

2008A-2012B

208207828

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS



Determinación del efecto genotóxico de extractos totales alcaloideos de *Lupinus exaltatus* mediante la prueba de micronúcleos

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
JUAN CARLOS PIZANO ANDRADE

ZAPOPAN, JALISCO JULIO 2014


FORMA F

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **TESIS E INFORMES**, opción Tesis con el título: "**Determinación del efecto genotóxico de extractos totales alcaloideos de *Lupinus exaltatus* mediante la prueba de micronúcleos**" que realizó el/la pasante **Juan Carlos Pizano Andrade** con número de código **208207828** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Agujas, Nextipac, Zapopa, Jal., 23 de Junio del 2014


 M.C. Pedro Macedonio
 García López
 Director/a del trabajo


 Dra. Belinda Claudia
 Gómez Meda
 Asesor(es)





Nombre completo de los Síndicos asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Jacinto Barvelo Murda		13-06-14
Carmon Cecilia Gómez Padilla		13-06-14
Mario Alberto Ruiz López		13-06-14
Supl. Juan Francisco Zamora N.		13-06-14

Dedicatorias y agradecimientos

Al triunfo de la verdad y al progreso del género humano.

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañándome en todo el tiempo que duro este proyecto.

A todas estas personas solo me resta decirles gracias.

Ustedes saben quienes son.....

Índice de contenido

Índice de contenido.....	4
Índice de cuadros.....	7
Índice de figuras.....	8
1. Introducción.....	9
2. Antecedentes.....	10
2.1 Leguminosas.....	10
3. Género <i>Lupinus</i>	10
3.1. Reseña histórica de los lupinos.....	10
3.2 Cultivo.....	11
3.3 Taxonomía.....	12
3.4 Morfología.....	13
3.5 Lupinos silvestres.....	13
3.6 <i>Lupinus exaltatus</i>	14
4. Semillas de lupinos.....	14
4.1 Análisis químico.....	14
5. Alcaloides.....	16
5.1 Definición.....	16
5.2 Distribución.....	16
5.3 Clasificación.....	16
6. Alcaloides de lupinos silvestres.....	23
6.1 Biosíntesis de alcaloides quinolizidínicos (AQ) en lupinos.....	24
6.2 Toxicidad de los alcaloides quinolizidínicos.....	25
6.3 Actividad biológica de los AQ.....	27
7. Alcaloide quinolizidínicos de <i>Lupinus exaltatus</i>	27
8. Genotoxicidad y citotoxicidad.....	28
8.1 Prueba de micronúcleos (MN).....	28

8.2 Micronúcleos.....	28
9. Bioindicadores	29
10. Ciclofosfamida.....	30
11. Planteamiento del problema.....	31
12. Justificación.....	32
13. Hipótesis	33
14. Objetivos	34
14.1 Objetivo general	34
14.2 Objetivos específicos.....	34
15. Materiales y métodos	35
15.1 Tipo de estudio:.....	35
15.2 Sede:	35
15.3 Universo de estudio:	35
15.4 Criterios de inclusión:.....	35
15.5 Criterios de no inclusión:.....	36
15.6 Colecta	36
15.7 Obtención de harinas	36
15.8 Extractos totales de alcaloides.....	37
15.9 Identificación y cuantificación de alcaloides por cromatografía de gases.....	37
15.10 Formación de grupos y administración de tratamientos.....	38
15.11 Elaboración de Frotis.....	39
15.12 Conteo de micronúcleos.	39
15.12 Análisis estadístico	40
16. Resultados	41
16.1 Alcaloides presentes en el extracto alcaloideo de <i>L. exaltatus</i>	41
16.2 Prueba de genotoxicidad	42
16.2.1 Análisis intragrupos en eritrocitos micronucleados.....	43

16.2.2 Análisis intergrupos en eritrocitos micronucleados.....	43
16.2.3 Análisis intragrupos en eritrocitos policromáticos	46
16.2.4 Análisis intergrupos en eritrocitos policromáticos	47
17. Discusión	49
18. Conclusiones	51
Bibliografía.....	52

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica.....	12
Cuadro 2. Lista de aminoácidos presentes en semillas de <i>Lupinus exaltatus</i>	15
Cuadro 3. Clasificación de los alcaloides de acuerdo a su distribución botánica	18
Cuadro 4. Clasificación de acuerdo a su origen biosintético.....	20
Cuadro 5. Muestra de afinidad de AQ (IC50) a receptores aceticolinérgicos, nicotínicos y muscarínicos. Los valores IC50 (Índice de concentración) indican la concentración de un AQ en particular que muestra el 50% de especificidad de un ligando marcado radiactivamente (Schmeller et al., 1994).....	26
Cuadro 6. Composición de alcaloides en el extracto alcaloideo de semillas de <i>L exaltatus</i>	42
Cuadro 7. Frecuencia de eritrocitos micronucleados, error estándar por día y grupo	42
Cuadro 8. Frecuencia de eritrocitos policromáticos, error estándar por día y grupo	46

Índice de figuras

Figura 1. Planta del género <i>Lupinus</i>	13
Figura 2. Clasificación de alcaloides a partir de diferentes precursores	17
Figura 3. Clasificación de los alcaloides por sus propiedades farmacológicas	18
Figura 4. Núcleos de alcaloides	23
Figura 5. Estructura química de los alcaloides presentes en la mayoría de las especies de lupinos	24
Figura 6. Estructura central de AQ	25
Figura 7. Obtención de extractos alcaloideos totales	37
Figura 8. Administración de dosis vía oral por medio de cánula	38
Figura 9. Frotis sanguíneos	39
Figura 10. Eritrocitos de sangre periférica. Tinción naranja de acridina, 100x	40
Figura 12. Número de EMN observados por día en un periodo de 5 días	43
Figura 13. Comparación del número de EMN entre el control negativo vs control positivo	44
Figura 14. Comparación del número del EMN entre el Control Negativo vs Extracto	45
Figura 15. Comparación del número del EMN entre el Control Positivo vs Extracto	45
Figura 16. Frecuencia de EPC/1000 ET en 5 días	46
Figura 17. Comparación del número de EPC entre el control negativo vs control	47
Figura 18. Comparación del número de EPC entre el control negativo vs Ext-A	48
Figura 19. Comparación del número de EPC entre el control positivo vs Ext-A	48

1. Introducción

Las especies del género *Lupinus* perteneciente a la familia Leguminosae han sido cultivadas durante siglos en amplias zonas geográficas del mundo (Gladstones, 1974). Su empleo en la alimentación, como fuente de proteína, compuestos bioactivos y mejorador de suelos, debido a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico por la asociación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium* ha sido ampliamente reconocido.

Actualmente se han reportado más de 626 especies de lupinos en el mundo según *the plant list* (2013), de las cuales se han domesticado *L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius* y *L. mutabilis*. De las especies silvestres distribuidas en el mundo, se han reportado 80 especies para México distribuidas en 26 estados de los 32 que conforman el país. En Jalisco se han reportado 15 especies distribuidas en el 70% de los municipios del estado (McVaugh, 1987; Ruiz, 1994).

Las semillas de lupinos domesticados y silvestres poseen elevado contenido de proteínas, aceite, fibra y carbohidratos (Bedillo y García, 1991). Sin embargo, los alcaloides quinolizidínicos de la planta que constituyen una defensa química eficaz contra sus depredadores como bacterias, hongos, insectos, y mamíferos herbívoros (Agid et al., 1988) son una limitante para su empleo en la alimentación (Ruiz, 1994).

Se han reportados más de 100 alcaloides quinolizidínicos presentes en las especies silvestres de los lupinos (Múzquiz et al., 1982). Estos compuestos poseen propiedades toxicológicas y farmacológicas como: neurotóxicos, antipiréticos, antiinflamatorios, depresores del sistema nervioso central (SNC) y antiaritmico cardíaco. Por ejemplo, la esparteína se ha utilizado como antiaritmico y oxitócico mientras existen reportes que indican la actividad insulino secretora de la lupanina (García et al., 2004). La utilización potencial de estos compuestos como fármacos (Schemeller et al., 1994) hace indispensable realizar estudios para evaluar los efectos secundarios como la genotoxicidad.

2. Antecedentes

2.1 Leguminosas

Las plantas de la familia Leguminosae también llamadas fabáceas (Fabaceae) pertenecen al orden Fabales, que incluyen arbustos hierbas perennes o anuales, en general se reconocen por su fruto en forma de legumbre (vaina en donde están contenidas las semillas) y hojas compuestas estipuladas. Actualmente se han reportado 19,400 especies de leguminosas distribuidas mundialmente, agrupadas en 730 géneros.

Las plantas de esta familia tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, el cual se incorpora al suelo y es aprovechado por otros cultivos, en un sistema de producción en rotación. Además sus semillas contienen un porcentaje elevado de proteína, por lo cual son ampliamente utilizadas en la alimentación. También los efectos biológicos que poseen se han reportado ampliamente en la literatura científica. La especie más estudiada es la soya (*Glycine max*), de la cual se obtienen flavonoides empleados como fitoestrogenos, proteínas con propiedades hipocolesteremiantes y antihipertensivas. Otras leguminosas, entre ellas las especies del género *Lupinus* comparten las propiedades descritas para la soya, de tal forma que sus alcaloides y proteínas poseen propiedades hipoglucemiantes (Bobkiewicz et al., 2007).

3. Género *Lupinus*

3.1. Reseña histórica de los lupinos

El origen de la palabra “Lupino” es desconocido, parece derivar de la palabra latina *Lupus* que significa lobo, probablemente porque la planta crecía en áreas geográficas donde habitaban los lobos (Glandstones, 1974). En griego, el nombre de los lupinos fue *thermos*, probablemente atribuido al sabor amargo de las semillas, es posible que todos los nombres por los alrededores del mediterráneo surjan de este vocablo, termis en Egipto, turmus en Arabia Saudita, altramuz en España y turmusa en Siria y Palestina.

Teofrasto (372-299 a de c.), filósofo griego discípulo de Aristóteles escribió extensamente sobre *Lupinus albus* en su tratado de historia natural de las plantas, en el cual menciona el tipo de

suelo que requería y la forma de cultivarlo. En Roma y Grecia el cultivo de lupino “blanco” era muy común y sus semillas artificialmente endulzadas fueron utilizadas en la alimentación del ganado y moderadamente en humanos. Además en la antigua roma fungió como cuenta o moneda de baja denominación cuyo nombre fue *Nummus Lupinus* (Gladstones, 1974).

Los antecesores modernos del cultivo de lupinos amargos pudieron haber iniciado en el norte de Europa en 1791 cuando el rey de Prusia Federico el Grande envió a manera de experimento agronómico unas semillas de *L. albus* de Italia con el fin de mejorar los suelos pobres de Alemania del norte. El cultivo persistió durante 6 meses, sin embargo no fue exitoso debido a la maduración tardía de las plantas.

En 1841 un granjero llamado Brochard cultivó exitosamente *L. luteus*, llamado lupino “amarillo”, el cual se adaptó mejor que el *L. albus* en esta zona de Alemania. El cultivo de este lupino se convirtió en una parte esencial de la agricultura en la zona báltica, siendo usado en suelos ácidos y arenosos (Gladstones, 1998).

En América, *L. mutabilis* se cultivó en las tierras altas andinas de Sudamérica y jugó un papel importante en la alimentación de los pueblos andinos. Durante el imperio Inca esta planta alcanzó su mayor auge, el cultivo se expandió desde Venezuela hasta el norte de Argentina. Hoy día, el agricultor andino lo utiliza regularmente en la rotación de cultivos con papa y cebada (Gross y Baer, 1977).

En estos lugares, *L. mutabilis* también fue usado con fines religiosos en ritos, festivales y con fines medicinales en enfermedades del corazón, reumatismo, malaria y parasitismo. Con la llegada de los españoles se provocó la pérdida de la agricultura tradicional y el interés agronómico por esta planta se retomó hace un par de décadas (Gladstones, 1974).

