



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y

**Evaluación de la genotoxicidad de
compuestos aislados de *Lupinus
mexicanus* y *Lupinus montanus***

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática
y Manejo de Recursos Naturales y
Agrícolas**

Presenta

Monica Reynoso Silva

Zapopan, Jalisco

Julio del 2011

Dedicatoria

*A Dios por darme la vida
y permitirme realizar mis sueños
A dos seres extraordinarios, mis padres quienes
con su apoyo, dedicación y paciencia incondicional
me motivaron a seguir adelante.
A ti por ayudarme a realizar mis sueños.*

AGRADECIMIENTOS

**Mi eterna gratitud y sincero agradecimiento a mi
Director M. en C. Pedro Macedonio García López
por su valiosa dirección durante el desarrollo
y culminación de la presente investigación**

**Al Dr. Carlos Álvarez Moya por su valiosa
Colaboración incondicional brindada
en el desarrollo de la investigación**

**Al Dr. Mario Alberto Ruíz López por
el gran aporte brindado en la elaboración
del trabajo**



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Dr. Lino de La Cruz Larios
Coordinador de Posgrados
Centro Universitario de Ciencias Biológicas
y Agropecuarias

P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de tesis con el título **“Evaluación de la genotoxicidad de compuestos aislados de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*”** que realizó la Biol Monica Reynoso Silva, ha sido ACEPTADO para su impresión y con ello cumplir como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas.

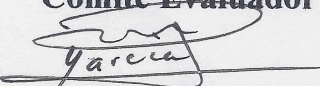
Sin otro en particular quedamos de usted con un cordial saludo.

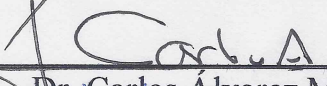
A T E N T A M E N T E

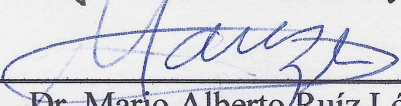
“PIENSA Y TRABAJA”

Las Agujas, Zapopan, Jalisco a 14 de Junio del 2011

Comité Evaluador

Sinodal: 
M. en C. Pedro Macedonio García López

Sinodal: 
Dr. Carlos Álvarez Moya

Sinodal: 
Dr. Mario Alberto Ruíz López

Sinodal: _____

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE GRAFICAS.....	vii
LISTA DE ANEXOS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
TAXONOMÍA Y SISTEMÁTICA.....	4
LA DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS LUPINOS.....	4
LOS LUPINOS DE JALISCO.....	5
ALCALOIDES.....	7
LOS ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS.....	7
BIOSINTESIS Y EL METABOLISMO DE LOS ALCALOIDES QUINOLIZIDINICOS EN LOS LUPINOS.....	8
LA DISTRIBUCIÓN DE ALCALOIDES QUINOLIZIDINICOS.....	10

LUPANINA Y ESPARTEINA.....	11
FLAVONOIDES.....	12
SISTEMAS PARA LA DETECCIÓN DE DAÑO GENÉTICO.....	13
ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD.....	13
PRUEBA COMETA.....	14
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS.....	19
MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIÓN.....	49
LITERATURACITADA.....	50
ANEXOS.....	62

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Los posibles centros de origen y diversificación del género <i>Lupinus</i>	5
Figura 2. Distribución de las especies de lupinos en la República Mexicana.....	6
Figura 3. Las estructuras de algunos alcaloides quinolizídnicos.....	8
Figura 4. Biosíntesis de alcaloides quinolizídnicos.....	10
Figura 5. Núcleos cometizados observados con microscopía de fluorescencia.....	16
Figura 6. Flor de <i>Tradescantia</i> (clon 4430).....	17
Figura 7. Procedimiento completo para la evaluación de la genotoxicidad de extractos <i>Lupinus mexicanus</i> , <i>Lupinus montanus</i> , lupanina, esparteina y flavonoides en linfocitos humanos y en los núcleos estaminales de <i>Tradescantia</i> (clon 4430).....	27
Figura 8. Estructura de posible fragmentación del perclorato de lupanina.....	28

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Longitud promedio en micras de la cauda en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de los extractos de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*, lupanina, esparteína y flavonoides.....38

Cuadro 2. Longitud promedio en micras de la cauda en núcleos de *Tradescantia* (4430) expuestos a diferentes concentraciones de los extractos de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*, alcaloides lupanina, esparteína y flavonoides.....40

LISTA DE GRAFICAS

Página

Gráfica 1 . Cromatograma de estándar de lupanina.....	29
Gráfica 2. Espectro de masas que muestran los iones más abundantes de estándar de lupanina.....	29
Gráfica 3. Cromatograma de estándar de lupanina.....	30
Gráfica 4. Espectro de masas que muestra el ion principal de estándar de lupanina.	30
Gráfica 5. Cromatogramade estándar de lupanina.....	31
Gráfica 6. Espectro de masas que muestra la masa molecular de estándar de lupanina.....	31
Gráfica 7. Cromatograma de perclorato de lupanina de la muestra 3.....	32
Gráfica 8. Espectro de masa de la muestra 3 de perclorato de lupanina con su ion principal.....	32
Gráfica 9. Cromatograma de perclorato de lupanina de la muestra 4.....	33
Gráfica 10.Espectro de masa de la muestra 4 de perclorato de lupanina con su ion principal.....	33
Gráfica 11. Cromatograma de perclorato de lupanina de la muestra 5.....	34
Gráfica 12.Espectro de masa de la muestra 5 de perclorato de lupanina con su ion principal.....	34
Gráfica 13. Cromatograma de perclorato de lupanina de la muestra 6.....	35
Gráfica 14.Espectro de masa de la muestra 6 de perclorato de lupanina con su ion principal.....	35
Gráfica 15. Cromatograma de perclorato de lupanina de la muestra 7.....	36
Gráfica 16.Espectro de masa de la muestra 7 de perclorato de lupanina con su ion principal.....	36
Gráfica 17 a. Tendencia de la actividad genotóxica en linfocitos humanos	42
Gráfica 17 b.Tendencia de la actividad genotóxica en linfocitos humanos.....	42
Gráfica 17 c.Tendencia de la actividad genotóxica en linfocitos humanos	42
Gráfica 17 d.Tendencia de la actividad genotóxica en linfocitos humanos.....	42

Gráfica 17 e.Tendencia de la actividad genotóxica en linfocitos humanos.....	43
Gráfica 18 a.Tendencia de la actividad genotóxica en núcleos de <i>Tradescantia</i>	44
Gráfica 18 b.Tendencia de la actividad genotóxica en núcleos de <i>Tradescantia</i>	44
Gráfica 18 c.Tendencia de la actividad genotóxica en núcleos de <i>Tradescantia</i>	44
Gráfica 18 d.Tendencia de la actividad genotóxica en núcleos de <i>Tradescantia</i>	44
Gráfica 18 e.Tendencia de la actividad genotóxica en núcleos de <i>Tradescantia</i>	45

LISTA DE ANEXOS

Página

Anexo 1.
Cuestionario.....62

.

RESUMEN

El género *Lupinus* (Fabaceae) se encuentra distribuido en países del Mediterráneo y América reportándose la presencia de aproximadamente 300 especies y en México existen más de 80. Sus semillas tienen potencial farmacológico y alto contenido de alcaloides quinolizidínicos. Se obtuvieron extractos crudos de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*, así como flavonoides de *Lupinus mexicanus* y se aisló la lupanina de *Lupinus albus* a una pureza del 95% (analizada por HPLC-ME), esparteína (Sigma Chemical Company). Se evaluó la genotoxicidad utilizando la prueba del cometa en linfocitos humanos y en los núcleos estaminales de *Tradescantia* (*Tradescantia subacaulis* y *Tradescantia hirsutiflora*, clon 4430) a concentraciones de (0.01, 0.1, 0.5 y 1.0 mM). La migración de la cauda en linfocitos humanos expuestos a los extractos de *Lupinus mexicanus* (6.17 a 675 μ), lupanina (3.44 a 5.94 μ) y flavonoides (2.54 - 2.68 μ) fue mayor estadísticamente al testigo negativo ($p < 0.01$), y por tanto, mostraron actividad genotóxica, en todas las concentraciones de 0.01 a 1.0 mM. El extracto de *Lupinus montanus* no presentó diferencia significativa en las concentraciones de 0.5 mM (1.57 μ) y 1.0 mM (1.95 μ) ($p > 0.05$), comparados con el testigo negativo. El mismo caso para esparteína a la concentración de 1.0 mM (2.96 μ) ($p > 0.05$), comparados con el testigo negativo. La migración de la cauda en los núcleos estaminales de *Tradescantia* (clon, 4430) expuestos a los extractos de *Lupinus mexicanus* (19.12 a 25.99 μ), *Lupinus montanus* (15.29 a 24.28 μ) y la lupanina (12.33 a 32.06 μ) mostraron significancia estadística ($p < 0.01$) respecto al testigo negativo y por tanto, genotoxicidad en todas las concentraciones 0.01 a 1.0 mM. La esparteína no presentó diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) en las concentraciones 0.01 mM (5.96 μ), 0.1 mM (5.48 μ) y 1.0 mM (5.44 μ), solo en la concentración de 0.5 mM (7.01 μ) con respecto al testigo negativo. Los flavonoides tampoco fueron capaces de inducir actividad genotóxica (5.73 μ) ($p > 0.05$) en la concentración de 1.0 mM. y el resto de las concentraciones si mostraron diferencia significativa con el testigo negativo.

Es clara la genotoxicidad detectada en los compuestos antes mencionados, principalmente en las concentraciones más bajas (0.01 y 0.1 mM). Estos resultados contrastan con otros previamente publicados. Sin embargo, las diferencias pueden atribuirse a los distintos sistemas de prueba empleados y/o a las concentraciones de

extractos o alcaloides estudiados; el rango de concentración utilizado por nosotros es mucho más bajo, en este sentido, resulta muy interesante que la capacidad genotóxica de los compuestos estudiados sea inversa a la concentración estudiada. Es probable que las altas concentraciones de estas sustancias provoquen gran fragmentación del ADN y, por lo tanto, que resulta difícil la visualización de la cauda, lo que conduce, a una cuantificación a la baja o incluso una nula detección. Tal comportamiento ya ha sido reportado en otras sustancias químicas.

Ante la escasa información, es evidente que se requieren de más estudios toxicológicos y genotóxicos antes de explotar el potencial farmacológico de los compuestos de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*.

ABSTRACT

Lupinus (Fabaceae) is distributed in the Mediterranean and America reported the presence of about 300 species and in Mexico there are over 80. Its seeds have a high potential pharmacological and quinolizidine alkaloids. Crude extracts were obtained of *Lupinus mexicanus* and *Lupinus montanus*, and flavonoids of *Lupinus mexicanus*, lupanina was isolated from *Lupinus albus*, lupanine to a purity of 95% (analyzed by HPLC-ME), sparteine (Sigma Chemical Company). The genotoxicity was assessed using the comet assay in human lymphocytes and stem nuclei of *Tradescantia* (*Tradescantia subacaulis* and *Tradescantia hirsutiflora*, clone 4430) at concentrations (0.01, 0.1, 0.5 and 1.0 mM). The migration of the tail in human lymphocytes exposed to extracts from *Lupinus mexicanus* (6.17 to 675 μ), lupanine (3.44 to 5.94 μ) and flavonoids (2.54 - 2.68 μ) was greater than the negative control statistically ($p < 0.01$), and both showed genotoxic activity in all concentrations of 0.01 to 1.0 mM. *Lupinus montanus* extract showed no significant difference in concentrations of 0.5 mM (1.57 μ) and 1.0 mM (1.95 μ) ($p > 0.05$), compared to negative control. The same goes for sparteine to the concentration of 1.0 mM (2.96 μ) ($p > 0.05$), compared to negative control. The migration of cauda nuclei staminal *Tradescantia* (clone 4430) exposed to extracts from *Lupinus mexicanus* (19.12 to 25.99 μ), *Lupinus montanus* (15.29 to 24.28 μ) and lupanine (12.33 to 32.06 μ) showed statistical significance ($p < 0.01$) compared to negative control and therefore genotoxicity at all concentrations from 0.01 to 1.0 mM. Sparteine showed no statistically significant difference ($p > 0.05$) in concentrations 0.01 mM (5.96 μ), 0.1 mM (5.48 μ) and 1.0 mM (5.44 μ), only the concentration of 0.5 mM (7.01 μ) with respect to negative control. Flavonoids also were able to induce genotoxic activity (5.73 μ) ($p > 0.05$) in the concentration of 1.0 mM. and the rest of the concentrations did show significant difference from the negative control.

It is clear the genotoxicity detected in the compounds mentioned above, mainly in lower concentrations (0.01 and 0.1 mM). These results contrast with others previously published. However, the differences can be attributed to the different test

systems used and/or concentrations of extracts alkaloids studied, the range of concentration used by us was much lower, in this sense, it is very interesting that the genotoxic potential of compounds studied is inverse of concentration studied. Maybe high concentrations of these substances cause significant fragmentation of DNA and, therefore, it is difficult visualization of the tail, leading to a low quantification or even zero detection. Such behavior has been reported for other chemicals.

Given the limited information it is clear that more studies are required before toxicological and genotoxic exploit the pharmacological potential of compounds in *Lupinus mexicanus* and *Lupinus montanus*.

INTRODUCCIÓN

Los lupinos son ampliamente utilizados en algunos países para la alimentación animal y humana (Gladstones, 1974), se ha empleado la harina de *L. albus* en la elaboración de panes, galletas y espagueti, también se ha utilizado en la elaboración de análogos de leche y yogurt, así como en dulces de chocolate hiperproteícos para deportistas a partir de semilla tostada o aislado de proteína por sus diversas propiedades y alto contenido de proteínas, aceite, fibra, carbohidratos (López y Fuentes, 1986; Bunger *et al.*, 1999; Egaña *et al.*, 1992; Dash y Garbieri 1980).

Se han reportado que las semillas de *L. angustifolius* y *L. termis*, tienen efectos beneficios en diversas enfermedades: reducen la presión sanguínea y la hiperglucemia en ratones, conejos y ratas (Cabo *et al.*, 1984; Omran 1996), diabetes, enfermedades cardiovasculares, generación de tratamiento hormonal alternativo en humanos y animales, son anticancerígenos, antimicrobianos, antiinflamatorios (Wood, 2006; Scott *et al.*, 2008; Kurser, 2002; Claussnitzer *et al.*, 2011).

Sin embargo, el empleo de las semillas de lupinos silvestres se ve limitada por el alto contenido de alcaloides de tipo quinolizidínico (mayor a 1%) ya que puede provocar toxicidad aguda o crónica. También causan envenenamiento agudo en animales que se pueden conducir a fallo respiratorio, convulsiones y coma, lo que puede provocar la muerte del animal o desencadenar grandes trastornos en las neuronas de áreas motoras del sistema nervioso central (Agid *et al.*, 1988).

Así mismo, existen reportes de la toxicidad de los alcaloides quinolizidínicos en diversas especies de vertebrados. Esparteína se encuentra en *L. albus* y *L. angustifolius* sólo en cantidades trazas, sin embargo, es considerada junto a la lupanina, como los alcaloides más tóxicos presentes en las semillas de lupino (Jurado 1989). La esparteína y lupanina son considerados tóxicos para los vertebrados por ser agonistas de los receptores de acetilcolina, inhibidores de los canales de Na⁺ y K⁺, lo que bloquea la señal de transducción neuronal, probablemente también alteran la síntesis de proteínas (Wink, 1991; Wink y Roberts, 1998). Se describe, en bovinos y ovinos, una intoxicación por lupino, que se produce por la acción directa de los alcaloides sobre el organismo. Se sabe que los efectos tóxicos están relacionados con una dosis alta de alcaloides ingerida en un período corto, por acción directa de ellos sobre el sistema nervioso central. El cuadro clínico se caracteriza por producir depresión respiratoria, acción hipotensora, inhibición de la transmisión

neuromuscular y fibrilación cardíaca. En cuadros agudos se ha observado que disminuye drásticamente el consumo de alimento. Especialmente en animales jóvenes hay una alteración metabólica, que reduce la eficiencia alimenticia (Merck, 1993). En los patos se presenta una disminución en la eclosión de la biomasa y producción de huevo, así como un bajo conteo de eritrocitos y contenido hemático en embriones. En ratones se ha observado que la dosis máxima no letal (DL_0) para esparteína y lupanina, vía intraperitoneal, es de 30.7 mg/kg y 150 mg/kg, respectivamente, y de 220 y 410 mg/kg por administración oral para cada alcaloide respectivamente. En la rata la DL_{50} por lupanina equivale a 177 mg/kg vía intraperitoneal y 1664 mg/kg vía oral (Neuwinger 1998). Dado que la lupanina se desecha rápidamente en el hígado no perdura en el cuerpo humano y es eliminado en pocas horas por lo que no se han reportado efectos crónicos (Neuwinger 1998). El principal inconveniente para la utilización de *Lupinus* para la alimentación es su toxicidad principalmente la de tipo crónico conocida como lupinosis (Allen, 1986; Blood y Radostitis 1992; Merck 1993).

En humanos la intoxicación por la ingestión de alcaloides quinolizidínicos produce vómito, diarrea, o lo opuesto constipación. De otro modo interfieren con la inhibición de enzimas digestivas o transporte de proteínas para aminoácidos, azúcares o lípidos (Wink y Hartmann 1982).

El potencial de aplicación terapéutica alternativa de los flavonoides es prometedor, no obstante es necesario evaluar los efectos adversos en citotoxicidad, ya que existen reportes de envenenamiento en animales y humanos aislados de plantas. Algunos flavonoides poseen actividad genotóxica como es el caso de genisteína-8-C (Boos y Stopper, 2000) sin embargo, hay datos controversiales de los efectos genotóxicos de los flavonoides, específicamente existe diferencia entre estudios *in vivo* con los realizados *in vitro* (Rucinska y Gabryelak, 2009).

La activación metabólica de estos compuestos en el hígado los convierte en moléculas altamente reactivas capaces de reaccionar con macromoléculas tales como el ADN (Arungundrum *et al.*, 1999). Por lo que en el presente trabajo se evaluó la genotoxicidad de extractos obtenidos de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*, así como lupanina, esparteína y flavonoides. Se utilizó la prueba del cometa alcalino en linfocitos humanos y en núcleos de *Tradescantia*.

ANTECEDENTES

El género *Lupinus* (Fabaceae) se encuentra ampliamente distribuido alrededor del mundo en latitudes de 65°N (Islandia) a 42°S (Chile y Nueva Zelanda), longitud (76° 3' 57" W) a nivel del mar (Australia) a 3,800 m (Bolivia) (Baylis y Hamblin, 1986), en países del Mediterráneo y en América. Gladstones (1998) reporta la presencia de aproximadamente 300 especies de las cuales más de 80 se distribuyen en 26 estados de la República Mexicana (Dunn, 1979; McVaugh, 1987). Algunas especies han sido cultivadas y usadas durante siglos en amplias zonas geográficas para la alimentación animal y humana (Gladstones, 1974). La distribución de los lupinos silvestres en México es importante, sobre todo en la Sierra Madre Occidental y el eje Neovolcánico transversal, el cual, es considerado como un centro secundario de diversificación de este género (Dunn, 1984; Cuanalo *et al.*, 1989; Planchuelo, 1996; Bermúdez *et al.*, 2000). En el estado de Jalisco se reportan 15 especies de lupinos silvestres, entre los cuales las poblaciones de *L. exaltatus*, *L. mexicanus*, *L. reflexus* y *L. montanus* son los más abundantes (Ruíz *et al.*, 2000).

El género incluye hierbas anuales, perennes, arbustos, e inclusive se reporta una especie arbórea (*Lupinus jaimehintoniana*) que alcanza los ocho metros de altura (Turner, 1995). Por lo general, posee hojas palmati-compuestas de 5 a 17 folíolos simples, pero también algunas especies tienen hojas simples; estipuladas adnadas en la base de los pecíolos con dos puntas libres; brácteas florales usualmente deciduas en anthesis; adnadas a la base del cáliz; el cáliz profundamente hendido; flores en racimos dispuestas en verticilos por lo regular azules, morados o violáceas, raramente blancas o amarillas; semillas compresas o en la mayoría obovoides (McVaugh, 1987). Las especies de *Lupinus* constituyen un importante componente de los bosques de pino-encino, tanto por su abundancia como por su amplia distribución (McVaugh, 1987).

Sin preferencia por condiciones topográficas específicas, aunque es abundante en claros de bosques y en sitios perturbados, por lo general se les encuentra a las orillas de caminos y en zonas de cultivo; asimismo, como maleza en los pastizales, en regiones semiáridas y en hábitats perturbados a causa de la tala y los incendios (McVaugh, 1987).

Taxonomía y sistemática

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

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

Los datos serológicos y la secuenciación de los genes, RbcL e ITS, le han permitido la clasificación como taxón monofilético, dándole las características propias del género *Lupinus* (Wink *et al.*, 1995; Kass y Wink, 1997).

