

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS**



“DESCRIPCIÓN TOPOGRÁFICA DE LOS DAÑOS POR LA ADMINISTRACION DE EXTRACTOS DE ALCALOIDES QUINOLIZIDINICOS EN EL CEREBRO DE LA RATA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA

PRESENTA:

MVZ. GUILLERMO NOLASCO RODRÍGUEZ

DIRECTOR: Dr. JACINTO BAÑUELOS PINEDA

ASESORES: M.C. PEDRO M. GARCIA LOPEZ

Dr. JOAQUIN GARCIA ESTRADA

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., Julio del 2004



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS

COORDINACION DE POSGRADO



COORDINACION DE POSGRADO DE LA
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E :

Por este conducto nos permitimos enviar la VERSION FINAL DE LA TESIS que desarrollo el pasante de Maestría en Ciencias Pecuarias de la Universidad de Guadalajara, MVZ Guillermo Nolasco Rodríguez cuyo titulo es:

"DESCRIPCION TOPOGRAFICA DE LOS DAÑOS POR LA ADMINISTRACION DE EXTRACTOS DE ALCALOIDES QUINOLIZIDINICOS EN EL CEREBRO DE LA RATA".

Trabajo Dirigido por: Dr. Jacinto Bañuelos Pineda

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

Las Agujas Zapopan Jal. a 01 de Marzo del 2004

REVISOR

DRA. MA. SONIA LUQUIN DE ANDA

REVISOR

DR. CARLOS BEAS ZARATE

REVISOR

DR. JOAQUIN GARCIA ESTRADA

REVISOR

DRA. ESTHER ALBARRAN RODRIGUEZ

REVISOR

DR. JACINTO BAÑUELOS PINEDA

c.c.p. archivo

INDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCION	4
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
3. HIPOTESIS	17
4. OBJETIVOS.....	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES	18
5. MATERIALES Y METODOS	19
5.1 Colecta e identificación de lupinus	19
5.2 Extracción y cuantificación de alcaloides.	19
5.3. Prueba toxicologica.....	19
5.4. Implantación de cánulas vía intracerebroventricular (ICV).....	20
5.5. Perfusión intracardiaca.....	21
5.6. Reacción con cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolio.....	21
5.7. Método Nissl (Estrada et al.,1982).	23
5.8. Método de Hematoxilina Eosina (Estrada et al .,1982).	23
6 RESULTADOS.....	25
6.1 Detección y cuantificación de alcaloides.....	25
6.2 Cromatografía de Gas Capilar.	25
6.3 Signos clínicos observados postaplicación de los alcaloides.....	32
6.4 Reaccion con el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium.....	32
.....	36

6.5 Observaciones Histopatológicas	47
7. DISCUSIÓN	60
8. CONCLUSIONES.....	66
9. BIBLIOGRAFIA	67

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por haberme dado la oportunidad de tener una carrera profesional y enseñarme a ser útil a la sociedad.

A mi esposa Marisol A. Mata Jiménez por su apoyo incondicional durante la elaboración del presente trabajo.

A mis hijos Guillermo y Jesús Maximiliano, porque alegran cada momento de mi vida y son el motivo de mis logros profesionales.

A mis hermanos Gilberto, Ramiro, Beatriz y Nora por sacrificar parte de sus vidas para que yo pudiera tener una carrera.

Muy especialmente al Dr. Jacinto Bañuelos Pineda, principal guía en este trabajo y quien me estimuló para iniciarme en la investigación desde 1997 "GRACIAS".

A la Dra. Esther Albarran Rodríguez por sus enseñanzas en este trabajo y por su paciencia para conmigo como coordinadora del Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias (PICP).

Al Dr. Carlos Beas Zarate por su paciencia en las correcciones durante todo el tiempo que duró este trabajo.

Al Dr. Joaquin García Estrada por sus consejos y experiencia para que el trabajo se realizara lo mejor posible.

A la Dra. Sonia Luquin De Anda por sus consejos para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Manuel Rosales Cortés y la Maestra Carmen Cecilia Gomez Rodiles por su asesoría en informática y estadística para la elaboración de este trabajo.

Este trabajo se llevó a cabo en los Departamentos de Botánica y Zoología y de Medicina Veterinaria del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara y fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el proyecto titulado “estudio toxicológico y microbilógico de cuatro lupinos de la región Occidente de México e implementación de un modelo de regeneración In vitro “con numero de referencia 4047P-B

RESUMEN

El género *Lupinus*, es un grupo de leguminosas que tienen como característica la presencia de alcaloides quinolizidínicos (AQ), sustancias que no representan un grupo químico homogéneo, contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico, derivan de la lisina, vía cadaverina, que es la precursora de alcaloides tetracíclicos quinolizidínicos y que le confieren efectos tóxicos y antinutricionales para los animales que los consumen. Los trastornos más graves se presentan en neuronas de diferentes regiones del Sistema Nervioso Central (SNC). El objetivo del presente estudio fue conocer los principales daños neurotóxicos en el cerebro de ratas por la administración, vía intracerebroventricular, de extractos clorofórmicos de alcaloides quinolizidínicos de 4 especies diferentes de lupinus. Para esto se obtuvieron extractos de AQ a partir de semillas de *L. montanus*, *L. exaltatus*, *L. reflexus* y *L. stipulatus*, posteriormente se cuantificaron mediante un método titulométrico, luego se realizó la cuantificación de los alcaloides integrantes del extracto por cromatografía de gas capilar. Para la prueba toxicológica se utilizaron 125 ratas Sprague-Dawley machos adultos jóvenes, distribuidos al azar en cinco grupos de diez animales cada uno. El primer grupo recibió los extractos de *L. exaltatus*, y el segundo grupo de *L. montanus*, el tercer grupo de *L. reflexus*, el cuarto grupo de *L. stipulatus*. Todas las fracciones se administraron diluidas en aceite de sésamo a una concentración de 28 ng por cada 10 microlitros durante 5 días consecutivos. El quinto grupo correspondió al control, que recibió un volumen semejante de aceite de sésamo. Al sexto día los animales fueron perfundidos vía intracardiaca, se obtuvieron los cerebros y se procesaron histológicamente para obtener cortes de 10 micras de espesor y teñirlos con Hematoxilina –Eosina o violeta de cresilo o hacerlos reaccionar con rojo de trifeniltetrazolio. Los resultados evidenciaron que los animales tratados con extractos de *L. exaltatus* mostraron piloerección, erección de la cola, pérdida de equilibrio, anorexia y mutilación de miembros. Los animales que recibieron el extracto de *L. montanus* mostraron disminución en el consumo de agua y alimento, piloerección, pérdida del equilibrio, excitación, taquipnea y caminar vacilante, signos que fueron observados de la misma manera en los animales tratados con *L. reflexus* y *L. stipulatus* no así los animales controles. Los datos obtenidos de la observación microscópica de los cortes de tejido nervioso expuesto al efecto de los extractos de AQ mostraron neuronas con cambios morfológicos como hinchamiento celular, cariólisis y cariorexis en diferentes áreas de corteza, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, hipocampo, algunos núcleos del cerebro medio, puente, cerebelo y médula oblonga. Mientras que los datos observados en los cortes de cerebro y teñidos utilizando la técnica con cloruro de trifeniltetrazolio efectivamente evidenciaron el daño de algunas zonas de los cortes de encéfalo, los cuales se midieron en porcentaje por corte, los daños más significativos se presentaron en áreas sensoromotoras de la corteza, tálamo, ganglios basales, núcleos hipotalámicos y cerebelo, los hallazgos mejor visualizados mediante la técnica de Nissl fueron compactación citoplasmática en neuronas y gliosis generalizada del tejido, además de la presencia de un gran número de células hinchadas y células rojas y células fantasma, mientras que con la técnica de 2,3,5-trifeniltetrazolio se confirmó la presencia de daño en las áreas sensoromotoras de la corteza cerebral, así como en algunos centros del hipotálamo y en tallo cerebral.

1. INTRODUCCION

El genero *lupinus*, pertenece a la familia *Fabaceae*, posee cerca de quinientas especies distribuidas en el mundo, de las cuales el 96% son originarias del continente americano. De estas, 100 especies se han reportado en México y 15 de ellas crecen en el estado de Jalisco como: *Lupinus exaltatus*, *L. montanus*, *L. estipulatus*, *L. reflexus*, *L. rotundiflorus*, *L. mexicanus*, *L. leptocarpus* y *L. madrensis*. son de las especies más abundantes en el estado. (Mc Vaught.1987; Dunn, 1984)

El genero incluye hierbas anuales, perennes, arbustos e inclusive se reporta una especie arbórea que alcanza los ocho metros de altura. Presenta hojas palmaticompuestas, de cinco a 17 foliolos simples y enteros; aunque se tiene un ejemplar, en el herbario IBUG (*Lupinus villosus* Willd), de Carolina del Sur, el cual tiene las hojas enteras. Estipulas adnates en la base de los pecíolos con dos puntas libres. Bracteas florales usualmente deciduas en anthesis. Bracteolas adnates a la base del cáliz. Flores en racimos dispuestas en verticilos, por lo regular azules, moradas o violáceas, raramente blancas o amarillas; con un estandarte, una quilla rostrada (picudas), formada por dos pétalos, cubiertos parcialmente por las alas, las anteras alternadamente cortas y versátiles o largas y basifijas. Gineceo con ovario sésil, multi-ovulados; estilo glabro, estigma barbado. Fruto más o menos compreso, linear-oblongo usualmente hirsuto o sedoso-veloso, dehiscente a lo largo de ambas suturas, Semillas compresas o en la mayoría obovoides.

El género constituye un importante componente de los bosques de pino-encino, la distinción de especies se basa en la combinación de varios caracteres, entre los que destacan:

- a) Hábito y aspecto de la planta
- b) Consistencia de la raíz
- c) Presencia y tipo de distribución de pubescencia en tallos, hojas y frutos.
- d) Forma de la hoja, tamaño del peciolo, número y aspecto de los folíolos.
- e) Tamaño de estípulas, parte basal adnate y puntas libres.
- f) Forma y tamaño de las inflorescencias.
- g) Aspecto y forma de las bracteas florales.

- h) Presencia de bracteolas.
- i) Angulo de la quilla.
- j) Tipo, tamaño y forma de la vaina.
- k) Número y color de la semilla.

L. montanus **H.B.K.**

Planta que muestra una preferencia por los habitats perturbados de los bosques de pino a altitudes de 3500 a 4000 metros sobre el nivel del mar (msnm). Por lo general se les encuentra en claros de bosque en las partes elevadas de las montañas, en Jalisco se tienen ejemplares de la Sierra de los Huicholes y en el Nevado de Colima (McVaugh, 1987).

L. exaltatus **Zucc.**

Se desarrolla entre 1000 a 2800 msnm. Especialmente en claros de bosques de pino-encino, junto con pastos en zonas de pastoreo, a orillas de caminos y campos cultivados en las montañas de la sierra volcánica transversal. En el estado de Jalisco crecen numerosos ejemplares en las comunidades de la base del nevado de Colima (McVaugh, 1987).

L. reflexus **Rose.**

Plantas de montaña y de la cúspide de las cordilleras en bosques de Abies, Pinus y Alnus, también en suelos volcánicos cerca del límite de la vegetación arbórea, entre los 2700 a 3600 msnm. Especie muy abundante en las laderas, y a orilla del camino, en el trayecto al refugio La Joya del Nevado de Colima (McVaugh, 1987).

L. stipulatus **J.**

Especie de los bosques de pino o encino, encontrándose también en matorrales. Se localizan de los 1800 hasta 2650 msnm. En el estado de Jalisco localizados en la sierra de los Huicholes y en el nevado de Colima (McVaugh, 1987).

Los lupinos se caracterizan por el alto contenido de proteína de su semilla (38-50 %), (Cheeke and Kelly, 1989, Davis, 1982), aceite, fibra y carbohidratos (Bellido y García, 1991). Se clasifican en dos grupos: "especies dulces"; como *L. albus*, *L. luteus* y *L. angustifolius*, que se han utilizado en la alimentación de diferentes especies animales incluyendo al hombre (Petterson, 1998, Petterson, 1995) y las "especies amargas"; como son todas las especies silvestres de este genero, entre las que se encuentran *L. montanus*, *L. exaltatus*, *L. reflexus* y *L. stipulatus* (Ramos et al., 1998), las cuales tienen como limitante para consumirse directamente la presencia de altas cantidades de alcaloides quinolizidinicos, (de 2.5 a 5.0%) (Kinghorn, 1984). Estas sustancias son inodoras (Molyneux y Ralphs, 1992) y confieren un sabor amargo que lo hace no palatable (Robbins et al., 1996), además de provocar toxicidad aguda, subaguda o subcronica (Ballester et al., 1980) del sistema nervioso central (Yovo et al., 1984 Robbins et al., 1996). Actúan a nivel ganglionar (Duke, 1987; Bruneton, 1993). inhibiendo la transmisión del influjo ganglionar simpático y parasimpático del sistema nervioso autónomo (Agid et al., 1988; Garner, 1957). Los síntomas del envenenamiento agudo en animales se resumen en fallo respiratorio, parálisis pulmonar, inapetencia, caminar vacilante, sudor repentino, midriasis, movimientos violentos, fallo cardiaco, convulsiones y coma, lo que conduce a la muerte del animal (Garner, 1957). La intoxicación subcrónica se presenta con anorexia, ictericia y depresión progresiva (Humphereys, 1990).

Químicamente los alcaloides quinolizidinicos (AQ), son compuestos nitrogenados considerados como metabolitos secundarios (Harborne, 1993) sintetizados en el follaje en fase de crecimiento y que se transportan a otras partes de la planta vía la savia, como a la semilla y la flor (Cheeke, 1989). Constituyen una defensa química contra sus depredadores; insectos y mamíferos herbívoros (Schmeller, 1994). Las yemas en crecimiento de arbustos, las hojas jóvenes, los órganos reproductores y de dispersión, y en general todas las partes en crecimiento anual muestran una mayor concentración de compuestos secundarios que los tejidos viejos (Rhoades, 1979). En si, se ha propuesto a estos compuestos como sustancias

ecológicamente eficaces frente a los compuestos primarios (Strasburger et al., 1994). Los compuestos secundarios han sido durante mucho tiempo ignorados, no obstante su carácter claramente ventajoso para la planta y en muchos casos, en obvio detrimento de los herbívoros, ha conducido a que actualmente se valore su incidencia en la producción agroganadera (Strasburger et al., 1994).

En las plantas existe una enorme diversidad bioquímica de compuestos secundarios, frutos, tal vez, de su imposibilidad de huida de sus agresores (Cheeke, 1995). Frente a las condiciones adversas las plantas tienden a aumentar sus defensas, sobre todo de tipo cualitativo (alcaloides, glucósidos cianogenéticos, etc.), ya que en estos casos les resulta mucho más difícil regenerar los tejidos dañados por los herbívoros (Lundberg y Palo., 1993). En estas condiciones esto resulta en una intoxicación más fácil del animal siendo de especial incidencia en el ganado doméstico cuando su manejo en pastoreo no es el más adecuado, o cuando se enfrenta a la escasez de otros recursos vegetales (James y Molyneux, 1992).

Muchos compuestos secundarios son empleados por la planta con distintas funciones. Intervienen en relaciones de competencia con otras plantas; actuando como agentes alelopáticos y contra invasiones de hongos, bacterias y virus (Harborne, 1993). En relaciones de mutualismo; atracción de polinizadores y dispersores de semillas (Mangan, 1988; Min et al., 2002). Como protección contra la radiación ultravioleta y como moléculas portadoras de información relacionada con posibles funciones defensivas contra sus depredadores (Poulton, 1990; Zaklad et al., 1998).

Los compuestos secundarios suelen ser agrupados con relación a las sustancias químicas que les constituyen en: compuestos fenólicos (taninos, fitoestrogenos y cumarinas), terpenos (lactonas, sesquiterpénicas, glucosidos cardiacos, saponinas), hidrocarburos poliacetilénicos, oxalatos y toxinas nitrogenadas (glucósidos cianogenéticos, glucosinolatos, aminoácidos tóxicos, lectinas, inhibidores de las proteasas y alcaloides de tipo quinolizidínico) (Hagerman, 1991).

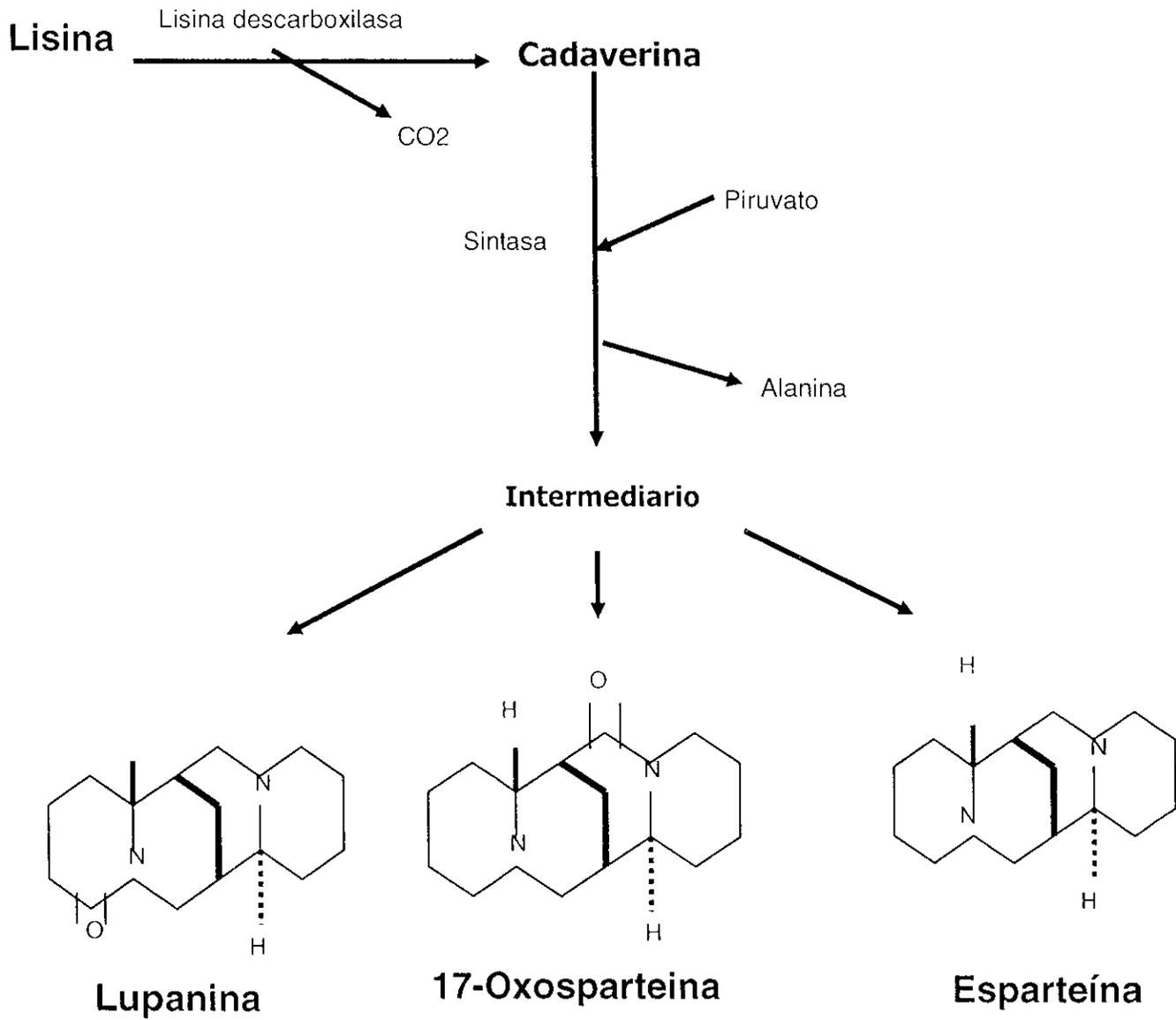
A la fecha se han reportado más de 150 alcaloides quinolizidínicos con 10 estructuras químicas diferentes (Wink, 1993); entre las que se encuentran las

bicíclicas (lupinina), tricíclicas (angustifolina), tetracíclicas (lupanina, anagirina),

Estos alcaloides se distinguen de otros debido a la presencia de por lo menos un sistema de anillo quinolizidínico particularmente peligrosos por sus efectos teratogénicos, tóxicos y antinutricionales (Wink, 1993; Keller and Selenski, 1978; Hatzold et al., 1983). La concentración y el tipo de alcaloides dependen de la variedad de lupinus, especie y condiciones ambientales (Butler et al., 1996; Petterson, 1995). Los efectos tóxicos de los AQ no son acumulativos, ya que son poco digestibles y son rápidamente excretados del cuerpo por el riñón (Petterson et al., 1994), lo que sugiere que se pueden ingerir grandes cantidades de semillas de lupinus, siempre y cuando la cantidad de alcaloides no rebase la dosis letal media; la cual en ratones vía intraperitoneal para lupanina y esparteína es de 30 mg/kg (Yovo et al 1982 y Yovo et al., 1984), mientras que la DL100 para ratones la esparteína es de 150 mg/kg (Petterson et al., 1987) y 225 mg/kg. para la lupanina, mientras que para ratas es de 50 mg/kg de peso . Estudios realizados por Couch en 1926 sobre la toxicidad de estos alcaloides sugiere una dosis mínima letal de 22-25 mg/kg., de peso en cobayos vía intraperitoneal, mientras que en ratones es de 50 mg/kg (Butler et al., 1996).