3.2 Cultivo

Las especies *L. albus* y *L. mutabilis* ya eran cultivadas por los Romanos e Incas respectivamente desde épocas antiguas. En la actualidad estas especies y otras como *L. angustifolius*, han sido domesticadas y son consideradas cultivos de invierno. Se desarrollan mejor en suelos arenosos con pH ácido, son principalmente utilizados como fuente de grano para la alimentación humana y animal. Los pobladores de la zona de Cuzco, Perú, al igual que sus ancestros (Incas), siguen consumiendo las semillas de *L. mutabilis* previa eliminación de los alcaloides, lo utilizan cocido y molido en un platillo llamado “segundo de tarwi”. Actualmente *Lupinus albus*, y *Lupinus angustifolius*, son la principal fuente de proteína vegetal empleada en

la alimentación animal en Australia. Además es importante señalar que el cultivo de *Lupinus* permite la eficiente fijación de nitrógeno y movilización de fósforo en el suelo, lo que contribuye a su conservación. Una característica importante es que el cultivo de lupinos presenta resistencia a heladas. Además las semillas tienen aporte energético-proteico, valioso, son fáciles de cosechar, no compiten con otros cultivos y además presentan buena adaptación en suelos no aptos para otros cultivos, por su raíz profundizadora, es más resistente a la sequía que otras leguminosas (Von Baer, 1983). Es importante señalar que los lupinos, al igual que otras leguminosas, almacenan en sus tejidos y semillas proteínas, carbohidratos, lípidos, minerales, oligosacáridos, fitatos y alcaloides entre otros (Muzquiz *et al.*, 1993).

3.3 Taxonomía

El género *Lupinus* pertenece a la familia de las leguminosas, en el Cuadro 1 se muestra la descripción taxonómica.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Faboideae
Tribu	Genisteae
Género	<i>Lupinus</i>

3.4 Morfología

Los lupinos, presentan un tallo erecto succulento, de entre 50 cm y 2 m de altura. Sus hojas son compuestas y sus flores agrupadas en inflorescencias racimosas (Figura 1). Los colores de los pétalos varían del blanco al azul intenso, predominan los tonos azules y rosados. Su fruto es una legumbre, con semillas achatadas en forma de esfera.

Según *The Plant List* (2013) este género tiene alrededor de 626 especies, distribuidas en América, el Mediterráneo y África. Ha sido cultivado y usado durante siglos, siendo empleado en la alimentación, así como en el mejoramiento de suelos (Gladstones, 1974).



Figura 1. Planta del género *Lupinus*

3.5 Lupinos silvestres

El género *Lupinus* (Genistae) agrupa más de 300 especies. No obstante, el número exacto es desconocido y la cantidad de nombres botánicos publicados es de más de 1700. Actualmente se han propuesto tres centros de origen del género: uno en la región Mediterránea y las tierras altas de África, y los otros dos en América; la región andina de Bolivia, Chile y Perú en Sudamérica y México en Norteamérica. En América las especies de lupinos se encuentran distribuidas desde la Patagonia hasta la región ártica (Gross, 1986; McVaugh, 1987).

En México, se han reportado más de 100 especies de lupinos, que incluyen arbustos anuales, perennes y raramente con más de 8 metros de altura como el *L. jaimehintoniana* (McVaugh, 1987). Los lupinos en México se localizan principalmente en la región de la Sierra Madre Occidental donde se une con el Eje Neo-volcánico Transversal. Esta zona es considerada el centro secundario más importante de diversificación de este tipo de plantas. Aunque solo 12 especies de lupinos se han reportado para el estado de Jalisco, los lupinos son un componente importante del bosque de pino-encino en el estado. Es importante señalar que varias especies de lupinos son conocidas por nombres vernáculos tales como “moco de guajolote”, “jilotillo”, “cantues”, “zapotillo” y “garbancillo”.

A continuación nos referiremos a una especie silvestre del estado de Jalisco que es *Lupinus exaltatus* por ser objeto de estudio de esta tesis.

3.6 *Lupinus exaltatus*

Es una especie anual o bianual, crece en claros de bosques de coníferas, a orillas de caminos o zonas de cultivo, entre los 1800 y 2200 metros sobre el nivel del mar, se distribuye en los estados de Jalisco, Morelos, Puebla, Estado de México, Michoacán, Colima y Guanajuato (McVaugh, 1987; Dunn 2001).

Es común encontrar esta especie en el sur de Jalisco, en la época de invierno, estación en la que escasean plantas silvestres que puedan ser usadas como material forrajero. Esta especie de lupinos contiene 23.5% de proteína en el follaje, siendo similar o superior a otras especies que se usan como forraje (Ruiz et al., 2002).

4. Semillas de lupinos

4.1 Análisis químico

Las semillas de lupinos contienen entre 36 % y 40 % de proteína, la mayoría de las proteínas son globulinas llamadas conglutinas, las cuales contienen en su mayoría 4 tipos de proteína conglutina α , conglutina β , conglutina γ y una proteína específica de los lupinos llamada conglutina δ (Blagrove y Gilespe, 1975). La lista de aminoácidos muestra que son deficientes en lisina, treonina y metionina (cuadro 2) (Gladstones, 1974).

Cuadro 2. Lista de aminoácidos presentes en semillas de *Lupinus exaltatus*

Aminoácidos	
Aminoácidos aromáticos ¹	Ácido aspártico
Isoleucina	Ácido glutámico
Leucina	Alanina
Lisina	Arginina
Aminoácidos asufrados ²	Glicina
Treonina	Histidina
Triptófano	Prolina
Valina	Serina

¹ Fenilalanina + tirosina, ²Metionina +cisteína

El contenido de carbohidratos solubles es de 40% a 50%, entre los que se encuentran la galactosa, arabinosa, ácido urónico, glucosa, manosa, xilosa y ramnosa. Mientras que las concentraciones de fibra cruda y aceite representan de 10 a 15%, y de 6% a 12% respectivamente. (Gladstones, 1974). En cuanto a los minerales presentes, en los lupinos se encuentran el calcio, magnesio, fósforo, potasio, sodio, azufre, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc, cobalto y selenio. También contienen oligosacáridos, fitatos y alcaloides considerados como antinutrientes (compuestos que interfieren con la absorción de nutrientes). La ajucosa, estaquiosa, verbacosa son oligosacáridos de los lupinos que causan flatulencia, mientras que los fitatos (hexafosfato de inositol) están relacionados con la formación de complejos minerales no biodisponibles. Los alcaloides quinolizidínicos (AQ) en las semillas de lupinos alcanzan concentraciones del 0.025% en las especies domesticadas y de 4% en los silvestres, que le confieren sabor amargo (Ruiz y Sotelo, 2001) y son causa de intoxicación en el ganado. Una de las alternativas para el aprovechamiento de lupinos silvestres, es la aplicación de procesos tecnológicos para la extracción de alcaloides y su aprovechamiento como subproductos útiles en la agricultura y farmacología (Stobiecki et al., 1992).

A continuación nos referiremos a los alcaloides de los lupinos por tratarse de un objeto de estudio en esta tesis.

5. Alcaloides

5.1 Definición

Según Pelletier (1983) un alcaloide es un compuesto cíclico que contiene nitrógeno en un estado de oxidación negativa, cuya distribución es limitada en organismos vivos.

5.2 Distribución

En el reino animal se ha reportado la presencia de alcaloides en artrópodos (Coleóptera, Miriópoda, Arácnida e Himenóptera), vertebrados (Amphibia, Dendrobatide) y animales marinos de los grupos Bryzoa y Ascidiáns (Roberts y Wink, 1998). También se encuentran presentes en hongos, algas y vegetales inferiores. Sin embargo, la principal fuente de alcaloides son las plantas superiores; en las dicotiledóneas se han reportado más alcaloides que en las monocotiledóneas (Domínguez, 1973).

5.3 Clasificación

La química de los átomos de nitrógeno permite cuatro grupos de compuestos nitrogenados en los alcaloides: (Roberts y Wink, 1998).

1.- Aminas secundarias y terciarias, son más o menos protónicas debido a lo cual tienen propiedades hidrofílicas a $\text{pH} < 7$ o en la mayoría de los casos son lipofílicas y no protónicas a $\text{pH} > 8$. Este es el tipo de alcaloide clásico.

2.- Compuestos amino cuaternarios: Son muy polares (Las cargas eléctricas forman un dipolo), cargados a todos a los valores de pH y por sus características tienen que ser aislados como sales.

3.- Compuestos amino neutros: Los que incluyen los alcaloides tipo amida

4.- N-óxidos, que son por lo general altamente solubles en agua y frecuentemente encontrados en muchas clases de alcaloides.

De acuerdo a la ruta metabólica empleada en la síntesis de los alcaloides estos se denominan

a) Alcaloides verdaderos; metabolitos secundarios que poseen un nitrógeno heterocíclico y su esqueleto de carbono proviene parcial o totalmente de un aminoácido proteico.

b) Seudo-alcaloides; metabolitos secundarios que poseen un nitrógeno, pero que no han sido sintetizados a partir de aminoácidos, sino que se forman por transferencia de nitrógeno en forma de amoniaco a un compuesto de origen terpénico, esteroide, policétido, monosacárido o a un ácido graso.

c) Protoalcaloides; son compuestos que no forman un sistema heterocíclico y se sintetizan a partir de un aminoácido proteico. Muchos de estos compuestos contienen un grupo amino o amida

d) Alcaloides imperfectos; que se derivan de bases púricas, y no precipitan con los reactivos específicos para alcaloides.

La Figura 2 muestra una síntesis de la clasificación de los alcaloides.

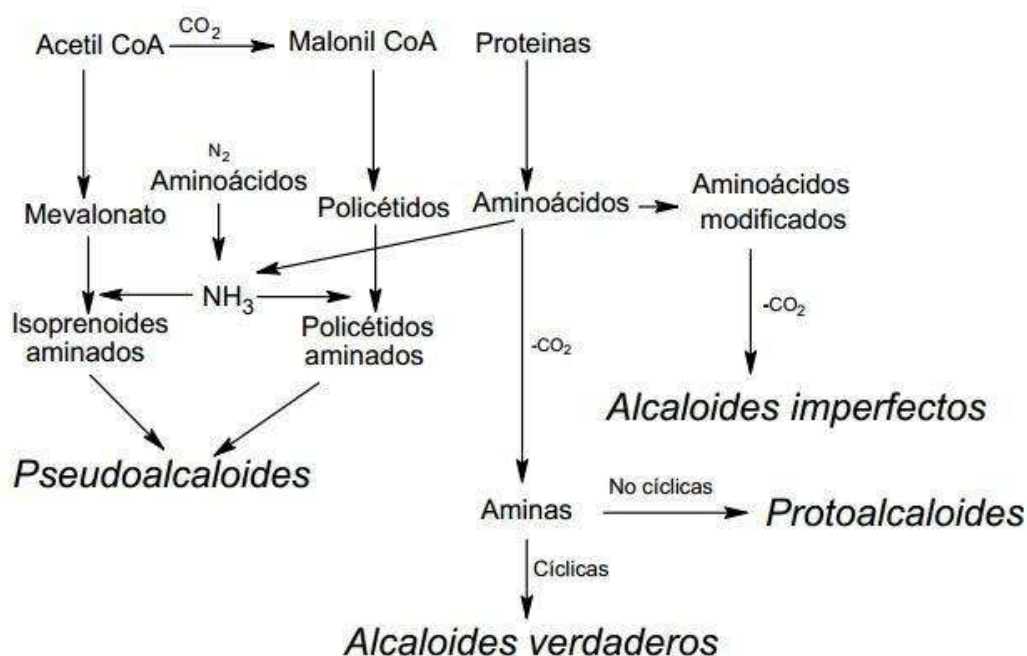


Figura 2. Clasificación de alcaloides a partir de diferentes precursores

Los alcaloides también se clasifican de acuerdo a sus propiedades farmacológicas (figura 3), distribución botánica (cuadro 3) y origen Biosintético (cuadro 4)