Distribución geográfica de los lupinos

Un gran número de especies de los *Lupinus* se ubica en la costa y en las regiones montañosas del oeste de Norteamérica como Alaska; en México se encuentran en las regiones superiores a los 1,500 msnm. De igual manera los encontramos en las tierras altas de los andes en Perú y regiones vecinas, en Brasil, Uruguay y Argentina. Unas cuantas especies se encuentran en el este y sureste de las costas de Estados Unidos, así como en la región del Mediterráneo, incluyendo Grecia, Turquía, España y Portugal; también existen en tierras montañosas tropicales de África (figura 1) (Gladstones, 1974; McVaugh, 1987).

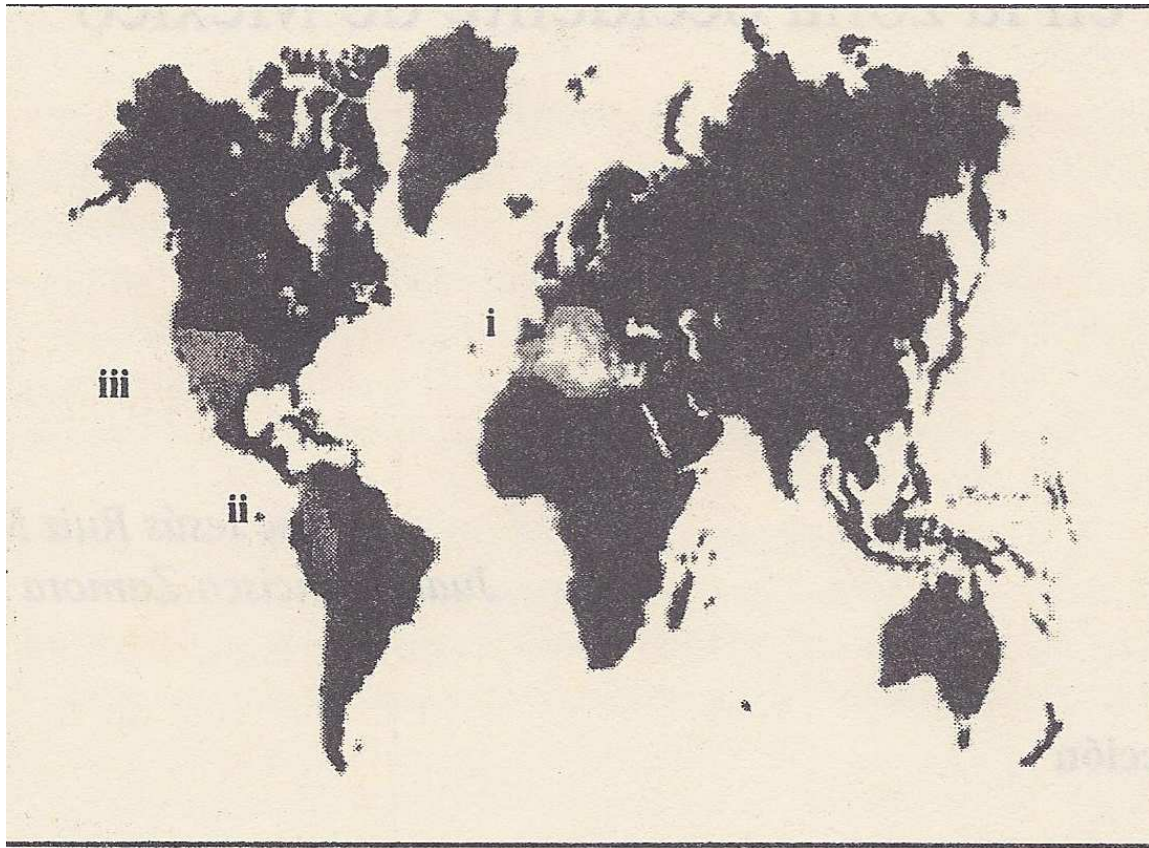


Figura 1. Los posibles centros de origen y diversificación del género *Lupinus*: i) Mediterráneo, ii) andino y iii) norteamericano.

Los lupinos de Jalisco

En Jalisco existen alrededor de 15 especies de lupinos distribuidos en su mayoría en las zonas montañosas del estado, con mayor incidencia en el nevado de Colima, Lagos de Moreno, Sierra de Quila, la Sierra de los Huicholes que forman parte de la Sierra Madre Occidental, las Sierras de Talpa y Tapalpa en el Eje Neovolcánico Transversal, en altitudes que van desde los 1,500 msnm (*L. exaltatus*) a los 4,200 msnm (*L. aschenbornii*) localizadas en los municipios de Tapalpa y Chiquilistlán (Sierra de Halo), Mezquitic (San Juan Peyotán y San Andres cohamiata), Tequila (Volcán de Tequila), Mascota (Cerro del Molcayete y Lago de Juanacatlán), Autlán (Sierra de Manatlán), San Martín de bolaños (San Miguel de la Sierra), Mazamitla (Sierra del Tigre), Cuquio (Cerca del Río Agua Caliente), Jocotepec (Sierra de Tecuán), Tonila (Volcán de Fuego), Talpa (Cumbre del Cerro Tejamanil y Sierra de la Campana), ciudad Guzmán y Ojuelos (McVaugh, 1987) (figura 2).

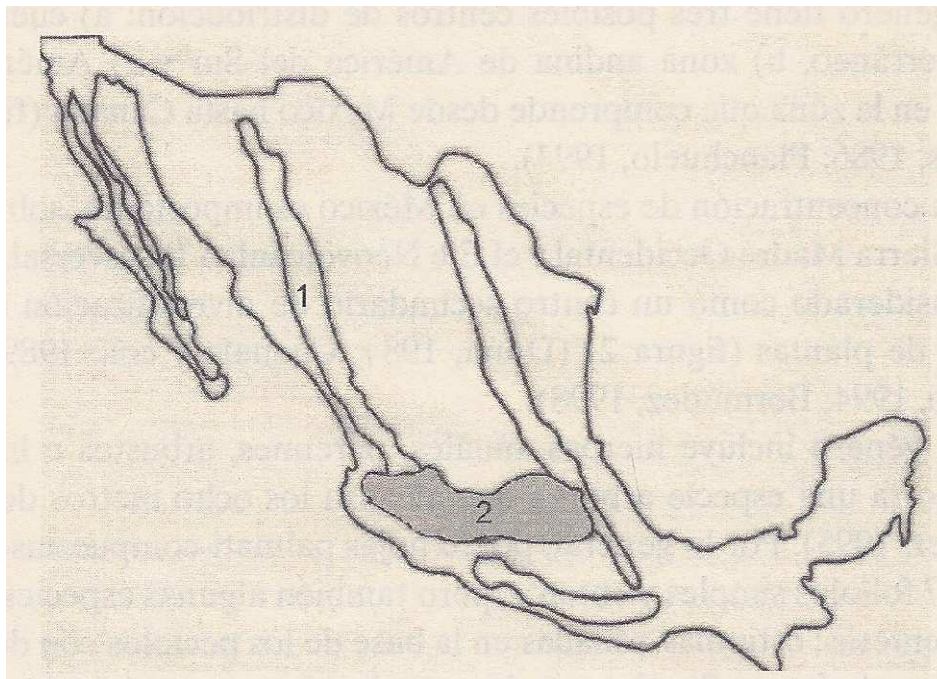


Figura 2. Distribución de las especies de lupinos en la República Mexicana. Las zonas enmarcadas señalan los sitios de principal distribución de lupinos: 1. Sierra Madre Occidental 2. Eje Neovolcánico Transversal (Bermúdez, 1988).

Lupinus montanus H.B.K. es la especie amplia distribución en el estado de Jalisco y se encuentra, usualmente, en Bolaños, Mezquitic, San Gabriel y en el Eje Transversal Neovolcánico en, Nevado de Colima en suelos pobres, arenosos y poco fértiles, sobre praderas montañosas en zonas abiertas de bosque de *pinus hartwegii*, o como maleza en hábitat perturbado a partir de 3,000 msnm. Su floración se presenta en Diciembre y Junio (McVaugh, 1987). Otra especie con amplia distribución es *Lupinus mexicanus*, de fácil adaptación a hábitats perturbados y malezas cada vez a lo largo de las carreteras, o sobre las zonas cultivadas, (1300-1800 hasta 2200 m en la meseta central y en la cuenca alta del río Santiago. Su floración se presenta en Mayo hasta Noviembre. Se encuentra en Acatic, Arandas, Cd. Guzmán, Cuquío, Etzatlán, Gómez Farias, Juanacatlán, Lagos de Moreno, Ojuelos, Talpa, Teuchitlán, Villa Obregón, Yahualica y Zapopan (McVaugh, 1987).

ALCALOIDES

Un alcaloide es un compuesto cíclico que contiene nitrógeno en un estado de oxidación negativa, cuya distribución es limitada en organismos vivos (Roberts y Wink, 1998). Su clasificación química es la siguiente:

- a) 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.
- b) Compuestos aminocuaternarios; son muy polares, cargados todos los valores de pH y por sus características tienen que ser aislados como sales.
- c) Compuestos amino neutros, los que incluyen los alcaloides tipo amida.
- d) N-Oxidos, que son por lo general altamente solubles en agua y frecuentemente encontrados en muchas clases de alcaloides.

ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS

Se derivan de la quinolizidiana en complejidad, aunque en su mayoría son bicíclicos o tetracíclicos (2 ó 4 anillos de nitrógeno). Aparecen como aminas terciarias y como N-óxidos (Muzquiz *et al.*, 1982). Se distinguen de otros alcaloides debido a que contienen por lo menos un sistema de anillo quinolizidínico (Wink, 1993; Salantino y Gottlieb, 1980; Kinghorn y Balandrin, 1984). De acuerdo con el grado de sustitución, por lo menos ocho grupos de alcaloides quinolizidínicos pueden ser distinguidos en los siguientes grupos estructurales: a) lupanina, b) leontidina, c) esparteína/lupanina/multiflorina, d) α -pyridonico, e) matrina, f) ormo-sianina, g) piperidinicos y dipiperidinicos, y h) estructuras miceláneas (Wink, 1993). La figura 3 muestra los diferentes tipos estructurales de alcaloides quinolizidínicos.

Los diferentes tipos estructurales de alcaloides quinolizidínicos no están homogéneamente distribuidos en las leguminosas; por ejemplo, los del tipo lupanina/esparteína/multiflorina, así como los del tipo lupanina y derivados (ésteres y formas hidroxiladas) están presentes en unos cuantos géneros, principalmente en *Lupinus*. Sin embargo, sólo la familia Fabaceae posee los genes necesarios para la biosíntesis, transporte y almacenamiento de alcaloides quinolizidínicos (Wink y Hartmann 1982).

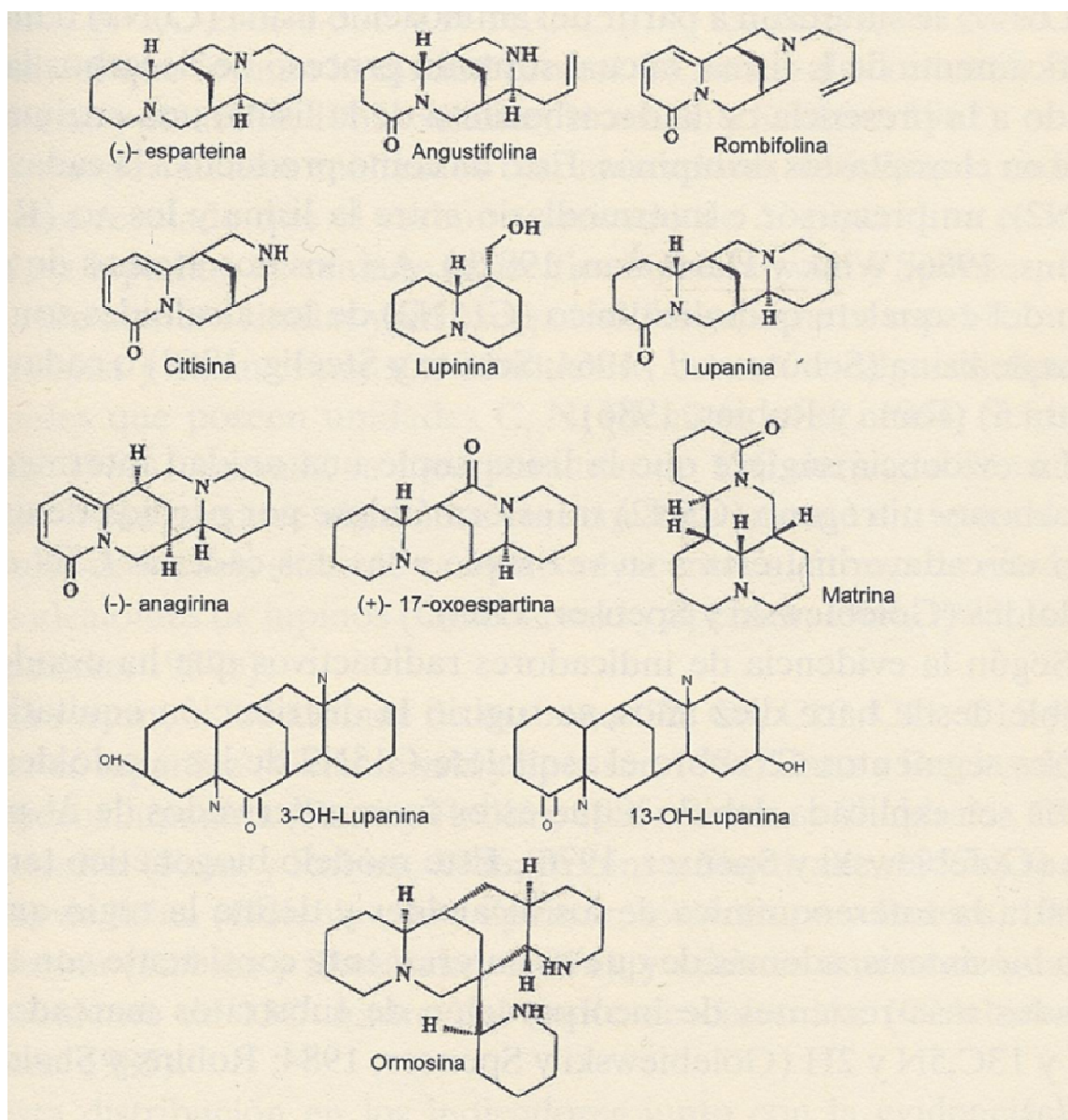


Figura 3. Las estructuras de algunos alcaloides quinolizídnicos

Fuente: Muzquiz *et al.*, 1994.

Biosíntesis y el metabolismo de alcaloides quinolizidínicos en Lupinos

La biosíntesis de los alcaloides quinolizidínicos en los lupinos se realiza en las partes aéreas verdes de la planta, específicamente en el cloroplasto (Wink y Hartmann, 1982). Las concentraciones de alcaloides quinolizidínicos poseen un ritmo diurno con una producción

estimulada durante el día. Son transportados por el floema a otras partes de la planta (Wink y Witte, 1991) y acumulados predominantemente en sustratos celulares sub-epidérmicos. Las semillas son especialmente ricas en alcaloides pueden alcanzar hasta el 3-4%, ya que son movilizadas a las hojas senescentes durante el periodo vegetativo (Wink y Hartmann, 1982).

Los alcaloides quinolizidínicos se sintetizan a partir del aminoácido lisina (C₆N₂), la cual sufre un proceso de decarboxilación, debido a la presencia de decarboxilasa de la lisina. Esto da como producto a la cadaverina (C₅N₂), un precursor e intermediario entre la lisina y los alcaloides quinolizidínicos (Wink y Hartmann, 1982). Así los átomos de nitrógeno del esqueleto quinolizidínico (C₁₅N₂) de los alcaloides son derivados de lisina o cadaverina (figura 4).

La evidencia sugiere que la lisina suple una unidad intermediaria de carbono-nitrógeno (C₅N₂) transformándose por pérdida de un carbono en cadaverina; ésta a su vez suple a las dos cadenas C₅N de los alcaloides (Golebiewski y Spenser, 1985).

Según la evidencia de indicadores radioactivos, se sugirió la distribución equitativa de los tres segmentos C₅ sobre el esqueleto C₁₅N₂ de los alcaloides que, podría ser explicada debido a que estos fueron derivados de Δ^1 -piperidina (Golebiewski y Spenser, 1976). La piedra angular de este modelo es la incorporación equitativa de ¹⁴C⁶¹³C dentro de tres segmentos C₅ de los alcaloides (Golebiewski y Spenser, 1985). En efecto, los datos apuntan a otros intermediarios entre cadaverina y los alcaloides quinolizidínicos como son el 5-aminopentanal, que es el aldehído derivado de la pérdida de un átomo de hidrogeno de la cadaverina (Fraser y Robins 1987), o a la base cíclica del 5-aminopentanal, la Δ^1 -piperidina, que es el resultado de una denominación oxidativa o transformación del 5-aminopentanal y catalizada por las enzimas diaminoxidasa o diaminotransferasa, respectivamente (Hasse y Schmid, 1963). Debido a esto, Δ^1 -piperidina también sirve como intermediario en la biosíntesis de los alcaloides de los lupinos y suple las dos cadenas C₅n que producen unidades N-1, C-2,-3,-4-5,6 y N-16, C-15,-14,-13,-12,-11, así como a las cadenas CS que forman la unidad central C₅ de los alcaloides (Wink *et al.*, 1980).

Los experimentos realizados con marcadores de isótopos radioactivos han revelado que el carbono derivado de Δ^1 -piperidina es incorporado a lupanina de manera específica (Golebiewski y Spenser, 1976, 1984). De manera similar y sin excepción, los sustratos con ¹⁴C, a partir de lisina y cadaverina, son conducidos dentro de algunos tipos de alcaloides que poseen unidades C₁₅N₂ (Fraser y Robins 1987; Wink *et al.*, 1980). Además, la incorporación de ¹³C derivado de cadaverina y/o lisina produce alcaloides casi equitativamente enriquecidos en cada uno de los

seis sitios de carbono adyacentes al átomo de nitrógeno de los alcaloides de los lupinos (Golebiewski y Spenser, 1984).

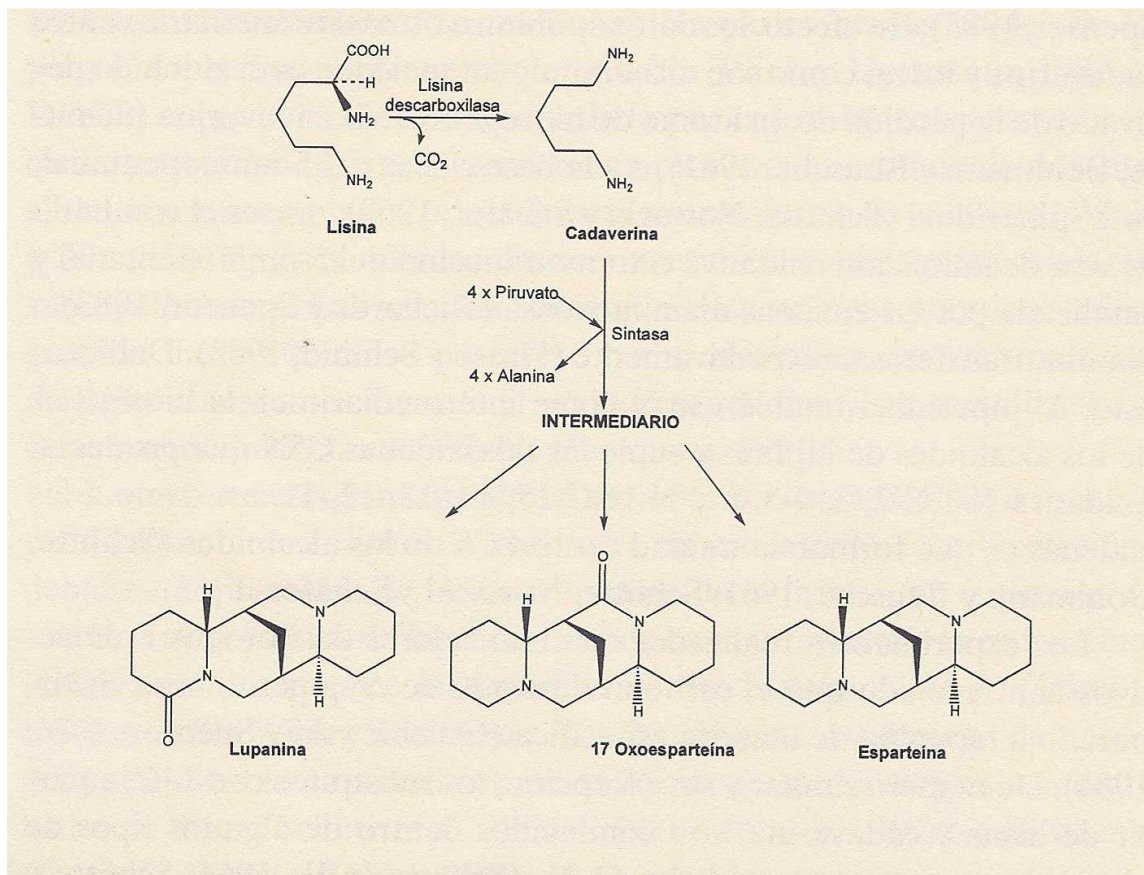


Figura 4. Biosíntesis de alcaloides quinolizidínicos

La distribución de alcaloides quinolizidínicos

Los alcaloides quinolizidínicos están distribuidos principalmente en las leguminosas (Fabaceae), que es la familia de plantas con flores más grande, después de Compositae y Orchidaceae. Agrupa 650 géneros y aproximadamente, 18,000 especies (Bañuelos y Jiménez 2006). Los alcaloides quinolizidínicos se sintetizan y acumulan en las llamadas leguminosas primitivas de las tribus siguientes: Genisteae (*Lupinus*), Sophoreae, Dalbergieae, Euchrestae, Thermopsidae,

Bossiaeeae, Brongniartieae, Podalyrieae, Liparieae y Crotalarieae (Kingham y Balandrin, 1984). La transferencia de alcaloides quinolizidínicos a plantas hospedadoras de especies productoras de alcaloides quinolizidínicos es posible, como se da el caso en especies de Scrophutariaceae (Wink *et al.*, 1982). Por otro lado, algunos insectos especializados en parasitar plantas que contienen alcaloides quinolizidínicos (por ejemplo Macrosiphumalbifrons, Aphisgenistae y Aphis cytisorum) pueden almacenarlos de manera activa y utilizarlos como una defensa contra sus depredadores (Wink *et al.*, 1982; Wink y Witte, 1985, 1991; Wink y Romer, 1986; Wink, 1992). Actualmente se han reportado más de cien alcaloides de tipo quinolizidínico presentes en las especies silvestres del género *Lupinus*, sin embargo, existe una variación inter e intra-especie en el contenido y proporción entre ellos (Muzquiz *et al.*, 1982).

