pp.77 (1994).
27. **Lechat P.** Pharmacology Medical. Masson, Paris. P. 570 (1978).
28. **Li F., Irie K., Anwer MS., Fisher M.** Delayed triphenyltetrazolium chloride staining remains useful for evaluating cerebral infarct volumen in a rat stroke model., *Journal Cerebral Blood Flow Metab.*(1998).
29. **Lovell K. L., Jones M.Z.,** Cytopathology – Pathological changes in cell components, Pathology review carousel 11., Neuropathology II., Department of pathology., Michigan State University., East fee Hall east Lansing., (2003).
30. **Lunderberg P. y Palo R.T.** Resource use, plant defenses, and optimal digestion in ruminants., *Oilos*, 68:224-228 (1993).
31. **Marquez R. L., Gutierrez. Rave M., Miranda Fl.** Acute poisoning by lupine seed debittering water., *Vet Hum Toxicol.* 33: 265-267 (1999).
32. **Makkar H.P.S. y Sing B.** Tanin Levels in leaves of some oak species at different stages of maturity., *Journal of Science, Food and Agricultural*, 54:513-519 (1991).
33. **Morzov G., Romasenko V.** Neuropatología y psiquiatría, Editorial Paz, Moscú, pp. 29-41 (1985).
34. **Mukisiart A.E., Phillip E.L., Mitaru N.B.** The effect of feeding diets containing intact or partially detoxified lupin on voluntary intake and milk production by Friesian dairy cows. *Journal of Animal Science*, 60:169-175 (1995).

35. **Muzquiz M., Cuadra C., Cuadrado C., Burbano, Calvo R.** Herbicide-like effect of *Lupinus* alkaloids. *Journal of Industrial Crops and Products*, 2:273-280 (1994).
36. **Nolasco R.G., Bañuelos P.J., Rosales C.M., Peregrina S.J., Albarrán R.E., Gómez R.C., Sarabia E.R.** Evaluación y cuantificación de células rojas en corteza cerebral de rata provocada por intoxicación con alcaloides de *Lupinus*, Departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad de Guadalajara, XX Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Universidad Autónoma de Nuevo León Vol. IV, p. 569 (2002).
37. **Panter K.E y Keller R.F.** Quinolizidine and piperidine alkaloids teratogenic from poisonous plants and their mechanism of action in animal., *Congenital anomalies*, 9(1):33-40 (1993).
38. **Petrie R.H., Danilo P.** Maternal and fetal effects of uterine stimulants and relaxants. *Digestion Gynecol Obstet.*, Columbia Univ., Coll Physcns. Surgeons, Columbia-Presbyt. Med. Cent., New York, N.Y., USA, 3 (2): 111-7 (1981).
39. **Piéri F. Kirkiacharian S.** Pharmacologie et Thérapeutique., Ellipses. Paris, P. 185 (1986).
40. **Pothier J., Cheav S.L., Galand N.** A comparative study of the effects of sparteine, and lupin extract on the central nervous system of the mouse. *Journal of Pharm Pharmacology*, 50:949-954 (1998).
41. **Poulton J.E.** Congenesis in plants, *Plant Physiol*, 94:401-405 (1990).
42. **Rhoades D.F.** Evolution of plant chemical defense against herbivores., Chapter 1 in Rosenthal, G.A and Janzen D.A.(eds). *Herbivores; Their Interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, N.Y., pp 4-55(1979).
43. **Roberts M., Wink M.** Alkaloids-Biochemistry., Ecology and medical application *Pharmacol.*, New York., Estados Unidos de América., Pp.32-453(1998).
44. **Ruiz M.A., Sotelo A.** Chemical Composition, Nutritive Value, and Toxicology Evaluation on Mexican Wild *Lupinus*., *J. Agric. Food Chem.*, 49(11):4 (2001).
45. **Schauf C.L., Colton C.A., Colton J.S., Davis F.A.** Aminopyridines and sparteine as inhibitors of membrane potassium conductance: effects on Mycola Giant

- axons and the lobster neuromuscular junction. *Journal of Pharmacology Experimental*, 197:414-425 (1976).
46. **Schmitt H.** Elements of Pharmacology, Ed. Flammarion. Paris, 365 (1980).
47. **Schmeller T., Saurewein M., Sporer F., Wink M.** Binding of quinolizidine alkaloids to nicotinic muscarinic acetylcholine receptors, *Journal of Natural Products*, 9: 13116-1319 (1994).
48. **Strasburger E., Noll F., Schenk H., Shimper A.F.W.** Tratado de botanica., Ed. Marin Barcelona, (1994).
49. **Strublet O.** Experimental studies on therapeutic modification of sparteine poisoning, *Arzneimittelforschung*, 32:1287-92 (1982).
50. **Wink M. and Hartmann T.** Localization of the enzymes of quinolizidine alkaloid biosynthesis in leaf chloroplasts of *Lupinus Polyphyllus*, *Plant Physiol*, 70: 74-77 (1982).
51. **Tyski S., Markiewicz M., Gulewicz K., Twordowski T.** The effect of lupin alkaloids and ethanol extracts from seeds of *Lupinus angustifolius* on selected bacterial strains, *Journal Plant Physiol*, 1333:240-242 (1998).
52. **Wink M.** Metabolism of quinolizidine alkaloids in plants and cell suspension cultures, en: Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Ed. Reinhard, E. Spinger. Heidelberg. pp. 107-116 (1985).
53. **Wink M.** Plant breeding: Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl- Genet* 75:228-223 (1988).
54. **Wink M. and Witte L.,** Storage of quinolizidine alkaloids in *Macrosphym albifrons* and *Aphis genistaea* (Homoptera: Aphididae), *Entomol. Gener.*, 15:237-254 (1991).
55. **Wink M.** Role of quinolizidine alkaloids in plant-insect interactions. *Focus and insect plant interactions*, 4:131-166 (1992a).
56. **Wink M.** *Lupinus mutabilis*: Composition and potencial applications of quinolizidine alkaloids. En: Agrimed Res. Programme: *Lupinus mutabilis*: its adaptation and production Under European pedoclimatic conditions. *EUR*, 14102:47-62 (1992b).

57. **Wink M.** Allelochemical properties and the raison detre of alkaloids. The Alkaloids. Ed. G Cordell, 43: 1-117 (1993a).
58. **Wink M.** Quinolizidine alkaloids. In Methods of plant Biochemistry, Ed. Academic Press., 8: 197-239 (1993b).
59. **Wink M.** In: Methods of Plant Biochemistry, Ed. Academic Press. Boca Raton., 8:197-239 (1993).
60. **Wink M.** Meibner C.,Witte L. Patterns of Quinolizidine Alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. Phytochemistry. 38:139-153 (1995).
61. **Wink M.** and Witte L., Quinolizidine alkaloids as nitrogen source for lupin seedlings and cell cultures, *Z. Naturforsch.*, 40:767-775 (1985).
62. **Yovo K.S.** These Doct. 3émecycle., Pharmacochimie., pp.47-58(1982).
63. **Yovo K.S., Huget F., Pothier J., Durand M., Breteau M., Narcisse G.** Comparative pharmacological study of sparteine and its ketonic derivate lupanine from seeds of *Lupinus albus*, *Planta Medica.*, Pp.420-424(1984).