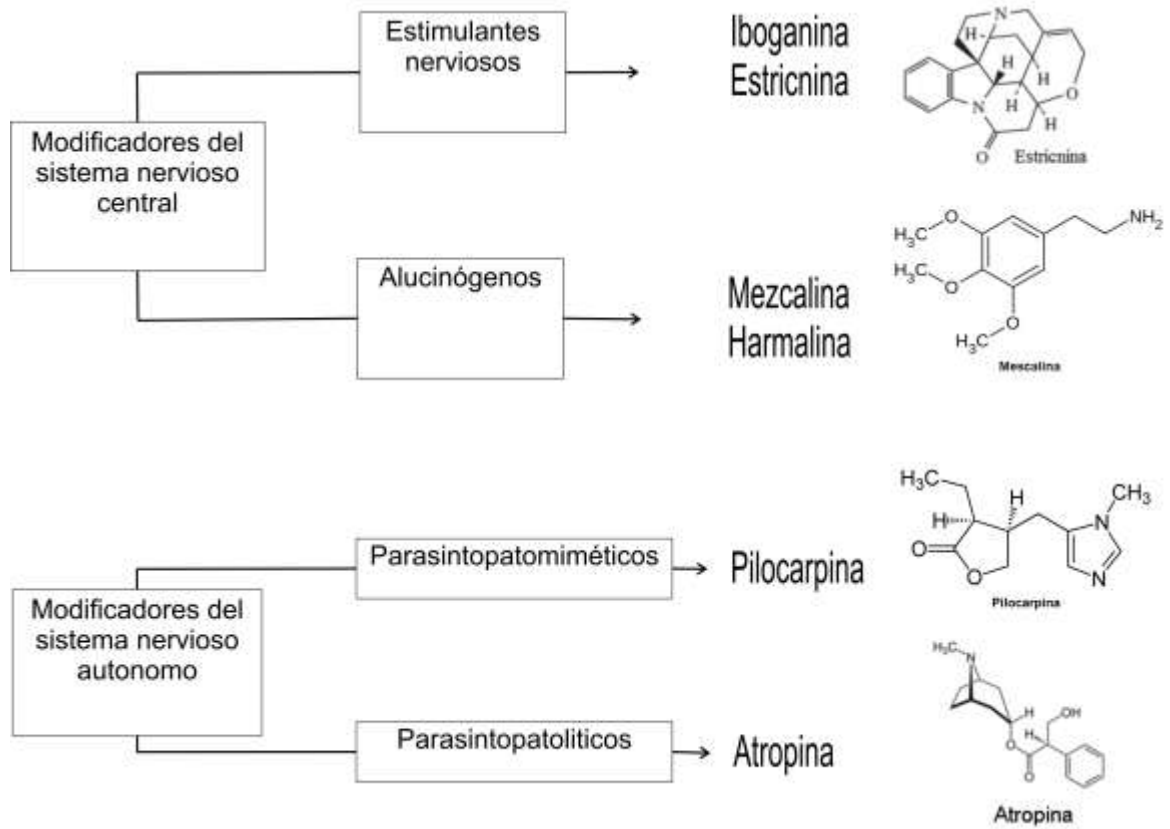
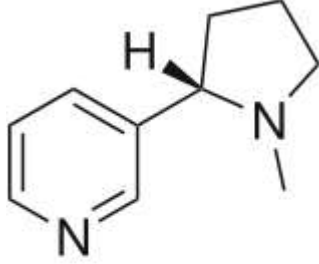
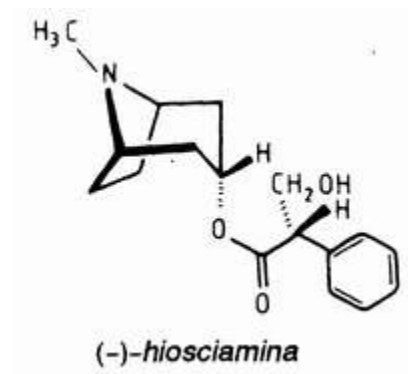
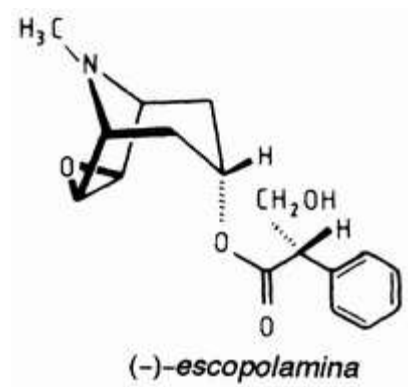
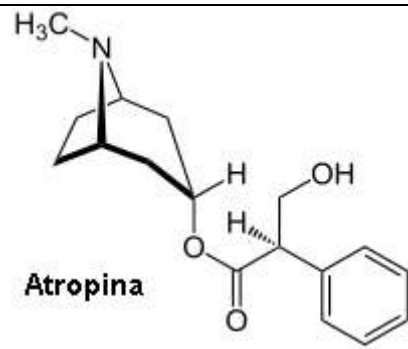


Figura 3. Clasificación de los alcaloides por sus propiedades farmacológicas

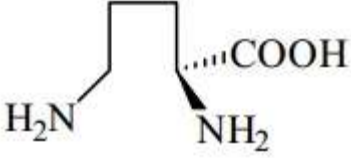
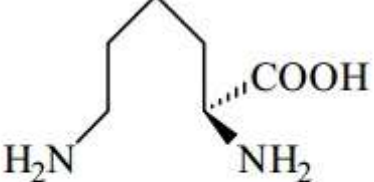
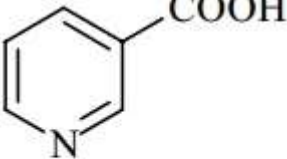
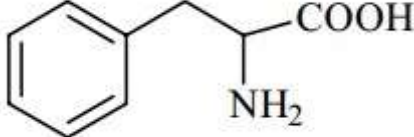
Cuadro 3. Clasificación de los alcaloides de acuerdo a su distribución botánica

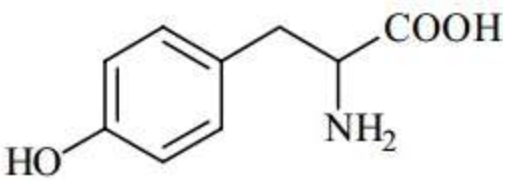
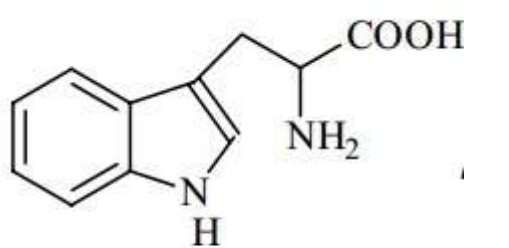
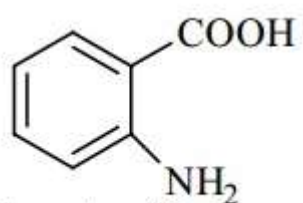
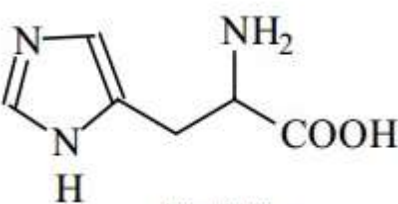
<ul style="list-style-type: none"> Alcaloides del tabaco: nicotina. 	 <p style="text-align: center;">Nicotina</p>
--	---

- Alcaloides del estramonio:
Atropina,
Escopolamina,
hiosciamina.

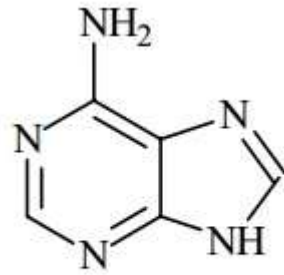


Cuadro 4. Clasificación de acuerdo a su origen biosintético

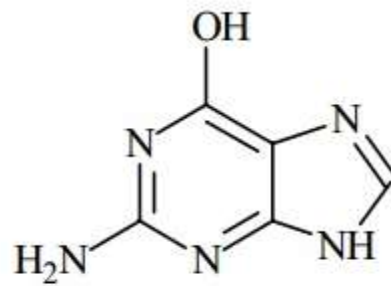
Alcaloides alifáticos	Aminoácidos o bases que forman alcaloides
Derivados de la ornitina (pirrolidinas, tropánicos, pirrozilidínicos).	 <p style="text-align: center;">ornitina</p>
Derivados de la lisina (piperidinas, quinolizidínicos).	 <p style="text-align: center;">lisina</p>
Alcaloides aromáticos	
Derivados del ácido nicotínico (piridinas).	 <p style="text-align: center;">ácido nicotínico</p>
Derivados de la fenilalanina y tirosina (isoquinoleínas).	 <p style="text-align: center;">Fenilalanina</p>

	 <p>tirosina</p>
Derivados del triptófano (indólicos, quinoleínas).	 <p>Triptófano</p>
Derivados del ácido antranílico (quinoleínas).	 <p>ácido antranílico</p>
Derivados de la histidina (imidazoles).	 <p>histidina</p>
Alcaloides de origen diverso	
Alcaloides terpénicos y esteroidales.	

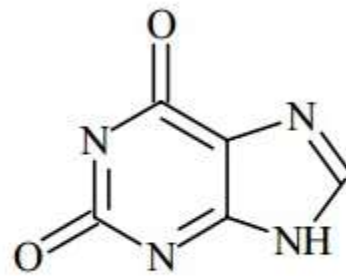
Alcaloides diversos (purinas,
macrociclos).



Adenina



guanina



xantina

En la figura 4 se muestran los núcleos básicos de los alcaloides sintetizados a partir de los aminoácidos y bases.

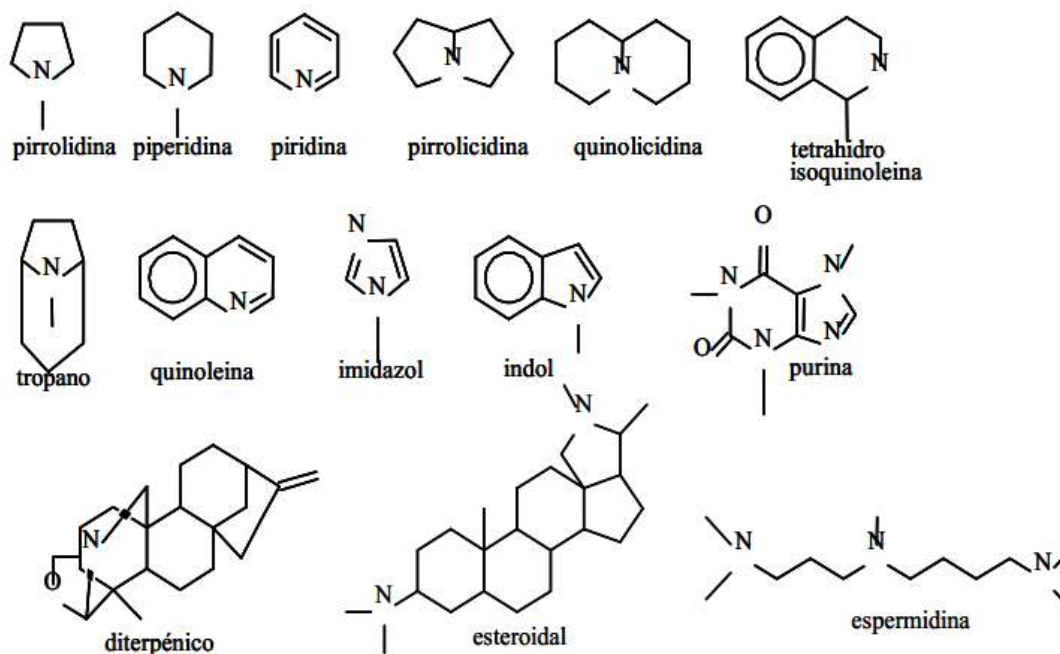


Figura 4. Núcleos de alcaloides

6. Alcaloides de lupinos silvestres

Las especies silvestres de lupinos contienen alta concentración de alcaloides del tipo quinolizidínico, que oscila entre el 1 al 4%, mientras que en los domesticados el contenido de alcaloides es menor al 0.05%. En relación a los lupinos de América, los alcaloides más abundantes reportados son la lupanina y la esparteína, además de la 13- α '-lupanina, 17-oxo-lupanina, multiflorina, angustifolina, epiafilina, Dehidro-oxoesparteina, afilina (Wink, 1993) Figura 5.

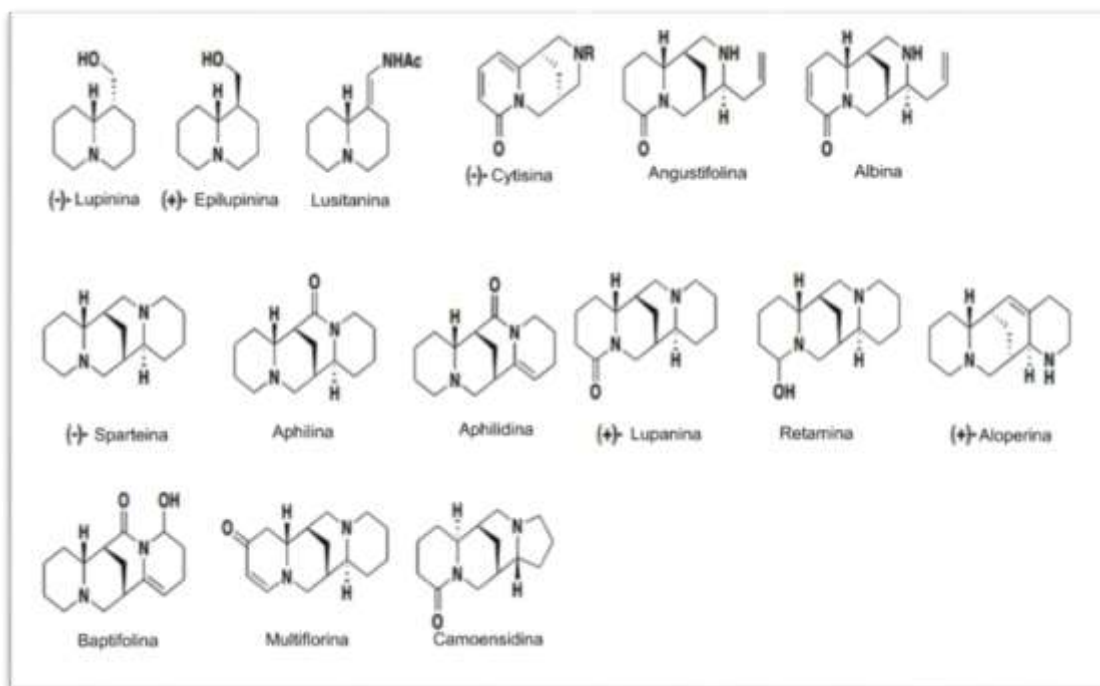


Figura 5. Estructura química de los alcaloides presentes en la mayoría de las especies de lupinos

6.1 Biosíntesis de alcaloides quinolizidínicos (AQ) en lupinos

La biosíntesis de AQ en los lupinos se realiza en las partes aéreas verdes de la planta, específicamente en el cloroplasto, de tal forma que el núcleo quinolizidínico representa la unidad básica del alcaloide más simple (lupinina) presente en los lupinos. La síntesis es regulada por la luz, por ello alcanzan sus niveles más altos durante el día, son transportados por el floema a otras partes de la planta y se acumulan predominantemente en estratos celulares sub-dérmicos. En las semillas pueden almacenar hasta el 8% de su peso seco (Wink y Hartmann, 1982; Wink y Witte, 1991). La concentración total de AQ varía de acuerdo a la etapa fenológica y partes de la planta analizadas.