Los alcaloides quinolizidínicos representan la principal defensa química de los lupinos contra sus predadores naturales, sean herbívoros o fito-patógenos ya que estos son tóxicos e inclusive teratogénicos (Keeler, 1976; Wink, 1985; Wink, 1987; Wink, 1988; Wink, 1993; Salantino y Gottlieb, 1980).

Estas sustancias además de representar una defensa de los lupinos contra sus depredadores (insectos y herbívoros). También muestran propiedades farmacológicas como antihipertensivos, antipiréticos, antiinflamatorios y anti arrítmicos cardiacos entre otros (Schmeller *et al.*, 1994).

LUPANINA Y ESPARTEÍNA

La lupanina y esparteína son los principales alcaloides presentes en casi todas las especies de lupinos silvestres de Jalisco, además de 13- α -lupanina y 17-oxo-lupanina (Wink, 1993). La esparteína se utilizó en el tratamiento de arritmias cardiacas, contracción uterina y como diurético. La lupanina y esparteína presentan también actividad antipirética, antiinflamatoria, depresora del sistema respiratorio, diurética, hipoglucemiante, hipotensiva, alucinógena y antidiabética (Kingham y Balandrin, 1984).

El sulfato de esparteína administrado intravenosamente en pacientes normales incrementa el nivel basal de insulina (Sgambato *et al.*, 1986) y con diabetes tipo 2 estimula la secreción en las células β pancreáticas reduciendo el nivel de glucosa sanguínea (Paolisso *et al.*, 1988).

También se ha demostrado que *in vitro* varios alcaloides quinolizidínicos incrementan la secreción de insulina en presencia de niveles de glucosa elevada (García *et al.*, 2004).

Es notable que en las diferentes especies varíe la abundancia tomando en cuenta el patrón de alcaloides, la mayoría de las especies de lupinos mexicanos están más relacionadas con las especies Norteamericanas (Bermúdez *et al.*, 2000; Bermúdez *et al.*, 2002).

FLAVONOIDES

Los flavonoides son un grupo importante de metabolitos secundarios sintetizados por los *Lupinus*. Estos compuestos se caracterizan por tener un esqueleto C6-C3-C6 exhiben un amplio espectro de actividades biológicas (Dixon y Paiva, 1995; Bednarek *et al.*, 2003). Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, son especialmente abundantes en las plantas. Estos se encuentran en la soya, frutas, vegetales, semillas, flores, te verde, te negro, cacao y en bebidas como vino, cerveza, extractos de plantas como arándano, ginkgobiloba, cardo, mariano o crataegus (Formica y Regelson 1995).

La soya contiene flavonoides individuales, pero los más beneficiosos son la genisteína y daidzeína (Mentor *et al.*, 2001). Los flavonoides de soya tienen actividad antioxidante que ayudan a proteger el sistema cardiovascular de la oxidación de LDL (lipoproteína de baja densidad) (Kirk *et al.*, 1988).

Previenen diferentes enfermedades, como el aumento de la placa arterial, reduce el riesgo de obtener enfermedades cardíacas coronarias, ayuda a reducir el cáncer de seno y previene el cáncer de próstata, pueden combatir la osteoporosis estimulando la formación del hueso y también pueden aliviar síntomas de la menopausia (Mentor *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; So *et al.*, 1996). Existen reportes del empleo de isoflavonoides como la generación en tratamiento hormonal alternativo en humanos y animales (Wood, 2006; Scott *et al.*, 2008; Kurser 2002). Presentan propiedades antioxidantes y tienen acción protectora en la terapia preventiva de diversas cardiopatías, capacidad de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) (Pace *et al.*, 1995) antimicrobianos, anticancerígenos, disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, mejoran los síntomas alérgicos y artritis, aumentan la actividad de la vitamina C, bloquean la progresión las cataratas tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejoran la circulación (Claussnitzer *et al.*, 2011).

El potencial de aplicación terapéutica alternativa de los flavonoides es prometedor, no obstante es necesario evaluar los efectos adversos en citotoxicidad ya que la activación metabólica de estos compuestos en el hígado los convierte en moléculas altamente reactivas capaces de reaccionar con macromoléculas tales como el ADN (Arungundrum *et al.*, 1999). Pueden inducir apoptosis (Fioravanti *et al.*, 1998; Po *et al.*, 2002) y daño genético (Boos y Stopper, 2000). Los flavonoides también mostraron actividad genotóxica en fibroblastos de ratón (Rucinska y Gabrielak 2009).

En su estructura química contienen un número variable de grupos hidro-fenólicos, y presentan una gran capacidad antioxidante que depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos, son quelantes del hierro y otros metales de transición y de la acción inhibitoria de radicales hidroxilo y superóxido, altamente reactivos en la cadena de peroxidación lipídica (Jovanovic *et al.*, 1998; Pace *et al.*, 1995).

Sistemas para la detección de daño genético

El sistema más adecuado para detectar actividad mutagénica es aquel que localiza los mutágenos antes de que estos manifiesten sus efectos nocivos. Por lo anterior, resulta apropiado aplicar sistemas de prueba en otros organismos, para detectar daño genético ocasionado por contaminantes como pesticidas, metales pesados, medicamentos y productos naturales, siempre y cuando estén expresadas sus limitaciones y diferencias en el metabolismo y en los sistemas de reparación del ADN (Li y Loretz, 1991). Algunos autores opinan que tales diferencias son tan evidentes que los resultados pueden extrapolarse inclusive al hombre, de tal suerte que, estos tipos de estudios se han recomendado a la Organización Mundial de la Salud (Grant *et al.*, 1992).

ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD

En muchos países se establecieron los requisitos necesarios para ensayos agudos o de corto plazo y crónico o de largo plazo y se fijaron normas y niveles de tolerancia, así como, el desarrollo de una serie de bioensayos de tiempos cortos para la observación de cambios genéticos. Estos sistemas de prueba tienen diferentes propósitos como son (1) búsqueda de productos ambientales con propiedades mutagénicas, (2) identificación de carcinógenos en fluidos del cuerpo, (3) evaluación

de los mecanismos de la activación química de carcinógenos y sus reacciones con el ADN y (4) predicción de carcinogenicidad de sustancias. Generalmente se requiere de 2 o 3 bioensayos para afirmar que una sustancia química es carcinogénica (Casiano, 1991).

Actualmente se cuenta con una gran variedad de pruebas con las que se puede determinar daño genético o detectar compuestos genotóxicos, estas pueden ser bioquímicas, *in vitro*, con microorganismos, células vegetales o animales *in vivo* o con roedores para determinar daño a nivel o molecular (Ramírez, 2001).

Por lo anterior, es necesario el uso de indicadores biológicos para evaluar el daño en el material genético, por ello se desarrollaron diferentes sistemas de prueba o bioensayos para detectar daño genético inducido por agentes físicos o químicos en plantas (Grant y Salamone, 1994; Ichikawa, 1992; Grant, 1994; Grant *et al.*, 1992), en insectos (Graf y Singer, 1992; Graf *et al.*, 1984) y en bacterias (Ames *et al.*, 1973). Los sistemas de prueba antes mencionados poseen ventajas y desventajas que deben de ser consideradas para obtener mejores resultados.

Prueba cometa

Se han utilizado varias técnicas basadas en el daño al ADN para identificar sustancias con actividad genotóxica. Una de las pruebas más recientes para la detección de rompimientos de hebra sencilla o doble de ADN en poblaciones celulares es la denominada prueba del cometa o electroforesis en célula única, diseñada en 1984. El principio básico del ensayo cometa es la migración del ADN en la matriz de agarosa bajo condiciones alcalinas. Las células son embebidas en agarosa y colocadas en un porta objetos, posteriormente son lisadas por detergentes altos en sales, se someten a migrar en un campo electroforético bajo diferentes valores de pH, neutralizadas, teñidas y analizadas al microscopio de fluorescencia. Al observar la célula tiene una apariencia de un cometa, con cabeza que corresponde a la región nuclear y una cola o cauda conteniendo los fragmentos del ADN o hebras que migraron en la dirección del ánodo (figura 5). La migración del ADN es cuantificada al medir la longitud de la cauda lo que corresponde a migración. Sus características con respecto a otros métodos son las siguientes: 1) se ha demostrado su sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al ADN, 2) se requiere un número

pequeño de células por muestra, 3) flexibilidad, 4) bajo costo, 5) fácil aplicación, 6) puede ser usada para valorar genotoxicidad con cantidades relativamente pequeñas de la sustancia a evaluar, 7) se necesita relativamente poco tiempo para completar el experimento, y 8) es más eficiente que otros sistemas para detectar mutagenicidad (Monteith y Vanstone 1995).

Con este método es posible detectar una amplia variedad de daño al ADN, tales rompimientos de hebra sencilla y doble, enlaces covalente cruzados entre ADN/ADN, ADN/proteínas o desaminación de bases por daño oxidativo, en los sitiosapurínicos o apirimídicos traduciéndose en rompimientos y sitios bajo reparación de ADN (Collins *et al.*, 1997). También ha sido utilizada para visualizar degradación de ADN debido a necrosis o apoptosis. Se puede llevar a cabo en células de cualquier órgano u organismo eucariótico, ha sido extensamente empleada en células animales (Singh, *et al.*, 1988; Pandrangi, *et al.*, 1995). Por esta razón ha sido ampliamente utilizada como un indicador temprano de exposición a una amplia variedad de agentes físicos, químicos o genotóxicos y un medio sensible para detectar daño al ADN inducido o inherente, es decir como un biomonitor no específico de impacto genotóxico, por ello, se consideran como herramientas útiles en los estudios de toxicología ambiental (Ames, *et al.*, 1973; Graf, *et al.*, 1984; Grant, *et al.*, 1992; Tice *et al.*, 2000; Avishai *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2003).

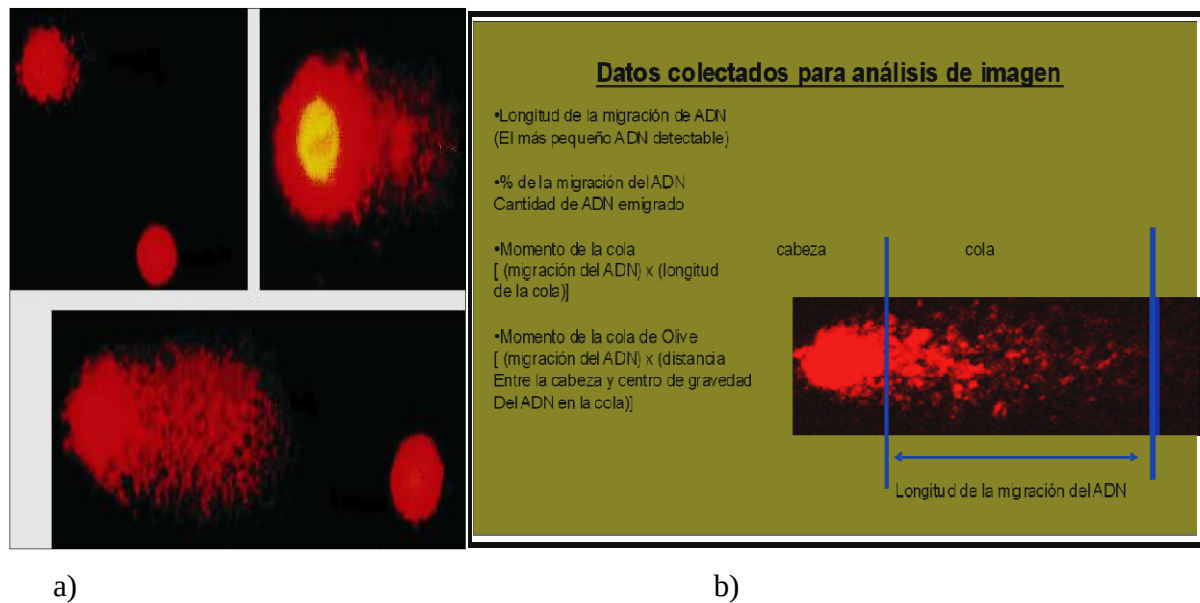
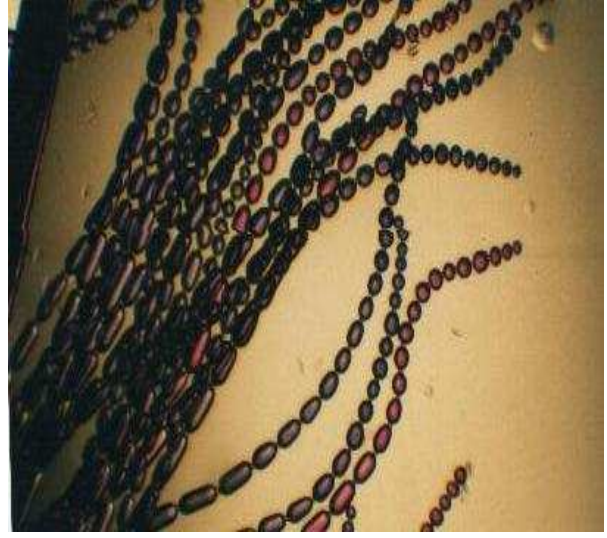


Figura 5. (a) Núcleos cometizados observados con microscopía de fluorescencia donde se observa el típico “cometa”. (b) Parámetros analizados sobre la imagen de un cometa mediante el análisis de imágenes. (<http://www.cometassay.com>).

Tradescantia es un género de plantas herbáceas y perenes perteneciente a la familia de las commelináceas y originarias del Nuevo Mundo. Comprende 74 especies que se distribuyen desde el sur de Canadá hasta el norte de Argentina. Sus especies, además, han sido objeto de muchos estudios citogenéticos su utilización como bioindicadores para la determinación de la presencia de mutágenos en el medio ambiente, Koppen y Vershaeve (1996) fueron los primeros que reportaron la aplicación de la prueba del cometa en las células de plantas, particularmente en *Vicia faba*. La planta *Tradescantia* mostró también gran eficiencia para el estudio de genotóxico, además de ser relativamente más sencilla (Álvarez *et al.*, 2001). Figura 6. (a) Flor de *Tradescantia* (clon 4430). (b) Pelos estaminales de *Tradescantia*.



a)



b)

Figura 6. (a) Flor de *Tradescantia* (clon 4430). (b) Pelos estaminales de *Tradescantia*.

HIPÓTESIS

Los extractos de alcaloides de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*, lupanina, esparteína y flavonoides poseen actividad genotóxica detectable con la prueba cometa alcalino.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad genotóxica de extractos de alcaloides de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*, flavonoides lupanina y esparteina mediante la prueba del cometa.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.1 Obtener extractos de alcaloides a partir de semilla de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*.
- 1.2 Obtener la lupanina como perclorato de lupanina a partir de semilla de *Lupinus albus*.
- 1.3 Obtener flavonoides a partir de semilla de *Lupinus mexicanus*.
- 1.4 Evaluar la genotoxicidad de extractos de alcaloides de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus* a diferentes concentraciones con la prueba del cometa alcalino en linfocitos humanos y en núcleos de *Tradescantia*.
- 1.5 Evaluar la genotoxicidad de lupanina, esparteína y flavonoides a diferentes concentraciones con la prueba del cometa alcalino en linfocitos humanos y en núcleos de *Tradescantia*.
- 1.6 Establecer comparaciones del efecto genotóxico entre ambos sistemas linfocitos y núcleos de *Tradescantia*.

MATERIAL Y METODOS

Colecta

Se colectaron ejemplares de *Lupinus mexicanus* en lagos de moreno a 1700 msnm y *Lupinus montanus* en el nevado de colima a 2800 msnm, Jalisco, México. Se clasificaron en el Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara. A las muestras les fueron separadas las semillas maduras se guardaron hasta el momento de su utilización.

Obtención del extracto crudo de alcaloides para bioensayos

Los extractos se obtuvo a partir de 100g de semillas de *Lupinus mexicanus* o *Lupinus montanus*. Las semillas se molieron y la harina se colocó en un aparato Soxhlet por 6 horas a reflujo con éter de petróleo. Posteriormente la harina desengrasada se seco al aire libre y se mezcló con 300 ml de hidróxido de potasio (KOH) al 25%, durante 3 horas, en seguida la harina alcalinizada se homogenizó con 300 g de tierras de diatomeas (Sigma 91053-39-3). Enseguida, la mezcla, harina: tierras diatomeas se colocó en columnas preparadas previamente con una capa tierras de diatomeas y arena de mar. Los extractos se arrastraron con 500 ml de diclorometano hasta que no se detecto la presencia de alcaloides con el reactivo dragendorff. Los extractos acarreados se llevaron a un rotavapor para separar el diclorometano y concentrar los alcaloides. Se verificó la presencia de alcaloides con el reactivo dragendorff (Wysocka y Przybyl 1994).

Obtención de Lupanina

Este compuesto fue aislado en forma de perclorato a partir de la semilla de *L. albus*. Se utilizaron 200 g de semilla y se desgrasó con hexano durante 24 horas en un aparato soxhlet y la harina se secó por 24 horas en la campana de extracción. Posteriormente se preparó una solución de hidroxido de (KOH) al 25% y se mezcló con la harina desengrasada, se dejó reposar durante 3 horas, se homogenizó con 300 g de tierras de diatomea y se macero, enseguida la mezcla se sometió a reflujo con una solución de éter anhidro por 14 horas y se colocó en un rotavapor para recuperar el solvente.

Al extracto de lupanina ya tratada anteriormente se le agregaron 50 ml. de metanol, posteriormente se ajustó a pH 6.5 con ácido perclórico y se colocó en la campana de extracción hasta que evaporara. El extracto de lupanina se colocó en un embudo y se filtró con metanol, posteriormente se le agrego eter anhidro y se colocó en la campana de extracción, se precipito en cristales de perclorato de lupanina.

Enseguida se mezclo 1 ml de agua, 4 gotas de hidróxido de amonio, 4 gotas de cloruro de metilo y una pequeña muestra de perclorato de lupanina. Se retiro el agua, se colocaron varias gotas en una tira reactiva y se determinó la presencia de alcaloides con el reactivo dragendorff (Wysocka y Przybyl 1994).

Análisis e identificación de lupanina

La confirmación preliminar de la presencia de lupanina se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF). Para la CCF se usaron placas de aluminio recubiertas de gel de sílice 60 GF254 (Merck); el eluyente de corrimiento fue diclorometano:metanol:NH₄OH 8:2:0.5. Las placas se revelaron con el reactivo de Dragendorff. Posteriormente la identificación de la lupanina se llevo acabo por cromatografía líquida acoplada a espectometría de masas-masas Triple Cuadrupolo modelo 6430. Marca Agilent Technologies. El equipo consta de HPLC modelo 1200. Consta de: Desgasificador, bomba binaria, horno de columnas, automuestreador con refrigeración interfase Electrospray. Las condiciones fueron:

Fase acuosa: H₂O y Ac. Fórmico 0.1% (60%).

Fase orgánica: (acetonitrilo) ACN 95% + 5% H₂O y Ac. Fórmico 0.1% (40%)

Columna: C18, de 50 mm X 4.6, 1.8 μ tamaño de partícula. Phenomenex.

Flujo: 0.3 ml/min.

Tiempo de corrida 1.0 min.

Polaridad: positiva

Transición: 249.3/136.2

Concentración de la muestra: 1000 ng/ml

PM: 248.36 de la lupanina

Obtención de esparteína

La esparteína se obtuvo de manera comercial, como sulfato de esparteína (Sigma Chemical Company).