La biosíntesis de estos alcaloides se realiza en las partes más verdes de la planta y su sitio intracelular es el cloroplasto (Wink y Hartmann, 1982). Las semillas son ricas en AQ y pueden guardar hasta el 8 % de su peso seco como alcaloides, además estos desaparecen de hojas senescentes durante el periodo vegetativo y son movilizados a otras partes de la planta (Wink, 1993).

Los AQ se sintetizan a partir del aminoácido L-lisina, la cual sufre un proceso de descarboxilación debido a la presencia de la descarboxilasa de la lisina, una enzima presente en el cloroplasto del lupino. Esto da como producto a la cadaverina, un precursor intermediario entre lisina y los AQ. Así, los dos átomos de nitrógeno del esqueleto quinolizidínico de los alcaloides son derivados de lisina o cadaverina (Wink, 1993; Wink y Hartmann, 1982).



BIOSÍNTESIS DE LOS ALCALOIDES QIONOLIZIDINICOS

Por otro lado, los alcaloides quinolizidinicos poseen propiedades farmacológicas y medicinales. Actúan como antipiréticos, antiinflamatorios, depresor cardiaco e hipotensivo, estimulantes y depresores respiratorios, estimulantes de la musculatura uterina, diuréticos, hipoglicemicos, alucinógenos, anestésicos, relajante muscular, (Kinghorn y Balandrin, 1984) y oxitócicos, entre otros (Schmitt, 1980; Cohem, 1981).

Estos alcaloides también pueden influir adversamente sobre el desarrollo del feto que va desde el retraso del crecimiento, malformaciones, hasta la letalidad (Looms, 1974): En pollos de engorda se reduce significativamente la ganancia de peso (Robbins et al., 1996). Otros efectos de los alcaloides se ven reflejados en algunos parámetros hematológicos y bioquímicos de algunas especies (Rahman et al., 1996; Robbins et al., 1996), como en pollos en los que se presenta un incremento en la cantidad de suero de sangre periférica y produce un ligero efecto hemoaglutinante en eritrocitos de conejo y vaca, no así en eritrocitos de humanos (Gross,1982). También produce una disminución de hematocrito de la sangre en ratas (Buttler et al., 1996), modifica la secreción de algunas hormonas como la insulina y las gonadotropinas (Pearse et al.,1991; Blache et al., 1996), En aves en tasas que van del 5-10 % de la dieta (Van Der Poel, 1989), bovinos 15-18, % ovinos y caprinos 20 % (Dixon y Hosking, 1992) y en cerdos en crecimiento de 5 al10 %, ya que no se recomienda en otras etapas productivas de suinos (Batera, 1989) En ovejas alimentadas con semillas de lupinus disminuye la calidad de la fibra de la lana (Masters et al; 1996), en vacas de ordeña, la ingesta de harina de semillas de lupinus mejora el volumen y los componentes lácteos (Valentine y Barlsch, 1996); por ingestión de agua amargada por los alcaloides de los lupinus en humanos produce movimientos involuntarios de miembros superiores (Luque et al.,1991), produce destrucción gradual de motoneuronas y otros trastornos neurológicos por el consumo por largo tiempo de semillas de lupinus (Agid et al.,1988).

Se han descrito cuadros tóxicos en hombres y en animales. La sintomatología consiste en manifestaciones cardiovasculares (arritmias, taquicardia), neurológicas (debilidad, astenia, visión borrosa y descoordinación) y síntomas gastrointestinales

(nauseas y vómitos). Así mismo se han descrito dos casos en los que un enema con líquido obtenido por la cocción de 5 onzas de lupino produjo los siguientes síntomas tóxicos: malestar general, visión borrosa, mareo, debilidad palpebral, cansancio, alucinaciones y constricción laríngea y faríngea (Marquez et al., 1999; Agid et al., 1988; Tsiodras et al., 1999).

La toxicidad de la planta depende de su contenido en alcaloides, principalmente de esparteína o lupanina. Estos contienen α -piridoxina, n-metilcistisina y cisticina; con afinidad por los receptores nicotínicos y alcaloides tipo quinolizina; con mayor afinidad por receptores muscarínicos (Pothier, 1998; Jabbar, y et al., 2001).

Además estos AQ tienen una función biológica activa al repeler a los depredadores naturales de los lupinos, sean herbívoros o fitopatógenos, ya que los AQ son directamente mutagénicos (Tsiodras et al., 1999) y tóxicos a un amplia gama de organismos y constituye una defensa química contra los mismos (Wink, 1985). Así mismo, existen datos que reiteran la toxicidad de los AQ en diversas especies de vertebrados como son:

1. En el pato, los AQ provocan una disminución en la eclosión, en la biomasa y en la producción de huevos, así como un bajo conteo de eritrocitos y contenido hemático en embriones (Wink,1993).
2. El AQ anagirina, posee propiedades teratogénicas para el ganado, provocando malformaciones en becerros (Bednarczyk et al., 1987).
3. En vacas productoras de leche, alimentadas con lupinus amargos, se reporta una disminución en la ingesta alimenticia, perdida de peso, así como una menor producción de leche y menos cantidad de grasa en ella (Panter y Keeler,1993; Panter y et al., 1999).

De manera paralela a los efectos tóxicos, los AQ poseen propiedades farmacológicas y medicinales. Actúan como antipiréticos, antiinflamatorios, antiarrítmico cardiaco, estimulantes y depresores respiratorios, hipoglicémicos, alucinógenos, anestésicos, como relajantes musculares, etc.,

La esparteína se aísla con facilidad de *Cytisus scoparius* (Fabaceae), y es el

único AQ que esta comercialmente disponible y que se ha utilizado ampliamente en medicina humana por sus propiedades antiarrítmicas y oxióticas; algunas presentaciones comerciales son: Anxoral™, Arive™, Cardipax™, Desapan™, Diffucord™, Gelsadon™, Hypolind™, Hypotonin™, Jatamansin™, Kanovenol™, Morfi™, Normotin™, Palpilax™, Perivar™, entre otras (Roberts y Wink, 1998). De cualquier manera, un 10 % de los pacientes son incapaces de metabolizar la esparteína y esto les ha causado intoxicación. Por este efecto colateral, el uso de la esparteína en la medicina moderna se ha restringido (Schmeller y Wink, 1988).

Uno de los sitios en que los AQ provocan sus efectos es a nivel de los ganglios nerviosos, inhibiendo la transmisión del influjo ganglionar simpático del sistema nervioso autónomo (Mukissirat y Mitaru, 1995; Yang, et al., 2000). Debido a estas propiedades ganglioplégicas, dosis altas de lupanina y esparteína reducen el flujo del seno carotideo, así como el flujo coronario, la contracción, la amplitud y la velocidad cardiaca (Agid, et al., 1988). Estudios recientes han demostrado que la lupanina es menos tóxica que la esparteína, esto debido a que la primera tiene una capacidad de difusión mayor y puede metabolizarse más rápidamente que la esparteína.

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

1. Actividad de receptores muscarínicos para acetilcolina (Schmeller et al., 1994).
2. Actividad de receptores nicotínicos para acetilcolina (Schmeller et al., 1994).
3. Inactivación de canales de Na⁺ (Koper et al., 1998).
4. Inactivación de canales de K⁺ (Koper et al., 1998).

Con base a esto, se conoce que los AQ actúan como agonistas en los receptores colinérgicos (Ach) (Kinghorn y Balandrin, 1984; Anne-Lise Sagen et al., 2002). Sin embargo, estos son afines de manera específica a receptores nicotínicos y muscarínicos. Los AQ afines a receptores nicotínicos son menos activos en los muscarínicos y viceversa (Schmeller et al., 1994).

Diversas evidencias experimentales han demostrado que algunos AQ inhiben el transportador de serotonina observándose un aumento en la neurotransmisión

serotonérgica y por mecanismos aun no bien conocidos también se observa un aumento en la neurotransmisión dopaminérgica que produce un aumento en la liberación de acetilcolina. Esto puede inducir a una sobre-activación de los receptores a acetilcolina tanto de tipo muscarínico y nicotínico.

La activación de los receptores m1, m3 y m5 de tipo muscarínico conlleva a la activación de la fosfo-específico-fosfoinositol fosfolipasa C (PI-PLC) que contribuye a la formación de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) segundo mensajero que promueve la liberación de Ca⁺⁺ de almacenes intracelulares, y de diacilglicerol (DAG) que junto con altas concentraciones de Ca⁺⁺ promueve la activación de la proteína cinasa C (PKC); la activación de los receptores m2 y m4 promueven la inhibición de la adenilciclase (cAMP) (Kassessinoff, et al., 1998).

Una elevación de Ca⁺⁺ intracelular por la activación de los receptores a glutamato (Glu), promueve la lípo-peroxidación (LP) de la membrana citoplasmática, del retículo endoplásmico (RE) y de la membrana mitocondria. Esta LP se induce por la producción de óxido nítrico (NO) y el radical superóxido (O₂⁻), los cuales forman peróxido de nitrato y éste a su vez origina la LP (Sterin-Borda, et al., 2003).

La LP induce daño en la bomba Na⁺ / K⁺ ATPasa, transportadores de glucosa y transportadores de Glu, lo cual produce una despolarización de la membrana y una excesiva activación de los receptores a Glu, lo cual produce a una excitotoxicidad celular (Aramakis, et al., 1999). También perturba la homeostasis iónica en el RE y mitocondria, comprometiendo su importante función en el secuestro de Ca⁺⁺ (Aramakis, et al., 1999). Con la base de todos estos argumentos anteriores se puede observar la estrecha relación que existe entre la homeostasis del Ca⁺⁺ y la sobrevivencia celular (Slutsky et al., 2003).

Un incremento en la liberación de Ca⁺⁺ de la mitocondria por agentes oxidantes estimula enzimas dependientes de Ca⁺⁺ como proteasas, nucleasas y fosfolipasas, las cuales subsecuentemente llevan a las células a apoptosis (AP) (Slutsky et al., 2003).

En los procesos apoptóticos se pueden distinguir tres fases: activación, propagación y ejecución, que en ocasiones, se preceden por un período de latencia, de extensión variable (Segura, 2003). La fase de activación suele mediarse por

señales extracelulares, como la unión de un neurotransmisor excitatorio a su receptor. La fase de propagación, ya intracelular, se media por segundos mensajeros, como el Ca^{++} , las especies reactivas del oxígeno y factores de transcripción. Finalmente, en la etapa de ejecución, la célula activa procesos de degradación en los que participan proteasas y ADNasas. Entre las dos últimas etapas se ha situado a la mitocondria como organelo clave en el punto de no retorno.

Donde una serie de datos sugieren que el flujo de Ca^{++} a través de la mitocondria, es el evento central que coordina la fase efectora de la AP (Chakrabort, 1999). El citocromo c es un componente necesario en la activación del programa apoptótico, lo que sugiere que la mitocondria participa en la AP por la liberación del citocromo c al citosol (Martin, 1998).

La modulación de receptores acetilcolinérgicos (receptores nicotínicos y muscarínicos) y la inhibición de canales de Na^+ y de K^+ por AQ, se han propuesto como los mecanismos para explicar la toxicidad en el tejido nervioso (Schmeller et al., 1994), bloqueando la señal de transducción en células nerviosas e interfiriendo con el metabolismo y actividad de los neurotransmisores en el cerebro (Wink, 1998).

Utilización del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio como marcador histoquímico del daño neuronal.

La sal de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio es un reactivo que actúa como indicador histoquímico de la actividad de las enzimas en la cadena respiratoria de la mitocondria (Cole et al., 1990.; Robert et al., 1993); la actividad de este organelo puede observarse hasta de forma automática en las células de cerebro, aunque otros organelos como el núcleo pueden ser destruidos (Liszczyk et al., 1984) esta sustancia se utiliza por los patólogos para detectar las áreas de infarto en órganos como el corazón (Bederson et al., 1986; Bendar et al 1994) y cerebro (Dettmers et al., 1994) ya que su reacción se compara a la que se obtiene con la técnica de Hematoxilina-Eosina (Bederson et al., 1986) o la utilización del Ioduro de propidio para teñir la muerte celular (Ito et al., 1997). También es útil como marcador de tejido dañado tempranamente en roedores y gatos (Lee et al., 2003), así como otros

animales de laboratorio (Dettmers y col., 1994; Holbom et al., 1993). Para detectar isquemia (Park et al., 1988; Chan et al., 2003), para medir el volumen de trauma en cerebros de animales causado por la perfusión de un fluido (Bascaya et al., 2000; Hu et al., 2003) o para medir la extensión del cambio histoquímico causado por la oclusión de la arteria cerebral media (Cole et al., 1990; Hatfield et al., 1991, Shen et al., 2003), Esta sustancia puede utilizarse via perfusión intracardiaca o bien por inmersión del tejido nervioso (Isamaya et al., 1991)

Con base a lo anteriormente mencionado, nos planteamos conocer los efectos tóxicos de los alcaloides quinolizidínicos administrados por via intracerebrónica sobre las diferentes estructuras y núcleos del cerebro.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los Alcaloides Quinolizidinicos son compuestos heterocíclicos nitrogenados que se encuentran en altas concentraciones en los lupinus silvestres, lo que representa la principal limitante para su uso en la alimentación. Estas sustancias confieren un sabor amargo y puede producir toxicidad aguda, subaguda o subcrónica del SNC. La modulación de receptores acetilcolinérgicos (receptores nicotínicos y muscarínicos) y la inhibición de canales de Na⁺ y de K⁺ por AQ, son los mecanismos que hasta el momento explican la toxicidad en el tejido nervioso, este efecto produce el bloqueo de la señal de transducción en células nerviosas e interfiere con el metabolismo y actividad de los neurotransmisores en el cerebro y las neuronas.

Los síntomas de envenenamiento en animales puede resumirse en fallo respiratorio, convulsiones y coma lo que puede conducir a la muerte del animal y provocar graves trastornos en neuronas de diferentes áreas del encéfalo. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios que describan topográficamente el tipo de lesion y regiones sensibles al efecto de estos alcaloides en el cerebro de roedores.

3. HIPOTESIS

Los alcaloides quinolizidínicos de semillas de lupinus producen neurotoxicidad de severidad variable, entre las distintas regiones del cerebro de ratas, por lo tanto es posible su descripción topográfica sobre los daños celulares causados en diferentes regiones del cerebro.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios patológicos de neuronas en diferentes áreas del cerebro por la administración ICV de extractos de alcaloides quinolizidínicos obtenidos de cuatro especies diferentes de lupinus silvestres del Occidente de México (*L. montanus*, *L. exaltatus*, *L. reflexus*, *L. stipulatus*).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar las alteraciones tisulares en el cerebro de ratas que recibieron alcaloides extraídos de lupinus, mediante tinción con rojo de trifeniltetrazolio, para evidenciar la diferente sensibilidad residual entre cada especie de lupinus.
2. Analizar las principales alteraciones histopatológicas en el tejido cerebral de ratas lesionadas por la administración ICV de alcaloides, mediante tinción con con la técnica de Nissl y Hematoxilina-Eosina.
3. Identificar la diferente vulnerabilidad de las distintas regiones cerebrales frente a los efectos neurotóxicos de AQ.
4. Establecer la pérdida neuronal en el cerebro completo de ratas lesionadas por los diferentes alcaloides, mediante un estudio semicuantitativo de la muerte celular.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Colecta e identificación de lupinus

Se realizaron varias colectas en algunas localidades del estado de Jalisco (Zapotlan el Grande y Bolaños) con el propósito de obtener semillas de cuatro especies diferentes de lupinus (*L. montanus*, *L. exaltatus*, *L. stipulatus* y *L. reflexus*).

5.2 Extracción y cuantificación de alcaloides.

La extracción y cuantificación de AQ se realizó con el apoyo del personal del laboratorio de Biotecnología del departamento de Botánica y Zoología, allí las semillas colectadas se deshidrataron a temperatura ambiente y se cuantificó el contenido total de alcaloides quinolizidínicos (AQ) por titulometría (Muzquiz et al., 1994) a partir de cuatro muestras independientes (0.5 g) colectadas de cada una de las harinas de lupinus estudiadas (Bear Von et al., 1979). El análisis cromatográfico se llevó a cabo por inyección de 0.2 ml. de extracto alcaloideo en un cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem con detector de Nitrógeno-Fósforo y columna capilar SPB-1 (30m x 0.26 mm di; 0.26 nm), las temperaturas del inyector y detector fueron de 240 y 300 °C, respectivamente, y la temperatura del horno programada de 136 a 236°C a razón 6°C por minuto, esta última se mantuvo durante 16 min. El gas portador fue el Helio y el flujo 1.1 ml./ min. La presencia de lupanina, lupinina, esparteína, alfa-isolupanina, 13-OH lupanina, gramina, angustifolina o epilupanina presentes en las especies analizadas se llevó a cabo por comparación con los tiempos de retención obtenidas con estándares puros de los mismos, diluidos en metanol (Muzquiz et al., 1993)

5.3. Prueba toxicológica

Una vez obtenidos los AQ se procedió a iniciar la prueba toxicológica para esta se utilizaron 125 ratas *Sprague Dawley* machos adultos jóvenes con un peso aproximado de 175 g, mismas que se mantuvieron en jaulas individuales bajo condiciones de bioterio. Los animales se distribuyeron al azar en cinco grupos de 25

cada uno y se alimentaron con nutricubos de purina durante los días en que recibieron la aplicación de los alcaloides vía intracerebroventricular (ICV).