Los AQ son sintetizados a partir del aminoácido L-lisina, la cual sufre un proceso de descarboxilación por la actividad de la descarboxilasa de lisina, una enzima presente en los cloroplastos de la planta. Lo anterior genera la cadaverina; un precursor e intermediario entre la lisina y los AQ (Wink y Hartman, 1982b). Así, los dos átomos de nitrógeno del núcleo quinolizidínico (quinolizidina) Figura 6 de los alcaloides son derivados de la lisina o cadaverina (Figura 8) en su mayoría son bicíclicos o tetracíclicos (2 o 4 anillos de nitrógeno), aparecen como aminas terciarias y como N-óxidos (Muzquiz et al., 1982; Ruiz 1997).

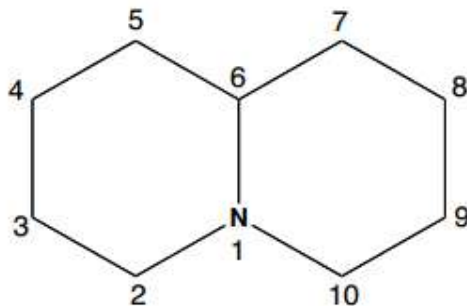


Figura 6. Estructura central de AQ

Se distinguen de otros alcaloides porque poseen al menos, un sistema de anillo quinolizidínico (Figura 6) (Wink; Salatino y Gottlieb, 1980; Kinghorn y Balandrin, 1984). Se pueden agrupar por lo menos en 8 grupos con los siguientes tipos estructurales: (1) Lupinina, (2) leontidina, (3) esparteina/lupanina/multiflorina, (4) α -piridónico, (5) Matrina, (6) Ormosia, (7) Piperidinicos y dipiperidinicos, (8) Estructuras misceláneas (Wink, 1993).

6.2 Toxicidad de los alcaloides quinolizidínicos

La mezcla de los diversos AQ provocan sintomatología de envenenamiento agudo como fallo respiratorio, convulsiones y coma, lo cual fue reportado en animales que consumieron forraje de lupinos silvestres cuyo contenido es mayor al 1%. Los AQ tienen cuatro vías de acción, las cuales pueden explicar los efectos tóxicos observados en vertebrados:

-Inhibición de la transmisión del influjo ganglionar simpático del sistema nervioso autónomo a nivel de ganglios nerviosos (Agid, Pertuiset y Dubois, 1988).

-Afinidad y actividad a receptores acetilcolinérgicos de tipo muscarínico (mACh) y nicotínico (nACh) que varía de acuerdo al tipo de alcaloide (Schemeller et al., 1994)(Cuadro 5).

Cuadro 5. Muestra de afinidad de AQ (IC50) a receptores aceticolinérgicos, nicotínicos y muscarínicos. Los valores IC50 (Índice de concentración) indican la concentración de un AQ en particular que muestra el 50% de especificidad de un ligando marcado radiactivamente (Schmeller et al., 1994)

Compuesto	Receptor Nicotínico*	Receptor Muscarínico*
Albina	193µM	33µM
Anagirina	2096µM	132µM
Angustifolina	500µM	25µM
Citisina	0.14µM	400µM
3µ-Hidroxilupanina	190µM	74µM
13µ-Hidroxilupanina	490µM	140µM
Lupanina	5µM	114µM
Lupinina	500µM	190µM
N-Metilcitisina	0.05µM	417µM
Multiflorina	500µM	47µM
17-Oxosparteina	155µM	118µM
Esparteina	331µM	21µM
Tetrahidrorhombifolina	310µM	129µM
13µ-Tigloiloxilupanina	160µM	11µM

La dosis letal 50 (LD50) de la esparteína y la lupanina, alcaloides mayoritarios en los lupinos americanos varía dependiendo la vía de administración, así como de la especie animal. En ratones, la LD50 de la lupanina vía intraperitoneal es 50 mg/Kg, mientras que la LD50 de esparteína vía oral es 350-510 mg/Kg (Roberts y Wink, 1998).

6.3 Actividad biológica de los AQ

Los AQ representan la defensa química de los lupinos contra sus depredadores naturales (herbívoros o fito-patógenos), ya que son directamente tóxicos e inclusive mutagénicos (Keeler, 1976) para una amplia diversidad de organismos (Wink, 1985, 1982, 1993). Se ha demostrado que los AQ muestran propiedades biológicas como neurotóxicos, antipiréticos, antiinflamatorios, depresores del sistema nervioso central (SNC) antiaritmico cardíaco, diurética, hipoglucemiante y/o hipotensiva entre otros. Estos efectos biológicos hacen atractiva la utilización de los AQ en el tratamiento de algunas enfermedades como el eczema y la diabetes (Schemeller et al., 1994).

Los receptores acetilcolinérgicos están ampliamente distribuidos en las células del organismo, los distintos tipos de tejidos y estructuras nerviosas pueden ser afectados en diferente grado por los AQ (Schemeller et al., 1994). Las células controlan la homeostasis mediante concentraciones iónicas que pasan a través de canales iónicos, como los 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, neuromuscular y neuronal. A partir de que se inhiben los canales de K⁺ el Na⁺, se modifica el transporte a través de la membrana celular, lo que bloquea la transducción de la señal en células nerviosas (Schmeller y Wink, 1998) y musculares (Körper, Wink y Fink, 1998).

7. Alcaloide quinolizidínicos de *Lupinus exaltatus*

Los tallos y hojas de *L. exaltatus* contienen los alcaloides epiafilina, α -isolupanina, lupanina, afillina, dehidro-oxosparteína, 3- β -hidroxilupanina. El contenido relativo de lupanina en relación al contenido total de alcaloides es de 33 y 53% distribuida en tallos y frutos respectivamente, seguidos de la epiafilina en las flores y hojas con 26 y 37% respectivamente (Zamora-Natera et al., 2005).

La lupanina es el alcaloide mayoritario, ya que representa el 53.2% en relación al total de alcaloides, seguido por epiafilina (9.6%), afilina (7.9%), α -isolupanina (6.9%), dehidro-oxosparteína (6.7%) y 3 α -hidroxilupanina (6.3%) (Zamora-Natera et al., 2005).

Los extractos alcaloideos de *L. exaltatus* contienen alcaloides que presentan actividad farmacológica lo cual ha sido demostrado tanto en experimentos *in vivo* e *in vitro*, sin embargo, es necesario estudiar sus posibles efectos adversos, tales como la genotoxicidad. La evaluación de la genotoxicidad se puede realizar a través de métodos, como la prueba cometa y de micronúcleos (MN), entre otros.

8. Genotoxicidad y citotoxicidad

8.1 Prueba de micronúcleos (MN)

La prueba de MN fue desarrollada por W. Schmid en 1975, quien originalmente la propuso para practicarse en la médula ósea del ratón; posteriormente, la técnica se ha estandarizado en gran variedad de tejidos y especies, de tal forma que en la actualidad su uso está muy difundido.

La prueba de MN detecta el efecto de agentes mutagénicos sobre los cromosomas, mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados que al quedar fuera del núcleo forman tales estructuras. La técnica permite detectar tanto agentes, genotóxicos y citotóxicos (Schmid, 1975).

La prueba de micronúcleos presenta las siguientes ventajas:

- 1) Facilidad y rapidez.
- 2) Posibilidad de evaluar un solo químico o una mezcla.
- 3) Abundancia de células, que se pueden analizar en diferentes periodos del ciclo
- 4) Los MN que se forman persisten hasta la siguiente interface lo cual puede aumentar el tiempo de evaluación (Zúñiga-González y Gómez-Meda, 2006).

8.2 Micronúcleos

Los MN son cromosomas completos o fragmentos, que a causa de agentes que los rompen (como las radiaciones) o que alteran la integridad del huso mitótico, quedan fuera del núcleo

durante la mitosis. La forma de los MN es generalmente redonda o almendrada, su diámetro varía desde 0.4 a 1.6 μm .

En anafase los fragmentos cromosómicos que no posean centrómero, no podrán integrarse a un núcleo por carecer del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas; sin embargo, los elementos rezagados –que pueden ser fragmentos o cromosomas completos– quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas, y una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios, estos núcleos secundarios son más pequeños que el principal, de ahí el nombre de MN (Zúñiga-González y Gómez-Meda, 2006).

9. Bioindicadores

Se conoce como bioindicadores a los organismos utilizados para detectar efectos tóxicos de algún compuesto. La denominación de una especie como indicadora requiere del conocimiento previo respecto a su composición comunitaria bajo condiciones normales, incluyendo el ciclo de vida de las especies, su estacionalidad y sus variaciones naturales, de manera que sea posible comparar las condiciones antes y después de una alteración ambiental (Raz-Guzman, 2000).

Un organismo se considera bioindicador siempre y cuando se conozca el grado de tolerancia del mismo, ya que no todos pueden darnos información debido a su ciclo de vida y hábitos alimentarios. Algunos organismos que pueden ser usados como bioindicadores son los moluscos, insectos, mamíferos, peces, entre otros. (Raz-Guzman, 2000).

10. Ciclofosfamida

En los estudios de mutagenicidad, se utilizan sustancias capaces de formar MN, como la ciclofosfamida, usada como control positivo para comparar la formación de MN contra algún compuesto en estudio. Este es un fármaco antineoplásico que también tiene propiedades inmunosupresoras (Santos-Soler et al., 2005).

La ciclofosfamida pertenece a la familia de los fármacos alquilantes, es un profármaco que necesita ser activado por el sistema de enzimas microsomales hepáticas para ser citotóxico. Estas enzimas hepáticas convierten la ciclofosfamida en primer lugar a aldofosfamida y 4-hidroxiciclofosfamida, y luego a acroleína y fosforamida, dos potentes sustancias alquilantes del ADN. Al reaccionar con el ADN, los agentes alquilantes forman puentes cruzados que impiden la duplicación del mismo y provocan la muerte de la célula (Santos-Soler et al., 2005) de ahí su efecto genotóxico.

11. Planteamiento del problema

La escasa información relacionada con la genotoxicidad y/o citotoxicidad de los alcaloides quinolizidínicos presentes en los lupinos limitan su empleo como un compuesto insulino secretor en el tratamiento de la diabetes tipo 2.

12. Justificación

Las especies del género lupinos tienen amplia distribución y abundancia en el mundo, para México se ha reportado al menos una especie para cada estado del país. Las especies de este género se han empleado en forma tradicional para el tratamiento de la diabetes y presión arterial alta. Actualmente, se ha reportado que los alcaloides son el principio activo responsable de la actividad antidiabética y antihipertensiva en humanos y animales. Sin embargo, para emplear estos compuestos en el tratamiento de pacientes diabéticos o hipertensos es necesario descartar su posible efecto genotóxico mediante pruebas biológicas. Por lo que, en el presente trabajo se presenta un estudio de genotoxicidad con un extracto de alcaloides de semillas de *Lupinus exaltatus* previa caracterización química mediante cromatografía de gases.

13. Hipótesis

En base a los antecedentes de uso y efectos benéficos de alcaloides presentes en los lupinos, la utilización de extractos de alcaloides totales de *Lupinus exaltatus* no presenta efecto genotóxico.