Obtención de flavonoides

Los flavonoides se obtuvieron a partir de 100g de plantulas de semillas de *Lupinus mexicanus* se colocaron en un vaso de precipitado con ácido sulfúrico (95%). Enseguida se lavaron en agua corriente y enjuagaron con agua destilada 10 veces. Se germinaron en charolas con agua sin que sean totalmente cubiertas, durante 24 horas y posteriormente se mantuvieron húmedas por aspersión de agua por 24 horas más. Los germinados obtenidos se colocaron en un vaso de precipitado donde se adicionó 100 ml de metanol al 80%, se homogenizó con un Ultraturrax durante 5 minutos, al homogenizado se le agregó 100 ml del solvente utilizado, el producto obtenido se sometió a baño ultrasónico por 30 minutos, después se filtró al vacío en un embudo Büchner acoplado a un matraz Kitasato de 1 litro. Se hicieron lavados del material residual con 20 ml de metanol al 80%. Al filtrado obtenido se eliminó el metanol en un rotavapor, a una temperatura de 40°C, utilizando vacío.

El extracto concentrado se almacenó en refrigeración a – 20°C sin exposición a la luz, hasta su posterior proceso.

Extracción en fase sólida (EFS)

Los extractos metanólicos concentrados que se obtuvieron, se disolvieron en 25 ml de agua destilada y se homogenizó en baño ultrasónico por 20 minutos. Después con la finalidad de concentrar y purificar, los compuestos polifenólicos se sometieron a (EFS). Previo a la percolación de los concentrados se activaron los cartuchos con 10 ml de agua cada uno. Posteriormente se percoló el concentrado a través del tándem de cartuchos (fuerte extracción catiónica y C-18 fase reversa), después se eluyeron los compuestos más polares con 10 ml de agua y 10 ml de metanol grado HPLC, para eluir los compuestos fenólicos que fueron retenidos en ambos cartuchos. Cuando se obtuvo el extracto concentrado y purificado se sometió a rotación y evaporación y posteriormente a congelación (- 20°C) (Stobiecki *et al.*, 1997.)

Para monitorear la presencia de isoflavonoides se utilizó, la cromatografía en capa fina, (TLC) para lo cual se utilizó como estándar indicador genisteína y como revelador el reactivo de Gibbs.

Los extractos congelados se liofilizaron, se envasaron al vacío y se mantuvieron a una temperatura de -20°C sin exponerlos a la luz.

De cada una de los extractos anteriores *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*, lupanina y esparteína y flavonoides se prepararon las siguientes concentraciones con la finalidad de evaluar su actividad genotóxica: 0.01, 0.1, 0.5 y 1.0 mM. Y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su utilización.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA COMETA EN LINFOCITOS HUMANOS

Las muestras de sangre se obtuvieron de estudiantes jóvenes (sanos) no expuestos a medicamentos, radiación, no fumadores (datos obtenidos mediante la elaboración de un cuestionario). La sangre se colocó en tubos capilares posteriormente se colocó en una solución amortiguadora de fosfatos (Na_2PO_4 4 mM, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 8 mM, NaCl 160 mM, pH 7) (Singh *et al.*, 1988) y fueron separados mediante centrifugación a 5000 rpm/10 minutos en tubos capilares. Los portaobjetos primero se cubrieron con agarosa tipo Normal Melting Point (NMP) al 1 %, se permitió que solidifique y luego fue retirado el microgel para tener una superficie completamente limpia. Después de esto, 300 μl de agarosa Low Melting Point (LMP) al 0.6 % se colocó en el portaobjetos. Se preparó una mezcla con 250 μl de agarosa de tipo LMP al 0.5% más 10 μl de la suspensión de linfocitos y se colocó sobre la primera capa. Finalmente una tercera capa de 100 μl de agarosa LMP al 0.5 % fue añadida para cubrir la segunda capa. Dos laminillas por concentración se sumergieron en las concentraciones previamente preparadas de 0.01, 0.1, 0.5 y 1.0 mM de extractos de alcaloides de *Lupinus mexicanus* (incluyendo al testigo positivo: nitrosodietilamina 1.0 mM) y no tratados (testigo negativo con agua destilada) durante 3 horas, se lavaron con agua destilada. Posteriormente se colocaron en solución de lisis (NaCl 2.5 mM, Na_2EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM, lauril sarcosinato 1%, Tritón X-100 1% y DMSO 10%, pH

10) por 1 hora a 4° C. Después de la lisis, los microgeles se colocaron en buffer de electroforesis (NaOH 30 mM, Na₂EDTA 1mM, pH 13) por 45 minutos a 4° C. Finalizado el tiempo en el amortiguador se realizó la electroforesis, se llevo a cabo por 10 minutos en una camara horizontal a 200 mA y 9 voltios, se lavaron los microgeles con agua destilada durante un minuto e inmediatamente se tiñeron con 0.5 ml de bromuro de etidio (20 µl/ 1 ml) por 5 minutos. Después, se procedio a lavarlas 2 veces con agua destilada y un cubreobjetos se colocó sobre el gel para su observación en el microscopio. La evaluación se realizó mediante la cuantificación de la longitud de la cauda (ADN dañado). La observación de los cometas se realizó en un microscópio de fluorescencia de la marca Axioskop 40 con un filtro de excitación 515-560 nm. La distancia de migración del ADN se midió con la utilización del software comet assay system II.

Se hizo lo mismo para el extracto de *Lupinus montanus*, lupanina, esparteina y flavonoides.

PRUEBA COMETA EN NÚCLEOS DE *TRADESCANTIA*

El clon 4430 de *Tradescantia* (*T. subacaulis* X *T. hirsutiflora*), de gran sensibilidad a mutágenos ambientales, se obtuvo del Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del Centro Universitario de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México. Las plantas se mantuvieron en el Jardín bótánico del CUCBA a condiciones de invernadero, fueron regadas y propagadas vegetativamente hasta su utilización.

Obtención de núcleos de *Tradescantia*

Los núcleos de los pelos estaminales se obtuvieron de la siguiente manera: 48 estambres de plantas sanas se colocaron en dos morteros fríos (24 en cada mortero) y se añadieron a cada uno 440 µl de amortiguador Honda (0.44 M sucrosa, 2.5% Ficoll (type 400), 5% Dextran T-40, 25 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol, y 2.5% Triton X-100). Después de la homogenización, la mezcla fue filtrada en una malla de nylon de 80 µm de apertura de poro. Los núcleos se separaron por centrifugación a 3000 rpm (4°C) por 3 minutos y

luego se lavaron 3 veces en 5 ml de PBS (0.9% NaCl), se resuspendieron con 200 μ l de amortiguador de fosfatos (Álvarez *et al.*, 2001).

Prueba del cometa en *Tradescantia*

La suspensión nuclear se sometió a la prueba alcalina del cometa como describieron Álvarez *et al.*, (2001). Los portaobjetos primero se cubrieron con agarosa tipo Normal Melting Point (NMP) al 1 %, se permitió que solidifique y luego fue retirada para tener una superficie completamente limpia. Después de esto, 300 μ l de agarosa Low Melting Point (LMP) al 0.6 % se colocaron en el portaobjetos. Enseguida, 250 μ l de agarosa de tipo LMP al 0.5% fueron mezclados con 10 μ l de la suspensión nuclear y la mezcla se colocó sobre la primera capa. Finalmente una tercera capa de 100 μ l de agarosa LMP al 0.5 % fue añadida para cubrir la segunda capa.

Dos laminillas con los núcleos de *Tradescantia*, por concentración (1.0, 0.5, 0.1, y 0.01 mM) de los compuestos, se sumergieron durante tres horas. Los microgeles con núcleos de *Tradescantia* tratados (incluyendo al testigo positivo: nitrosodietilamina 5 mM) y no tratados (testigo negativo) se sumergieron en solución de lisis (NaCl 2.5 mM, Na₂EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM, lauril sarcosinato 1%, Tritón X-100 1% y DMSO 10%, pH 10) por 1 hora a 4° C. Después de la lisis se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en (NaOH 30 mM, Na₂EDTA 1mM, pH 13) por 45 minutos a 4° C. La electroforesis se llevó a cabo por 10 minutos en una cámara de electroforesis horizontal con amortiguador de pH alcalino (buffer de electroforesis) a 200 mA y 9 voltios y una vez terminada se lavaron los microgeles con agua destilada durante un minuto e inmediatamente se tiñeron con 0.5 ml de bromuro de etidio (20 μ l/ 1 ml) por 5 minutos. Después, se procedió a lavar los microgeles 2 veces con agua destilada y un cubreobjetos se colocó sobre el microgel para su observación en el microscopio. La evaluación del daño se realizó como se mencionó anteriormente.

Análisis estadístico

Se analizaron por lo menos 100 cometas por tratamiento para obtener la media de migración del ADN. Los datos del grupo de estudio fueron comparados con los datos de los testigos negativos. Los datos en cada una de las pruebas se analizaron con el programa “Co Stat” y se aplicó la prueba F ANOVA para el análisis de varianza (Ma *et al.*, 1994). Se empleó también la prueba de comparación múltiple de Dunnett la cual, mide la significancia estadística de las diferencias entre los controles y cada una de las concentraciones de los alcaloides estudiados. Se utilizó un nivel de probabilidad de 0.05.

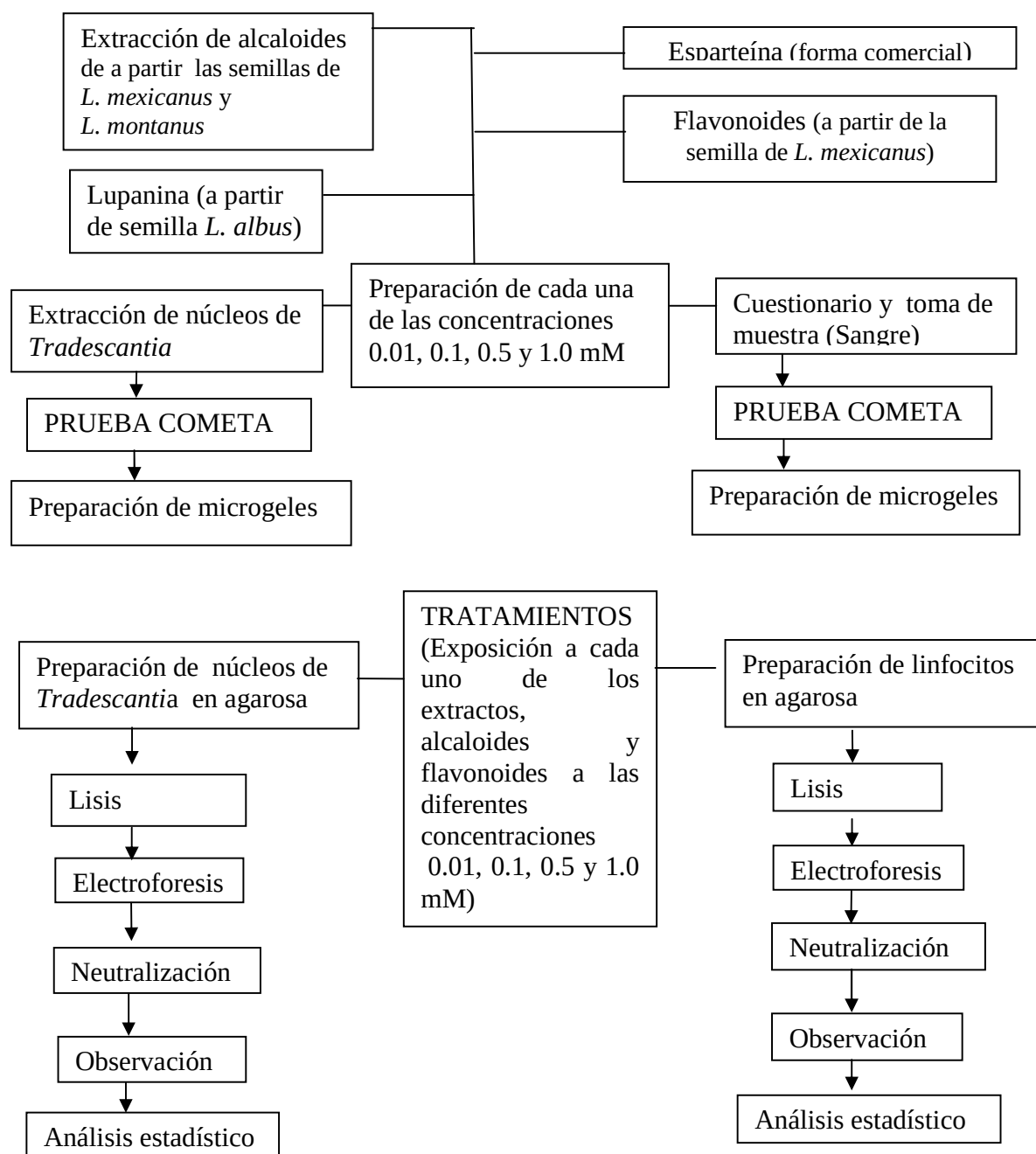


Figura 7. Procedimiento completo para la evaluación de la genotoxicidad de *Lupinus mexicanus*, *Lupinus montanus*, los alcaloides lupanina y esparteina y flavonoides en linfocitos humanos y en los núcleos estaminales de *Tradescantia* (clon 4430).

RESULTADOS

En la figura 8 se muestra la posible fragmentación de perclorato de lupanina, las gráficas 1,3,5 muestran los cromatogramas de estándar de lupanina y las gráficas 2,4,6 muestran el ion molecular en los espectros de masas de estándar de lupanina. Las gráficas 7, 9, 11, 13, 15 muestran los cromatogramas de perclorato de lupanina en donde se confirmó que la lupanina está presente en un 95% en cada una de las muestras analizadas. Las gráficas 8, 10, 12, 14, 16 muestran los espectros de masas del perclorato de lupanina.

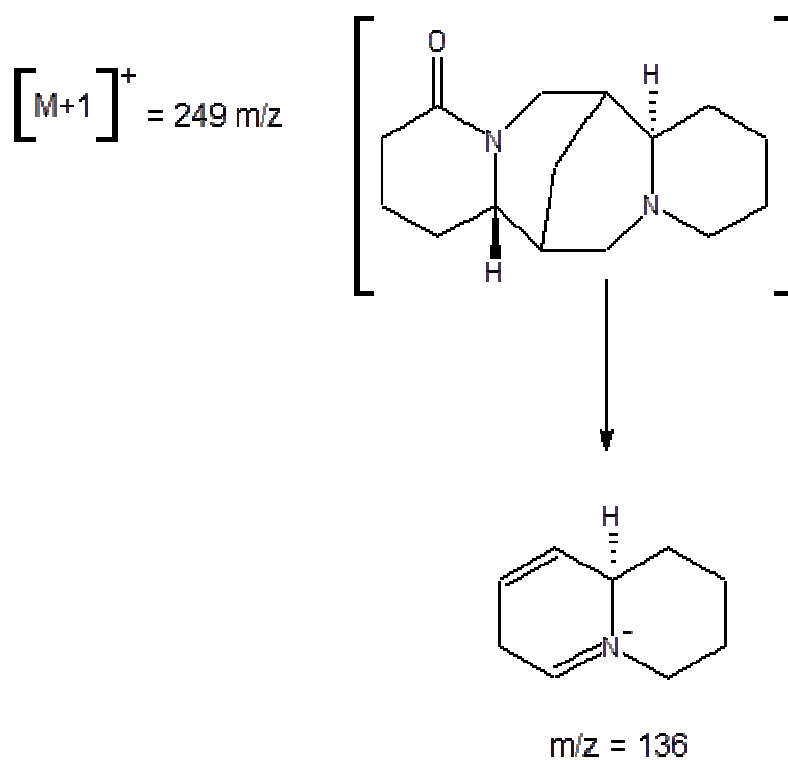
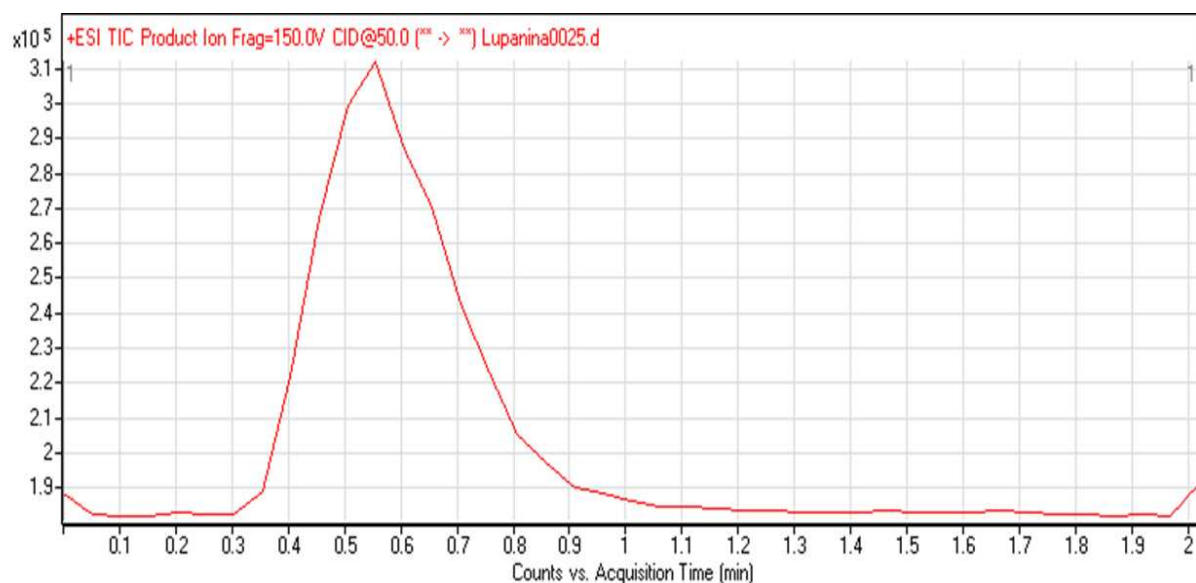
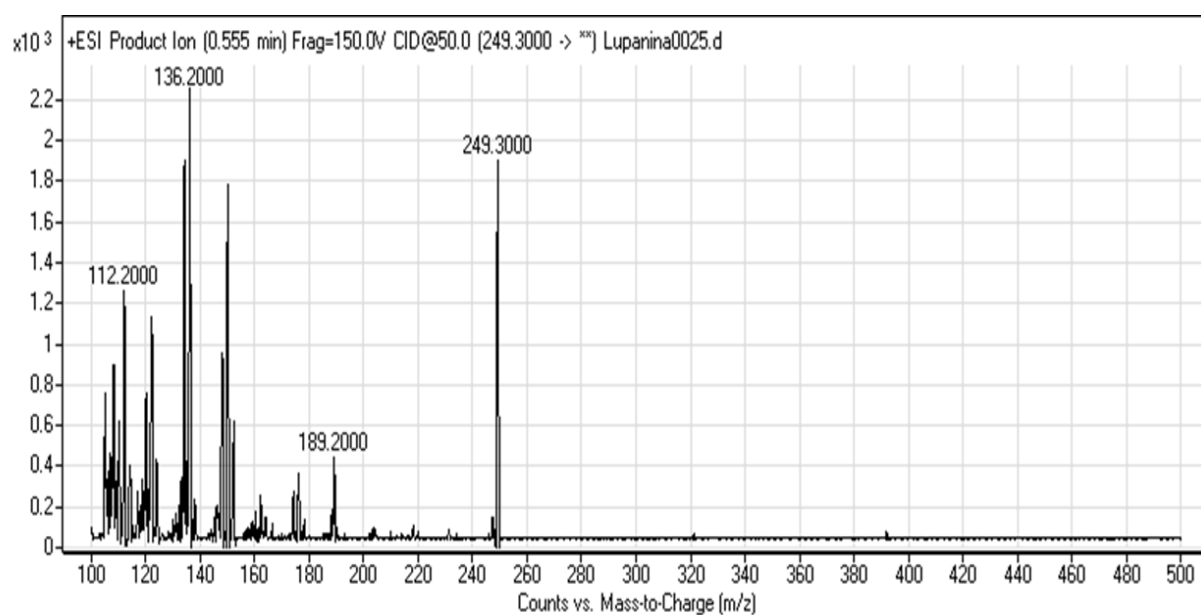


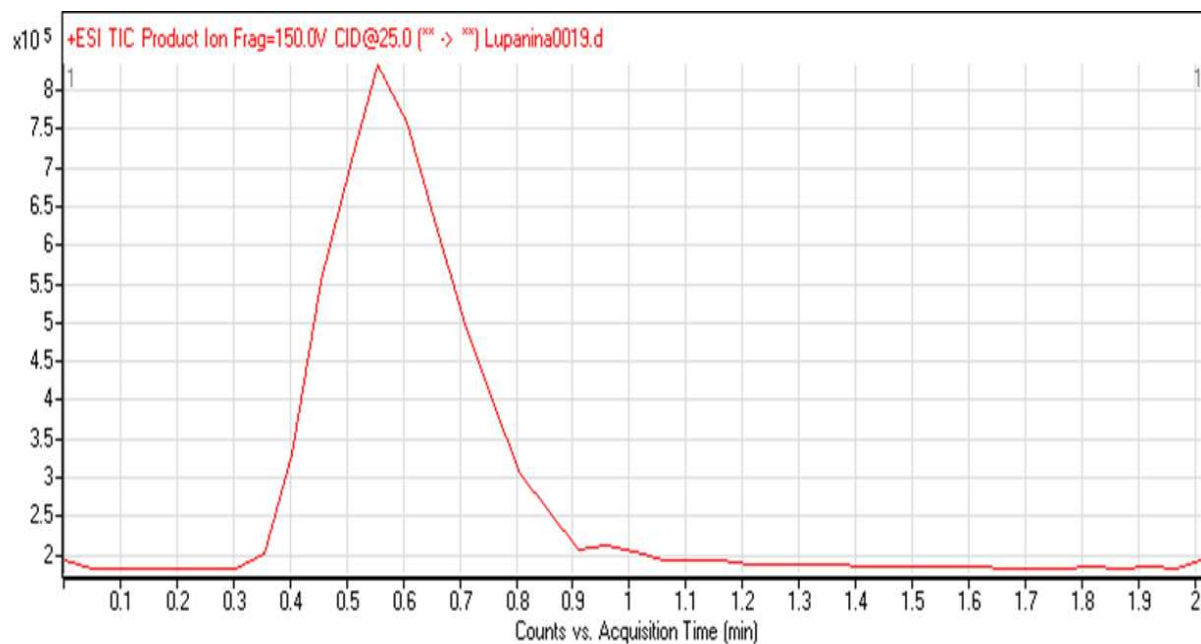
Figura 8. Estructura de posible fragmentación del perclorato de lupanina.