5.4. Implantación de cánulas vía intracerebroventricular (ICV).

Para esto se rasuró el dorso de la cabeza del animal antes de colocarlos en un aparato estereotáxico, David-Kopff, se anestesiaron mediante inyección peritoneal con pentobarbital sódico (50 mg/kg. de peso) y una vez anestesiadas se colocaron las barras auditivas y los incisivos (-3.3 mm) para fijar la cabeza. Con el animal inmovilizado se hizo un corte en la piel del cráneo por la línea media empezando por detrás de la comisura posterior de los ojos y se prolongó hasta el nivel donde se encuentran la orejas, con un raspador de periostio de bordes romos se separaron lateralmente; el tejido conectivo subcutáneo y el periostio, partiendo de la línea media hacia los lados para descubrir la sutura de Bregma (anterior) y Lambda (posterior), y obtener los registros iniciales de posición; antero-posterior, mediolateral y dorso-ventral, a partir de estos se definió la ubicación del sitio donde se fijó la cánula; -1.4 mediolateral, 8.2 anterior a Lambda y -4.0 dorsoventral. Estas coordenadas corresponden a la ubicación del espacio correspondiente al ventrículo lateral derecho.

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

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

utilizando puntos en "U" con seda trenzada de cuatro ceros.

Enseguida se separó la rata del aparato estereotáxico y se regresó a sus condiciones habituales de mantenimiento.

5.5. Perfusión intracardiaca.

Inmediatamente después del periodo de tratamiento, el cual consistió en la aplicación ICV de los extractos de alcaloides quinolizidínicos a dosis de 28 ng. en 10 microlitros en dos aplicaciones de forma lenta durante cinco días, vía intracerebroventricular, los animales fueron anestesiados por inhalación de cloroformo, con el propósito de realizar una perfusión intracardiaca y fijar el encéfalo. Para esto se practicó toracotomía en cada uno de los animales para acceder al corazón.

Luego se introdujo una aguja biselada calibre 22 en el ventrículo izquierdo y simultáneamente se cortó la aurícula derecha; posteriormente se hizo pasar una solución lavadora de suero fisiológico durante 4 min, hasta ver fluir este líquido sin restos de sangre por la aurícula derecha, inmediatamente después se procedió a perfundir la solución fijadora de Bouin (que contiene 15 partes de ácido pícrico en solución saturada, cinco partes de formol y una parte de ácido acético concentrado) por un periodo de tiempo de 5 a 7 min. Al final de la perfusión se practicó craneotomía y se extrajo el encéfalo completo, el cual se posfijó por inmersión durante 24 h. en la misma solución fijadora, después, el cerebro fue procesado, hasta su inclusión en parafina, se realizaron cortes coronales seriados de 10 micras de espesor en un microtomo rotatorio. Los cortes se tiñeron con el método de NISSL (violeta de Cresilo) hematoxilina-eosina, fueron montadas en portaojetos con Entellan (Merck) para su posterior observación y análisis microscópico,

5.6. Reacción con cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolio (Goldlust et al., 1996)

Para la técnica de marcaje con rojo de Trifeniltetrazolio se utilizaron 5 ratas de cada grupo, las cuales fueron anestesiadas con una dosis intraperitoneal de 0.2 ml de pentobarbital al 6.3 %, posteriormente con el animal anestesiado, se procedió a realizar una perfusión intracardiaca con una solución de PBS a 0.1 mol durante 5

min, posteriormente se les practicó una craneotomía, obtenido el cerebro completo se colocó sobre una lamina de parafina en congelación a temperatura de -2 a 0°C durante 10-15 min. Luego se realizaron cortes coronales de $200-300\mu\text{m}$. de espesor, los tejidos fueron inmersos en una solución al 2 % de cloruro de trifeniltetrasolio en PBS 0.1 molar (pH ajustado a 7.4) durante 10 minutos a 37°C en baño María y completa oscuridad en un vaso de precipitado. Durante el baño los tejidos se mantuvieron con movimientos orbitales suaves para asegurar la inmersión simétrica de toda su superficie. Posteriormente, el exceso de cloruro de trifeniltetrasolio fue drenado y los tejidos se mantuvieron en una solución de formalina a una temperatura de 4°C (Goldlust et al., 1996). 24 horas después los cortes de encéfalo se separaron y el tejido meningeal suelto se removió. Posteriormente los tejidos fueron colocados en orden a los grupos en una superficie plástica transparente y cubiertos con un fondo de plástico blanco (las secciones de la parte rostral del cerebro fueron colocados con la parte caudal hacia abajo, el resto fue colocado con la superficie rostral hacia abajo, este procedimiento asegura que el área de cada corte solo sea contada una vez). De esta manera los tejidos fueron colocados en la superficie de un escáner de cama plana a color (marca Microtek modelo 600) y se procedió a escanearlos.

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

Los tejidos presentaron dos colores, blanco (o blanquecino); el cual indica una inhibición significativa en las enzimas funcionales de la mitocondria y por otro lado un rojo oscuro; que revela una correcta actividad mitocondrial (Goldlust et al., 1996). De esta manera el área de las imágenes en color (blanco-rojo) y el área total fueron marcadas en el analizador de imágenes (Leica modelo Q550) de manera

semiautomática (las zonas mielinicas se excluyeron manualmente), obteniendo, por diferencia, el volumen de área de las regiones anatómicas dañadas en μm . cuadradas para mayor accesibilidad de los datos.

5.7. Método Nissl (Estrada et al., 1982).

Cinco cerebros de cada grupo se deshidrataron en series crecientes de alcohol 70, 80, 90, 96 y 100 % durante 24 h cada uno. Posteriormente, se incluyeron en líquidos intermediarios (benzoato de metilo y alcohol bencilico). Se llevó acabo la inmersión en parafina (I y II) 24 h cada uno a una temperatura de punto fusión 54-56°C. Con los bloques se hicieron cortes coronales de 10 μm de espesor en un micrótopo (REICHERT™) y se montaron en portaobjetos preparados con albúmina de huevo. Para su tinción se desparafinaron con 2 pases de 15 min en xileno y se deshidrataron en series decrecientes de alcohol; 100, 96, 90, 80, 70, 40 % cada una con duración de 5 min. De esta manera, la tinción fue de 25 seg. En una solución de 0.5% de acetato de violeta de cresilo (colorante Nissl, sigma™ 5042).los tejidos fueron deshidratados mediante dos pases de alcohol; 96 y 100 %(5 min cada uno) montados en resina Entellan (Merck™ 1079710100). Lo anterior permitió evidenciar la topografía del daño en el SNC.

Mediante esta técnica, los tejidos cerebrales teñidos se cuantificaron utilizando un equipo para análisis de imágenes Leica™ Q550, las medidas de superficie celular (superficie total de la célula en micras) y superficie nuclear (superficie del núcleo celular en micras) para los núcleos observados

5.8. Método de Hematoxilina Eosina (Estrada et al ., 1982).

Cinco cerebros de cada grupo se deshidrataron en series crecientes de alcohol 70, 80, 90, 96 y 100 % durante 24 h cada uno. Posteriormente , se incluyeron en líquidos intermediarios (benzoato de metilo y alcohol bencilico). Se dejaron en inmersión en parafina líquida (I y II) durante 24 h cada una a una temperatura de punto fusión 54-56°C, despues los tejidos se bloquearon y se hicieron cortes coronales de 10 μm .de espesor en un micrótopo (REICHERT™). Se montaron en

portaobjetos y previo a su tinción, se desparafinaron con 3 pases de 5 minutos en xileno y se hidrataron en series decrecientes de alcohol; 100, 96, 90, 80, y 70 % cada una con duración de 5 min. Se tiñeron con hematoxilina y eosina amarillenta al 1%, luego se deshidrataron con series crecientes de alcohol, se aclararon en dos pases de xileno y se montaron en resina Entellan (Merck™ 1079710100).

Mediante esta técnica, los tejidos cerebrales teñidos se cuantificaron utilizando un equipo para análisis de imágenes Leica™ Q550, las medidas de superficie celular (superficie total de la célula en micras) y superficie nuclear (superficie del núcleo celular en micras)

6. RESULTADOS

6.1 Detección y cuantificación de alcaloides.

Los resultados de la extracción de alcaloides quinolizidínicos, muestran la presencia, principalmente de lupanína, 3-OH lupanina y esparteína en diferentes concentraciones en las cuatro especies de lupinus

6.2 Cromatografía de Gas Capilar.

En este trabajo la concentración de los alcaloides quinolizidínicos se manifestó en los cuatro estándares de AQ, no obstante la concentración fue muy variable, siendo para *L. montanus* la esparteína como alcaloide mayoritario (35.4 mg/gr), seguido por la lupanína (17.7 mg/gr), la 3-OH-lupanina (3.8 mg/gr). la 13-OH-lupanina (3.2 mg/gr) en *L. exaltatus* el alcaloide que se encuentra en mayor cantidad fue la lupanína con (5.832 mg/gr), la 3-OH-lupanína (1.526 mg/gr) y la espateína (0.284 mg/gr), para *L. reflexus* el alcaloide en mayor cantidad es la esparteína con (26.634 mg/gr), luego al lupanína (2.13 mg/gr), después la 3-OH-lupanina (0.159 mg/gr), y luego la 13-OH-lupanina (0.790 mg/gr), por ultimo el *L. stipulatus* presentó como alcaloide mayoritario 4-OH-Lupanina (17.84 mg/gr), 13-OH-Lupanina (14.51 mg/gr), Angustifolina (5.67 mg/gr), Lupanína (3.39 mg/gr), Esparteína (0.01mg/gr),

Cuadro 1. Contenido de alcaloides principales del extracto de *L. montanus*.

Alcaloide	mg/gr. \pm DE
Esparteína	35.4 \pm 0.13
Lupanina	17.7 \pm 0.096
3-OH-Lupanina	3.8 \pm 0.47
13-OH-Lupanina	3.2 \pm 0.43

Cuadro 2. Contenido de alcaloides principales del extracto de *L. exaltatus*.

Alcaloide	mg/gr. \pm DE
Lupanina	5.832 \pm 0.46
3-OH-Lupanina	1.526 \pm 0.19
Esparteina	0.284 \pm 0.004

Cuadro 3. Contenido de alcaloides principales del extracto de *L. reflexus*.

Alcaloide	mg/gr. \pm DE
Esparteina	26.634 \pm 1.136
Lupanina	2.13 \pm 0.03
3-OH-Lupanina	0.159 \pm 0.051
13-OH-Lupanina	0.790 \pm 0.018

Cuadro 4. Contenido de alcaloides principales del extracto de *L. stipulatus*.

Alcaloide	mg/gr. \pm DE
4-OH- Lupanina	17.84 \pm 0.45
13-OH-Lupanina	14.51 \pm 0.79
Angustifolina	5.67 \pm 0.34
Lupanina	3.39 \pm 0.13
Esparteina	0.018 \pm 0.88

En las Figuras 1, 2, 3 y 4 se muestra los cromatogramas correspondientes a los extractos de *L. montanus*, *L. exaltatus*, *L. reflexus* y *L. stipulatus* respectivamente. Así como la resolución y presencia de los alcaloides detectados y el estándar interno utilizado (cafeína). El tiempo de corrida fue de 35.2 minutos en promedio para los cuatro ensayos.

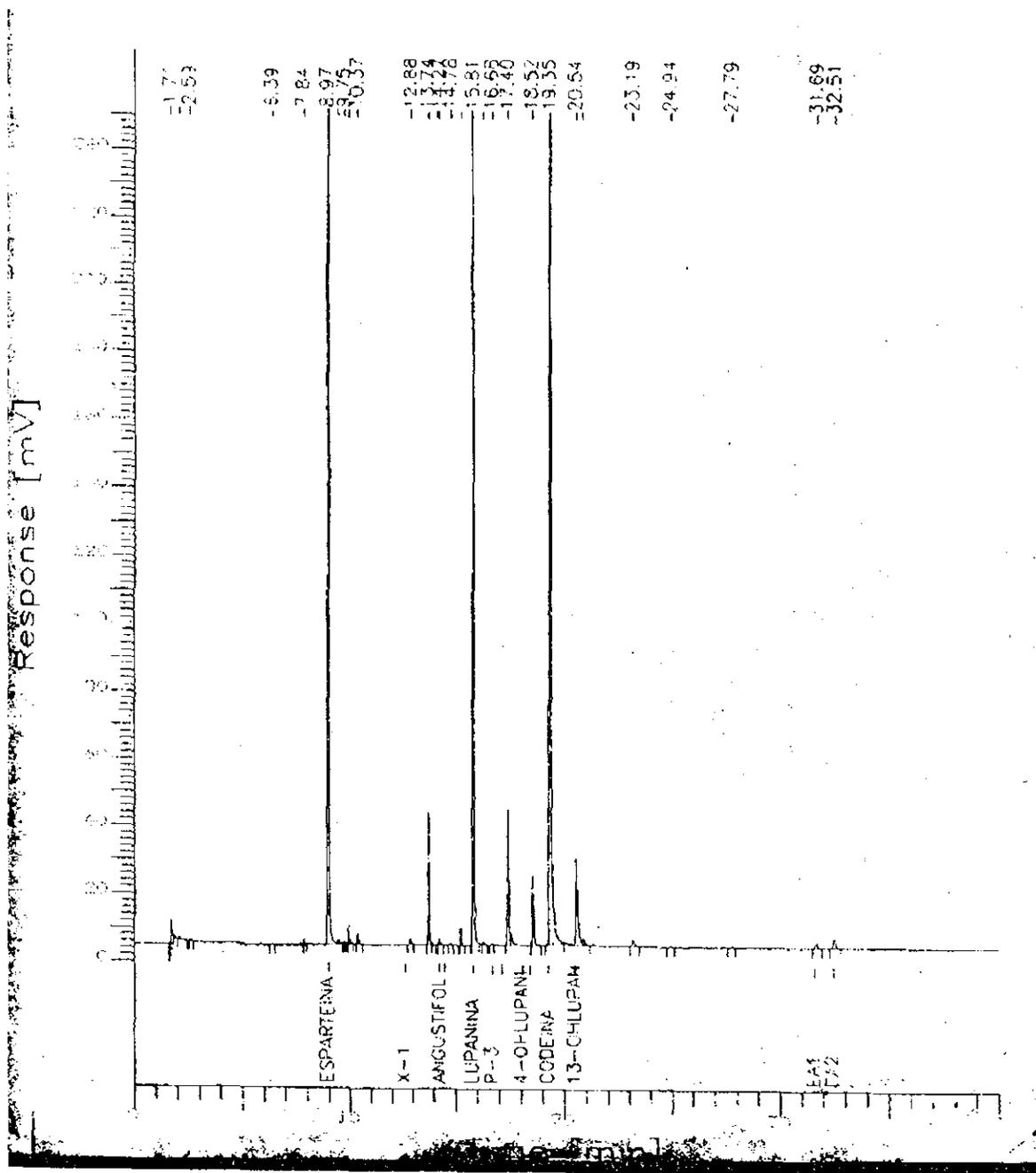


Figura 1. Muestra el cromatograma de *L. montanus*.