14. Objetivos

14.1 Objetivo general

Evaluar la actividad genotóxica en ratones de la cepa Balb/c de un extracto alcaloideo total de *Lupinus exaltatus*, obtenido a partir de semillas.

14.2 Objetivos específicos

- 1.- Obtener los extractos alcaloideos totales a partir de semillas de *Lupinus exaltatus*.
- 2.- Evaluar la genotoxicidad del extracto alcaloideo de *Lupinus exaltatus* comparado con un grupo control tratado con ciclofosfamida y con un grupo control sin tratamiento.

15. Materiales y métodos

15.1 Tipo de estudio:

Experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo.

15.2 Sede:

Laboratorio de Biotecnología, del Departamento de Botánica y Zoología, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, así como el Instituto de Enfermedades Crónicas Degenerativas, del Centro Universitario de Ciencias de la Salud.

15.3 Universo de estudio:

- *Lupinus exaltatus* (semillas).
- Ratones machos de la cepa Balb/c.

15.4 Criterios de inclusión:

Lupinus exaltatus.

- Plantas aparentemente sanas.
- Planta madura.
- En estado de producción de vaina.
- Con flores.

Ratones Balb/c.

- Animales aparentemente sanos.
- En edad adulta joven (2 meses y medio de edad).

15.5 Criterios de no inclusión:

Lupinus exaltatus.

- Especie diferente.
- Fuera de la zona de colecta.
- Si es inmadura
- Que esté cerca de alguna zona de cultivo (Ya que podría estar contaminada con fertilizantes o agroquímicos)
- Semillas con algún daño físico.

Ratones Balb/c.

- Ratones que muestren algún signo de enfermedad.
- Que no sean adultos, y/o que no cumplan con los criterios de edad.
- Pérdida de muestras de algún ratón.

15.6 Colecta

En marzo del 2012 se colectaron semillas de *Lupinus exaltatus* en el municipio de Ciudad Guzmán, a las faldas del volcán de Colima, en las localidades descritas en la “Flora Novo Galiciana” (McVaugh 1987). Los especímenes recolectados se depositaron en el herbario del IBUG (Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara), que se encuentra en el CUCBA, donde se realizó su identificación botánica.

15.7 Obtención de harinas

Las semillas se molieron en un molino marca Ikea hasta que se obtuvo una harina con tamaño de partícula de 2 mm. La harina se desengrasó con hexano en un equipo Soxhlet.

15.8 Extractos totales de alcaloides



Figura 7. Obtención de extractos alcaloides totales

Se emplearon 10 gramos de harina desengrasada de semillas, se homogeneizaron con 50 mL de ácido tricloroacético al 5% durante 1 minutos (min) a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm. El sobrenadante se colectó en una pera de decantación de 250 mL (Figura 7). El proceso de homogeneizado y recolección se repitió 2 veces más. El sobrenadante se basificó con 10 mL de una solución de hidróxido de sodio 10 M. Enseguida se añadió diclorometano (3 x 50 mL) y el solvente (150 mL) se recolectó en un matraz redondo. La fase orgánica colectada se sometió a desecación en rotavapor. El residuo se suspendió en diclorometano y se transfirió a un frasco de color ámbar y después de evaporar el solvente con nitrógeno, el extracto se almacenó a 4 °C hasta su utilización en los bioensayos (Múzquiz *et al.*, 1993).

15.9 Identificación y cuantificación de alcaloides por cromatografía de gases

El extracto de alcaloides se analizó mediante cromatografía de gases en un cromatógrafo de gases HP5890. Las condiciones de separación fueron: tipo de columna: OV1; 30m; 0.25 mm d.i, 0.25 μ m de película; radio de separación 1:30; gas acarreador: He; flujo 1mL min⁻¹; Programación del horno 120 °C a 2 minutos isoterma; 120-310 °C con incremento de 4 °C por minuto; luego 4 min isoterma.

Los tiempos de retención de cada pico de alcaloides presentes en el extracto alcaloideo de *L. exaltatus* se calcularon mediante comparación mediante cromatograma generado por la inyección de una mezcla de n-alcenos de 8 a 28 carbonos, con incremento de dos átomos de

carbono (índice de Kovacs). La identificación de los compuestos se realizó mediante la librería para alcaloides del Instituto de Farmacia de Biología Molecular (Universidad de Heidelberg). La lupanina y la esparteína fueron usados como estándares externos para la cuantificación de los alcaloides del extracto. Lo anterior fue realizado como trabajo colaborativo por el M.C. García-López con el Dr. Wink (Universidad Ruprecht-Karls de Heidelberg, Heidelberg, Alemania).

15.10 Formación de grupos y administración de tratamientos.

El experimento de genotoxicidad se realizó con ratones machos de la cepa Balb/c, de 2.5 meses de edad. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos de 5 ratones cada uno. Los ratones se mantuvieron en condiciones estándares de bioterio, con temperatura controlada entre $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$, con agua y alimento a libre acceso.

Los grupos de estudio fueron los siguientes:

- 1.- Ctrl-Neg (Vehículo): Animales que recibieron solución amortiguadora buffer fosfato salino (PBS) 1X.
- 2.- Ctrl-Pos (Ciclofosfamida): Animales a los que se les administró ciclofosfamida a la dosis de 10mg/kg de peso.
- 3.- Ext-A (Extracto alcaloideo): Animales que recibieron una dosis de 200 mg/kg del extracto total de semillas de *L. exaltatus*.



Figura 8. Administración de dosis vía oral por medio de cánula

Durante el periodo de estudio (5 días), los animales tanto controles y experimentales, recibieron su respectivo tratamiento vía oral mediante una cánula orogástrica (Figura 8) dos veces al día en intervalos de 12 horas, en un volumen final de 0.2 ml.

15.11 Elaboración de Frotis.

La toma de muestra de sangre periférica se realizó una vez al día (por la mañana) durante 5 días, previo a la administración del tratamiento. Para lo cual, se realizó un pequeño corte en la punta de la cola del ratón, de esta manera se obtuvo una gota de sangre, con la cual se realizaron dos frotis por animal. Cabe mencionar que en los días posteriores no fue necesario realizar un nuevo corte, ya que solo se retiró la costra, se obtuvo la gota de sangre necesaria para realizar el frotis.



Figura 9. Frotis sanguíneos

Una vez realizado el frotis sanguíneo las laminillas se secaron a temperatura ambiente y enseguida, se fijaron con etanol al 96% durante 10 min (Figura 9).

Al finalizar el periodo de estudio todas las laminillas se tiñeron con naranja de acridina a una concentración de 5 mg por 500 mL de buffer fosfato. Para almacenar los frotis teñidos se utilizó una caja oscura para protegerlos de la luz.

15.12 Conteo de micronúcleos.

Previo a la evaluación de MN se realizó un periodo de 3 meses de entrenamiento en el Laboratorio de mutagénesis (En el Centro de Investigación Biomédica de Occidente del IMSS)

del Dr. Guillermo Zúñiga con el fin de identificar adecuadamente los eritrocitos micronucleados (EMN), eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC).

La lectura y cuantificación de eritrocitos micronúcleos (EMN), Eritrocitos totales (ET), Eritrocitos Policromáticos (EPC) en cada laminilla se realizó con la ayuda de un microscopio de fluorescencia de la siguiente manera: Se agregaron dos gotas de buffer fosfato a la laminilla, enseguida, se cubrió con un cubreobjetos, se añadió una gota de aceite de inmersión y se observó con objetivo inmersión de 100x. El cálculo de EMN y EPC se realizó seleccionando los campos homogéneos (desplazándose en Zig-Zag por la laminilla) (Figura 10) necesarios hasta alcanzar un total de 10000 ET, 1000 ET y 1000 EPC respectivamente. Durante todo el proceso se emplearon guantes de látex como protección y bata de maga larga.

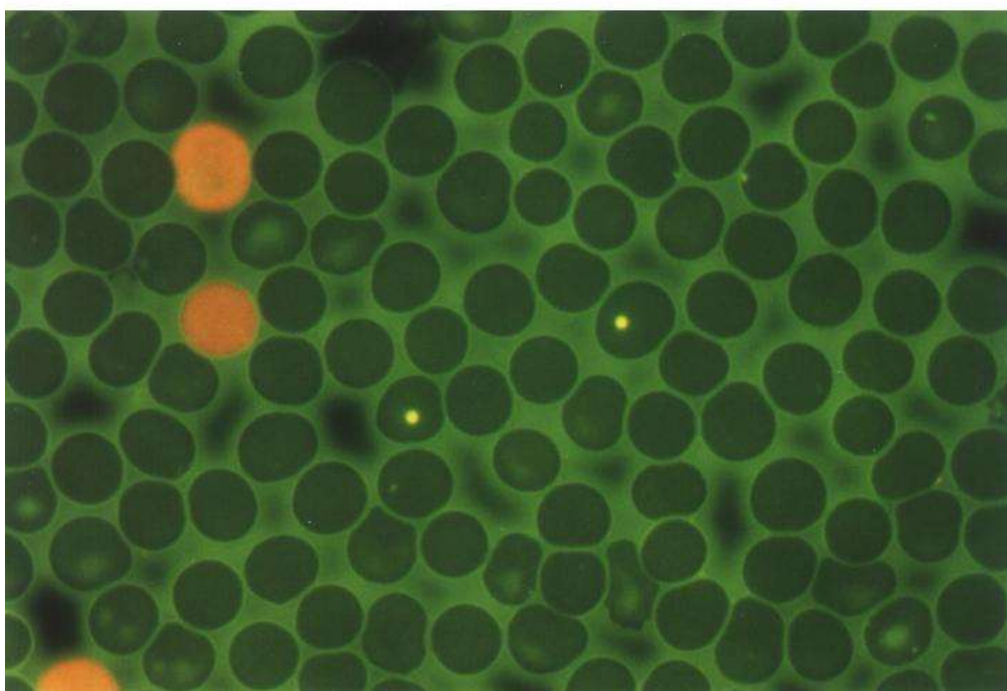


Figura 10. Eritrocitos de sangre periférica. Tinción naranja de acridina, 100x

15.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 18.0. Para calcular las diferencias intragrupal se evaluó el cambio de promedio de EMN, EPC, EPCMN de cada grupo mediante la prueba de Friedman, empleando como prueba de contrastación la prueba de Wilcoxon. Respecto al análisis intergrupos se analizó la diferencia de los valores

promedio de EMN, EPC, EPCMN entre los grupos de estudio en el intervalo de tiempo que duro el experimento mediante la prueba de U-Mann Whitney.

16. Resultados

16.1 Alcaloides presentes en el extracto alcaloideo de *L. exaltatus*.

El cromatograma de la figura 11 muestra el registro de 7 picos con sus respectivos tiempos de retención correspondientes a los alcaloides presentes en el extracto alcaloideo de *L. exaltatus*. La inspección simple indica que los alcaloides más abundantes fueron la lupanina y la epiafilina. En el cuadro 6 se presenta la abundancia porcentual de cada uno de los alcaloides identificados en el extracto, la lupanina con 50.0 y la epiafilina con 21.7, mientras que el resto de los alcaloides estuvieron comprendidos en rangos de 4.2 a 7.5.

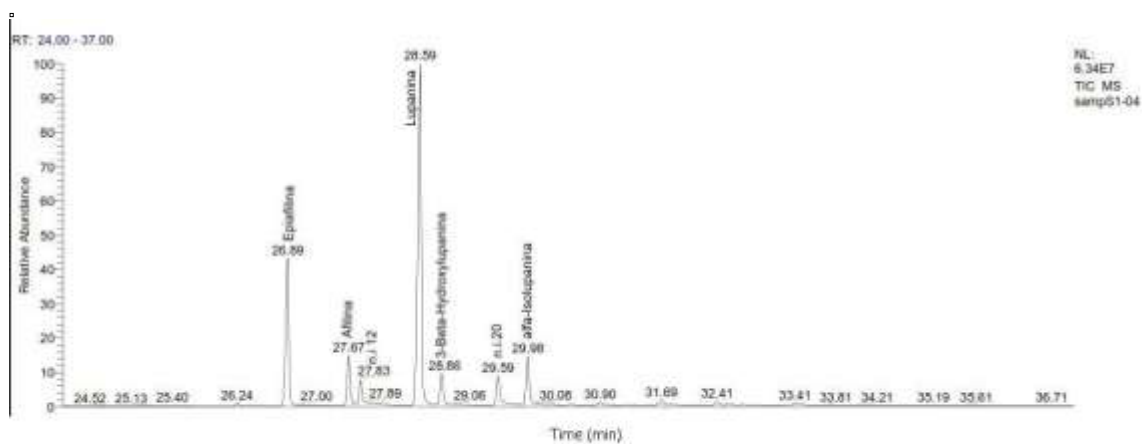


Figura 11. Cromatograma de AQ presentes en el extracto alcaloideo de *Lupinus exaltatus*

Cuadro 6. Composición de alcaloides en el extracto alcaloideo de semillas de *L exaltatus*

Ki	Alcaloides	Composición de alcaloides %
2859	<i>Lupanina</i>	50.0
2689	<i>Epiafilina</i>	21.7
2767	<i>Afilina</i>	7.5
2998	<i>Alfa-Isolupanina</i>	7.5
2886	<i>3-Beta-Hydroxylupanina</i>	5.0
2783	<i>Ni-12</i>	4.2
2959	<i>Ni-20</i>	4.2

Ki: Índice Kovac.