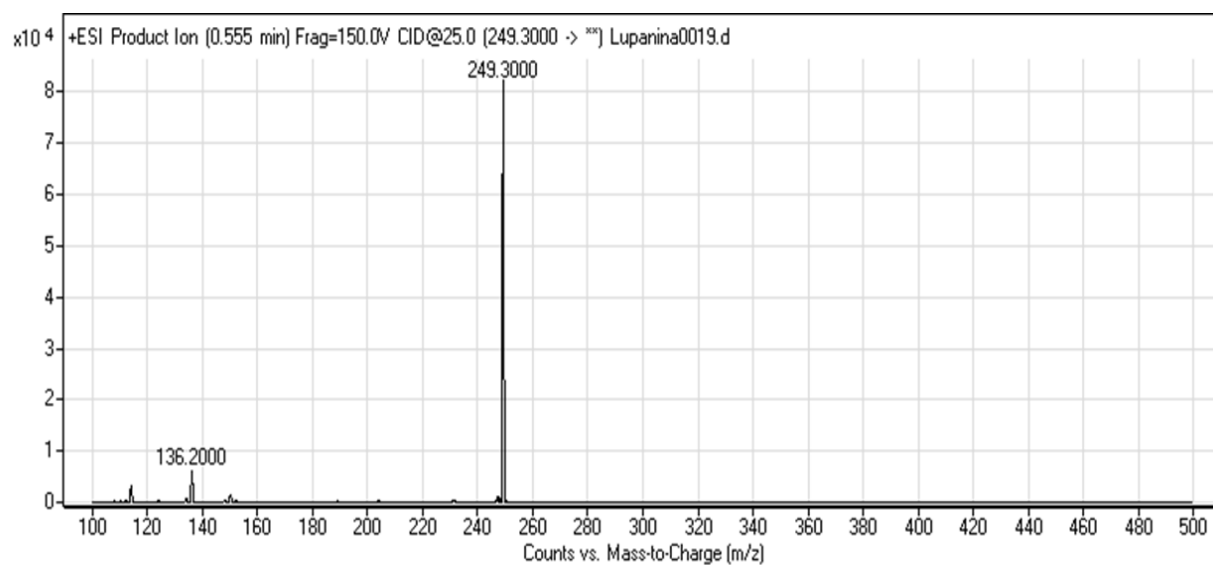
Gráfica 1 . Cromatograma de estándar de lupanina.



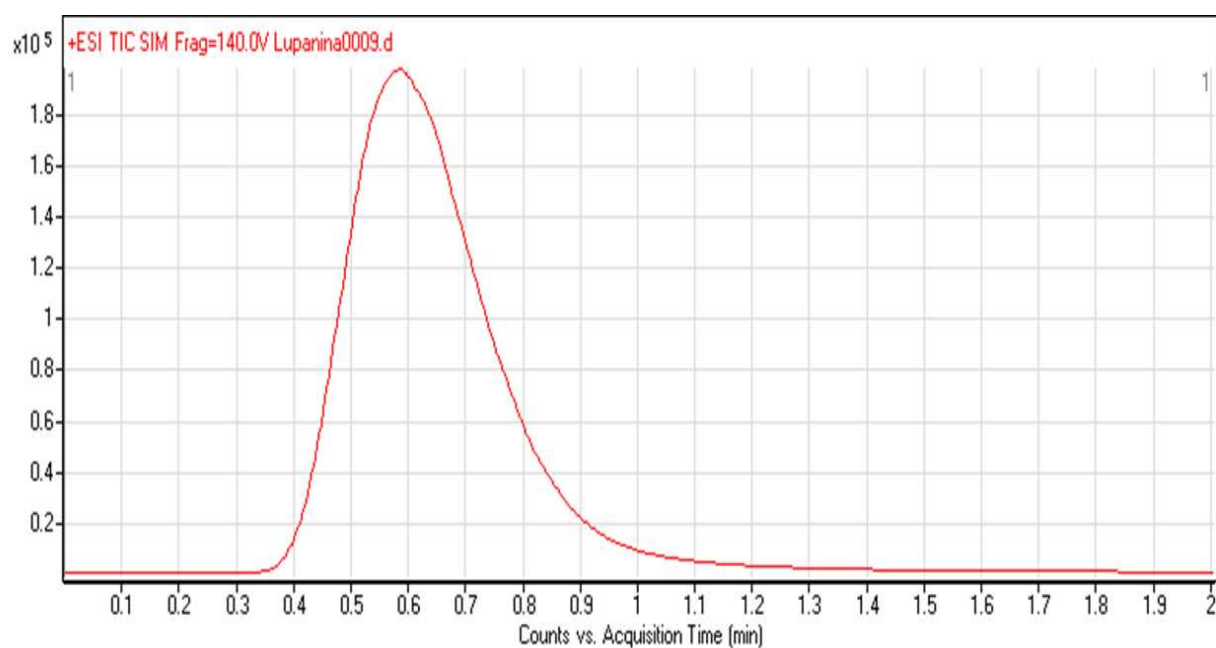
Gráfica 2. Espectro de masas que muestran los iones más abundantes de estándar de lupanina.



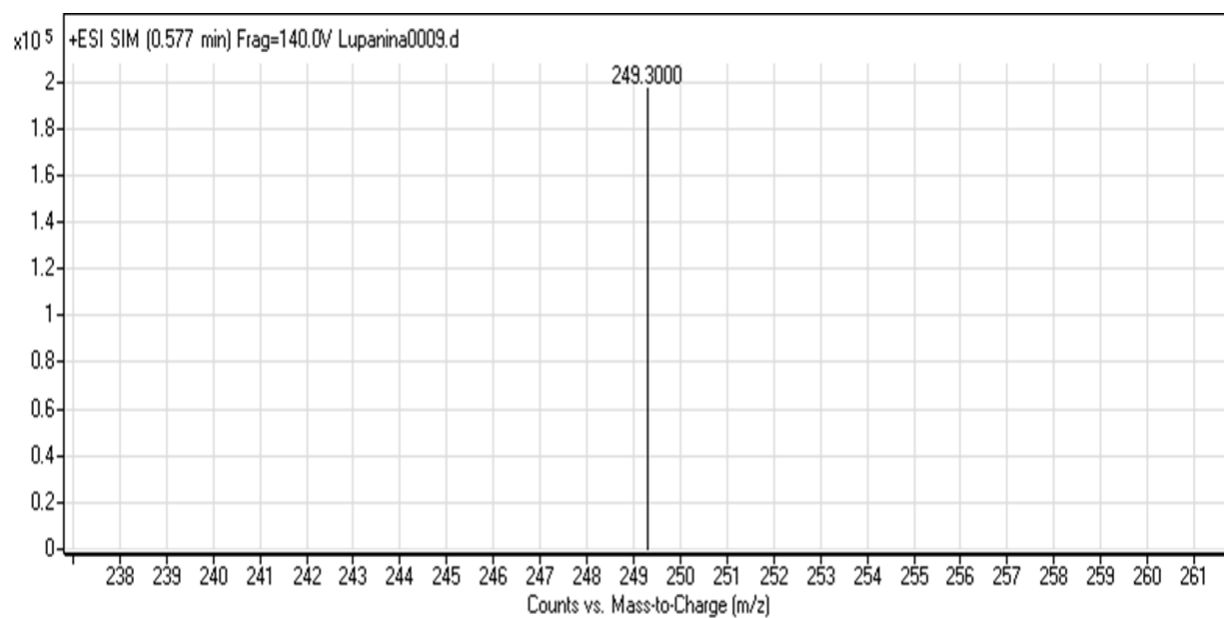
Gráfica 3. Cromatograma de estándar de lupanina.



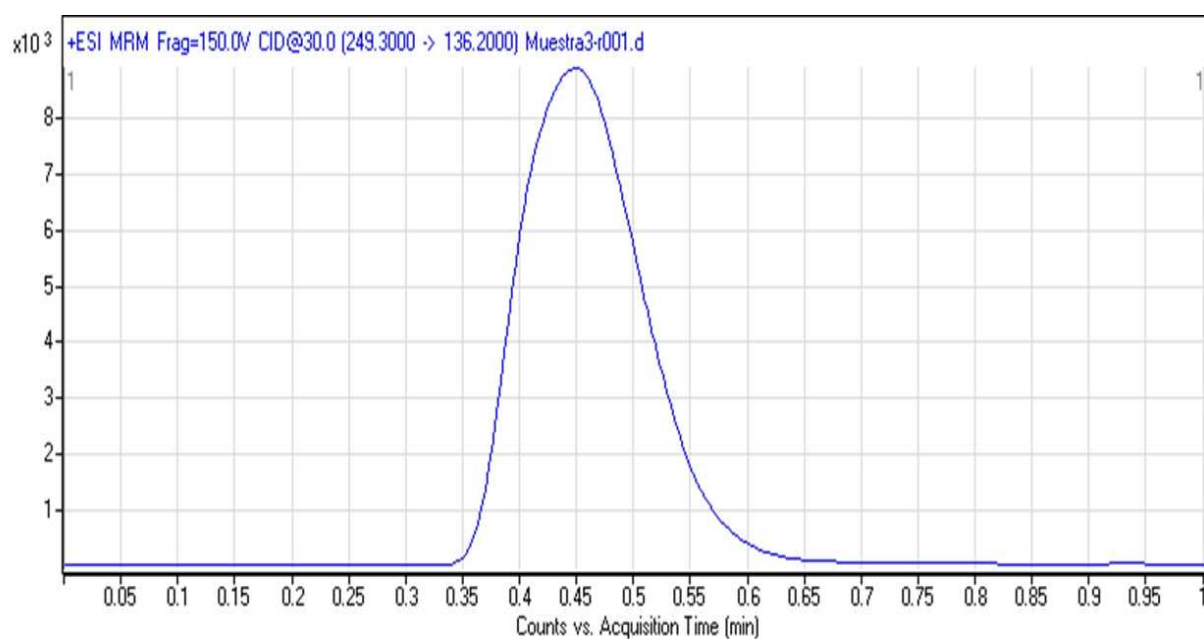
Gráfica 4. Espectro de masas que muestra el ion principal de estándar de lupanina.



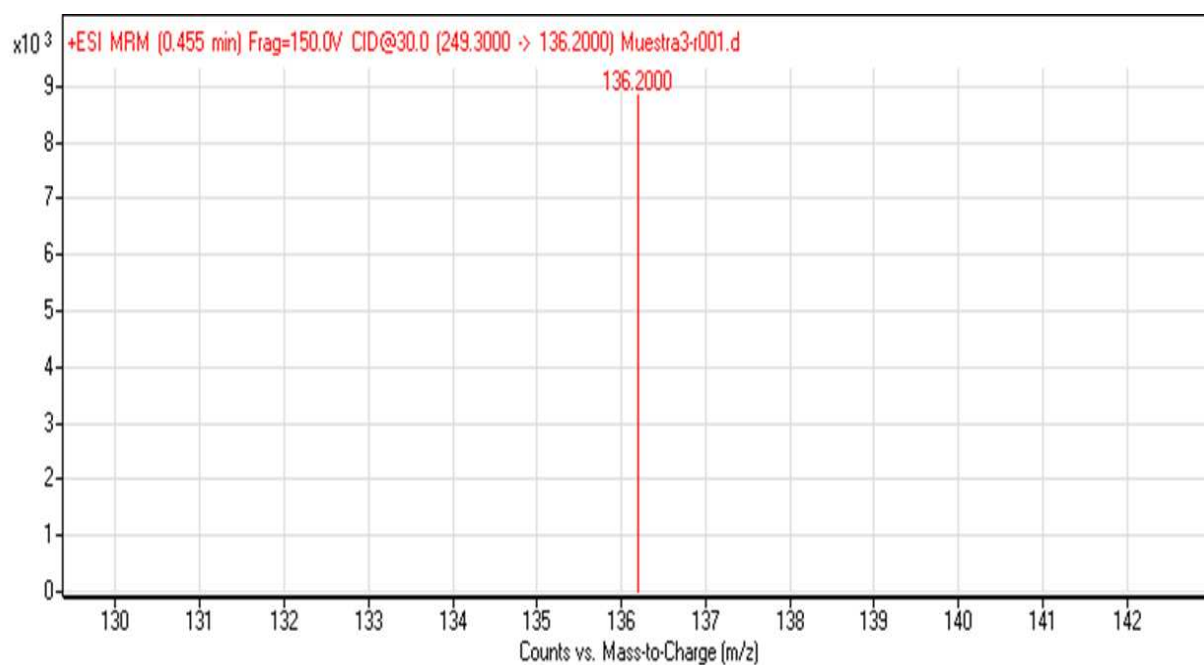
Gráfica 5. Cromatograma de estándar de lupanina.



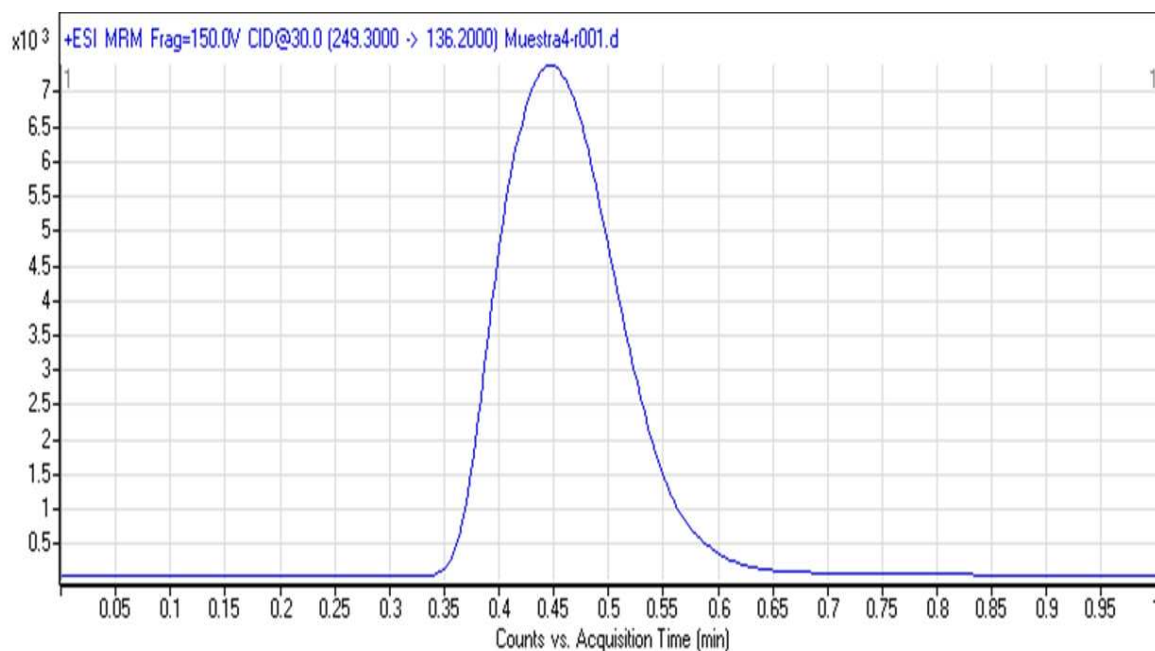
Gráfica 6. Espectro de masas que muestra la masa molecular de estándar de lupanina.



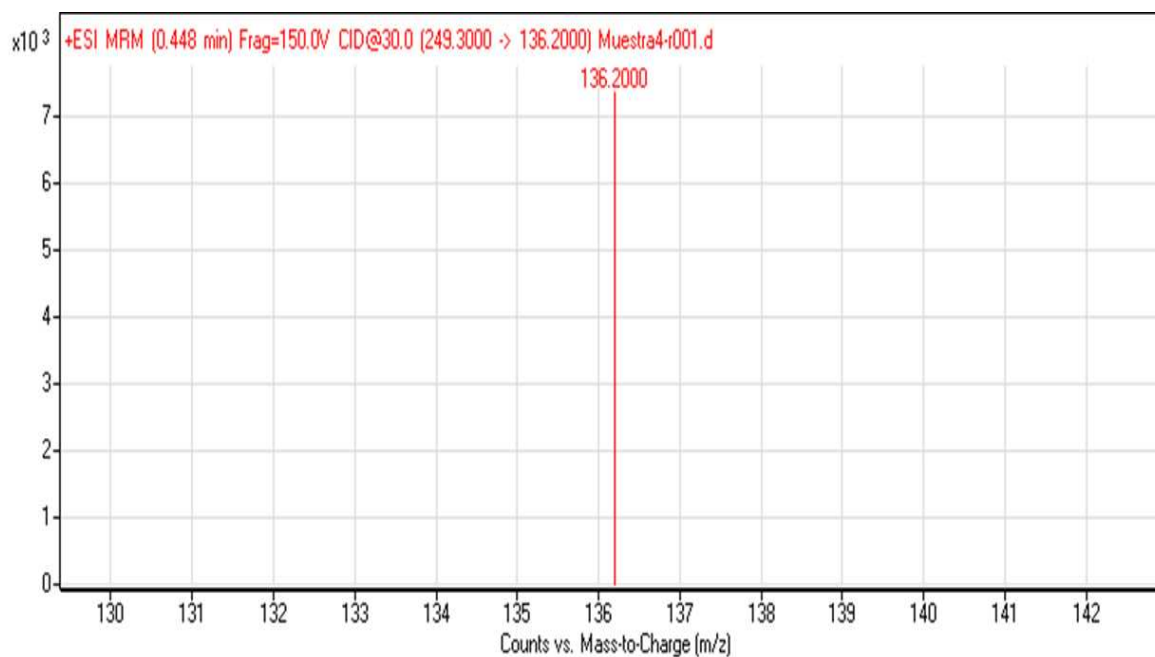
Gráfica 7. Cromatograma de perclorato de lupanina de la muestra 3.



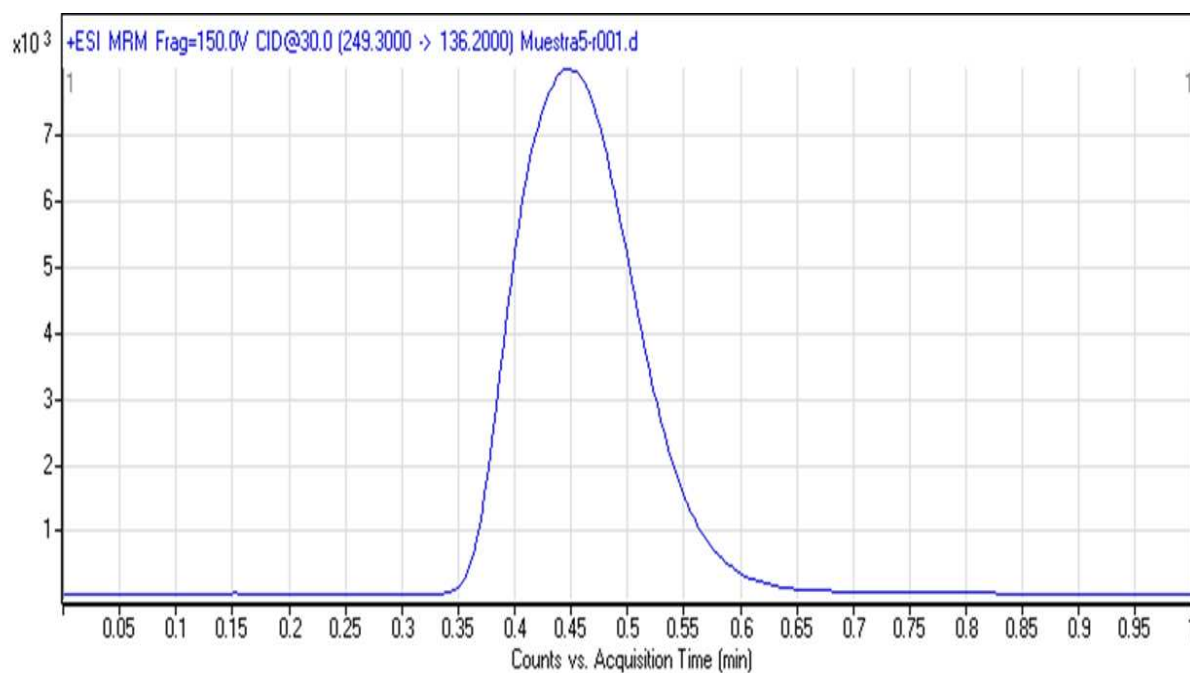
Gráfica 8. Espectro de masa de la muestra 3 de perclorato de lupanina con su ion principal.