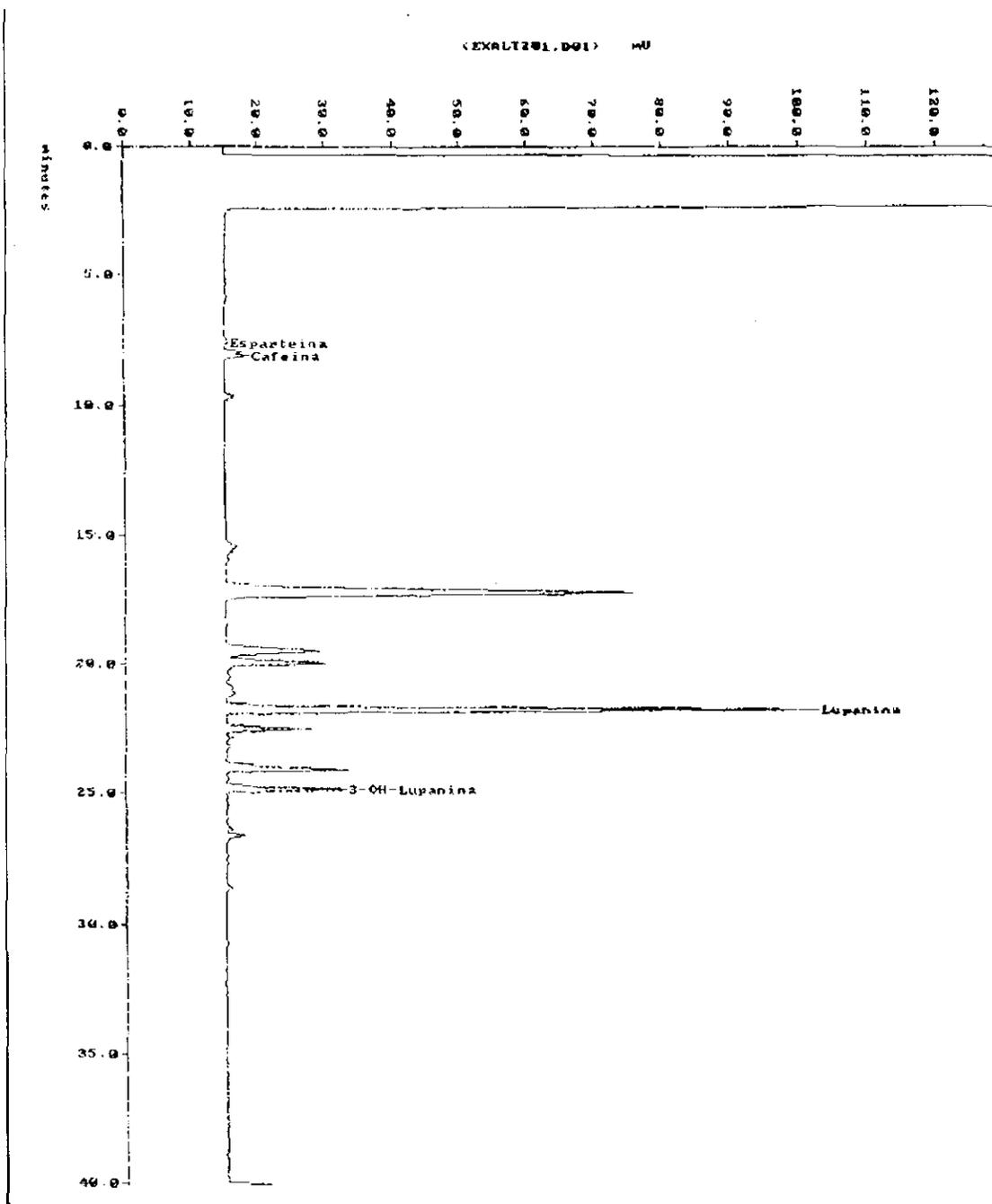


Figura 2. Muestra el cromatograma de *L. exaltatus*

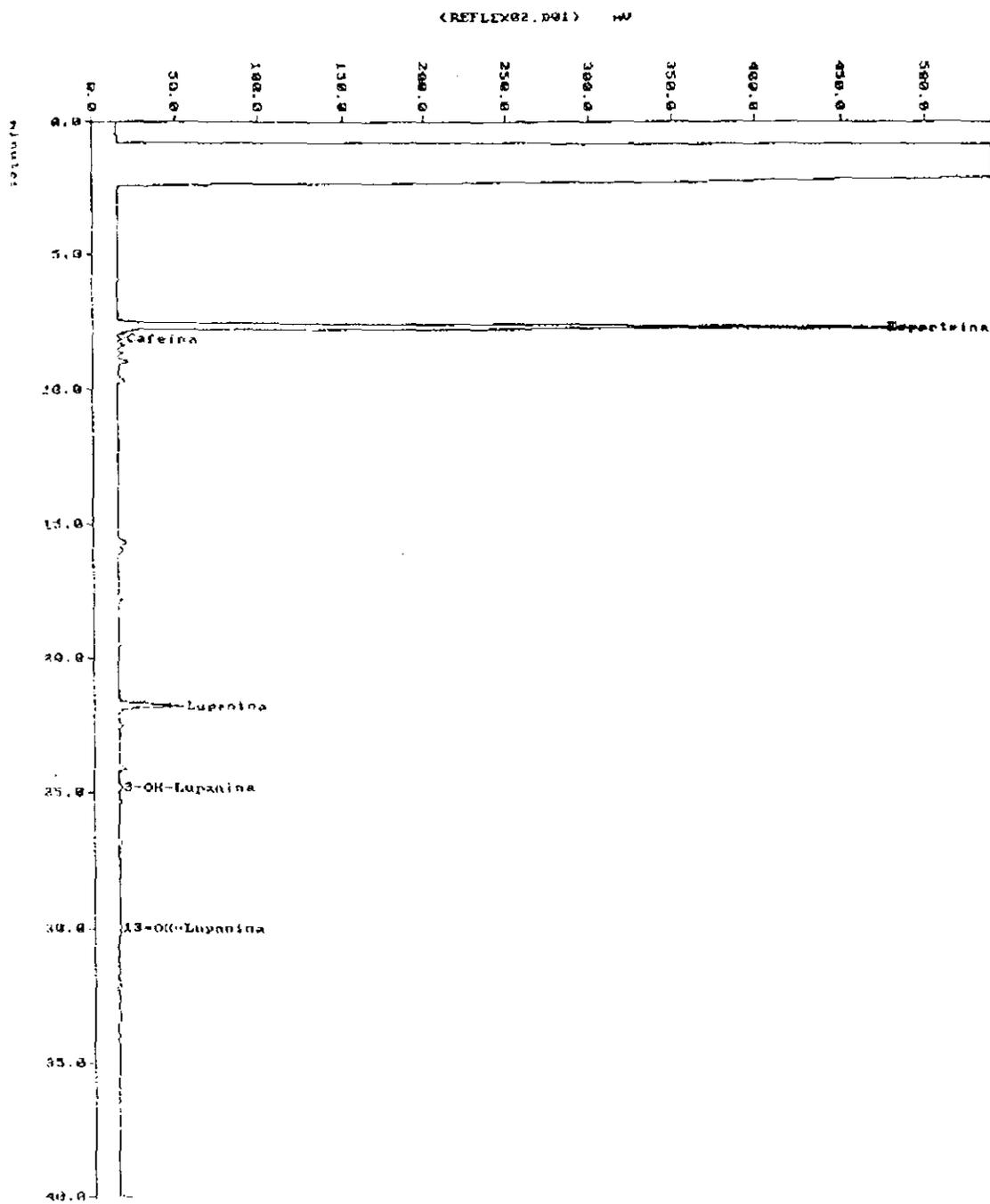


Figura 3. Muestra el cromatograma de *L. reflexus*.

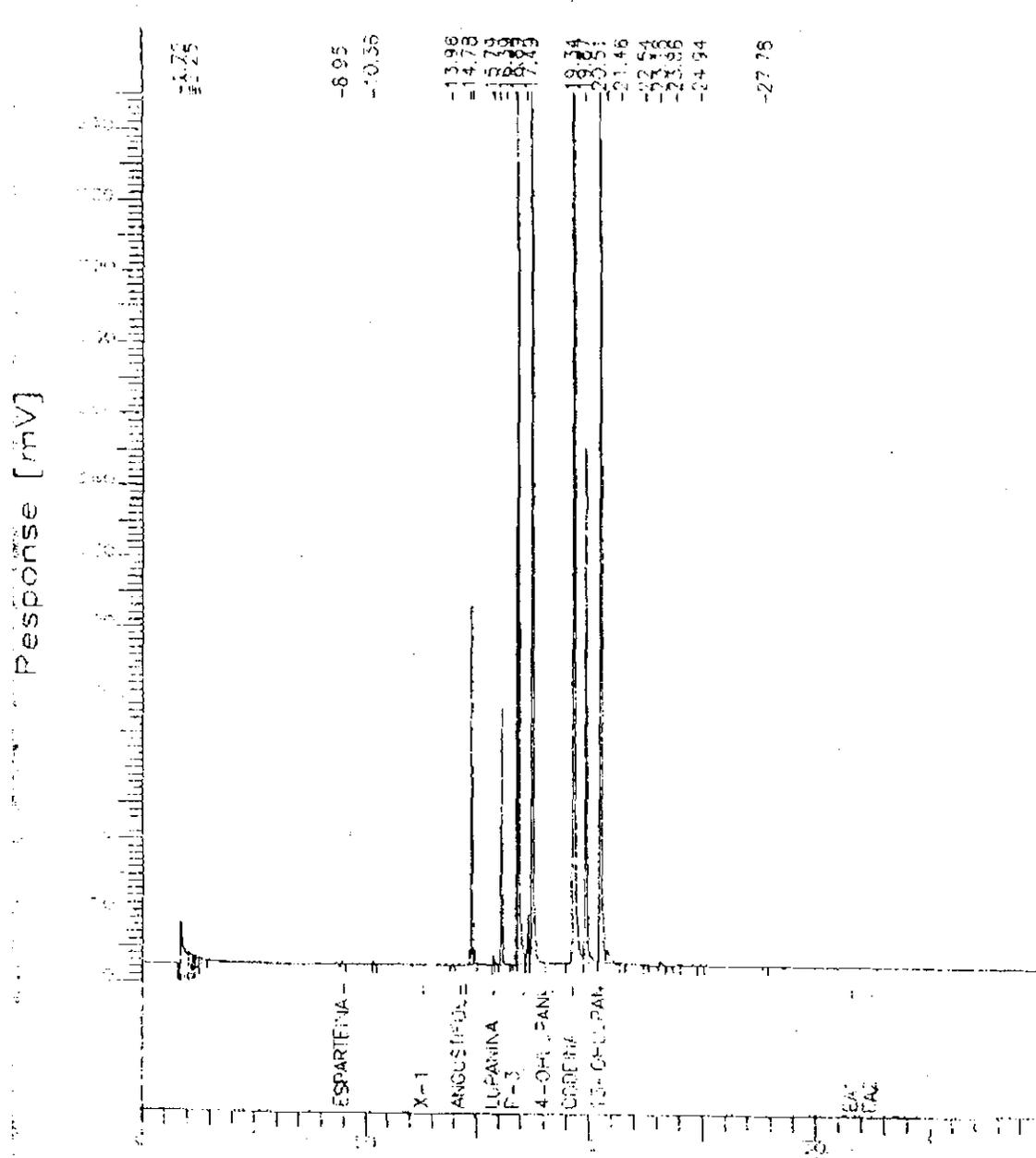


Figura 4. Muestra el cromatograma de *L. stipulatus*.

6.3 Signos clínicos observados postaplicación de los alcaloides.

Los resultados obtenidos en la prueba toxicológica evidenciaron que los animales tratados con extractos de *L. exaltatus* inmediatamente después de la primera administración mostraron signos de excitación, piloerección, erección de la cola, moderada pérdida del equilibrio, anorexia. Después del tratamiento total con los AQ (cinco días) los animales presentaron, mutilación de miembros y caquexia.

Los animales que recibieron el extracto de *L. montanus* al primer día de tratamiento mostraron disminución en el consumo de agua y alimento, piloerección, pérdida del equilibrio, excitación, taquipnea y caminar vacilante. Al término del tratamiento presentaron aletargamiento en una sola postura y caquexia, en cambio, los animales tratados con *L. reflexus* y *L. stipulatus* presentaron los mismos signos, solo que con menor duración y diferente intensidad, mientras que los animales del grupo control no presentaron signo alguno

6.4 Reaccion con el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium

La ubicación de las regiones dañadas por los alcaloides quinolizidinicos (AQ) se realizó según las coordenadas señaladas por Paxinos y Watson (1982). Las zonas en donde se detectó la disminución significativa en la síntesis de enzimas funcionales de la mitocondria (Goldlust et al.,1996) fue calculado según la superficie total de cada corte y con base a la ausencia de color rojo de las diversas áreas. Las zonas carentes de reacción correspondientes a tractos fueron omitidas de la prueba con base a concatenación de las áreas intactas de los cortes control.

En los cuadro 5, 6, 7 y 8 se muestran las áreas afectadas correspondientes a cortes de cerebros expuestos a los diferentes extractos de alcaloides, *L. montanus*, las áreas más afectadas fueron FrPaM, FrPaSS, PO, Cpu y Acg respectivamente, en tanto que para *L. exaltatus*, las áreas más afectadas correspondieron a FrPaM, FrPaSS, cg, ec y Cpu, mientras que para *L. reflexus*, las áreas más afectadas fueron FrPam, FrPa, SS,PO, cg, ecy Cpu, por ultimo las áreas más susceptibles a *L. stipulatus* fueron FrPaM, FrPaSS, ec, Cg, Acg, PCg, Cpu, respectivamente. Así como los valores porcentuales correspondientes a las zonas que mostraron daño,

calculado a partir de la diferencia de superficie por cada color, con respecto a la superficie total del corte.

Cuadro 5. Muestra las áreas cerebrales en la que no se encontro actividad mitocondrial evidenciada mediante marcaje con Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio en cortes coronales de cerebros de animales control.

No. Imagen	Coordenad	Núcleos	Área (μ^2)	Area sin actividad Mitocondrial (μ^2)	% daño
1	Interaural1 4.7 Bregma 5.7	lo, VN, AOE	324.8	15.65	4.8
2	Interaural1 3.2 Bregma 4.2	Fr, RF	512.56	11.96	2.3
3	Interaural 12.7 Bregma 3.7	Fr, RF, PO	974.82	16.72	1.7
4	Interaural1 2.2 Bregma 3.2	Fr, PO	1018.74	22.77	2.2
5	Interaural 11.7 Bregma 2.7	FrPaM, FrPaSS, PO	1222.53	26.74	2.1
6	Interaural 11.2 Bregma 2.2	FrPaM, FrPaSS, PO	1242.87	23.73	1.9
7	Interaural 10.7 Bregma 1.7	FrPaM, FrPaSS, PO, Cpu	1275.31	29.68	2.3
8	Interaural 10.2 Bregma 1.2	FrPaM, FrPaSS, PO, Cpu, Agran, CI	1156.32	26.61	2.3
9	Interaural 9.7 Bregma 0.7	FrPaM, FrPaSS, Acg, CI, Cpu	1064.04	29.01	2.7

10	Interaural 9.2 Bregma 0.2	FrPaM, FrPaSS, Acg, Cl, CPu	1084.20	31.96	2.9
11	Interaural 8.7 Bregma -- 0.3	FrPaM, FrPaSS, Acg, Cpu, Cl, En	1048.65	26.77	2.5
12	Interaural 8.2 Bregma -- 0.8	FrPaM, FrPaSS, Acg, PCg, ec, cg, Cl, En	874.82	23.81	2.7
13	Interaural 7.2 Bregma -- 1.8	FrPaM, FrPaSS, Acg, PCg, ec, cg, lg	805.05	19.23	2.3
14	Interaural 6.2 Bregma -- 2.8	FrPaM, FrPaSS, Acg, PCg, cg, alv, La, PO, CA1	1219.10	27.91	2.2
15	Interaural 5.2 Bregma -- 3.8	FrPaM, PCg, ec, cg, CA1, CA2, CA3	1040.98	27.92	2.6
16	Interaural 4.2 Bregma -- 4.8	FrPaM, PCg, cg, BL, DLG, CA1, CA2, CA4	1045.60	30.63	2.9
17	Interaural -- 0.8 Bregma -- 9.8	C1, C2, Cx, 5	1115.45	31.27	2.8
18	Interaural -- 1.3 Bregma -- 10.3	PrF, 6, 5, Sim, C1, C2, PFI	1376.48	41.12	2.9
19	Interaural -- 2.3 Bregma -- 11.3	6, C1, C2, PrF, Int, LatC	1143.11	37.80	3.3
20	Interaural -- 3.3 Bregma -- 12.3	lcp, sp5, PM, C2, Cop	1088.67	30.55	2.8

Cuadro 6. Muestra las áreas cerebrales en la que no se encontro actividad mitocondrial evidenciada mediante marcaje con Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio en cortes coronales de cerebros de animales tratados con alcaloides de *L. montanus*.

No. Imagen	Coordenadas	Nucleos	Área (μ^2)	Área ~ actividad Mitocondrial (μ^2)	% daño
1	Interaural 13.7 Bregma 4.7	Fr,RF, AOB, lo, VN, AOE	986.68	134.33	13.6
2	Interaural 13.2 Bregma 4.2	Fr, RF	1227.99	110.79	9.02
3	Interaural 12.7 Bregma 3.7	Fr, RF, PO	1389.97	138.33	9.9
4	Interaural 12.2 Bregma 3.2	Fr, PO	1434.33	117.72	8.2
5	Interaural 11.7 Bregma 2.7	FrPaM, FrPaSS, Cl, PO	1642.07	152.57	9.2
6	Interaural 11.2 Bregma 2.2	FrPaM, FrPaSS,Cl , fmi, PO	1789.24	136.16	7.6
7	Interaural 10.7 Bregma 1.7	FrPaM, FrPaSS,Acg, ec, PO, Cpu	1616.76	125.69	7.7
8	Interaural 10.2 Bregma 1.2	FrPaM, FrPaSS, PO, Cpu, Agran,Cl, cl,cg,	1763.44	199	11.2
9	Interaural 9.7 Bregma 0.7	FrPaM, FrPaSS, Acg, cg, ec, Cl, Cpu	1276	137.40	10.7
10	Interaural 9.2 Bregma 0.2	FrPaM, FrPaSS, Acg, Cl, Cpu, cg, ec,lg,	1701.53	120.44	7.0
11	Interaural 8.7 Bregma -0.3	FrPaM, FrPaSS, Acg, Cpu, Cl, En Acg cg, ec,lg,En	1507.62	181.78	12.0
12	Interaural 7.7 Bregma -1.3	FrPaM, FrPaSS, Acg, PCg, ec, cg,	1519.14	148.95	9.8

		Cl, En			
13	Interaural 7.2 Bregma -1.8	FrPaM, FrPaSS, Acg, PCg, ec, cg, lg, Cpu	1712.65	168.46	9.8
14	Interaural 6.2 Bregma -2.8	FrPaM, FrPaSS, Acg, PCg, ec, cg,alv, La, PO, CA1,Cpu	1953.48	147.26	7.5
15	Interaural 5.2 Bregma -3.8	FrPaM, FrPaSS , Acg, PaM, alv, LaPCg, ec,fi, cg, CA1,CA2, CA3 Cpu	1964.12	164.55	8.3
16	Interaural 3.7 Bregma -5.3	Str18, Alv,eg, TeAud, FrPaM, PCg, cg, BL, DLG, CA1,CA2, CA4	1649.13	161.33	9.7
17	Interaural 2.7 Bregma -6.3	RSpl, Str18, Str17, TeAud , EntC1, C2, Cx, 5	1335.72	172.09	12.8
18	Interaural -0.3 Bregma -9.3	Cb, Ent, PFI, PrF, 6, 5, Sim, C1, C2, PFI	1017.63	149.18	14.6
19	Interaural -0.8 Bregma -9.8	6, C1, C2, PrF, Int, LatC, mcp,	1321.94	104.63	7.9
20	Interaural -1.8 Bregma -10.8	PrF, lcp, sp5,PFI, PM,C1, C2, Cop	1176.29	117.71	10.0

Cuadro 7. Muestra las áreas cerebrales en la que no se encontro actividad mitocondrial evidenciada mediante marcaje con Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio en cortes coronales de cerebros de animales tratados con alcaloides de *L. exaltatus*

No. Imagen	Coordenadas	Núcleos	Área (μ^2)	Área sin actividad mitocondrial (μ^2)	% daño
1	Interaural 13.7 Bregma 4.7	Fr,RF, AOB,lo, VN, AOE	441.88	24.83	5.6
2	Interaural 13.2 Bregma 4.2	Fr, RF	526.51	46.57	8.8
3	Interaural 12.7 Bregma 3.7	Fr, RF,PO	2152.45	116.04	5.3
4	Interaural 12.2 Bregma 3.2	Fr,PO	3113.31	131.28	4.2
5	Interaural 11.7 Bregma 2.7	FrPaM, FrPaSS, Cl,PO	2832.41	112.92	3.9
6	Interaural 11.2 Bregma 2.2	FrPaM, FrPaSS, Cl, fmi,PO	3021.36	136.77	4.5
7	Interaural 10.7 Bregma 1.7	FrPaM, FrPaSS, ACg, Cpu, ec, PO	3304.36	116.14	3.5
8	Interaural 10.2 Bregma 1.2	FrPaM, FrPaSS, Agran, Cpu,Cl, cl, cg	3158.15	116.11	3.6
9	Interaural 9.7 Bregma 0.7	FrPaM, FrPaSS, Acg, cg, ec, Cpu,Cl, cl	3360.68	112.03	3.3
10	Interaural 9.2 Bregma 0.2	FrPaM, FrPaSS, ec, cg, Acg, Ig, Cpu,Cl	3188.34	131.76	4.1
11	Interaural 8.7 Bregma -0.3	FrPaM, FrPaSS, ec, cg, Acg, Ig, CPU, Cl, En	2537.35	110.73	4.3
12	Interaural 7.7 Bregma -1.3	FrPaM, FrPaSS, ec, cg, Acg, Ig, PCg, Cl, En	2637.25	97.98	3.7
13	Interaural 7.2 Bregma -1.8	FrPaM, FrPaSS, Cpu, ec, cg, Acg, PCg, alv,La, PO,Ig	1919.11	95.02	4.9
14	Interaural 6.2 Bregma -2.8	FrPaM, FrPaSS, ec, cg,PCg, Cpu,Acg, alv., La, PO, CA1	3222.27	94.11	2.9
15	Interaural 5.2	FrPaSS, ec,fi, cg,	2940.75	123.26	4.1

	Bregma -3.8	PCg, Ig, FrPaM, CA1, CA2, CA3			
16	Interaural 3.7 Bregma -5.3	Str 18, Alv, eg, TeAud, CA1, CA2, CA4 FrPaM, PCg, cg, BL, DLG	2854.86	99.57	3.4
17	Interaural 2.7 Bregma -6.3	RSpl, Str18, Str17, TeAud, Ent, CA1, CA2, Cx,5	2894.90	105.08	3.6
18	Interaural -0.3 Bregma -9.3	Cb, Ent, PFI, PrF, 6, 5, SiMC1, C2	1451.75	114.54	7.8
19	Interaural -0.8 Bregma -9.8	IC, C1, C2, mcp, 6, PrF, Int, LatC	914.01	94.63	10.3
20	Interaural -1.8 Bregma -10.8	PrF, C1, C2, PFI, lcp, sp5, PM, Cop	993.75	90.42	9

Cuadro 8 Muestra las áreas cerebrales en la que no se encontro actividad mitocondrial evidenciada mediante marcaje con Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio en cortes coronales de cerebros de animales tratados con alcaloides de *L. reflexus*.