16.2 Prueba de genotoxicidad

Cuadro 7. Frecuencia de eritrocitos micronucleados, error estándar por día y grupo

Grupos	Promedio Por Día EMN/ET					SEM EMN/ET				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Control Negativo	19.84	19.02	17.10	21.40	19.00	0.37	0.75	1.83	1.91	0.46
Control Positivo	18.42	24.00	27.43	30.29	30.94	1.25	1.08	1.60	1.32	0.55
Extracto	20.00	22.99	31.50	32.77	36.43	1.00	1.00	2.60	3.95	2.80

16.2.1 Análisis intragrupos en eritrocitos micronucleados

La administración oral diaria por un periodo de 5 días del extracto alcaloide de *Lupinus exaltatus*, causó la formación de EMN a partir del tercer día con promedio de 31.5 EMN el cual se incrementó a 32.77 EMN y 36.43 EMN en los días cuarto y quinto, respectivamente. La formación de micronúcleos en el tratamiento con ciclofosfamida (Ctrl-Pos) fue similar en la formación de EMN a la del extracto, con la aparición de MN a partir del segundo día con la cantidad de 24 EMN, en el tercero 27.44 EMN y de 30.29 a 30.94 EMN en el cuarto y quinto día, respectivamente. En el grupo control negativo (Ctrl-Neg) de acuerdo a lo esperado no se observó diferencia en el número de EMN, con 17 EMN en el día uno hasta 21.4 en el último día del estudio (Figura 12) (Cuadro 7).

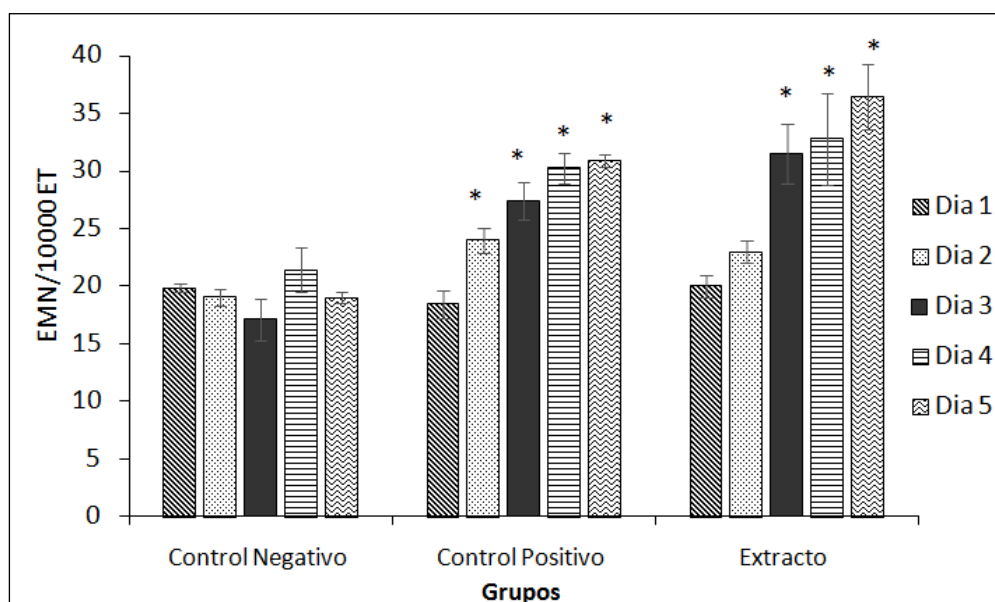


Figura 12. Número de EMN observados por día en un periodo de 5 días.

* Indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en relación al tiempo de exposición en EMN

16.2.2 Análisis intergrupos en eritrocitos micronucleados

El análisis intergrupos, Ctrl-Neg vs Ext-A (Figura 14) en este estudio, mostró que el extracto alcaloide a la dosis administrada tuvo efecto genotóxico ya que el número promedio de MN fue de 22.99, 31.5, 32.77 y 36.43, valores estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) comparados con el Ctrl-Neg, para el cual la cantidad de micronúcleos obtenida en el día dos, tres, cuatro y cinco fue 19.02, 17.10, 21.40, 19.00, respectivamente. Mientras que la comparación del Ctrl-Neg vs Ctrl-Pos (Figura 13) mostró la efectividad de la ciclofosfamida para producir

genotoxicidad, con el aumento de la formación de EMN a partir del segundo día de tratamiento. La comparación del Ctrl-Pos vs Ext-A (Figura 15) no presentó diferencia estadística significativa en la cantidad de EMN en los días uno, dos, tres y cuatro, no obstante en el quinto día si hubo diferencia significativa , con promedio de EMN de 36.43 en el Ext-A y 30.94 en el Ctrl-Pos.

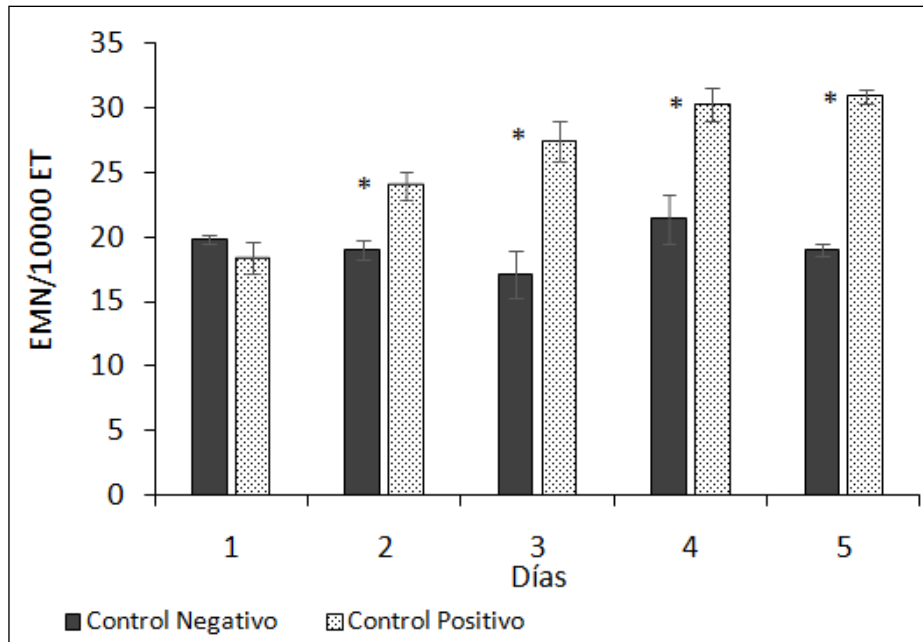


Figura 13. Comparación del número de EMN entre el control negativo vs control positivo

*** Indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en relación al tiempo de exposición en EMN**

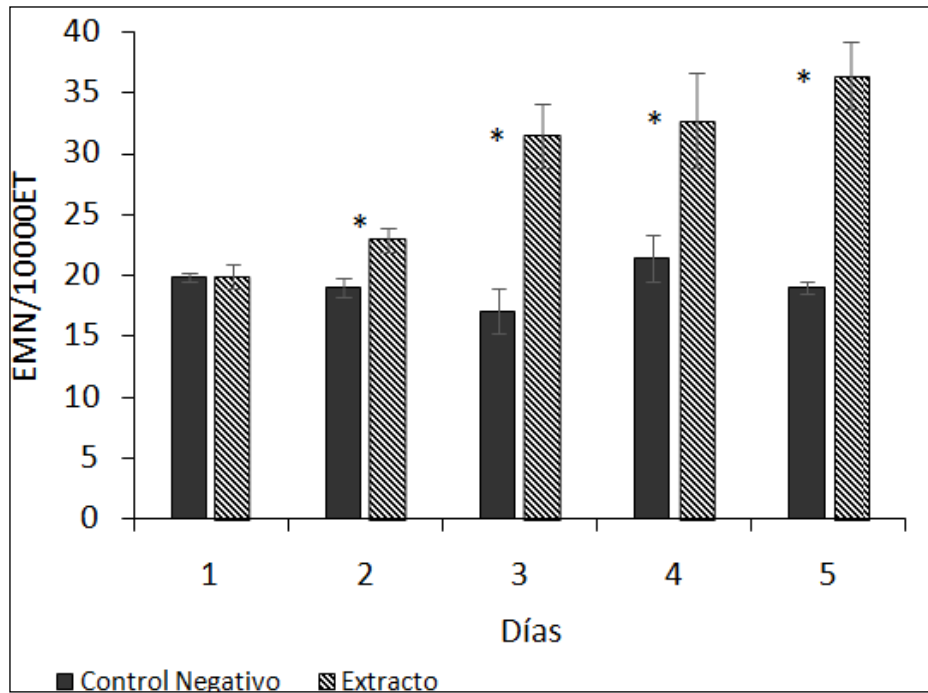


Figura 14. Comparación del número del EMN entre el Control Negativo vs Extracto

* Indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en relación al tiempo de exposición en EMN

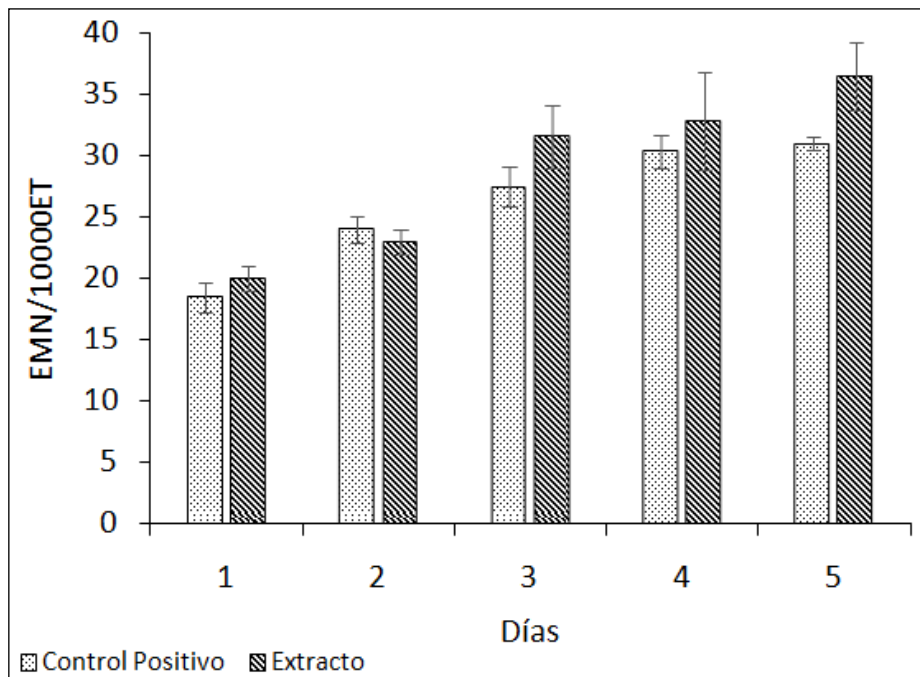


Figura 15. Comparación del número del EMN entre el Control Positivo vs Extracto

Cuadro 8. Frecuencia de eritrocitos policromáticos, error estándar por día y grupo

Grupos	Promedio Por Día EPC/ET					SEM EPC/ET				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Control Negativo	26.69	30.03	19.17	28.40	26.42	5.12	5.65	5.49	5.90	7.56
Control Positivo	31.80	21.00	12.87	15.14	22.58	7.24	3.79	1.92	3.78	6.21
Extracto	31.60	35.95	29.00	20.68	39.13	3.52	2.53	4.91	4.79	5.19

16.2.3 Análisis intragrupos en eritrocitos policromáticos

Al realizar el análisis Intragrupos se encontró que el número de EPC formados en los grupos Ctrl-Neg y Ctrl-Pos, fue menor en el tercer día de administración con 19.17 y 12.87 EPC respectivamente. Mientras que para ambos grupos en los días uno, dos, cuatro y cinco el número de EPC estuvo comprendido en el rango de 19.17 a 26.42 EPC para el Ctrl-Neg y 12.87 a 31.80 para el Ctrl-Pos, las diferencias registradas en el número de EPC no fueron estadísticamente significativas. El grupo Ext-A mostró incremento en el número de EPC formados, similar a lo observado en el grupo Ctrl-Neg con el rango de 20.68 a 39.13 EPC, sin embargo el análisis estadístico de los valores no mostró diferencia significativa (Figura 16) (Cuadro 8).