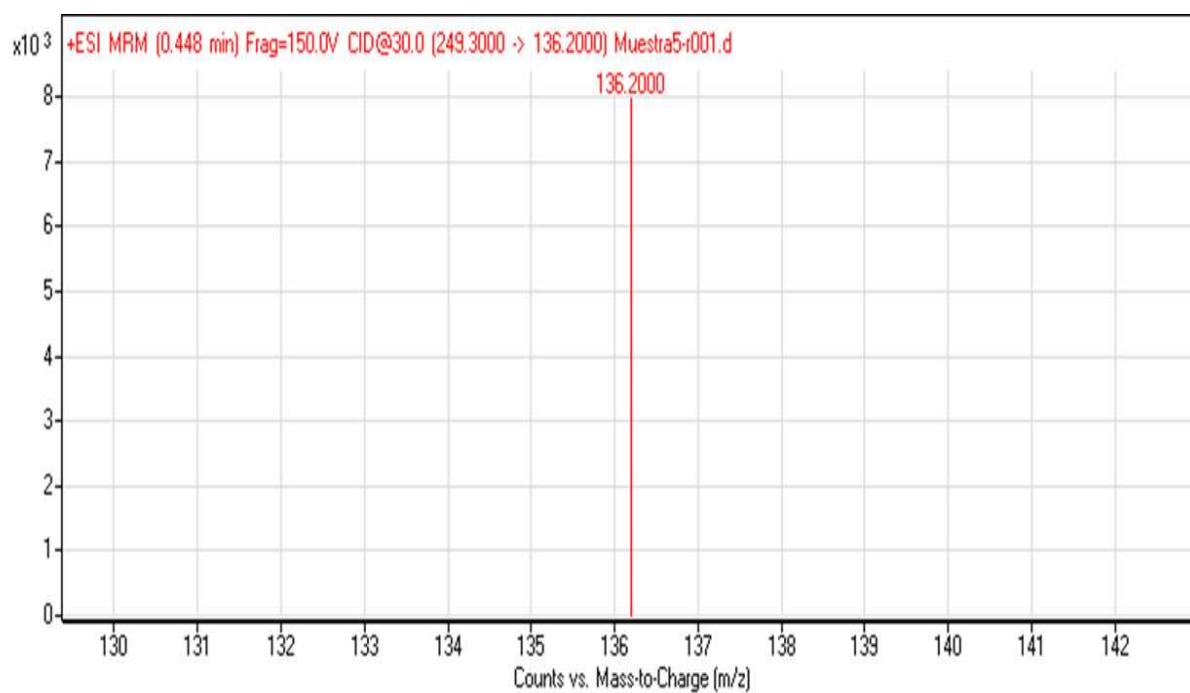
Gráfica 9. Cromatograma de perclorato de lupanina de la muestra 4.



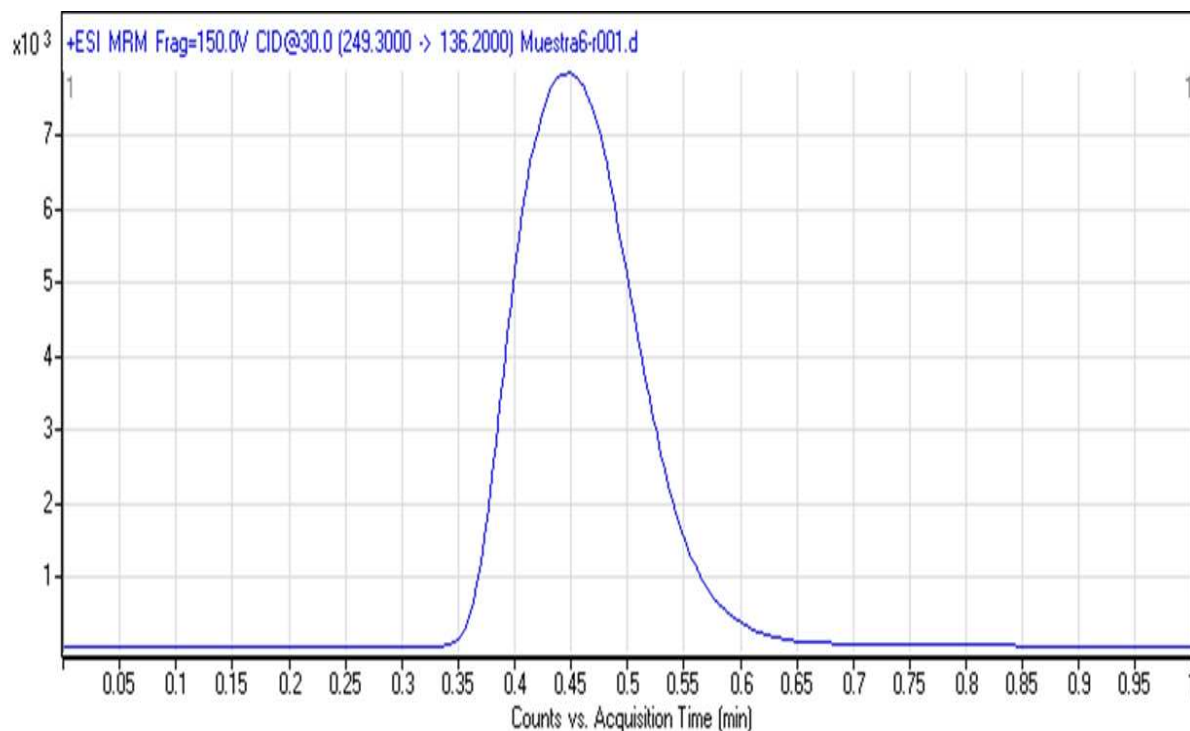
Gráfica 10. Espectro de masa de la muestra 4 de perclorato de lupanina con su ion principal.



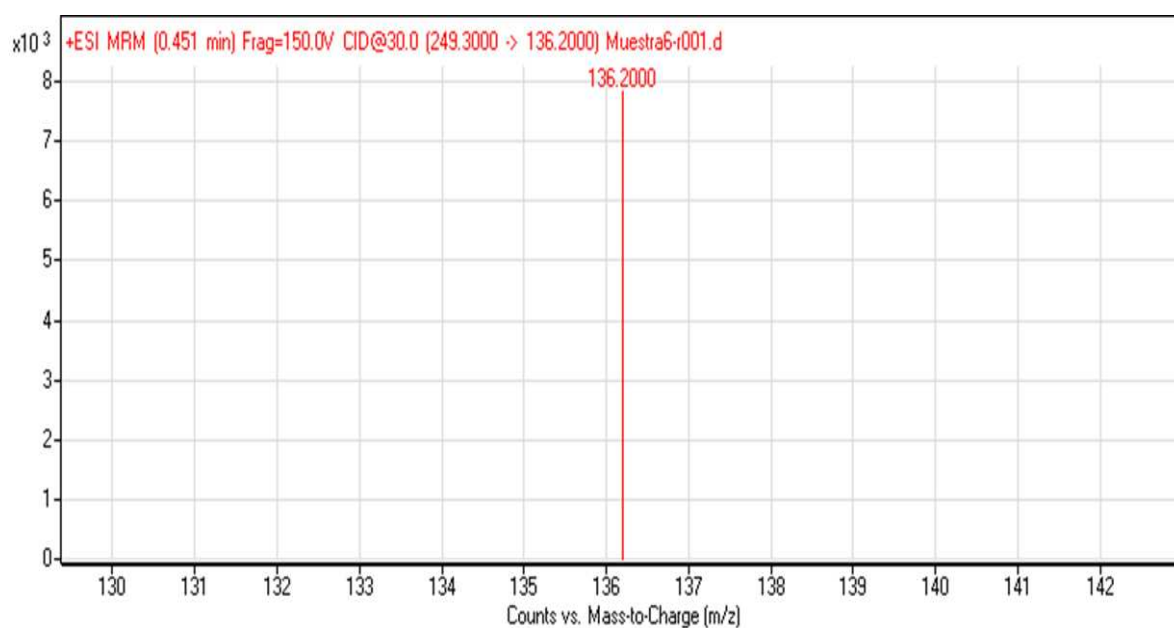
Gráfica 11. Cromatograma de perclorato de lupanina de la muestra 5.



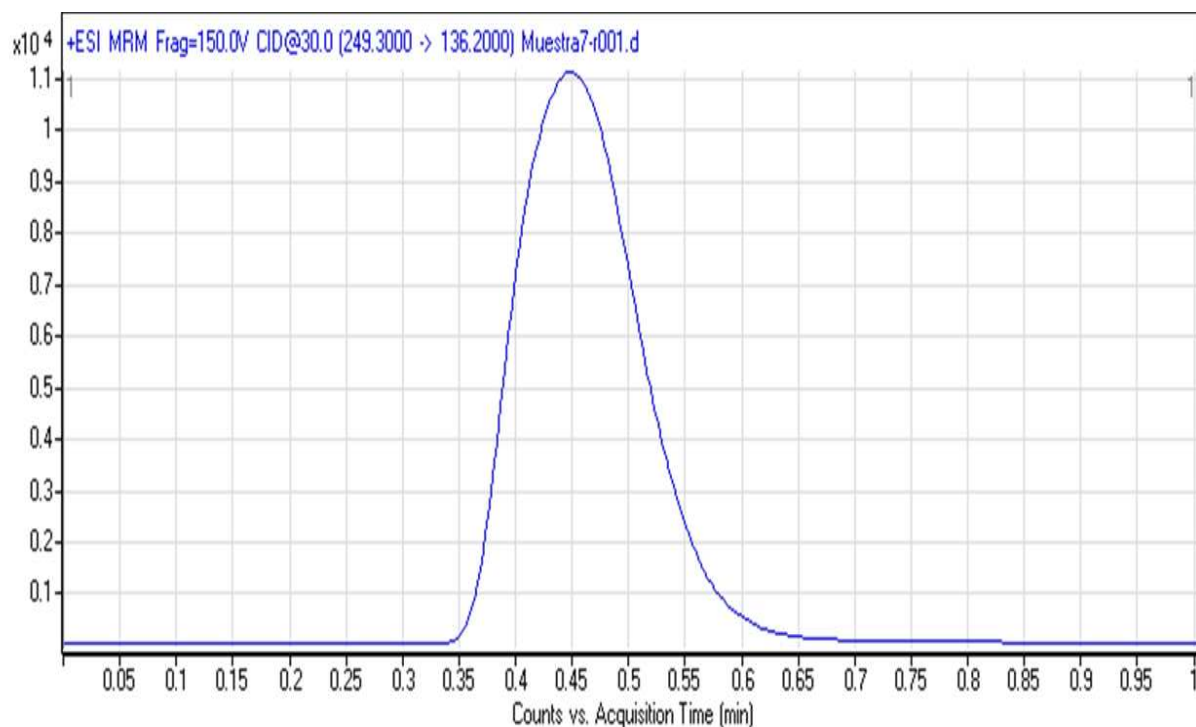
Gráfica 12. Espectro de masa de la muestra 5 de perclorato de lupanina con su ion principal.



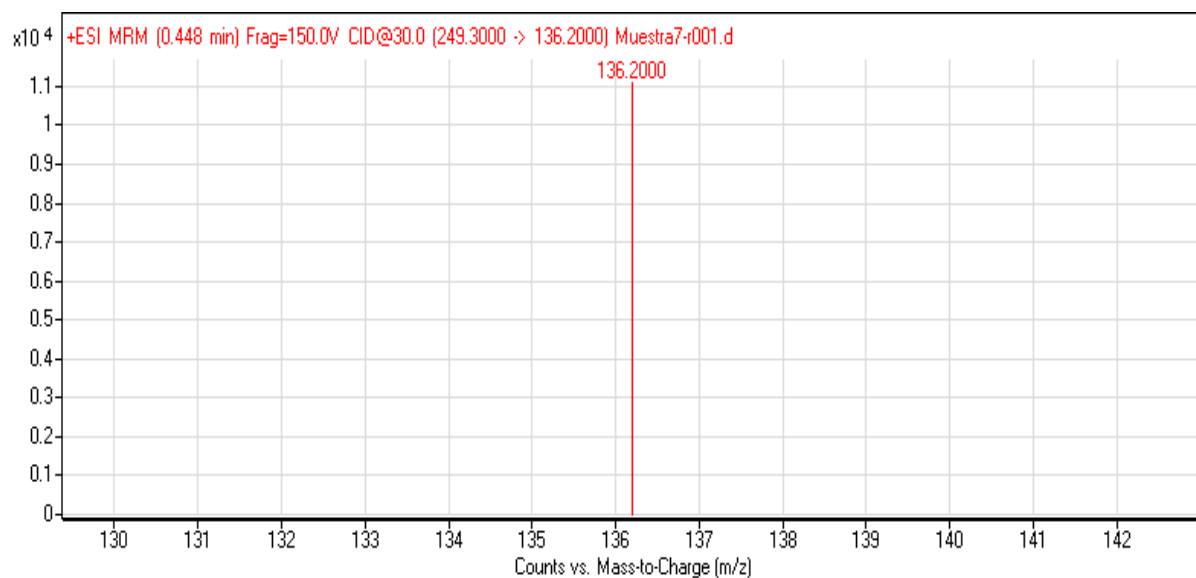
Gráfica 13. Cromatograma de perclorato de lupanina de la muestra 6.



Gráfica 14. Espectro de masa de la muestra 6 de perclorato de lupanina con su ion principal.



Gráfica 15. Cromatograma de perclorato de lupanina de la muestra 7.



Gráfica 16. Espectro de masa de la muestra 7 de perclorato de lupanina con su ion principal.

Prueba cometa en linfocitos humanos

En la cuadro 1 se muestra la migración promedio en micras de la cauda en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de extractos alcaloideos de *Lupinus mexicanus*, *Lupinus montanus*, lupanina, esparteína y flavonoides. En todas las concentraciones del extracto de *Lupinus mexicanus* (1.0, 0.5, 0.1 y 0.01 mM) se observó una longitud de cauda comprendida entre 6.17 a 6.75 μ , similar al testigo positivo de 6.66 μ . Esto indica actividad genotóxica del extracto comparable a las testigo positivo (1.0 mM), que es un potente mutágeno y mucho mayor estadísticamente en comparación con el testigo negativo (1.66 μ). En relación al extracto de alcaloides de *Lupinus montanus* la longitud promedio de la cauda de los linfocitos tratados a las concentraciones 0.5 y 1.0 mM, fue de 1.57 μ y 6.95 μ respectivamente, no hubo diferencia comparado con el testigo negativo de 1.65 μ ($P > 0.05$). Sin embargo las longitudes promedio de las caudas para la concentración 0.1 mM (3.95 μ) fue similar al control positivo (4.73 μ), mientras que la longitud promedio de las caudas en la concentración 0.01 mM fue mayor (6.42 μ) ($P < 0.05$).

La lupanina y esparteína presentaron actividad genotóxica ($P < 0.05$) en todas las concentraciones evaluadas que se manifestaron con una longitud promedio de caudas comprendida entre 2.96 y 6.68 μ en la esparteína 1.0 y 0.01 mM, sin embargo, en la concentración 1.0 mM en la lupanina la longitud promedio de caudas (3.44 ± 1.39) fue similar al control negativo (1.63 ± 0.64) ($P > 0.05$). Así mismo los flavonoides en todas las concentraciones aumentaron la longitud de cauda en linfocitos ($P < 0.05$) en un rango comprendido entre 2.54 a 2.68 μ el doble del testigo negativo.

Cuadro 1. Longitud promedio en micras de la cauda en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de los extractos de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*, lupanina, esparteína y flavonoides.

	0.01 mM		0.1 mM		0.5 mM		1.0 mM		T (+ NDEA 1.0 mM)		T (- , agua destilada)	
	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE
<i>L. mexicanus</i>	6.75	±1.81	6.70	± 1.28	6.17	± 2.06	6.61	± 1.71	6.66	± 2.54	1.66	± 0.83
<i>L. montanus</i>	6.42	±2.44	3.95	± 1.93	1.57	± 0.50	1.95	± 1.41	4.73	± 1.41	1.65	± 0.97
Lupanina	5.94	±2.04	4.22	± 1.47	4.35	± 1.52	3.44	± 1.39	5.43	±2.22	1.63	± 0.64
Esparteína	6.68	± 2.62	5.61	± 2.53	5.47	± 1.98	2.96	± 1.64	7.84	±2.85	1.68	± 0.72
Flavonoides	2.54	±1.52	2.60	± 1.90	2.60	± 1.59	2.68	± 1.72	3.92	± 1.42	1.20	± 0.43

NDEA: nitrosodietilamina

Prueba del cometa en *Tradescantia* (4430)

En el cuadro 2 se muestra la migración promedio en micras de la cauda en núcleos de *Tradescantia* expuestos a diferentes concentraciones de extractos de *Lupinus mexicanus*,

Lupinus montanus, lupanina, esparteína y flavonoides. En todas las concentraciones del extracto de *Lupinus mexicanus* se observó una longitud de cauda comprendida entre 19.12 a 25.99 μ , inferior al que el testigo positivo (28.76 μ). Esto indica la actividad genotóxica del comparable al testigo positivo y superior al testigo negativo (6.53 μ). En relación al extracto de alcaloides de *Lupinus montanus* la longitud de la cauda tratada a las concentraciones 0.1 y 1.0 mM, fue de 15.29 μ y 17.13 μ respectivamente, fueron menores a la del testigo positivo 29.62 μ ($P>0.05$). Sin embargo la cauda para la concentración 0.01 mM de 24.28 μ fue similar al control positivo 29.62 μ , mientras que la longitud de las caudas en la concentración 0.05 mM fue menor 21.58 μ ($P>0.05$).

La lupanina presentó actividad genotóxica ($P<0.05$) en las concentraciones de 0.01, 0.1 y 1.0 mM 32.06, 21.62 y 16.53 μ respectivamente, inclusive, superiores al testigo positivo. Sin embargo, la concentración de 0.5 mM fue menor con 12.33 μ similar al control positivo (11.27 ± 6.39) ($P>0.05$).

La mayor longitud de la cauda en la esparteína fue a la concentración de 0.5 mM 7.01 μ ($P<0.05$) en comparación con el testigo positivo ($14.38 \pm 5.12 \mu$). Las concentraciones de 0.01, 0.1 y 1.0 mM presentaron una actividad genotóxica muy similar 5.96, 5.48 y 5.44 μ respectivamente mayores que el testigo negativo ($P<0.05$) 4.77 μ .

Así mismo los flavonoides en la concentración de 0.1 mM mostró un aumento 14.91 μ en la longitud de cauda de los núcleos de *Tradescantia* ($P<0.05$). Las concentraciones de 0.01 y 0.5 mM tuvieron un promedio de 8.29 a 9.72 μ respectivamente, aproximadamente el doble del control negativo 4.80 μ respectivamente. Pero la concentración de 1.0 mM 5.73 μ fue similar al testigo negativo 4.80 μ . Todas son inferiores al testigo positivo.

Cuadro 2. Longitud promedio en micras de la cauda en núcleos de *Tradescantia* (4430) expuestos a diferentes concentraciones de los extractos de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*, lupanina, esparteína y flavonoides.