No. Imagen	Coordenadas	Núcleos	Á rea (μ^2)	Área sin actividad mitocondrial (μ^2)	% daño
1	Interaural 13.7 Bregma 4.7	Fr,RF, AOB,lo, VN, AOE	897.17	98.89	11
2	Interaural 13.2 Bregma 4.2	Fr, RF	953.99	87.61	9.1
3	Interaural 12.7 Bregma 3.7	Fr, RF, PO	1900.33	92.83	4.8
4	Interaural 12.2 Bregma 3.2	Fr, PO	2189.90	80.57	3.6
5	Interaural 11.7 Bregma 2.7	FrPaM, FrPaSS,Cl, PO	2268.82	101.11	4.4
6	Interaural 11.2 Bregma 2.2	FrPaM, FrPaSS,Cl, fmi, PO	2641.34	99.45	3.7
7	Interaural 10.7 Bregma 1.7	FrPaM, FrPaSS, ACg, ec, PO, Cpu	2877.86	85.77	2.9
8	Interaural 10.2 Bregma 1.2	FrPaM, FrPaSS, PO, Cpu, Agran, cl, cg	2730.04	102.52	3.7
9	Interaural 9.7 Bregma 0.7	FrPaM, FrPaSS, Agran, Acg, ec, cl, cg, Cpu,Cl	2740.61	105.19	3.8
10	Interaural 9.2 Bregma 0.2	FrPaM, FrPaSS, Acg, Cl, Cpu, ec, cg, lg,	2852.29	86.26	3.0
11	Interaural 8.7 Bregma -0.3	FrPaM, FrPaSS, Acg, Cpu, Cl, En ec, cg, lg, En	2447.88	85.69	3.5
12	Interaural 7.7	FrPaM,	2434..57	77.60	3.1

	Bregma -1.3	FrPaSS, Acg, PCg, ec, cg, Cl, En , cg, lg			
13	Interaural 7.2 Bregma -1.8	FrPaM, FrPaSS, Cpu, Acg, PCg, ec, cg, lg,alv,La,PO	2372.30	91.87	3.8
14	Interaural 6.2 Bregma -2.8	FrPaM, FrPaSS, , ec, cg, Acg, PCg, Cpu, cg,alv, La, PO, CA1	2159.98	96.33	4.4
15	Interaural 5.2 Bregma -3.8	FrPaM, FrPaSS, PCg, ec, fi, cg,PCg, lg, CA1,CA2, CA3	1994.31	85.66	4.2
16	Interaural 3.7 Bregma -5.3	Str18, alv,eg, TeAud, FrPaM, PCg, cg, BL, DLG, CA1, CA2, CA4	1576.58	96.35	6.1
17	Interaural 2.7 Bregma -6.3	RSpl, Str18, Str17, TeAud, Ent, C1, C2, Cx, 5	1534.34	93.50	6.0
18	Interaural -0.3 Bregma -9.3	Cb, Ent, PFI, PrF, 6, 5, Sim, C1, C2, PFI	1502.32	85.79	5.7
19	Interaural -0.8 Bregma -9.8	LC, 6, C1, C2, mcp, PrF, Int, LatC	1275.57	85.87	6.7
20	Interaural -1.8 Bregma -10.8	PrF,C1, C2,PFI, lcp, sp5, PM, Cop	1272.80	96.66	7.5

Cuadro 9 Muestra las áreas cerebrales en la que no se encontro actividad mitocondrial evidenciada mediante marcaje con Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio en cortes coronales de cerebros de animales tratados con alcaloides de *L. stipulatus*.

No. Imagen	Coordenadas	Núcleos	Área (μ^2)	Area sin actividad mitocondrial ₂	% daño
1	Interaural 13.7, Bregma 4.7	Lo, VN, AOE, Fr,RF,AO B	1088.09	90.10	8.2
2	Interaural 13.2, Bregma 4.2	Fr,RF	1395.87	105.20	7.5
3	Interaural 12.7 Bregma 3.7	Fr, RF,PO	1761.93	98.19	5.5
4	Interaural 12.2 Bregma 3.2	Fr,PO	2105.93	106.65	5.0
5	Interaural 11.7 Bregma 2.7	FrPaM, FrPaSS, PO, CI	2461.36	101.79	4.1
6	Interaural 11.2 Bregma 2.2	FrPaM, FrPaSS, PO, CI, fmi	2744.99	91.71	3.3
7	Interaural 10.7 Bregma 1.7	FrPaM, FrPaSS,P O,ACg, Cpu, ec	2690.88	86.45	3.2
8	Interaural 10.2 Bregma 1.2	FrPaM, FrPaSS,P O, Agran, Cpu, CI, cl, cg	2719.93	107.47	3.9
9	Interaural 9.7 Bregma	FrPaM, FrPaSS, Acg,CI,	2689.42	131.63	4.8

	0.7	cg, ec, CPu			
10	Interaural 9.2, Bregma 0.2	FrPaM, FrPaSS, ec, cg, Acg, lg,lg,Cpu	2567.83	111.08	4.3
11	Interaural 8.7, Bregma – 0.3	FrPaM, FrPaSS, ec, cg, Acg, lg,Cpu, Cl, En,	2475.92	105.44	4.2
12	Interaural 7.7, Bregma – 1.3	FrPaM, FrPaSS, ec, cg, Acg, lg,PCg, Cl, En	2427.13	106.75	4.3
13	Interaural 7.2, Bregma - 1.8	FrPaM, FrPaSS, Cpu, ec, cg, Acg, PCg, lg	2245.27	114.61	5.1
14	Interaural 6.2 Bregma – 2.8	FrPaM, FrPaSS, ec, cg, Acg, alv, PCg, La, Cpu	2492.92	112.51	4.5
15	Interaural 5.2, Bregma – 3.8	FrPaSS, FrPaM , PCg, ec, fi, cg, PCg, lg, CA1, CA2, CA3,	2387.60	96.35	4.0
16	Interaural 3.7, Bregma – 5.3	Str 18, FrPaM, PCg, cg, BL, DLG, Alv, eg, TeAud, CA1, CA2, CA4	2314.48	91.84	4.0
17	Interaural	RSpl,	1899.84	90.23	4.7

	2.7, Bregma – 6.3	Str18, Str17, TeAud, Ent,C1, C2, Cx, 5			
18	Interaural -0.3, Bregma – 9.3	PrF, 6, 5,Sim, C1, C2, Cb,Ent, PFI	1854.63	98.74	5.3
19	Interaural -0.8, Bregma -9.8	6, IC, C1, C2, PrF, Int, LatC, lc, mcp	1591.35	98.58	6.1
20	Interaural -1.8, Bregma – 10.8	lcp, sp5, PM, Cop, PrF, C1, C2, PFI	1513.39	100.51	6.6

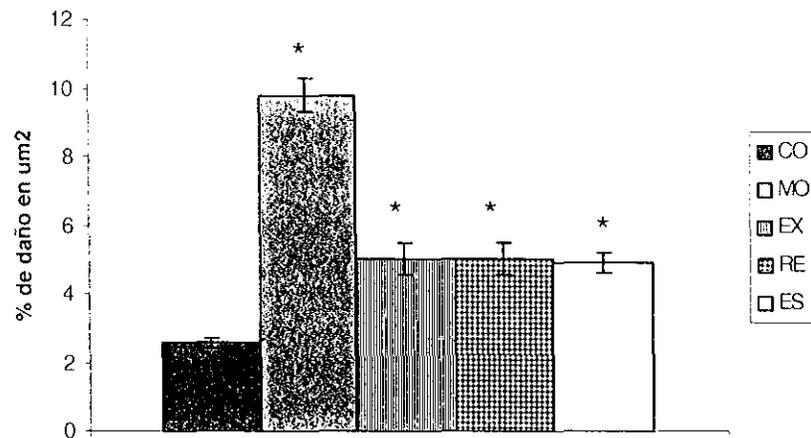


Figura 5. Muestra las medias del grupo control y grupos tratados con extractos de AQ del porcentaje de superficie de tejido cerebral que no manifestó reacción al cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolium (tejido con daño). Las literales diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). CO= control, MO= Extracto de *L. montanus*, EX= extracto de *L. exaltatus*, RE= extracto de *L. reflexus*, ES= extracto de *L. stipulatus*.

Los datos obtenidos a partir de las pruebas ANOVA seguida de una comparación entre medias con la prueba de Duncan nos indican que hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos a una $p < 0.05$. El grupo MO presentó mayor porcentaje de daño respecto del resto de los grupos ($p < 0.05$), el grupo EX también presentó diferencia significativa respecto de los otros grupos ($p < 0.05$), excepto del grupo RE, ya que con este no mostró diferencia significativa, en tanto que el grupo ES si presentó diferencia significativa respecto a los grupos restantes ($p < 0.05$).

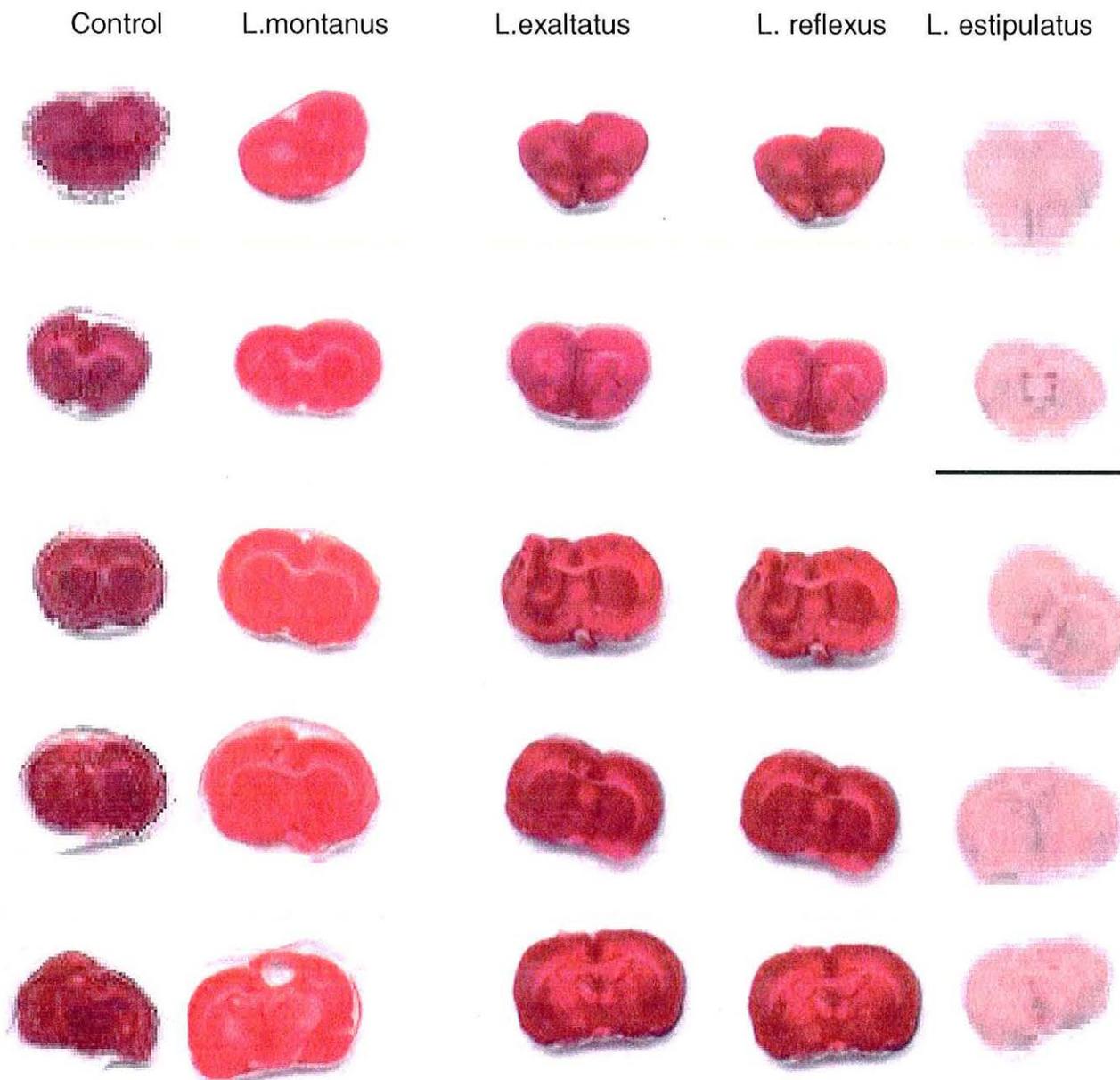


Figura 6. Muestra los cortes coronales más representativos de tejido sometido a tratamiento con el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, el cual muestra las zonas afectadas en los grupos control en la primera columna, el grupo montanus en la segunda columna, el grupo exaltatus en la tercera columna, el grupo reflexus en la cuarta columna y el grupo estipulatus en la quinta columna.

6.5 Observaciones Histopatológicas

Los datos obtenidos de la observación microscópica de los cortes de tejido nervioso expuesto al efecto de los extractos de AQ de *L. montanus*, *L. exaltatus*, *L. reflexus* y *L. stipulatus*, teñidos con la técnica de Hematoxilina-Eosina mostraron neuronas con cambios morfológicos degenerativos estos hallazgos fueron hinchamiento celular, cariolisis y cariorexis en áreas de corteza, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, hipocampo, ciertos núcleos del cerebro medio, puente, cerebelo y médula utilizando las coordenadas señaladas por Paxinos y Watson (1982). Además se manifestaron neuronas rojas, las cuales fueron identificadas por su forma angulada y eosinofilia. Otro tipo de células que se identificaron en cortes de cerebro fueron las células fantasma, estas células se manifiestan en estados avanzados de degeneración neuronal.

A continuación se presentan los cuadros 31 a 35 donde se muestran los núcleos y áreas afectadas correspondientes a cerebros expuestos a los diferentes extractos y al aceite de sesamo (control) las áreas se identificaron tomando como base las coordenadas señaladas por Watson y Paxinos (1982).

Cuadro 6. Muestra los promedios de la cuantificación de neuronas en cerebros de ratas a las que se aplicó aceite de sésamo vía intracerebroventricular.

Campo	Coordenadas	Núcleos	Células				
			Normales	Rojas	Hinchadas	Fantasmas	Total
1	Interaural11.7 Bregma 2.7	FrPaM,FrPaSS,RF,CI, PO	22	0	27	0	49
2	Interaural11.2 Bregma 2.2	FrPaM,FrPaSS, CI,Cpu, En,PO	34	0	7	0	41
3	Interaural10.7 Bregma 1.7	Acg,FrPaM,FrPaSS,Cpu ,CI,En,FStr	78	2	8	0	88
4	Interaural10.7 Bregma 1.2	Agran, FrPaM,FrPaSSCpu,ACg, CI,En,PO	53	0	5	0	58
5	Interaural 9.7 Bregma 0.7	ACg,IG,cg,FrPaM,FrPaS S,Cpu,CI,En,PO	29	2	4	0	35
6	Interaural9.2 Bregma 0.2	ACg,cg,FrPaM,FrPaSS, Cpu,CI,En,FStr,GP	49	0	11	0	60
7	Interaural 8.7 Bregma-0.3	ACg,IG,CG,CPu,GP,CI, En	29	0	14	0	43
8	Interaural 8.2 Bregma -0.8	Cg,ACg,IG,CPu,CI,En,P O,FrPaM,FrPaSS	34	0	4	0	38
9	Interaural 7.7 Bregma-1.3	PCg,IG,cg,FrPaM,FrPaS S,CPu,la,BL,CI, En,GP	40	0	4	0	44
10	Interaural 7.2 Bregma -1.8	PCg,FrPaM,FrPaSS,CP u,cg,IG,FStr,La,Er,Ce	33	1	11	0	45
11	Interaural 6.7 Bregma 2.3	PCg, FrPaM, FrPaSS,CPu, GP, FStr, La, B	26	2	4	0	32
12	Interaural 6.2 Bregma 2.8	IG, PCg,cg,CPu,La,En,PO,B L,Ce,FrPaMFrPaSS	35	1	8	0	44
13	Interaural 5.7 Bregma 3.3	Ag,PCg,IG,FrPaSS, CPu,La,BL,En,PO,Rt	29	1	10	0	40
14	Interaural 5.2 Bregma 3.8	FrPaSS,CA1,CA2, CA3,PP,VLGHC,VPL	32	2	9	0	43
15	Interaural 4.7 Bregma 4.3	FrPaSS, CA1, CA2, CA3, PCg, cg, BL, DG	27	0	9	1	37
16	Interaural 4.2 Bregma 4.8	TeAud, Strn, CA1, CA3,CA4,S,Ent	33	2	4	0	39

Cuadro 7. Muestra los resultados de la cuantificación de neuronas encontrados en cerebros de animales a los cuales se les aplicó extractos de alcaloides quinolizidinicos de *L. montanus* vía intracerebroventricular.

Campo	Coordenadas	Núcleos	CÉLULAS				
			Normales	Rojas	Hinchadas	Fantasma	Total
1	Interaural 11.7 Bregma 2.7	FrPaM,FrPaSS, RF,CI, PO	18	13	27	2	60
2	Interaural 11.2 Bregma 2.2	FrPaM,FrPaSS, CI,Cpu, En,PO	19	13	29	0	61
3	Interaural 10.7 Bregma 1.7	Acg,FrPaM,FrPaSS, Cpu,CI,En,FStr	14	10	46	0	70
4	Interaural 10.7 Bregma 1.2	Agran, FrPaM FrPaSSCpu,ACg,CI,En,PO	20	14	54	1	89
5	Interaural 9.7 Bregma 0.7	ACg,IG,cg,FrPaM, FrPaSS,Cpu,CI,En,PO	17	12	36	2	67
6	Interaural 9.2 Bregma 0.2	ACg,cg,FrPaM, FrPaSS,Cpu,CI,En,FStr,GP	23	10	26	4	63
7	Interaural 8.7 Bregma -0.3	ACg,IG,CG,CPu, GP,CI,En	19	13	47	0	79
8	Interaural 8.2 Bregma -0.8	Cg,ACg,IG,CPu,CI, En,PO,FrPaM,FrPaSS	20	8	42	1	71
9	Interaural 7.7 Bregma -1.3	PCg,IG,cg,FrPaM, FrPaSS,CPu,la,BL,CI, En,GP	18	9	30	0	57
10	Interaural 7.2 Bregma -1.8	PCg,FrPaM,FrPaSS,CPu, cg,IG,FStr,La,Er,Ce	27	17	40	0	84
11	Interaural 6.7 Bregma 2.3	PCg, FrPaM, FrPaSS, CPu, GP, FStr, La, B	22	14	31	0	67
12	Interaural 6.2 Bregma 2.8	IG, PCg,cg,CPu,La,En,PO, BL,Ce,FrPaMFrPaSS	19	10	36	0	65
13	Interaural 5.7 Bregma 3.3	Ag,PCg,IG,FrPaSS, CPu,La,BL,En,PO,Rt	22	13	53	0	88
14	Interaural 5.2 Bregma 3.8	FrPaSS,CA1,CA2, CA3,PP,VLGHC,VPL	19	15	35	0	69
15	Interaural 4.7 Bregma 4.3	FrPaSS, CA1, CA2, CA3, PCg, cg, BL, DG	14	23	41	0	78
16	Interaural 4.2 Bregma 4.8	TeAud, Strn, CA1, CA3,CA4,S,Ent	28	12	43	0	83

Cuadro 8. Muestra los resultados encontrados al cuantificar las neuronas de cerebros de ratas a los cuales se les aplicó extractos de alcaloides quinolizidinicos de *L. exaltatus* vía intracerebroventricular.