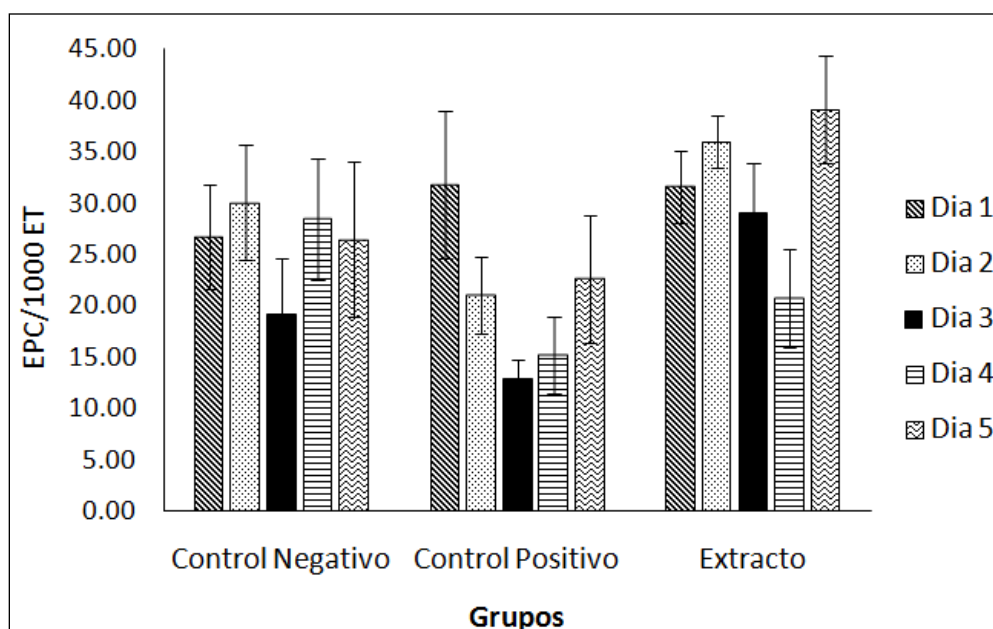


Figura 16. Frecuencia de EPC/1000 ET en 5 días

* Indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en relación al tiempo de exposición en EPC

16.2.4 Análisis intergrupos en eritrocitos policromáticos

El análisis intergrupos de Ctrl-Neg vs Ctrl-Pos (Figura 17) mostró reducción en el número de EPC a partir del día dos hasta el quinto día en el Ctrl-Pos, en relación al Ctrl-Neg. No obstante, las diferencias en los valores promedio de ambos grupos en el cuarto día fue de 28.40 y 15.14 respectivamente, lo cual muestra diferencia estadística. La comparación entre el Ctrl-Neg vs Ext-A (Figura 18) muestra aumento en el número de EPC en el Ext-A a partir del día dos, tres y quinto (35.95, 29.00, 39.13) con excepción del cuarto día donde ocurrió una disminución (20.68) comparada con el Ctrl-Neg (28.40) sin embargo estos valores no son estadísticamente diferentes. Finalmente, la comparación en los grupos Ctrl-Pos vs Ext-A (Figura 19) muestra claramente incremento en el número de EPC en el grupo Ctrl-Pos con rango de valores de 12.87 a 31.80 y en el Ext-A 20.68 a 39.13, durante el tiempo de experimentación. Las diferencias en el segundo y tercer día entre el número de EPC, 21.00 a 35.95 respectivamente en Ext-A contra 12.87 y 29 para el Ctrl-Pos mostraron diferencia estadística ($P<0.05$).

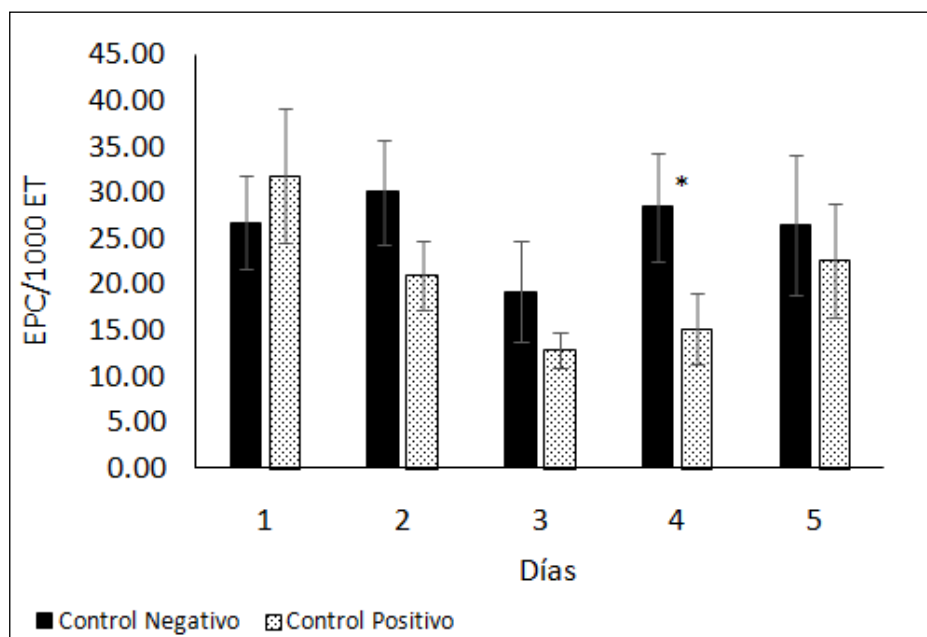


Figura 17. Comparación del número de EPC entre el control negativo vs control positivo.

* Indica diferencia estadística significativa ($P<0.05$) en relación al tiempo de exposición en EPC

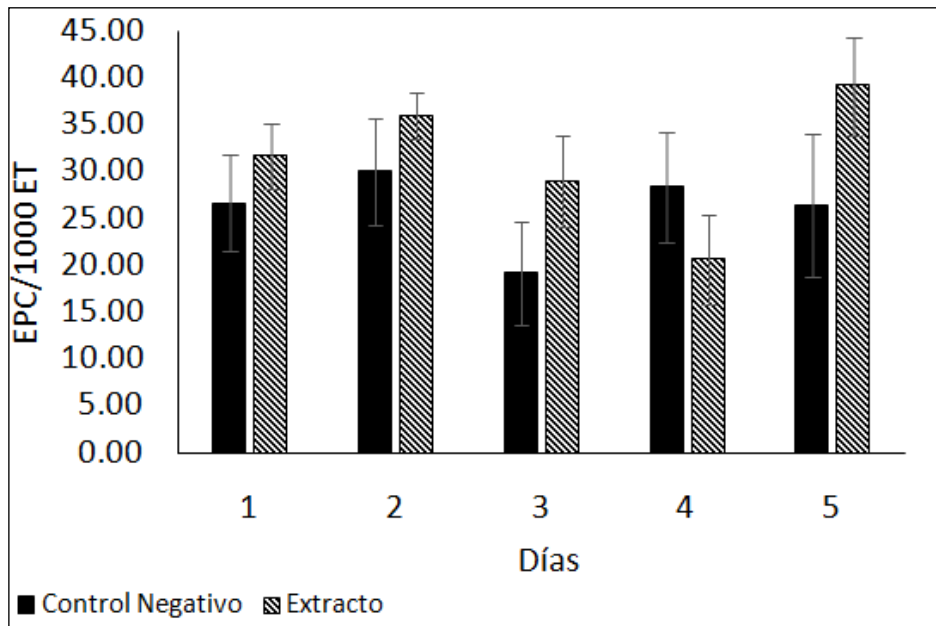


Figura 18. Comparación del número de EPC entre el control negativo vs Ext-A.

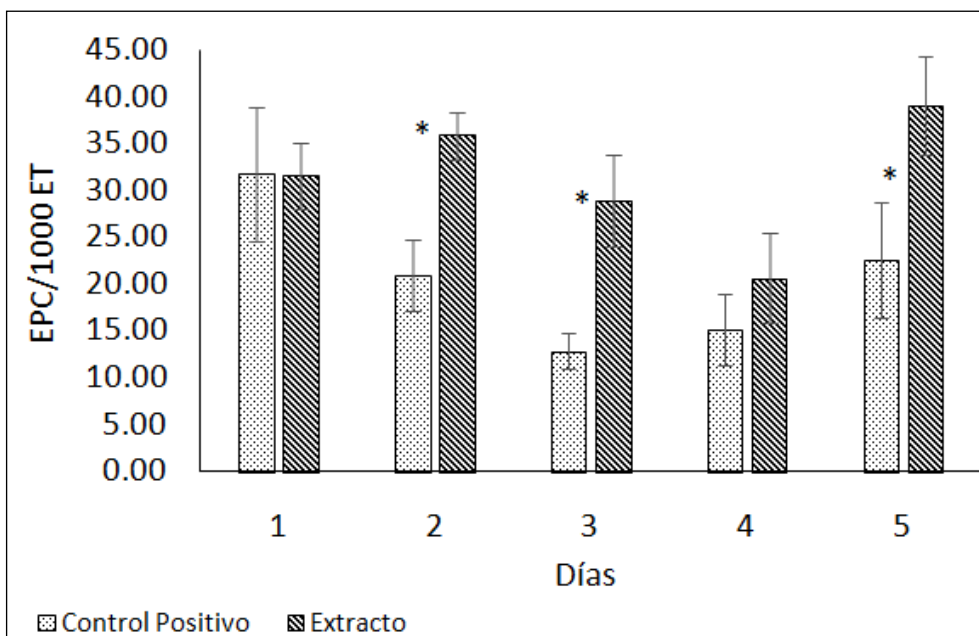


Figura 19. Comparación del número de EPC entre el control positivo vs Ext-A

* Indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en relación al tiempo de exposición en EPC

17. Discusión

Los metabolitos secundarios de las plantas desempeñan múltiples papeles en la interacción entre plantas y su entorno. Se han descrito más de 100000 metabolitos secundarios a partir de las plantas, dentro de estos se encuentran los alcaloides. Aproximadamente el 20% de las especies de plantas acumulan alcaloides, los cuales al igual que otros metabolitos presentan actividad biológica, la cual es aprovechada en los sectores médico, agrícola, farmacéutico. En este sentido las plantas del género *Lupinus* producen alcaloides del tipo quinolizidinico, los cuales se sintetizan a partir de la lisina, estos los utiliza la planta como un sistema de defensa contra sus depredadores (Keeler, 1976).

Se han reportado diversos efectos biológicos de los alcaloides, como neurotóxico, antipirético, antiinflamatorio, depresores del sistema nervioso central, antiaritmico, cardíaco, diurético, hipoglucemiante e hipotensiva entre otros (Schemeller et al., 1994). Por otro lado hay evidencia que la ingesta del agua de cocción de *Lupinus mutabilis* (Choco, Tarwi) con fines medicinales provocó intoxicación en las personas que lo emplearon, manifestándose por temblores, agitación, excitación, midriasis, visión borrosa, sequedad en la boca, intranquilidad y convulsiones (Saavedra Camacho et al., 1995). En Ecuador se han llevado a cabo ensayos clínicos fase II en sujetos normoglicémicos y disglucémicos se les administro semillas de *Lupinus mutabilis* y se observó efecto hipoglucemiante. De los compuestos presentes en *L. mutabilis*, los alcaloides presentan efecto insulino secretor *in vivo* e *in vitro* (Bobkiewich et al., 2007; García-López et al., 2004). No obstante, es necesario realizar pruebas para descartar efectos genotóxicos y citotóxicos, cuando se pretenden utilizar como tratamiento alternativo en productos naturales en diversas dosis y preparaciones. Por lo cual, en el presente estudio se evaluó la actividad genotóxica del extracto alcaloideo total de *L. exaltatus*, obtenido a partir de semillas, mediante la prueba de MN en sangre periférica.

El patrón y porcentaje de alcaloides en el extracto alcaloideo obtenido en este estudio a partir de las semillas de *L. exaltatus*, concuerda con el reportado para esta especie por Zamora-Natera et al., 2005, siendo la lupanina el alcaloide que se encuentra en mayor concentración (50%) seguido por la epiafilina (21.7%), afilina (7.5%) y el resto representó el 20.8%. Sin embargo, no fue posible cuantificar la cantidad de cada uno de los alcaloides identificados ya que se carece de sus estándares. El *L. exaltatus* en su perfil alcaloideo no presenta esparteína, en comparación con otras especies como *L. montanus*, sin embargo, de acuerdo a Przybylak et al., (2005) el perfil de *L. exaltatus* presenta seis alcaloides más que *L. montanus*.