	0.01 mM		0.1 mM		0.5 mM		1.0 mM		T (+ NDEA 1.0 mM)		T (- agua destilada)	
	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE
<i>L. mexicanus</i>	25.99±	10.75	20.04 ±	6.82	21.52±	9.29	19.12±	7.68	28.76 ±	9.25	6.53±	3.13
<i>L. montanus</i>	24.28 ±	14.78	15.29 ±	11.48	21.58±	11.42	17.13±	11.54	29.62 ±	8.32	9.71±	6.71
Lupanina	32.06±	12.34	21.62±	13.19	12.33 ±	5.69	16.53 ±	9.97	11.27 ±	6.39	6.15 ±	2.92
Esparteína	5.96 ±	2.75	5.48 ±	3.25	7.01 ±	3.45	5.44 ±	1.89	14.38 ±	5.12	4.77 ±	1.90
Flavonoides	8.29 ±	9.17	14.91±	6.47	9.72 ±	6.44	5.73 ±	2.66	14.81 ±	6.16	4.80 ±	3.05

NDEA: nitrosodietilamina

Efecto concentración genotoxicidad

Extracto alcaloideo de *Lupinus mexicanus*

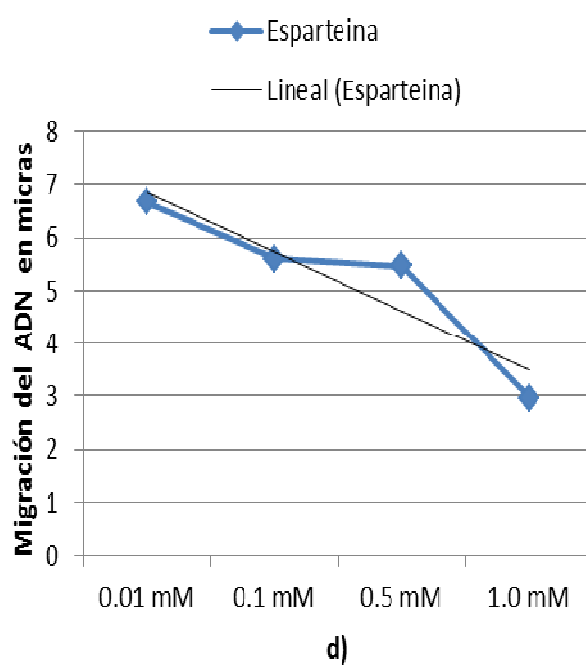
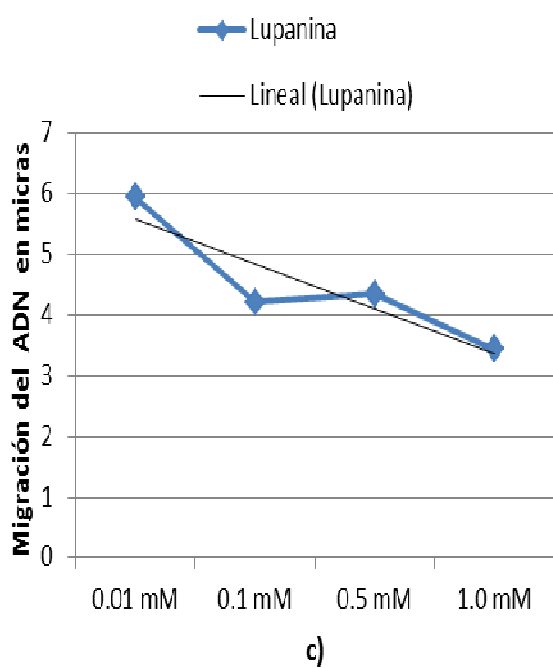
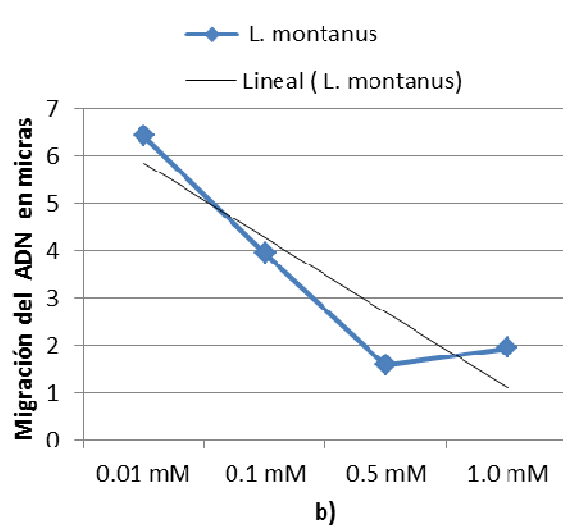
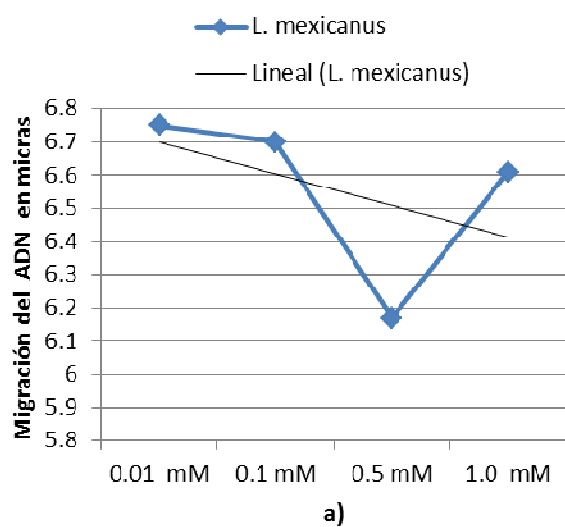
La actividad genotóxica en linfocitos humanos del extracto de *L. mexicanus* mostrado en la gráfica 17a indica que las más bajas concentraciones inducen mayor daño genético, si bien el comportamiento no es lineal. Extracto de alcaloide de *Lupinus montanus* presentó actividad genotóxica inversa a la concentración; las concentraciones más bajas (0.01 a 0.5 mM) indujeron migraciones de caudas mayores, mientras que en la concentración más alta (1.0 mM) disminuye el daño (gráfica 17b).

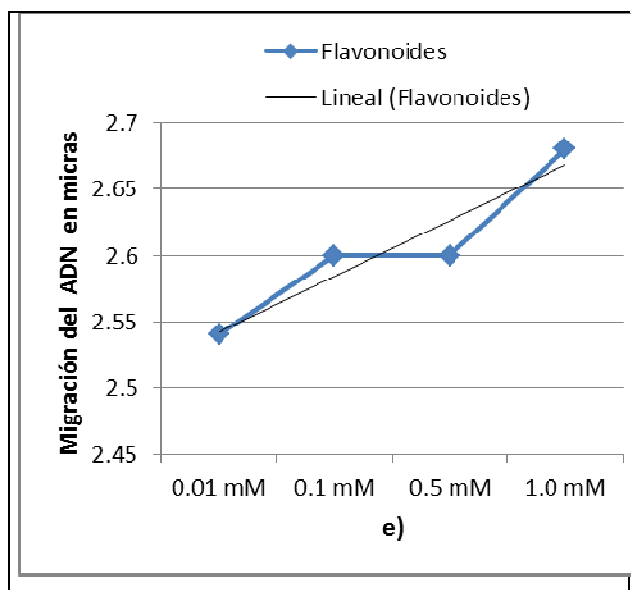
Lupanina y esparteína

Es claro el daño genético inducido por los alcaloides lupanina y esparteína en linfocitos humanos. Al igual que en los extractos de alcaloides de *Lupinus mexicanus* y *L. montanus* se observó actividad genotóxica inversa a la concentración; las dosis más bajas (0.01 a 0.5 mM) indujeron migraciones de caudas mayores mientras que en la concentración más alta (1.0 mM) disminuye el daño (gráfica 17c, 17d).

Flavonoides

Se observó un claro efecto genotóxico en todas las concentraciones estudiadas (0.01, 0.1, 0.5 y 1.0 mM), pero en contraste con las sustancias antes mencionadas, los flavonoides inducen daño genético en proporción a la concentración (gráfica 17e).





Gráfica 17. Tendencia de la actividad genotóxica en linfocitos humanos expuestos a los extractos de (a) *Lupinus mexicanus* y (b) *Lupinus montanus*, (c) lupanina y (d) esparteína y (e) flavonoides a diferentes concentraciones.

Extracto alcaloideo de *Lupinus mexicanus*

Este extracto presentó actividad genotóxica inversa a la concentración; las concentraciones más bajas (0.01 0.1 mM) indujeron migraciones de caudas mayores, mientras que en la concentración más alta (0.5 y 1.0 mM) disminuye el daño (gráfica 18a).

Los extractos de alcaloides de *Lupinus montanus* mostraron actividad genotóxica inversa a la concentración; las concentraciones más bajas (0.01 y 0.1 mM) indujeron migraciones de caudas mayores, mientras que en la concentración más alta (0.5 y 1.0 mM) disminuye el daño (gráfica 18b).

Lupanina

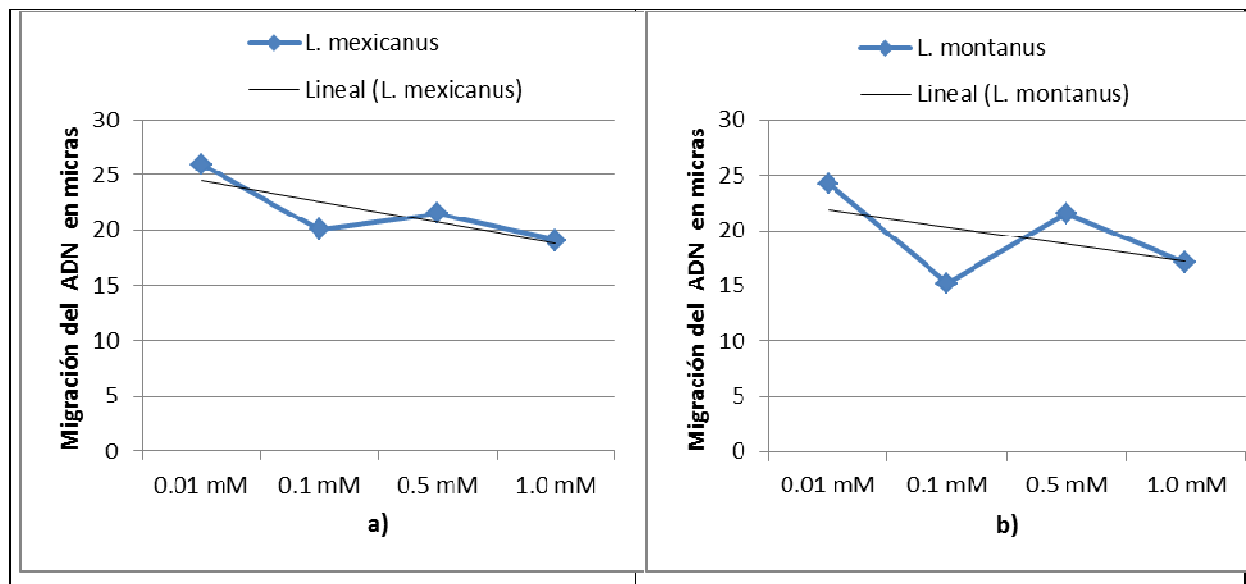
Este alcaloide presentó actividad genotóxica inversa a las concentraciones; las dosis más bajas (0.01 a 0.5 mM) indujeron migraciones de caudas mayores, mientras que en la concentración más alta (1.0 mM) disminuye el daño (gráfica 18c).

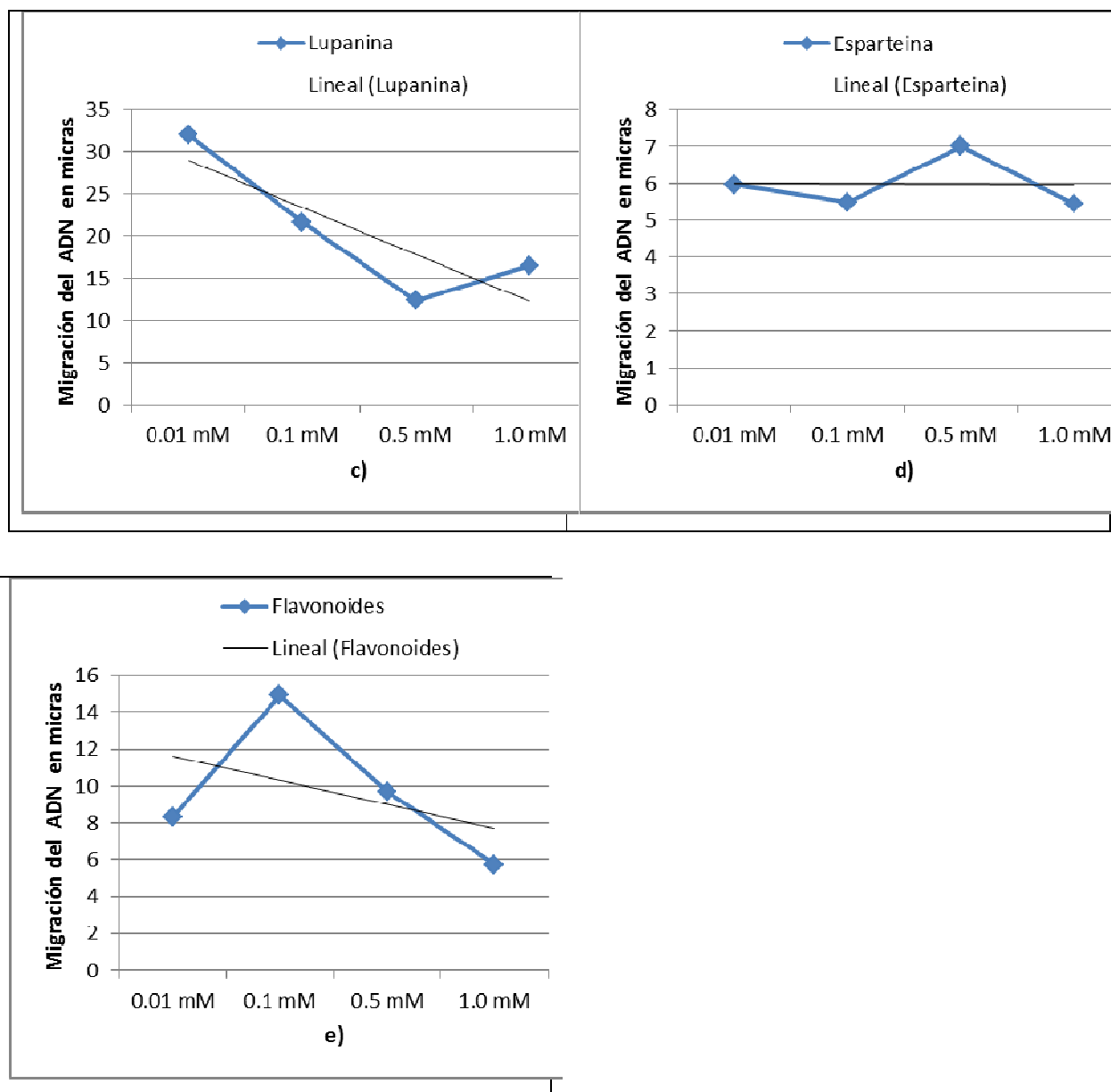
Esparteína

Es clara la genotoxicidad de este alcaloide en los núcleos de *Tradescantia* en todas las concentraciones investigadas, pero el efecto es particularmente notable en la concentración 0.5 mM. No parece existir relación concentración- actividad genotóxica (gráfica 18d).

Flavonoides

La genotoxicidad de los flavonoides es evidente en todas las concentraciones y esta es inversa a la concentración en los casos de 0.1 a 1.0 mM, no así para la concentración 0.01 mM en donde es notable la disminución de daño genético (gráfica 18e).





Gráfica 18. Tendencia de la actividad genotóxica en núcleos de *Tradescantia* expuestos a los extractos de (a) *L. mexicanus* y (b) *L. montanus*, (c) lupanina y (d) esparteína, (e) flavonoides a diferentes concentraciones.

DISCUSIÓN

La elevada proporción de alcaloides de tipo quinolizidínico (mayor a 1%) en las semillas de los lupinos silvestres limita su aprovechamiento directo en la alimentación (Ruíz, 1994), ya que poseen toxicidad aguda (Agid *et al.*, 1988) e inclusive actividad genotóxica (Omiya *et al.*, 1995; Kighorn y Balandrin, 1984). A la fecha no ha sido posible la caracterización del riesgo de su exposición en humanos, por ello, se requiere de más investigaciones para lograr una completa caracterización de los riesgos que supone su ingestión (Porcher y Sorting, 2007). Los flavonoides exhiben un amplio espectro de actividades biológicas, la mayoría se refieren a aspectos benéficos a la salud (Dixon y Paiva, 1995; Bednarek *et al.*, 2003). Sin embargo existe la necesidad de evaluar los efectos adversos en citotoxicidad y genotoxicidad ya que se ha reportado envenenamiento en animales y humanos. Posiblemente la activación metabólica de estos compuestos en el hígado los convierte en moléculas altamente reactivas capaces de reaccionar con macromoléculas tales como el ADN (Arungundrum *et al.*, 1999).

La evaluación de la genotoxicidad mediante la prueba del cometa ha sido ampliamente empleada por su gran sensibilidad para evaluar sustancias genotóxicas, además de ser rápida y relativamente económica (Singh *et al.*, 1988; Henderson *et al.*, 1988; Marek *et al.*, 1988; Álvarez *et al.*, 2001).

Los resultados de los compuestos analizados en ambos sistemas fueron positivos y se observó que las sustancias estudiadas poseen actividad genotóxica inversa a la concentración empleada lo que muestra la eficiencia de la prueba del cometa como fue previamente reportado (Singh *et al.*, 1988; Álvarez *et al.*, 2001). Llama la atención que las concentraciones más bajas presenten la mayor actividad genotóxica en ambos sistemas y las más altas (0.5 y 1.0 mM) en *Lupinus montanus* y 1.0 mM en esparteína carecen de actividad genotóxica en los linfocitos humanos. La ausencia de genotoxicidad de la esparteína también se observa en los núcleos estaminales de *Tradescantia* en casi todas las concentraciones.

Previamente Santiago *et al.*, (2010) reportó ausencia de genotoxicidad en extractos de *Lupinus termis* utilizando tres pruebas diferentes a las utilizadas en este estudio (prueba de Ames en *Salmonella thyphimurium*, el ensayo en linfoma de ratón y la prueba de micronúcleos en médula

ósea. Tanto la prueba de micronúcleos como la de linfoma de ratón son utilizadas para observar rupturas cromosómicas y no son las más eficientes para detectar mutaciones génicas. En adición, las concentraciones que ellos emplearon son relativamente superiores a las nuestras y el uso de esas concentraciones en nuestros sistemas presumiblemente hubiera conducido a la no detección de actividad genotóxica, por lo anterior, las diferencias en los resultados pueden atribuirse a los distintos sistemas de prueba empleados (Zúñiga 2001; Álvarez *et al.*, 2011).

Aunque la esparteína y la lupanina tienen un futuro prometedor como fármaco nuestros resultados revelan actividad genotóxica en bajas concentraciones tanto en linfocitos humanos, como en núcleos de *Tradescantia* siendo más fácilmente detectados en núcleos de esta planta sin existir reportes previos.

Los flavonoides estudiados en ambos sistemas mostraron una notable actividad genotóxica tal como fue reportados previamente para el caso de genisteína-8-C (Boos y Stopper, 2000) sin embargo, existen datos controversiales de los efectos genotóxicos de los flavonoides, específicamente existe diferencia entre estudios *in vivo* con los realizados *in vitro* (Rucinska y Gabryelak, 2009). Resulta particularmente interesante que en los compuestos estudiados la actividad genotóxica se incrementa al disminuir la concentración contrastando con trabajos previos (Rucinska y Gabryelak, 2009; Santiago *et al.*, 2010) en donde la genotoxicidad depende de la concentración. No existen reportes previos acerca de este comportamiento, pero es sabido que las dosis elevadas de cualquier genotóxico inducen un alto nivel de ruptura en el ADN, lo cual, puede ocasionar la aparición de caudas sumamente largas (y por lo tanto no perceptibles al microscopio), lo que conduce a una cuantificación a la baja de caudas. Concentraciones menores ocasionan daño genético no tan severo produciendo caudas más visibles y, aparentemente más largas. Lo anterior puede explicar esta aparente paradoja tal como reportó Álvarez *et al.*, (2001) en el caso de la nitrosodietilamina 1,5 y 1 mM en los núcleos de *Tradescantia*.

La agencia de administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos requiere de extensos estudios toxicológicos que aseguren que un producto no es peligroso para la salud humana, por ello, este trabajo contribuye a la prevención del consumo de semillas de *Lupinus* con extractos ricos en alcaloides que pudieran representar un riesgo para los consumidores. Nuestro reporte junto con otros estudios toxicológicos provee información valiosa que puede usarse para decidir

si se consumen o no compuestos ricos en lupanina o esparteína. Ante la escases de datos sobre la mutagenicidad de los alcaloides de *Lupinus montanus* y *Lupinus mexicanus* y sus efectos, es claro que se requieren más estudios toxicológicos y de genotoxicidad para conocer con mayor certeza el peligro que entraña el uso potencial de lupinos, aún más cuando se reporta que los datos varían dependiendo de si los estudios se realizan *in vivo* o *in vitro*.

Respecto a los flavonoides evaluados en linfocitos humanos estos mostraron actividad genotóxica dependiente de la concentración semejante a genisteína-8-C-glucosido cuando se estudiaron en fibroblastos de embrión en ratón (Rucinska y Gabryelak 2009). Los resultados en núcleos de *Tradescantia* mostraron también genotoxicidad positiva de los flavonoides, pero sólo en muy bajas concentraciones.