Campo	Coordenadas	Núcleos	CELULAS				
			Normales	Rojas	Hinchadas	Fantasma	Total
1	Interaural11.7 Bregma 2.7	FrPaM,FrPaSS, RF,Ci, PO	23	12	28	0	65
2	Interaural11.2 Bregma 2.2	FrPaM,FrPaSS, Ci,Cpu, En,PO	30	8	33	1	72
3	Interaural10.7 Bregma 1.7	Acg,FrPaM,FrPa SS, Cpu,Ci,En,FStr	30	10	46	0	86
4	Interaural10.7 Bregma 1.2	Agran, FrPaM FrPaSSCpu,AC g,Ci,En,PO	26	9	50	0	85
5	Interaural 9.7 Bregma 0.7	ACg,IG,cg,FrPa M,FrPaSS,Cpu, Ci,En,PO	30	10	38	2	80
6	Interaural9.2 Bregma 0.2	ACg,cg,FrPaM, FrPaSS,Cpu,Ci, En,FStr,GP	24	9	29	2	64
7	Interaural 8.7 Bregma -0.3	ACg,IG,CG,CPu GP,Ci,En	22	8	50	2	82
8	Interaural 8.2 Bregma -0.8	Cg,ACg,IG,CPu, Ci, En,PO,FrPaM,Fr PaSS	34	12	39	0	85
9	Interaural 7.7 Bregma -1.3	PCg,IG,cg,FrPa M,FrPaSS, CPu,la,BL,Ci,En, GP	36	12	26	1	75
10	Interaural 7.2 Bregma -1.8	PCg,FrPaM,FrP aSS,CPu,cg,IG, FStr,La,Er,Ce	32	9	47	1	89
11	Interaural 6.7 Bregma 2.3	PCg, FrPaM, FrPaSS, CPu, GP, FStr, La, B	34	13	32	0	79
12	Interaural 6.2 Bregma 2.8	IG, PCg,cg,CPu,La, En,PO, BL,Ce,FrPaMFr PaSS	20	10	34	2	66
13	Interaural 5.7 Bregma 3.3	Ag,PCg,IG,FrPa SS, CPu,La,BL,En,P O,Rt	38	12	22	2	74
14	Interaural 5.2 Bregma 3.8	FrPaSS,CA1,CA 2, CA3,PP,VLGHC	22	14	24	2	62

		VPL					
15	Interaural 4.7 Bregma 4.3	FrPaSS, CA1, CA2,CA3, PCg, cg, BL, DG	20	18	45	1	84
16	Interaural 4.2 Bregma 4.8	TeAud, Strn, CA1,CA3,CA4,S ,Ent	28	8	46	1	83

Cuadro 9. Muestra los resultados obtenidos de la cuantificación de neuronas de cerebros de ratas a las se les aplicó extractos de alcaloides quinolizínicos de *L. reflexus* vía intracerebroventricular.

Campo	Coordenadas	Núcleos	CELULAS				
			Normales	Rojas	Hinchadas	Fantasma	Total
1	Interaural 11.7 Bregma 2.7	FrPaM, FrPaSS, RF, CI, PO	29	12	32	1	74
2	Interaural 11.2 Bregma 2.2	FrPaM, FrPaSS, CI, Cpu, En, PO	37	15	39	1	88
3	Interaural 10.7 Bregma 1.7	Acg, FrPaM, FrPaSS, Cpu, CI, En, FStr	26	10	31	0	66
4	Interaural 10.7 Bregma 1.2	Agran, FrPaM FrPaSS Cpu, ACg, CI, En, PO	28	8	33	1	70
5	Interaural 9.7 Bregma 0.7	ACg, IG, cg, FrPaM, FrPaSS, Cpu, CI, En, PO	31	9	31	2	73
6	Interaural 9.2 Bregma 0.2	ACg, cg, FrPaM, FrPaSS, Cpu, CI, En, FStr, GP	30	11	33	0	74
7	Interaural 8.7 Bregma -0.3	ACg, IG, CG, CPU, GP, CI, En	21	12	39	0	72
8	Interaural 8.2 Bregma -0.8	Cg, ACg, IG, CPU, CI, En, PO, FrPaM, FrPaSS	28	5	43	1	77
9	Interaural 7.7 Bregma -1.3	PCg, IG, cg, FrPaM, FrPaSS, CPU, Ia, BL, CI, En, GP	25	6	41	0	72
10	Interaural 7.2 Bregma -1.8	PCg, FrPaM, FrPaSS, CPU, cg, IG, FStr, La, Er, Ce	27	4	42	0	73
11	Interaural 6.7 Bregma 2.3	PCg, FrPaM, FrPaSS, CPU, GP, FStr, La, B	34	5	38	0	77
12	Interaural 6.2 Bregma 2.8	IG, PCg, cg, CPU, La, En, PO, BL, Ce, FrPaM FrPaSS	30	8	47	0	85
13	Interaural 5.7 Bregma 3.3	Ag, PCg, IG, FrPaSS, CPU, La, BL, En, PO, Rt	22	7	35	0	64
14	Interaural 5.2 Bregma 3.8	FrPaSS, CA1, CA2, CA3, PP, VLGHC, VPL	36	12	44	0	92
15	Interaural 4.7 Bregma 4.3	FrPaSS, CA1, CA2, CA3, PCg, cg, BL, DG	22	5	33	2	62
16	Interaural 4.2 Bregma 4.8	TeAud, Strn, CA1, CA3, CA4, S, Ent	24	10	34	1	69

Cuadro 10. Muestra los resultados de la cuantificación de neuronas en cerebros de ratas a las que se aplicó extractos de alcaloides quinolizidinicos de *L. stipulatus* vía intracerebroventricular.

Campo	Coordenadas	Núcleos	Células				
			Normales	Rojas	Hinchadas	Fantasma	Total
1	Interaural 11.7 Bregma 2.7	FrPaM,FrPaSS, RF,Cl, PO	32	11	26	0	69
2	Interaural 11.2 Bregma 2.2	FrPaM,FrPaSS, Cl,Cpu, En,PO	22	9	24	1	56
3	Interaural 10.7 Bregma 1.7	Acg,FrPaM,FrPaSS, Cpu,Cl,En,FStr	25	7	20	0	52
4	Interaural 10.7 Bregma 1.2	Agran, FrPaM FrPaSSCpu,ACg,Cl,En,PO	26	10	20	1	57
5	Interaural 9.7 Bregma 0.7	ACg,IG,cg,FrPaM, FrPaSS,Cpu,Cl,En,PO	28	9	25	0	62
6	Interaural 9.2 Bregma 0.2	ACg,cg,FrPaM, FrPaSS,Cpu,Cl,En,FStr,GP	26	7	23	0	56
7	Interaural 8.7 Bregma -0.3	ACg,IG,CG,CPu, GP,Cl,En	28	9	10	0	47
8	Interaural 8.2 Bregma -0.8	Cg,ACg,IG,CPu,Cl, En,PO,FrPaM,FrPaSS	32	3	25	1	61
9	Interaural 7.7 Bregma -1.3	PCg,IG,cg,FrPaM,FrPaSS, CPu,la,BL,Cl, En,GP	25	7	19	0	51
10	Interaural 7.2 Bregma -1.8	PCg,FrPaM,FrPaSS,CPu, cg,IG,FStr,La,Er,Ce	32	7	20	0	59
11	Interaural 6.7 Bregma 2.3	PCg, FrPaM, FrPaSS, CPu, GP, FStr, La, B	24	10	23	0	57
12	Interaural 6.2 Bregma 2.8	IG, PCg,cg,CPu,La,En,PO, BL,Ce,FrPaMFrPaSS	39	5	18	1	63
13	Interaural 5.7 Bregma 3.3	Ag,PCg,IG,FrPaSS, CPu,La,BL,En,PO,Rt	30	7	15	1	53
14	Interaural 5.2 Bregma 3.8	FrPaSS,CA1,CA2, CA3,PP,VLGHC,VPL	24	5	20	0	49
15	Interaural 4.7 Bregma 4.3	FrPaSS, CA1, CA2, CA3, PCg, cg, BL, DG	22	9	14	0	45
16	Interaural 4.2 Bregma 4.8	TeAud, Strn, CA1, CA3,CA4,S,Ent	27	4	16	0	47

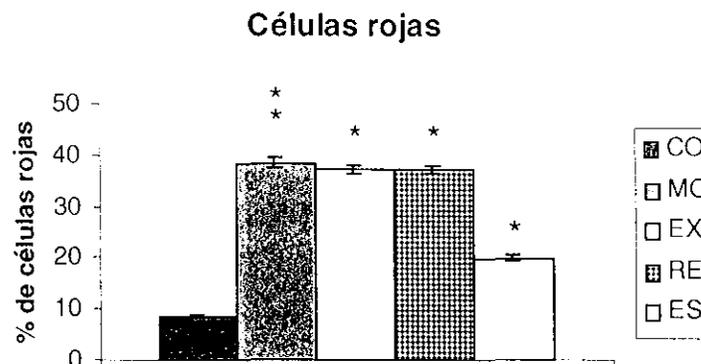


Figura 7. Muestra las medias del grupo control y grupos tratados con extractos de AQ del porcentaje de células rojas obtenidas de cortes coronales de cerebros de rata (tejido con daño). Las literales diferentes indican diferencia significativa* ($p < 0.05$). CO= control, MO= Extracto de *L. montanus*, EX= extracto de *L. exaltatus*, RE= extracto de *L. reflexus*, ES= extracto de *L. stipulatus*.

Los datos obtenidos a partir de las pruebas ANOVA seguida de una comparación entre medias con la prueba de Duncan nos indican que hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos a una $p < 0.05$. El grupo MO presentó mayor porcentaje de células rojas respecto del resto de los grupos ($p < 0.05$), el grupo EX también presentó diferencia significativa respecto de los otros grupos ($p < 0.05$), excepto del grupo RE, ya que con este no mostró diferencia significativa, en tanto que el grupo ES si presentó diferencia significativa respecto a los grupos restantes ($p < 0.05$).

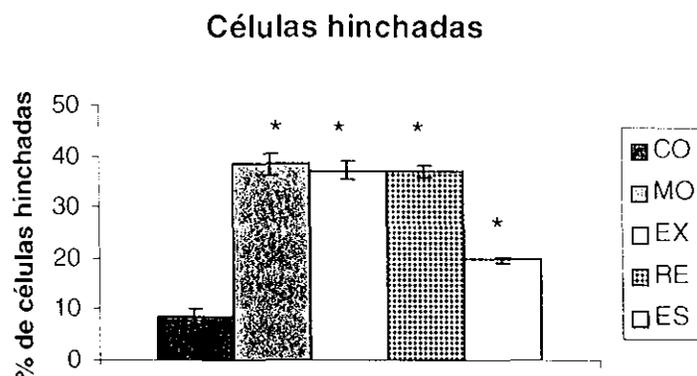


Figura 8 Muestra las medias del grupo control y grupos tratados con extractos de AQ del porcentaje de células hinchadas en cortes coronales de cerebros de rata (tejido con daño). Las literales diferentes indican diferencia significativa* ($p < 0.05$). CO= control, MO= Extracto de *L. montanus*, EX= extracto de *L. exaltatus*, RE= extracto de *L. reflexus*, ES= extracto de *L. stipulatus*.

Los datos obtenidos a partir de las pruebas ANOVA seguida de una comparación entre medias con la prueba de Duncan nos indican que hubo diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos, el grupo MO presentó un mayor porcentaje de daño. Mediante el análisis estadístico del número de células hinchadas en corteza frontoparietal, el grupo MO presentó mayor porcentaje celular respecto del resto de los grupos ($p < 0.05$), el grupo EX también presentó diferencia significativa respecto de los otros grupos ($p < 0.05$), excepto con el grupo RE ya que se encontraron diferencias significativas, en tanto que el grupo ES sí manifestó diferencia significativa respecto a los grupos restantes ($p < 0.05$).

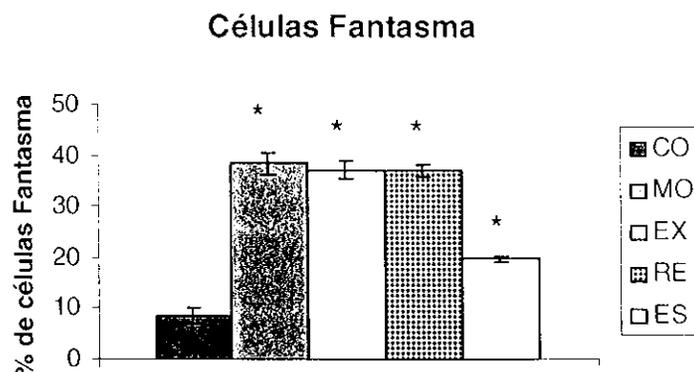


Figura 9. Muestra las medias del grupo control y grupos tratados con extractos de AQ del porcentaje de de células fantasma en cortes coronales de cerebros de rata (tejido con daño). Las literales diferentes indican diferencia significativa* ($p < 0.05$). C= control, MO= Extracto de *L. montanus*, EX= extracto de *L. exaltatus*, RE= extracto de *L. reflexus*, ES= extracto de *L. stipulatus*.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir de las pruebas ANOVA seguida de una comparación entre medias con la prueba de Duncan nos indican que hubo diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos , el grupo MO presentó un mayor porcentaje de células fantasma. El cuadro No. 38 muestra los resultados obtenidos por análisis estadístico para las células fantasma en la corteza frontoparietal , en donde el grupo MO presentó mayor porcentaje celular respecto del resto de los grupos ($p < 0.05$), el grupo EX también presentó diferencia significativa respecto de los otros grupos ($p < 0.05$), con excepción del grupo RE, ya que con este no se presentó diferencia significativa, en tanto que el grupo ES si mostró diferencia significativa respecto a los grupos restantes ($p < 0.05$).

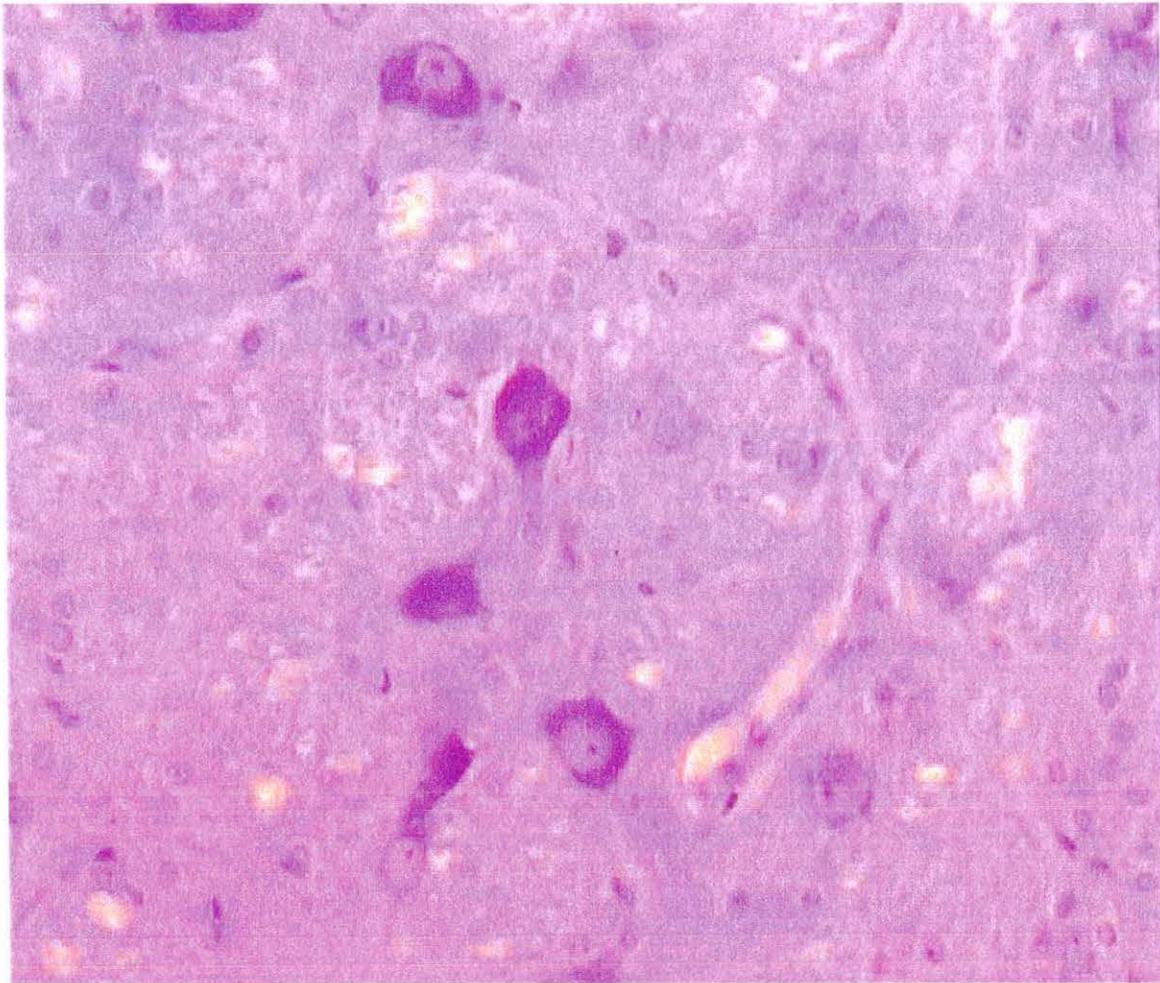


Figura 10. Muestra corte coronal de un animal control. Se observan neuronas normales del tallo cerebral, en las cuales es característico su escaso citoplasma, un núcleo, un nucleolo y la cromatina finamente granular. tinción con H-E; 20 X

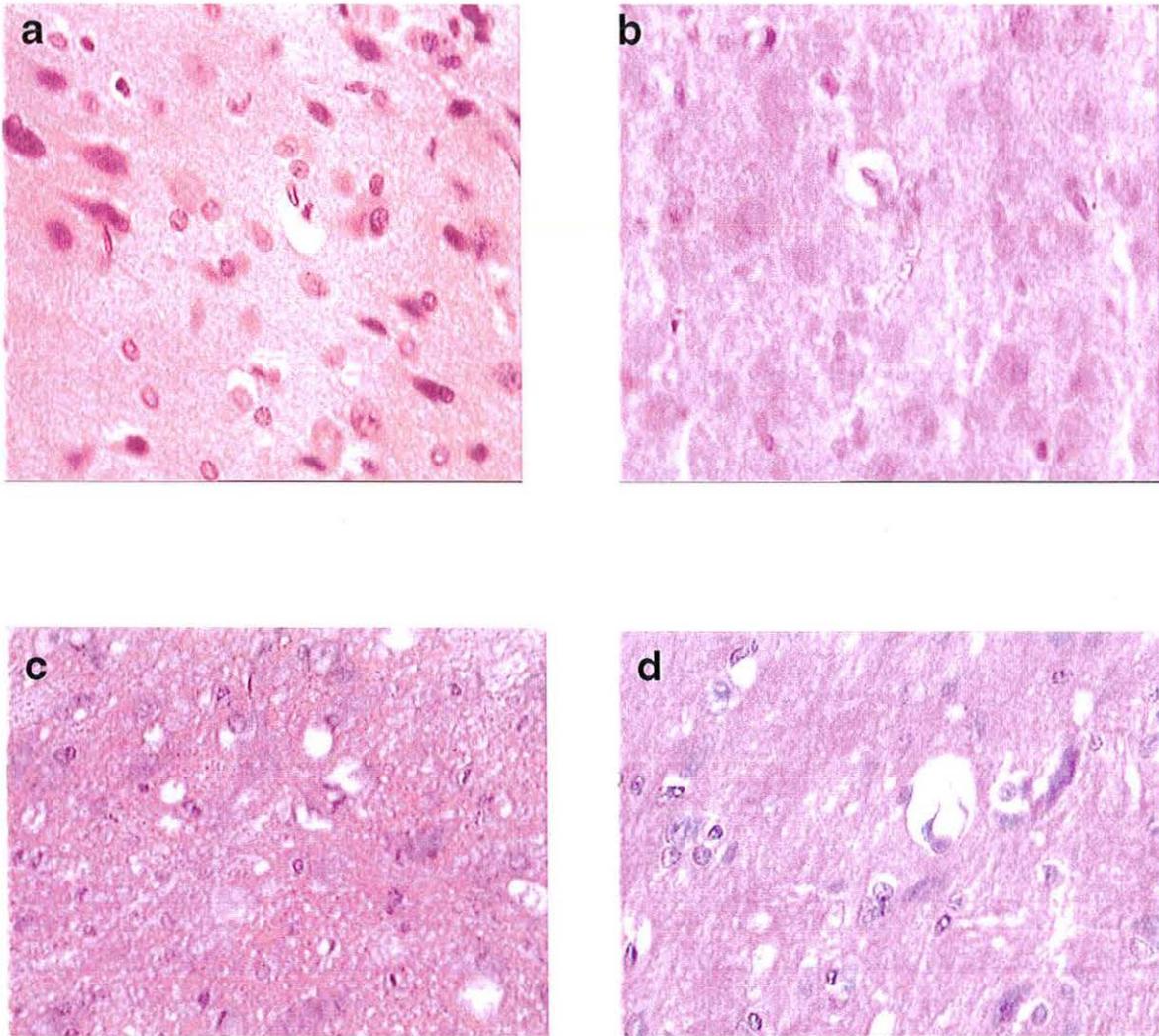


Figura 11. Muestra cortes coronales de 10 μm . de espesor correspondientes a cerebros de ratas tratadas con extracto de *L. montanus* (a) *L. exaltatus* (b), *L. reflexus* (c) y *L. stipulatus* (d). Tinción con hematoxilina –Eosina; 20X