Cabe señalar que la dosis usada del extracto alcaloideo de *L. exaltatus* fue calculada a partir de la dosis LD50 de la lupanina, que es el alcaloide mayoritario en este extracto. Los resultados obtenidos con esta dosis a través de la prueba de micronúcleos provocó daño genotóxico, el cual fue evidente al quinto día de administración. Este resultado contrasta con el reportado por Santiago et al., (2010) quienes no encontraron evidencia de genotoxicidad de un extracto metanólico de *L. termis*, evaluado mediante 3 pruebas, la prueba de Ames en *Salmonella thyphimurium*, el ensayo en linfoma de ratón y prueba de MN en medula ósea. Aunque usaron una dosis más alta que en el presente estudio, es importante destacar que la administración del extracto solo fue de un día, además el patrón y concentración de alcaloides difiere del de *L. exaltatus*.

En relación a la evaluación de la citotoxicidad de *L. exaltatus*, en el presente experimento se observó tendencia a la protección. Estos resultados concuerdan con el trabajo realizado por Ayman A. Farghaly en 2012, quien reporta en dicho experimento efecto protector de un extracto metanólico de *L. termis*, mediante el empleo de la prueba de MN y cromosomas aberrantes. Sin embargo, en este estudio el efecto protector reportado es contra daño genotóxico no citotóxico.

Los alcaloides poseen actividades biológicas con potencial para aprovecharse ya sea como bioplággida o fármacos (antihipertensivo, hipoglucémico) (Ruiz-López, et al., 2010). En el trabajo de Fornasini (2012). Se demuestra que el consumo de semillas de *Lupinus mutabilis* por sujetos con disglucemia y diabetes tipo-2 reduce los niveles de glucosa sanguínea. Con lo cual, este recurso podría ser una alternativa de bajo costo para el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas como el síndrome metabólico y la diabetes.

Es importante señalar que después de la administración del extracto alcaloideo a los ratones experimentales (Ext-A), en el cuarto y quinto día de dosificación, se mostró pérdida del equilibrio a la marcha y temblor. Estas observaciones concuerdan con las reportadas por Bañuelos, et al., (2005), inmediatamente después de la administración intracerebroventricular de extractos alcaloideos de *L. exaltatus* y *L. montanus*. A este respecto, Schemeller et al., (1994) señala las propiedades depresoras de la esparteína, lupanina e hidroxilupanina en el SNC.

Aunque no existen estudios numerosos en relación a los efectos genotóxicos de los AQ la prueba de MN ha demostrado su utilidad con otro tipo de alcaloides.

Existe suficiente evidencia científica de la actividad hipoglucemiante e antihipertensiva de los AQ de lupinos y su uso en pacientes diabéticos e hipertensos se ve limitado, debido al riesgo

de provocar genotoxicidad. Los resultados obtenidos en nuestro estudio con el extracto alcaloideo de *L. exaltatus* (200 mg/kg) provoca daño genotóxico que es evidente al quinto día de su administración a ratones. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales de genotoxicidad como las pruebas recomendadas por la FDA (Food and Drug Administration) de Ames, cometa, linfoma de ratón entre otras, para recomendar su utilización en forma segura.

El presente estudio es parte de una batería de pruebas para determinar si estos metabolitos secundarios provocan genotoxicidad o citotoxicidad.

Las perspectivas de los resultados de este estudio son:

- 1.- Realizar estudios para descartar daño a nivel de tejidos.
- 2.- Descartar el efecto sinérgico que pudiera tener *L. exaltatus* por poseer más contenido de alcaloides que otras especies.
- 3.- Corroborar con un estudio de comportamiento si existe o no, alteración en la percepción de los sentidos del ratón.

18. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos bajo las condiciones aquí descritas podemos concluir que el extracto es genotóxico.

Bibliografía.

Agid Y, Pertuiset B, Dubois B (1988) Motoneuron disease as manifestation of lupin seed toxicity. *Lancet* 1(8598):1347.

Bañuelos-Pineda J, Nolasco-Rodríguez G, Monteon JA, García-López PM, Ruiz-López MA, García-Estrada J (2005) Histological evaluation of brain damage caused by crude quinolizidine alkaloid extracts from lupines. *Histol Histopathol* 20(4):1147-1153.

Barba E, Sánchez AJ, Raz-Guzman A, Gallegos ME (2000) Dieta natural y tasa de forrajeo del carideo *Hippolyte zostericola* Smith sobre epífitas de *Thalassia testudinum* Banks et Solander ex König. *Hidrobiológica* (10):139–146.

Bedillo L, Garcia F (1991) El *Altramuz*. Ed Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación. Cordoba, España.

Blagrove RJ, Gillespie JM (1975) Isolation, purification and characterization of the seed globulins of *Lupinus angustifolius*. *Aust J Plant Physiol* 2(1):13-27

Bobkiewicz-Kozłowska T, Dworacka M, Kuczynski S, Abramczyk M, Kolanos R, Wysocka W, García-López PM, Winiarska H (2007) Hypoglycaemic effect of quinolizidine alkaloids-lupanine and 2-thionosparteine on non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 565(1-3): 240-244.

Domínguez X (1973) Métodos de investigación fitoquímica. Limusa, México

Dunn DB, Lupinus. In: Calderón de R, GR, Rzedowski J (2001) Flora Fanerogámica del Valle de México. Ed. Instituto de Ecología A. C., CONABIO. Pátzcuaro, Michoacán México: 290-300.

Duranti M, Consonni A, Magni C, Sessa F, Scaranfoni A (2008) The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends in Food Science & Technology* 19(12):624-633.

Farghaly AA, Hassan ZM (2012) Methanolic extract of *Lupinus termis* ameliorates DNA damage in alloxan-induced diabetic mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16(3):126-132.

García-López PM, de la Mora PG, Wysocka W, Maizteguia B, Alzugaray ME, Del Zotto H, Borelli MI (2004) Quinolizidine alkaloids isolated from *Lupinus* species enhanced insulin secretion. *Eur J Pharmacol* 504(1-2):139-142.

Gladstones JS (1998) Distribution, origin, taxonomy .history and importance of Lupins as Crop Plants Biology. New York.

- Gladstones JS (1974) Lupins of the Mediterranean Region and Africa. Technical Bulletin Number 26, Western Australian Department of Agriculture, Perth.
- Gross R (1986) Lupins of the old and new world - a biological culture coevolution. Proc. -IV Intern. Lupine Conf Gerarldton, Western Australia. 244-277.
- Gross R, Von Baer E (1977) Possibilities del *Lupinus mutabilis* and *Lupinus albus* in the Andean countries. Arch Latinoam Nutr 27(4):451-472.
- Gross R, Von Baer E, Rohrmoser K (1983b) The lupin-A new cultivated plant in the andes.III. The output and quality of lupins (*Lupinus albus* and *Lupinus mutabilis*) in one South American and three European locations. Z Acker Pflanzbau 152(1):19-31.
- Keeler RF, Brown D, Douglas DR, Stallknecht GF, Young S (1976) Teratogenicity of the solanum alkaloid solasodine and of Kennebec potato sprouts in hamsters. Bull Environ Contam Toxicol 15(5):522-524.
- Kinghorn AD, Balandrin MF (1984) Quinolizidine alkaloids of the Leguminosae: Structural types, analysis, chemotaxonomy, and biological activities. In Pelletier WS (Ed) Alkaloids: Chemical and biological perspectives. New York, Wiley: 105-148.
- Körper S, Wink M, Fink RH (1998) Differential effects of alkaloids on sodium currents of isolated single skeletal muscle fibers. FEBS Lett 436(2):251-255.
- McVaugh R (1987) Flora novogaliciana. A descriptive account of the vascular plants of Western México. University of Michigan Press. 786.
- Muzquiz MC, Burbano C, Cuadrado C, de lacuadra C (1993) Determinación de factores antinutritivos termorresistentes en leguminosas I: Alcaloides. Inv. Agraria Producción y protección Veq. 8: 3513-3561
- Muzquiz M (1982) Valoración cuantitativa de alcaloides en semillas del genero *Lupinus* (L.). En Lopez-Bedillo L, Fuentes M y Milne D. Actas II Conf. Int. Lupino. Torremolinos: 196:206.
- Pelletier SW (1983) The nature and definition of an alkaloid. In: Afkaloids: Chemical and biological perspectives. Vol I. Pelletier S W (ed.). Wiley, New York:1-31.
- Przybylak JK, Ciessiolka D, Wysocka W, García-López PM, Ruiz-López MA, Wysocki W, Gulewicz K (2005) Alkaloid profiles of Mexican wild lupin and an effect of alkaloid preparation from *Lupinus exaltatus* seeds on growth and yield of paprika (*Capsicum annum* L.). Ind Crop Prod 21(1):1-7.
- Raz-Guzman A, Barba E (2000) Seagrass biomass, distribution and associated macrofauna in southwestern Gulf of Mexico coastal lagoons. Biol Mar Medit 7:271-274.

Roberts M, Wink M (1998) Alkaloids: Biochemistry, ecology and Commercialization. Purdue University. InDínapolis, InDiana 21:486.

Ruiz L (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 Jalisco México.

Ruiz LMA, Sotelo A (2001) Chemical composition, nutritive value, and toxicology evaluation of mexican wild Lupins. *J Agric Food Chem* 49(11): 5336-5339.

Ruiz-López MA, García-López PM, Zamora-Natera JF, Ruiz MJ (1997) Leguminosas Silvestres Fuente Alternativa de Alimento. Universidad de Guadalajara. Presencia Universitaria. 57:4.

Ruiz-López MA, García-López PM, Castañeda-Vásquez H, Zamora-Natera JF, Garzon-de la Mora P, Bañuelos-Pineda J, Burbano C, Pedrosa MM, Cuadrado C, Muzquiz M (2002) Chemical composition and antinutrient content of three *Lupinus* species from Jalisco, México. *J Food Compos Anal* 13(3):1993-1999.

Ruiz-López MA, García-López PM, Rodríguez-Macías R, Zamora-Natera JF (2010) Mexican wild lupines as a source of quinolizidine alkaloids of economic potential. *Polibotanica* 29:159-164.

Saavedra-Camacho L, Uribe-Urbe L (1995) Intoxicación por agua de *Lupinus mutabilis* (chocho). *Bol Soc Med Interna* 8:35-37.

Salatino A, Gottlieb OR (1980) Quinolizidine alkaloids as systematic markers of the papilionoideae. *Biochem Syst Ecol* 8(2):133-147.

Santiago-Quiles MR, Oquendo-Jiménez I, Herreño-Saénz, Antoum MD (2010) Genotoxicity of alkaloid-rich extract from *Lupinus termis* seeds. *Pharmaceutical Crops* 2010(1):18-23.

Santos-Soler G, Gómez de Salazar JR, Ivorra-Cortés J, García-Carrasco M. Enfermedades autoinmunes sistémicas y reumatológicas. Ed. Elsevier, Madrid, España, 2005. Cap. 60: 800.

Schemeller T, Sauerwein M, Sporer F, Wink M, Müller WE (1994) Binding of quinolizidine alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptor. *J Nat Prod* 57(9):1316-1319.

Schmid W (1975) The micronucleus test. *Mutat Res* 31:9-15

Stokiecki M, Markewicz M, Michalski Z, Gulewicks K (1992) New concept of the bitter lupin seeds utilization. 1re Conf. Eur. Sur Les Proteagineux. Angers, France: 423-424.

- Tahktajan A (1987) *Systema magnoliophytorum*. Nauka. Leningrad: 440.
- Wink M, (1993) Quinolizidine alkaloids. Methods in plant Biochemistry, Academic Press. London: 197-239
- Wink M, Hartmann T (1982) Localization of the enzymes of quinolizidine alkaloid biosynthesis in leaf chloroplasts of *Lupinus polyphyllus*. Plant Physiol 70(1):74-77.
- Wink M, Witte L (1985) Quinolizidine alkaloids as nitrogen source for lupin seedlings and cell cultures. Z Naturforsch 40:767-775.
- Wink M, Witte L (1991) Storage of quinolizidine alkaloids in *Macrosiphum albifrons* and *Aphis genistae* (Homoptera: Aphididae) Entomol Gener 15(4):237-254.
- Zamora-Natera FJ, Bernal-Alcocer A, Virgen-Calleros G, Nuño-Romero R (2005) Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Lupinus spp.* Sobre hongos fitopatogenos. Revista Mexicana de fitopatfitopatología140-146.
- Zúñiga-González GM, Gómez-Meda BC (2006) La prueba de micronúcleos. La Ciencia y el Hombre. XIX (1).