CONCLUSIONES

- La evaluación de la genotoxicidad de los extractos de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*, lupanina, esparteína y flavonoides mostraron actividad genotóxica en bajas concentraciones en ambas pruebas empleadas.
- La actividad genotóxica detectada mediante la prueba del cometa en los diferentes compuestos estudiados es clara, sin embargo, resulta contrastante con otros estudios reportados. Las diferencias se pueden atribuir a los distintos sistemas de prueba empleados o bien, que el excesivo daño genético inducido debilite la detección correcta de las caudas de las células empleadas.
- A pesar de haber utilizado dos distintas células en la prueba del cometa: núcleos de *Tradescantia* y linfocitos humanos, los resultados fueron casi idénticos.

LITERATURA CITADA

Agid Y., Pertuiset B., Dubois B. (1988). Motoneuron disease as manifestation of lupin seed toxicity. *Lancet*. 351: 1347.

Ames D., Durston W., Yamasaki E., and Lee F. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Natl Acad Sci (USA)*. 69: 3128-3132.

Álvarez M., Santerre L., Zúñiga G., Torres B., Padilla C., and Feria V. (2001). Evaluation of genotoxic activity of maleic hydrazide, ethyl metanesulfonate, and N-nitrosodiethylamine in *Tradescantia*. *Salud Pública de México*. 43: 563-569.

Álvarez M., Reynoso S., Villalobos A., Islas S., Castañeda V., González M. (2011). Evaluation of genetic damage induced by glyphosate isopropylamine salt using *Tradescantia* bioassays. *Genet Mol Biol*. 1: 127-130.

Allen J. (1986). Lupinosis a review. En: *Proceeding of the IV International Lupin Conference*, Geraldton Western Australia.

Arungundrum S., Tamara N., Paul E. and Alan A. (1999). Alkaloids in human diet. *Mutat Res. Gen Toxicol Environ mutagen*.443: 53-67.

Avishai N, Rabinowitz C, and Rinkevich B (2003). Use test comet assay for studying environmental genotoxicity. Comparison between visual and image analyses. *Environ. Mol. Mutagenesis* 42: 155-165.

Bañuelos P. y Jiménez V. (2006). La importancia y el estado actual del género *Lupinus*. En: *Lupinos del Occidente de México*. (Eds) Bañuelos P., Ruíz L., Soltero Q., Castañeda V. Universidad de Guadalajara, México. pp 11-28.

Baylis J. and Hamblin J. (1986). Lupins in the farming system: a survey of production. In Proceedings of the Fourth International Lupin Conference, Geraldton, Western Australia, August 15-26; published for the International Lupin Association by the Department of Agriculture, 3 Baron-Hay Court, South Perth, Western Australia 6151. pp. 161-172.

Bednarek P., Wojtaszek P., Kerhoas L., Einhorn J., Franski R. and Stobiecki M. (2003). Profiling of flavonoid conjugates in *Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius* responding to abiotic and biotic stimuli. J Chem Ecol. 29: 1127-1142.

Bermudez T. (1988). Vorkommen und verbreitung der in México. En: M. Wink (ed.). Proc. Lupinen in forschung und Praxis. Heidelberg, Alemania: 27-40.

Bermudez T., Robledo Q., Martínez H., Tei A. and Wink M. (2000). Biodiversity of the Genus *Lupinus* in Mexico. En E. van Santen, et al., (editores). Lupin, an ancient crop for the new millenium. International Lupin Association. Canterbury, Nueva Zelanda: 294-296.

Bermudez T., Robledo Q., Barrera N. and Wink M. (2002). ALkaloid profile of leaves and seeds of *Lupinus hintonii* C.P. Smith from Mexico. Z. Naturforsch. 57c: 243-247.

Boos G. and Stopper H. (2000). Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II Inhibitors. Toxicol Lett. 116:7-16.

Bunger A. Soto D., Witting E., Cariaga L., and Hernández N. (1999). Development of food products containing lupin fiber and their effects in elderly people. En: E. van Santen, et al. (editores). Lupin, an ancient crop for the new millennium. IXth International Lupin Conference. Klink/Muritz, Alemania.

Blod D. and Radostitis M. (1992). Medicina Veterinaria. Vol. II. Interamericana. Mc Graw Hill. México.

Cabo J., Jiménez J., Risco S. and Zarzuelo A. (1984). Etudes sur L'action hypoglycemiant des graines du lupin (*Lupinus albus* L.) : IX. Action antihyperglycemiant de la fraction active. Plant. Méd. Phytothér 18. 4 :237-242.

Casiano A. (1991). Introduction : historical perspectives of the genetic toxicology. In Genetic Toxicology. (Li. P. A. y Heflich R. H., Eds.) CRC Press, Nueva Jersey. pp 1-12.

Collins A., Dusinská M., Franklin M., Somorovská M., Petrovská H., Duthie S., Fillion L., Panayiotidis M., Raslová K. and Vaughan N. (1997). Comet assay in Human Biomonitoring studies: Reliability, Validation and applications. Environ Mol Mut 30 :139-146.

Cuanalo de la Cerda H., Ojeda T., Santos O. and Ortiz S. (1989). Provincias, regiones y subregiones terrestres de México. Ed. Futura-Colegio de Posgraduados. Texcoco, Estado de México : 624.

Claussnitzer M., Skurk T., Havner H., Daniel H. and Rist M. (2011). Effect of flavonoids on basal and insulin-stimulated 2-deoxyglucose uptake in adipocytes. Mol Nutr. Food Res. 1:26-34

Dash A. and Garbieri C. (1980). Sweet Lupine-Fortified Bread: Nutritional Value and Amino Acid Content. Cereal Chem. 57:9-11.

Dixon R. and Paiva, N., (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell. 7: 1085-1097.

Dunn D. (1979). Flora fanerogamica del valle de México. In: Rzedowski, J., Rzedowski, G. C (Eds.), *Lupinus*. pp 326-338.

Dunn D. (1984). Genetic resources, cytotaxonomy and distribution of New world lupin species. Proceeding of the thord International Lupin Conference, International Lupin Association. La Rochelle, France: 68-85.

Egaña J., Uauy R., Cassorla X., Barrera G. and Yañez E. (1992). Sweet lupin protein quality in young men. J. Nutr. 122 . 12: 2341-2347.

Formica J. and Regelson W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food ChemTox. 33: 1061-1080.

Fraser A. and Robins D. (1987). Application of 2H-NMR spectroscopy to the study of the incorporation of enantiomeric 2H-labelled cadaverines into quinolizidine alkaloids. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1:105-109.

García L., Garzón de la Mora P., Wysocka W., Maiztegui B., Alzugaray M. E., Del Zotto H. and Borelli M. (2004). Quinolizidine alkaloids isolated from Lupinus species enhance insulin secretoion. Eur. J. Pharm. 504:139-142.

Gladstones J. (1974). The Mediterranean white lupin". Department of Agriculture, Western Australia. Tech. Bull. 26: 70-74.

Gladstones J. (1998). Distribution, origin, taxonomy, history and importance, In: Glandstones, J., Atkins, J., Hamblin C. (Eds.). Lupinus as Crop plants. Biology, Production and Utilization. Cab International, New York. pp 1-39.

Graf U. and Singer D. (1992). Genotoxicity of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Rev. Int. Contam. Ambient. 8, 15-27.

Graf U., Würigler F., Katz A., Frei H., Joan H., Hall C. and Kale P. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ. Mutagen. 6:153-188.

Grant W., Lee H., Logan D. and Salamone M. (1992). The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environmental. Mutat. Res. 270: 53-64.

Grant W. (1994). The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310, 175-185.

Grant W. and Salamone M. (1994). Comparative mutagenicity of chemical selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plant system for the detection on environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310: 187-209.

Golebiewski W. and Spenser I. (1976). Biosynthesis of the lupine Alkaloids: II Sparteine and Lupanine. *Can J. Chem.* 66. 7: 1737-1748.

Golebiewski W. and Spenser I. (1984). Deuterium NMR spectroscopy as a probe of the stereochemistry of biosynthetic reactions: The biosynthesis of lupanine and sparteine. *J. Am. Chem. Soc.* 106. 25: 7925-7927.

Golebiewski W. and Spenser I. (1985). Biosynthesis of the lupine alkaloids: II sparteine and lupanine. *Can J. Chem.* 66 (7). pp. 1734-48.

Hartmann A., Agurell E., Neevers C., Brendler S, Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., and Tice R. (2003). Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet Assay. *Mutagenesis.* 18: 45-51.

Hasse K. and Schmid G. (1963). Synthesis and degradation of biogenic Ramine by enzymatic Trans. *Biochem. Z.* 69: 337

Henderson L., Wolfreys A., Fedyk J., Bourner C. and Andwindebansk S. (1988). Cytotoxins. *Mutagenesis.* 13: 89-94.

[Http://www. Cometassay.com](http://www.Cometassay.com)

Ichikawa S. (1992) *Tradescantia* stamen-hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity: Its responses to ionizing radiations and chemical mutagens and some synergistic effects found. *Mutat. Res.* 210, 3-22

Jovanovic S., Steenken S., Simic M. and Hara Y. (1998). Antioxidante properties of flavonoides: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. In: Rice Evans C. Parker L (eds.): *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, Nueva York, 137-161.

Jurado C. (1989). *Toxicología Veterinaria*. (2^a ed.). Salvat, Barcelona.

Kass E. and Wink M. (1997). Molecular phylogeny and phylogeography of the genus *Lupinus* (Family Leguminosae) inferred from nucleotide sequences of the RbcL gene and ITS +2 sequences of rDNA. *Plant Syst. Evol.* 208: 139-167.

Keeler R. (1976). Lupin alkaloids from teratogenic and nonteratogenic lupines. Identification of anagryrine as the probable teratogen by feeding trials. *J. Toxicol. Environ. Healt.* 1: 887-976.

Kirk E., Sutherland P., Wang. S., Chait A. and LeBoeuf R. (1988). Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor deficient mice. *J. Nutr.* 128: 954-959.

Kinghorn A. and Balandrin M. (1984). Quinolizidine alkaloids of the Leguminosae : Structural types, analysis, chemotaxonomy, and biological activities. In S. Pelletier. *Alkaloids: Chemical and biological perspectives*. Wiley, New York : pp 105-148.

Koppen G. and Verschaeve L. (1996). The alkaline comet on plant cells: A new genotoxicity test for DNA breaks in *Vicia faba* roots cells. *Mutat Res.* 360: 193-200.

Kurser M. (2002). Hormonal effects of soy in premenopausal women and men. *J Nutr.* 3: 570-573.

Li A: P. and Loretz L. (1991). Assay genetic toxicology. In: Genetic toxicology (P. A. Li y R. H. Heflich, Eds.). CRC. Press, Nueva Jersey. pp 119-142.

López B. and Fuentes M. Lupin Crop as an alternative source of protein. *Adv. Agron.* 1986. 40. 239-289.

Ma T., Cabrera G., Cebulski W., Chen R., Loarca F., Vandenberg A. and Salamone M. (1994). *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. *Mutat Res.* 310: 211-220.

Marek W., Golebiewski L. and Spencer D. (1988). Biosíntesis de los alcaloides de lupino. II. II. Sparteine and lupanine Esparteína y lupanina. *Can J Chem.* 66:1734-1748.

McVaught R. (1987). A descriptive Account of the vascular plantas of Western Mexico. Leguminosae.(Ed). Mc Vaught. University of Michigan Press . pp 786.

McVaught R. (1987). Flora Novo Galicia. In: Legumonosae. (Ed.).McVaught. University of Michigan. EUA. pp 590-591.

Mentor M., Lamartiniere C., Eltoum I., Greenberg N. and Elgavish A. (2001). Genistein in the diet reduces de incidence of pooly differentiated prostatic adenocarcinoma in transgenic mice (TRAMP). *Cancer Res.* 61: 6777-6782.

Merck (1993). El Manual Merck de Veterinaria. (4ª ed.), Océano/Centrum, Barcelona.

Monteith D. and Vanstone K. (1995). Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. *Mutat Res.* 345: 97-103.

Muzquiz M., Rodenas I., Villaverde J. and Cassinello M. (1982). Valoración cuantitativa de alcaloides en semillas del género *Lupinus* (L.). En L. López-Bedillo, M. Fuentes y D. Milne, *Actas II Conf. Int. Lupino Torremolinos*. pp 196-206.

Muzquiz M., Cuadrado C., Ayet G., De la Cuadra C., Burbano c., Osagie A. (1994). Variation of alkaloid components of lupin seeds in 49 genotypes of *Lupinus albus* L. from different countries and locations. *J. Agr. Food Chem.* 42: 1447-1450.

Neuwinger D. (1998). Alkaloids in Arrow Poison. En: Alkaloids. Biochemistry, Ecology and Medicinal applications. New Yorch. pp 45-86.

Ohmiya S., Saito K. and Murakoshi I. (1995). Lupine alkaloids. In: alkaloids. Vol. 47. Cordell, G. (ed). Acad Press. New York. pp 1-114.

Omran A., (1996). Farmakologiczna aktywnosc wyciagow z naison wybranych gatunkow lubinu (*L. angustifolius* L., *L. albus* L., *L. luteus* L.) PhD Thesis. Department of Pharmacology, KarolMarcinkowskiUniversity of Medical Sciences.

Pace A., Hahn S., Diamandis E., Soleas G. and Goldberg D. (1995). The red wine phenolics trans-resveratol and quercitin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*, 235: 207-219.

Pandrangi R., Petras M., Ralph S. and Vrzoc M. (1995). Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using buel heads and carp. *Environ Mol Mutagen.* 26: 345-56.

Paolisso G., Sgambato S., Passariello N., Pizza G., Yorella R., Tesauro P., Varicchio M., D'Onofrio F. (1988). Plasma glucose lowering effect of sparteine sulphate infusion in non-insulin dependent (type 2) diabetic subjects. *Eur. J. Clin. Pharm.* 34: 227-232.

Planchuelo M. (1996). Relationship between South American and European species of *Lupinus*. In B. Pickergill and M Lock (Eds).Advances in Legume Systematic 8, Legumes of Economic importance: Royal Bot. Garden Kew Reino Unido. pp 109-116

Porcher, M.H. Sorting *Lupinus* names (Multilingual Multiscript Plant Name Database) 2007. <http://www.ars.grin.gov/misc/mmppnd/lupinus.html> Date created: 15/11(1999. Last modified; 28/05/2007. 1995-2003. The University of Melbourne, Australia.

Ramírez M. (2001). Mutágenos, químicos, físicos y biológicos. En: Álvarez Moya C. (Ed). Genética Ambiente y Salud. Universidad de Guadalajara, Guadalajara. pp 51-69.

Roberts M. and Wink M. (1998). Chemical ecology of alkaloids In: Alkaloids: Biochemistry, ecology and medicinal application. Plenum. Nueva York: 1-7 y 486.

Rucinska A. and Gabryelak T. (2009). Effect of genistein-8-C-glucoside from *Lupinus luteos* on DNA damage assessed using the comet assay *in vitro*. 33: 247-252.

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 L., García L., Castañeda V., Garzón M., Bañuelos P., Burbano C., Pedrosa M., Cuadrado C., Muzquiz M. (2000). Chemical composition and antinutrient content of three *Lupinus* species from Jalisco, Mexico. J. Food Comp and Anal.13: 193-199.

Sgambato S., Passariello N., Paolisso G., Bisesti V., Tesaro P. (1986). Effect of sparteine sulfate on insulin secretion in normal men. Horm. Metab. Res. 18: 686-688.

Santiago Q., Oquendo J., Herreño S. and Antoun D. (2010). Genotoxicity of Alkaloid-Rich Extract from *Lupinus termis* Seeds.1:18-23.

Salatino A. and Gottlieb O. (1980). Quinolizidine alkaloids as systematic markers of the papilionoideae. *Biochemical System and Ecology* 8: 133-147.

Scott L., Xu X., Veenstra T., Tooze J. and Wood C. (2008). Past oral contraceptive use and current dietary soy isoflavones influence estrogen metabolism in postmenopausal monkeys (*Macaca fascicularis*). *Cancer Epidemiol Prev.* 10: 2594-602.

Schmeller T., Saverwein M., Sporer F., Wink M. and Muller W (1994). Binding of quinolizidine alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *J Natural Prod.* 9: 1316-1319.

Singh N., McCoy M., Tice R. and Schneider L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175:184-1991.

So F., Guthrie N., Chambers A., Moussa M. and Carroll K. (1996). Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr cancer.* 26: 167-181.

Stobiecki M., Wojtaszek P. and Gulewicz K. (1997). Application of solid phase extraction for profiling quinolizidine alkaloids and phenolic compounds in *Lupinus albus*. *Phytochemical Anal.* 8: 153-158.

Tice R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Muiyamae Y., Rojas E., Ryu J. and Sasaki Y. (2000). Single cell comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagenesis.* 35:206-221.

Turner B. (1995). A new species of *Lupinus* (Fabaceae) from Oaxaca, México: A Shrub or tree mostly three to eight meters high. *Phytologia.* 79: 102-107.

Wang J., Eltoum I. and Lamartiniere C. (2002). Dietary genistein suppresses chemically induced prostate cancer in Lobund- Wistar rats. *Cancer Lett.* 186: 11-18.

Wink M., Hartman T., Witte L. (1980). Biotransformation of cadaverine and potential biogenetic intermediates of lupanina biosynthesis by plant cell suspension cultures. *Plant Med.* 40: 31-39.

Wink M., Hartman T., Witte L. and Rheinheimer J. (1982). Interrelationship between quinolizidine alkaloid producing legumes and ionfeeding insects: Exploitation of the alkaloid-containing phloem sap of *Cytisus scoparius* by the Broom Aphid, *Aphis Cytisorum*. *Z. Naturforsch.* 37c: 1081-1086.

Wink M. and Hartmann T. (1982). Sites of enzymatic synthesis of quinolizidine alkaloids and their accumulation in *Lupinus polyphyllus*. *J. Plant Physiol.* 165:560-565.

Wink M. (1985). Metabolism of quinolizidine alkaloids in plants and cell suspension cultures. In Reinhard and E. Springer. Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Heidelberg. pp. 107-116.

Wink M. and Witte L. (1985). Quinolizidine alkaloids as nitrogen source for lupin seedling and cell cultures. *Z. Naturforsch.* 40: 767-775.

Wink M. and Romer P. (1986). Acquired toxicity. The advantages of specializing on alkaloid-rich lupins to *Macrosiphum albifrons* (Aphidae). *Naturwissenschaften.* 73: 210-212.

Wink M. (1987). Chemical ecology of quinolizidine alkaloids. In: Allelochemicals. Role in Agriculture and Forestry. ACS Symp. Ser. 330 (G. R. Waller, ed) American chemical Society. Washington DC. pp. 524-533.

Wink M. (1988). Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protección against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.* 75: 225-223.

Wink M. and Witte L. (1991). Storage of quinolizidine alkaloids in *Macrosiphum albifrons* and *Aphis genistae* (Homopter: Aphididae). *Entomol. Gener.* 15:237-254.

Wink M. (1991). Plant Breeding: High or low alkaloid levels. *Proc. 6th Int. Lupin Conf. Temuco.* pp 326 – 334.

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

Wink M. (1993). Quinolizidine alkaloids. In: *methods in plant biochemistry.* Academic press. London 8: 197-239.

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

Wink M. and Roberts M. (1998). Alkaloids in arrow poison. En: *Alkaloids, Biochemistry, ecology, and medicinal applications.* Plenum. New York. EUA. pp 45-87.

Wood C. (2006). Soy isoflavonoid effects on endogenous estrogen metabolism in postmenopausal female monkeys. *Carcinogenesis.* 4:801-8

Wysocka W. and Przybyl A. (1994). Alkp. aloids from *Lupinus albus L.* And *Lupinus angustifolius L.*: An efficient method of extraction. *Sci Legum* 1:37-50.

Zuñiga G. (2001). Sistemas para la detección de daño genético En: *Genética Ambiente y Salud.* (Ed). Álvarez Moya C. Universidad de Guadalajara. México. pp. 127-150.

ANEXO 1 CUESTIONARIO

Fecha

Nombre y edad

Dirección _____

Fuma Si _____ No _____

Esta usted expuesto al humo del cigarro de alguien de su familia o trabajo que fume?

Si _____ No _____

Favor de especificar si ha recibido algún tipo de diagnóstico o tratamientos en los últimos seis meses (de ser posible mencionar tiempo, inicio y esquema):

Radio-diagnóstico Si _____ No _____

Observaciones _____

Radioterapia Si _____ No _____

Observaciones _____

Quimioterapia Si _____ No _____

Observaciones _____

Favor de señalar si es consumidor de lo siguiente.

Medicamentos Si _____ No _____

Anticonceptivos hormonales (en caso de ser mujer) Si_____ No_____

Especificar tipo y dosis_____

Bebidas alcohólicas Si_____ No_____

Especificar frecuencia, cantidad por semana y edad de inicio_____

Favor de señalar si tiene contacto constante con algunos solventes, pesticidas, fertilizantes, combustibles, y/o sustancias químicas Si_____ No_____

Especificar tipo y frecuencia de exposición_____

Señale con una X la frecuencia en la que consume los siguientes alimentos y productos:

Mínima Moderada Abundante

Enlatados			
Embutidos			
Frutas y verduras			
Carne			

¿Existen antecedentes de cáncer en su familia?

Si _____No _____

¿Qué contaminantes ha observado en la zona que habita? _____