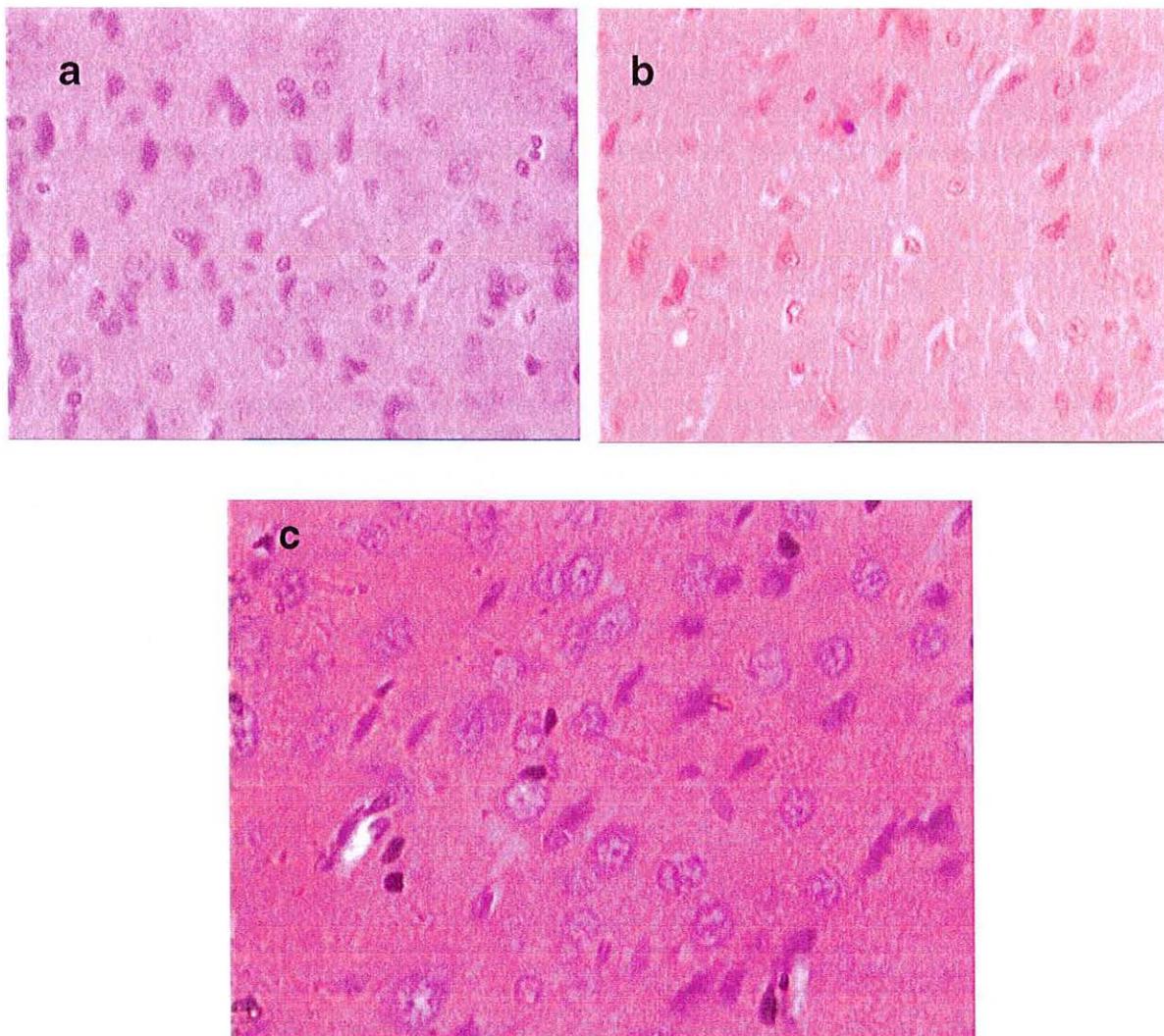


Figura 12. Muestra cortes coronales de 10 μ de espesor correspondientes a células rojas de cerebros de ratas tratadas con extracto de *L. montanus* (a) *L. exaltatus* (b), y *L. stipulatus* (c). Tinción con hematoxilina –Eosina; 20X

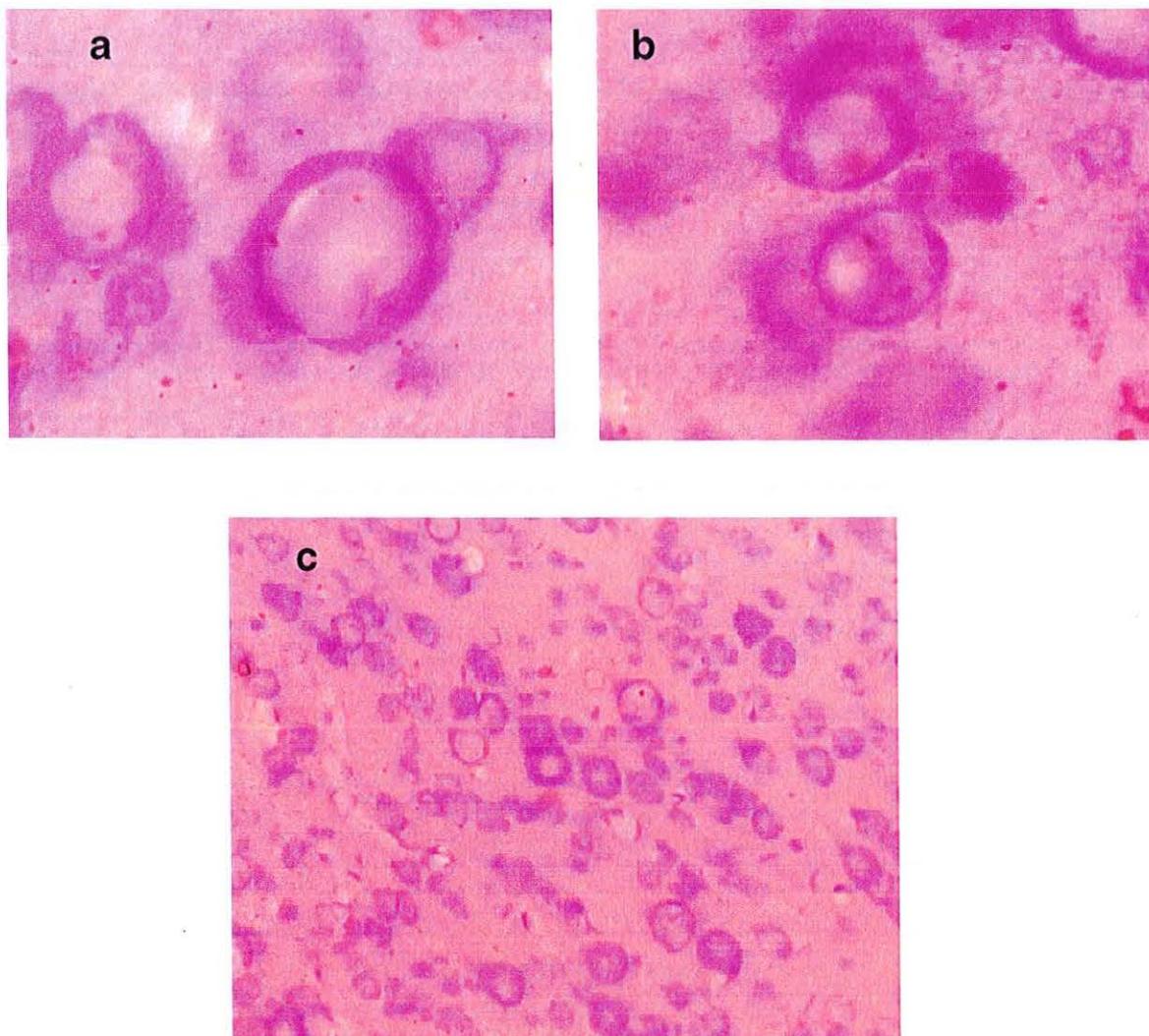


Figura 13. Muestra la presencia de células hinchadas en corteza frontoparietal de diferentes especies de lupinus silvestre *L. montanus* (a) *L. exaltatus* (b), y *L. stipulatus* (c). Tinción con Hematoxilina –Eosina; 20X.

7. DISCUSIÓN

Al realizarse la detección de los alcaloides de las fracciones extraídas de *L. montanus*, *L. exaltatus*, *L. reflexus* y *L. stipulatus*, los resultados mostraron reacciones positivas, tanto para las fracciones de lupinus como para la muestra testigo positiva (cafeína), lo cual indicó la presencia de los alcaloides mediante el

uso de los reactivos Mayer y Dragendorff, que son específicos para la determinación de los mismos (Hultin y Torrsell, 1995), mientras que la muestra testigo de soya presentó una reacción negativa, ya que carece de todo tipo de alcaloides (Domínguez, 1973).

La cromatografía de gas capilar es una técnica muy eficiente para el análisis cuantitativo y cualitativo de los alcaloides quinolizidínicos, por su rapidez y sensibilidad (Musquiz et al., 1989), tal y como se ha mencionado mundialmente en algunos eventos académicos.

En este trabajo la concentración de los alcaloides quinolizidínicos se manifestó en los cuatro estándares de AQ, no obstante la concentración fue muy variable, siendo para *L. montanus* la esparteina como alcaloide mayoritario (3347.16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), seguido por la lupanina (2613.19 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), la 13-OH-lupanina (347.29 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y la 3-OH-lupanina (325.39 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). En *L. exaltatus* el alcaloide que se encontró en mayor cantidad fue la lupanina con (1251.34 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), la esparteina (74.60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y la 13-OH-lupanina (55.36 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), para *L. reflexus* el alcaloide en mayor cantidad es la esparteina con (26.634 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), luego la lupanina (2.13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), después la 3-OH-lupanina (0.159 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), y luego la 13-OH-lupanina (0.790 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), por último el *L. stipulatus* presentó como alcaloide mayoritario 4-OH-Lupanina (17.84 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 13-OH-Lupanina (14.51 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), Angustifolina (5.67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), Lupanina (3.39 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), Esparteina (0.018 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$),

Esto concuerda con los datos obtenidos por diferentes autores, ya que *L. luteus*, *L. hispanicus* poseen la lupanina como alcaloide mayoritario (Wink et al 1995) en tanto que *L. angustifolius*, presenta la 13-OH-Lupanina como alcaloides quinolizidínicos mayoritarios (Priddis, 1983), mientras que algunos otros lupinus como *L. mutabilis* presentan la esparteina como el alcaloide con mayor concentración. García et al., reportaron que en algunas especies jalicenses, de lupinus como *L. montanus*, *L. exaltatus*, *L. reflexus* y *L. stipulatus* los alcaloides esparteina y lupanina, como los principales alcaloides lo que se confirma en este estudio, ya que se repiten las mismas concentraciones de alcaloides; presentándose como alcaloide en mayor cantidad la esparteina para *L. montanus* y *L. reflexus* lupanina para *L. exaltatus* y 4-OH-lupanina para *L. stipulatus* usando siempre para la

detección de los AQ la cromatografía de gases.

Para la acción directa de los alcaloides en los animales, se utilizó la técnica de la implantación de canulas via intracerebroventricular (ICV) en el ventrículo lateral derecho. Esto con la finalidad de asegurar la permeabilidad de los alcaloides al tejido cerebral y de esta manera obtener una respuesta específica de la aplicación de cada uno de los extractos crudos de alcaloides en las diversas áreas del cerebro de la rata. Aunque se tomaron todas las precauciones necesarias para la cirugía, es común que se presente daño en la zona de implante debido a la inserción de la canula, zona que fue descartada mediante la comparación de cada grupo experimental (M, E, R y Es) y el C para verificar la correcta implantación de la canula se utilizaron las coordenadas del sitio a canular obtenidas por Watson y Paxinos en 1982 mediante un aparato estereotaxico David-Koppf, las cuales son; -1.4 mediolateral, 8.2 anterior a lambda - 4.0 dorsoventral que corresponden a la ubicación del ventrículo cerebral derecho; mientras que otra forma de confirmarlo fue en el momento de obtención de los cerebros de manera visual el sitio de la canulación.

La sal de cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolium (CTT) ha sido utilizada por los patólogos para detectar las áreas de infarto en el corazón y cerebro (Holmbon et al 1993., Freeman et al., 1990) es un indicador histoquímico de la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria de la mitocondria (Peter et al., 2001) se han realizado estudios con ratas (Lin et al., 1993) gatos, (Liszczak et al 1984), primates (Dettmers et al 1994), conejos (Birnbbaum et al., 1997), gerbils (Lund et al., 1986, Baffour et al., 1992) y perros (Lin et al., 1986) utilizando este reactivo, no obstante algunos autores encontraron que en ratas y gatos con isquemia producida por procedimientos quirúrgicos las mitocondrias se encuentran intactas, a pesar de que hayan desaparecido otros organelos; como el núcleo. Este reactivo también ha sido utilizado por algunos investigadores en bacteriología como coadyuvante en la identificación de algunos tipos de bacterias; como las especies de campilobacter (Pefanis et al., 1989). De la misma manera puede utilizarse para detectar algunas infecciones de vías urinarias

De cualquier manera, estudios recientes demuestran que el cloruro de 2,3,5-

trifeniltetrazolio (CTT) es una sustancia que permite cuantificar el volumen completo de los infartos cerebrales causados por oclusión de la arteria cerebral media (ACM) de manera confiable y rápida en modelos examinados 24 h después del daño producido por la isquemia (Hatfield., 1991). Además de ser utilizado para detectar infartos en músculo esquelético (Cheng et al., 1996), y su reacción bajo esta circunstancia es comparable al método de tinción con hematoxilina-eosina (Bederson et al., 1986) ., Asimismo, esta técnica ha sido adaptada para medir el volumen de trauma en cerebros, causado quirúrgicamente por un infarto cortical cerebral ocasionado por la percusión de un líquido en el cerebro (Bascaya et al., 2000).

Aunque hasta el momento se le han dado un gran uso a este reactivo, no existe información disponible acerca de si el CTT sea útil como marcador de daño en los cerebros causado por alcaloides u otras sustancias tóxicas. Estos antecedentes, además del conocimiento que se tiene sobre el daño causado por los AQ en el SNC (Pothier et al., 1990) y más específicamente en motoneuronas (Agid et al., 1988), fueron las bases por las que se decidió aplicar este reactivo para cuantificar el volumen cerebral dañado por los alcaloides de los lupinus.

Los hallazgos encontrados indican que la técnica es confiable para marcar las áreas del cerebro afectadas por la aplicación ICV de los alcaloides extraídos de especies de lupinus, esto se confirmó mediante la observación de los cortes obtenidos, no obstante la técnica no es definitiva para marcar con precisión el total del volumen afectado, esto en base a las comparaciones realizadas con los tejidos sometidos a la técnica de hematoxilina-eosina y analizados mediante microscopía de luz, ya que se observan núcleos dañados severamente en zonas correspondientes a regiones del talamo, hipotálamo, hipocampo, así como algunas zonas de la corteza cerebral frontoparietal, sensitiva motora, auditiva, cingulada y estriada, las cuales fueron parcialmente detectadas con carencia de reacción al reactivo. Los resultados nos indican que los AQ afectaron la función mitocondrial, muy probablemente por los efectos degenerativos producidos en las neuronas.

Al aplicar la tinción de hematoxilina-eosina a los cortes cerebrales parafinados de los diferentes grupos, la prueba arrojó datos sobre la extensión y características

del daño causados por los extractos crudos de alcaloides quinolizidinicos obtenidos de cuatro especies de lupinus, ademas de corroborar la ausencia de zonas afectadas a consecuencia de la sustancia vehículo (aceite de sesamo) en los cortes del grupo control.

Las zonas afectadas por los extractos alcaloideos presentaron una considerable extensión que de forma general se presenta desde la parte anterior del cerebro hasta el cerebelo posterior, zonas pertenecientes al talamo, hipotalamo, hipocampo y puente resultaron especialmente afectadas, ademas de las regiones de la corteza frontal, sensorial, estriada, cingulada y auditiva, tambien presentaron efectos adversos, Los daños causados difieren en cuanto a las areas y núcleos afectados por el tipo de extracto alcaloideo utilizado de esta manera tenemos que en el cerebro anterior del grupo L. montanus en la ubicación interaural 11.7 , bregma 2.7, se presentaron los siguientes núcleos afectados corteza frontoparietal area sensitiva y area motora, corteza frontal, núcleo accesorio olfatorio. De manera diferente en el grupo L. exaltatus los cortes de las mismas coordenadas presentaron un daño menor, y aún menos manifiesto en los cortes de cerebros tratados con extractos de L. reflexus y L. stipulatus.

Al realizar las cuantificaciones mediante un analizador de imágenes utilizando las coordenadas interaural 10.7 bregma 1.7, nos revelaron que los tejidos de los grupos de M, E, R y Es presentaron células con hinchamiento considerable, cuando se compararon con tejidos del grupo C. Por otro lado, la medición realizada en los núcleos de los diferentes grupos, reveló que el grupo M presentó un mayor hinchamiento nuclear, lo cual indica una alteración en la permeabilidad de la membrana nuclear y celular por efecto de los alcaloides.

El mismo tipo análisis aplicados para la corteza frontoparietal coordenadas interaural 11.2 y bregma 2.2 nos muestra que el hinchamiento celular, el grupo M resultó significativamente mayor que los grupos E, R y Es, estos núcleos fueron elegidos para la cuantificación por la uniformidad del daño que presentaron sus neuronas. Por otro lado, en el cerebelo y zonas adyacentes también se encontraron diferencias con respecto a la extensión del daño entre los grupos experimentales.

De cualquier manera, a pesar de las diferencias entre las zonas afectadas, la mayoría de las regiones y núcleos afectados se encuentran presentes en cada uno de los grupos de tratamiento en donde el grupo E presentó un área mayor de daño que los otros tres grupos de tratamiento. Sin embargo el grupo M presentó un daño degenerativo más avanzado en algunas estructuras cerebrales como la corteza frontoparietal area sensitiva y motora, en todos los casos el daño es severo, aunque varía en cuanto a su magnitud.

Los resultados neurotóxicos, obtenidos en este trabajo pueden ser explicados mediante el mecanismo de acción que tienen los AQ, ya que varias de las zonas dañadas corresponden a vías acetilcolinérgicas; tanto nicotínicas como muscarínicas (Schmeller et al., 1994) mientras que por otro lado, pueden actuar inhibiendo los canales de sodio y potasio, aunque por vía de este mecanismo es de esperarse un campo de acción muy amplio y disperso en el tejido cerebral, de igual forma las diferencias encontradas entre los tratamientos experimentales, pueden deberse a diferencias en la concentración y contenido de AQ presentes en los extractos obtenidos y a la afinidad específica que presentan los receptores acetilcolinérgicos (Séller et al. 1994). Los efectos clínicos reportados de los AQ son: depresión (Schmitt, 1980) estimulación de la musculatura uterina (Cohen, 1981) disminución de la actividad locomotora y acción analgésica (Pothier et al., 1988)

8. CONCLUSIONES

1. Los daños observados en los tejidos de cerebro de rata ,se localizan principalmente en zonas sensitivo-motoras de la corteza, tálamo, ganglios basales, algunos núcleos hipotalámicos y cerebelo.
2. Los hallazgos histopatológicos mejor visualizados utilizando la técnica de Nissl fueron: compactación citoplasmática en neuronas y la gliosis generalizada del tejido; la presencia de un gran numero de neuronas hinchadas, de células rojas y fantasmas.
3. El Cloruro de 2,3,5- Trifeniltetrazolium, además de ser útil para marcar zonas de daño por isquemia, puede ser utilizado como un marcador de daño por sustancias toxicas en tejido cerebral, como los alcaloides quinolizidinicos (AQ).
4. Mediante la técnica de 2,3,5- trifeniltetrazolio se confirmó la presencia de daño en las áreas sensitivomotoras de la corteza cerebral, así como en algunos centros del hipotálamo y tallo cerebral.
5. En general, puede considerarse de gran cuantía el daño provocado por extractos de AQ de lupinus silvestres en el cerebro de la rata.

9. BIBLIOGRAFIA

Agid Y., Pertuiset, B. y Dubois. (1988). Motoneuron disease as manifestation of lupin seed toxicity.

Anne-Lise, Sagen Jürg Gertsch, Rita Becker, Jörg Heilmann., y Otto Sticher. Quinolizidine alkaloids from the curare adjuvant *Clathrotropis glaucophylla*. *Phytochemistry*. (2002); 61: 975-978.

Aramakis VB, Bandrowski AE, y Ashe JH. Role of muscarinic receptors, G-proteins, and intracellular messengers in muscarinic modulation of NMDA receptor-mediated synaptic transmission. *Synapse* (1999); 32:262-75.

Ballester D, Yanes E, García R, Erazo S, Lopez F, Haardt E, Cornejo S, Lopez Pikniak J, y Chichester CO. Chemical Composition, Nutritive Value, a Toxicological Evaluation of two Species of Sweet Lupine (*Lupinus Albus* and *Lupinus luteus*) *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, (1980); 28: 402-405

Baffour R, Berman J, Garb JL, Rhee SW, Kaufman J, y Friedmann P. Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *Journal Vascular Surgery* (1992); 16:181-91.

Baskaya MK, Dogan A, y Dempsey RJ. Application of 2,3,5 cloruro de trifeniltetrasolium chloride staining to evaluate injury volume after controlled cortical impact brain injury: role of brain edema in evolution of injury volume *Journal of Neurotrauma* (2000); 17:93-9.

Batterham ES. Lupin seed meal for pigs. *Pig News and Information*, (1989); 10: 323-325.

Bear Von D, Hartmut RE, y Felheim W., Methoden. Zur. Bestimmung der chinolizin alkaoloide in *lupin mutabilis* *Z. Lebensm unters*, (1979); 169;27-31

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

Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, y Bartkowski H.M. Evaluation of 2,3,5- tripheniltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* (1986); 17:1305-8.

Bellido LL, y García FM. El altramuz. Ed. Ministerio de Agricultura pesca y alimentación. Cordoba. España. (1991); 50- 75

Birnbaum Y, Hale SL, y Kloner RA. Differences in reperfusion length following 30 minutes of ischemia in the rabbit influence infarct size, as measured by

triphenyltetrazolium chloride staining. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. (1997); 29:657-66.

Blache D, Miller DW, Milton JTB, y Martín GB. The secretion of gonadotrophins, insulin and insulin like growth factor 1 by Merino Rams supplemented with, different legume seeds. *Australian Journal of Agricultural Research* (1996); 47(6): 843- 853

Blaicher FM, Nolte R, y Mukherjee KD. Lupin Protein concentrates by extraction with aqueous alcohol. *JAM Oil Chem Soc.* (1981); 58: 761-765.

Butler WH, Ford G, y Creasy DM. A 90 day feeding study of lupin (*Lupinus Angustifolius*) flour spiked with lupin alkaloids in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, (1996); 34: 531-536.

Chang YC, Wang MF, Chen YC, Yang DY, Lee MS, y Cheng FC. Long-term administration of polygonum multiflorum thumb. Reduce cerebral ischemia-induced infarct volume in gerbils *American Journal Chinese Medicine* (2003); 31: 71.

Chango AC, Villaume HM, Bau JP, y Nicolas ML. Debittering of lupin (*Lupinus luteus* L) protein by Calcium alginate and nutritional evaluation. *Journal Food Agriculture* (1996); 63:195-200

Cheeke PR, y Kelly JD. (1989). Metabolism, toxicity and nutritional implications of quinolizidine (lupin) alkaloids. *Proceedings of the first international workshop on Antinutritional Factors (ANF) in legume seeds; November 23-25 1988 Wageningen (the Netherlands).* 189-201.

Cheeke PR. Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. *Journal of Animal Science.* (1995). 73: 909-918..

Cheng HT, Chang H, Lue HJ, y Wen CY. Unpredictability of triphenyltetrazolium chloride in staining irreversible ischaemia-reperfusion injury in the skeletal muscle of rats. *Eur J Surg* May (1996); 162: 407-12.

Cohen Y. *Abregé de pharmacologie.* Ed. Masson. Paris, Francia. (19981). 217-218.

Cole DJ, Drummond JC, Ghasal EA, y Shapiro HM. A reversible component of cerebral injury as identified by the histochemical stain 2,3,5- triphenyltetrazolium chloride (TTC). *Acta Neuropathology* (1990); 80: 152-5

Corc DB, y WinK M. Elevational variation of quinolizidinic alkaloid contents. N a lupine (*L. argenteus*) of the Rocky Mountains. *Journal Chemical Ecology.* (1994); 20: 829-857.

Dettmers C, Hartmann A, Rommel T, Kramer S, Pappata S, Youg A, y Davis AM. The Occurrence of Anagryne in a Collection of Western American Lupines *Journal of Range Management.* (1982); 81: 82- 83

Díaz J, Durruty P, y Tapia JC. Efectos de una fibra dietaria (salvado de lupino dulce) en el tratamiento de la diabetes no insulino dependiente. *Revista Medica de Chile.*

(1990); 118: 24-32.

Dixon R.M., y Hosking B.J Nutritional value of grain legumes for ruminants. *Research Reviews*, (1992); 5: 19-43.

Dominguez XA. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Centro Regional de Ayuda Técnica. Agencia para el Desarrollo Internacional. Buenos Aires. Argentina (1973); 211-227.

Donovan BC, Mc niven M A, Van Lunen TA, Anderson DM, y Macleod JA. Replacement of soyabean meal with dehydrated lupin seeds in pig diets. *Animal Feed Science and Technology*, (1993); 43: 77-85.

Dunn DB. Genetic Resource, cytotaxonomy and distribution of New World lupin species. *Proceedings of the third International Lupin Conference, International Lupin Association.* La Rochelle. Francia (1984); 68-85

Estrada F, Peralta. Z, y Rivas, M., Manual de técnicas histológicas, Ed. AGT, México. (1982); 97-100

Freeman I, Grunwald AM, Robin B, Rao PS, y Bodenheimer MM Effect of early reperfusion on use of triphenyltetrazolium chloride to differentiate viable from non-viable myocardium in area of risk. *Cardiovascular Research.* (1990); 24:109-14.

Garcia HJ, Kay FL, y Khang-Loon H . Neuronal Necrosis After Occlusion in Wistar Rats Progresses at Different Time Intervals in the Caudoputamen and the Cortex. (1994); 26: 636-643

Gladstones JS. Lupinus as crop plants. *Field Crop Abstracts* vol. (1970); 23. 23-27.

Garner RJ. *Veterinary Toxicology.* Balliere. Tindal and Cox, London (1957); 316-317.

Goldlust EJ, Paczynski RP, HeYY, Hsu CY, y Golberg MP. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride stained rat brain. *Stroke* (1996); 27: 1657-62

Gross R Cultivo y utilización de *Lupinus Mutabilis Sweet*; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, (1982); 157-159.

Hagerman AE, y Butler LG. Tannins and lignins. In: G.A. Rosenthal and M. R. Berenbaum (Ed.) *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites.* Vol. I: The Chemical Participants (1991); pp: 355-388. Academic Press, New York.

Harborne, JB. *Introduction to Ecological Biochemistry.* Academic Press. London (1993).

Hartmann S, Zierz, Mackenzie ET, y Baron JC immersion and perfusion staining with 2,3,5- triphenyltetrazolium chloride (TTC) compared to mitochondrial enzymes 6 hours after MCA-occlusion in primates. *Neurology research* (1994); 16: 205- 8.

Hatfield RH, Mendelouw AD, Perry RH, Alvarez LM, y Modja P.

Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as a marker for ischaemic changes in rats brain following permanent middle cerebral artery occlusion. *Neuropathol Appl Neurobiol* (1991); 17: 61-7

Holbom B, Naslund U, Eriksson A, Virtanen I, y Thornell LE Comparison of triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining versus detection of ifibronectin in experimental myocardial infarction. *Histochemistry* (1993); 99:265-75.

Hatzold T, Quinolizidine alkaloids in seeds of *lupinus mutabilis*. *Journal Agriculture Food chemical*, (1983); 31: 934-93

Hultin E, y Torssell K . Alkaloid-sreening of Swedish plants *Journal of Phytochemistry* (1965); 4: 425-433.

Humphereys DJ. *Plantas Tóxicas. Toxicología Veterinaria. Tercera Edición. Editorial Mcgraw-Hill.* (1990); 257-258

Hu G, Lyeth BG, Zhao X, Mitchell JB, y Watson JC, Neuroprotection by 3-carbamoyl-proxyl during reperfusion in a rat model of transient focal ischemia *Journal surgeri* (2003); 98: 393-6

Isayama K, Pitts LH, y Nishimura MC. Evaluation of triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarcts. *Stroke* (1991); 22:1394-8

Ito WD, Schaarschmidt S, Klask R, Hansen S, Shafer HJ, Mathey D, y Bhakdi S. Infarct size measurement by triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining versus in vivo injection of propidium iodide. *Journal of molecular and Cellular Cardiology* (1997); 29:2179-75.

Jabbar S, Khan MT, y Choudhuri MS. The effects of aqueous extracts of *Desmodium gangeticum* DC. (Leguminosae) on the central nervous system. *Pharmazie*. (2001); 56: 506-8.

Jambrina AJL. *La Genetica de los alkaloides en el genero Lupinus*, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid España. (1993); 5-8

James LF, y Molyneux RJ Impact in poisonous plants on the livestock industry. *Journal of Range Manage.* (1992); 45:3-8.

Kassessinoff TA, Gabet A, Beaven MA, y Sagi-Eisenberg R. Inositol polyphosphates regulate the membrane interactions of the endosomal p100, G-protein-related protein. *Biochimica Biophysica, Acta.* (1998); 394:111-20.

Khan SH, Basiyan A, Banigesh AJ, Hemmings S, y Shualb A. Evaluation of an optimal temperature for brain storage in delayed 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. *Journal Neuroscience methods* (1998); 98:43-47

Keller WJ, y Zelenski SG. Alkaloids from *Lupinus argenteus* var. *stenophyllus*. *J Pharm Sci.* (1978); 67:430-1.

- Kinghorn AD, y Balandrin MF.** Alkaloids: Chemical and Biologicals es. De By W. Pelletier, John Wiley and Sons New York, (1984); (2): 105-148
- Koper S, Wink M, y Fink HA.** Differential effects of alkaloids on sodium currents of isolated single skeletal muscle fibers. *FEBS Letters*. (1998); 436: 251-255
- Lee SS, Goo HW, Park SB, Lim CH, Gong G, Seo JB, y Lim TH,** MR imaging of reperfused myocardial infarction: comparison of specific and intravascular contrast agent in a cat model. *Radiology* (2003); 226(3): 739-47.
- Li F, Irie K, Anwer MS, y Fisher M,** Delayed triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining remains useful for evaluating cerebral infarct volume in a rat stroke model. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (1997); 17(10):1132-5.
- Lin TN, He YY, Wu G, Khan M, y Hsu CY.** Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats *Stroke*. (1993); 24:117-2
- Liszczyk TM, Hedley-Whyte ET, Adams JF, Han DH, Kolluri VS, Vacante FX, Heros RC, y Zervas NT.** Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain. *Acta Neuropathol* (1984); 65(2):150-7.
- Longmore RB.** Insolation of minor lupin alkaloids 1. A simple procedure for the insolation of angustifoline from lupin angustifolius (cv. fest). seeds,with application to other lupin alkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1996); 44: 2129-2133.
- Looms TA.** Essentials of toxicology. En:" Toxicologic testing methods". Cap 13 (ed) Lea and Febiger, Philadelphia, USA, (1974); 195-237.
- Lowen RJ, Alam FKA, y EdgarJA.** Lupin bean toxocoty. *The Medical Journal of Australia*. (1995); 162: 256-257.
- Lundberg P, y Palo RT.** Resource use, plant defenses and optimal digestion in ruminants. *Oikos*. (1993); 68: 224-228.
- Lundy EF, Solik BS, Frank RS, Lacy PS, Combs DJ, Zelenock GB, y D'Alecy LG** J Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils *Pharmacol methods* (1986); 16:201-14.
- Makkar HPS, y Singh B.** Tannin levels in leaves of some oak species at different stages of maturity. *Journal of Science Food Agriculture*. (1991); 54: 513-519.
- Mangan JL.** Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research Reviews*. (1988); 1: 209-231.
- Masters DG, y Mata G.** Response to feeding canola meal or lupin seeds to pregnant, lactating and dry ewes. *Australian Journal of Agricultural Research*, (1996); 47: 1291-1303.
- Master DG, Stewart CA, Mata G, y Adams NR.** Responses in wool and live weight

when different sources of dietary protein are given to pregnant and lactating ewes. *Animal Science* (1996); 62: 497-5

Mc Vaught R. Flora novogaliciana V. Leguminosae. A. Descriptive account of the vascular plant of Western México. Ann Arbor The University of Michigan Press. U.S.A. (1987).

Molyneux, RJ, y Ralphs MH. Plant toxins and palatability to herbivores. *J. Range Manage.*, (1992); 45: 13-18.

Mukissirat AE, Mitaru NB. The effect of feeding diets containing intact or partially detoxified lupin on voluntary intake and milk production by Friesian dairy cows. *Journal of Animal Science.* (1995); 60: 169-175.

Muzquiz M, Burbano C, Cuadrado C, y De la Cuadra C. Determinación de factores antinutritivos termorresistentes en leguminosas.I: Alcaloides .En *Inves.Agro. Prod. Prot. Veg.* (1993); 8:350-361.

Panter KE, James LF, y Gardner DR. Lupines, poison-hemlock and *Nicotiana* spp: toxicity and teratogenicity in livestock. *Journal Natural Toxins.* (1999); 8:117-34.

Panter KE, y Keeler RF. Quinolizidine and piperidine alkaloids teratogens from poisonous plants and their mechanism of action in animals. *Journal Congenital Abnormal.* (1993); 8: 33-40.

Park CK, Mendelow AD, Graham DI, McCulloch J, y Teasdale G. Correlation of triphenyltetrazolium chloride perfusion staining with conventional neurohistology in the detection of early brain ischaemia. *Neuropathology Appl Neurobiology* (1988) 14(4):289-98.

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

Pefanis SM, Venter CG, y Herr S. The use of cephalothin and triphenyltetrazolium chloride impregnated filter paper strips in the identification of *Campylobacter* species. *Onderstepoort Journal Veterinary Research.* (1989); 56:143-4

Pearse BH, McMeniman NP, y Dowsett KF. Effect of lupin (*Lupinus Angustifolius*) supplementation on ovarian and pituitary activity in ewes. *Reproduction Fertility and Development* (1991); 3: 109-12.

Rich RP, Mischis AL, Purton S, y Joseph T. The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains Wiskich. *FEMS Microbiology Letters,* (2001); 202:2:181-187

Petterson DS, Greirson BN, Allen DG, Harris DJ, Power BM, Dusi LJ, y Ilet KF. Disposition of lupanine and 13- hidroxilupanine in man. *Xenobiotica* (1994); 24: 933-941

Petterson DS. Is there a role for lupins in human nutrition? *Proceedings of the 45*

Australian Cereals. Chemistry Conference, Adelaide (1995).

Petterson D.S. Composition and Food uses of lupins. In : Lupins as Crop Plants; Biology, Production and Utilisation. Gladstone JS, Atkins CA, Hamblin J (eds.) CAB International (1998); 353-384

Pothier J, Cheav SL, y Galand N.. A comparative study of the effects of sparteine, lupanin and lupin extract on the central nervous system of the mouse. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (1998); 50: 949-954.

Priddi CR. Capillary gas chromatography of lupin lupin alkaloids *Journal. of Chromatography.* (1983); 261:95-101.

Poulton JE. Cyanogenesis in plant. *Plant Physiol.* (1990); 94: 401-405.

Rahman MH, Hossain A, y Hossain. Hemato Biochemical parameters in rats fed *Lupinus angustifolius* (sweet lupin) seed protein and fiber fraction. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* (1996); 20: 99-111.

Ramos GP, Frutos G, y Mantecón AR Plants Secondary compounds in herbivores nutrition. Estación Agrícola Experimental. (1998); CSIC.Apdo 788. 24080 León España.

Rhoades DF. Evolution of plant chemical defense against herbivores. In: G.A Rosenthal. Ed. *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites.* Academic Press, New York. (1979); 3-54.

Robbins MC, Petterson DC, y Brantom PG. A 90-day feeding study of alkaloids of *lupinus angustifolius* in the rat. *Food and Chemical Toxicology* (1996); 34: 679-686.

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

Luque MR, Gutierrez RM, y Infante MF. Acute poisoning by lupine seed debittering water. (1991).

Sheng R y Liu GQ. EDT, tetrahydroacridine derivative inhibits cerebral ischemia and protects rat cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity. *Acta Pharmacol* (2003); 24: 390-3.

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

Schmeller T, Saurwein M y Wink M. Binding of Quinolizidine Alkaloids to Nicotinic and Muscarinic Acetylcholine receptors, *Journal of Natural Product*, (1994); 57 (9) 1316-1319.

Schmitht H. Elements de Pharmacologie. Ed.Flammarion. Paris, Francia. (1980); 356.

Slutsky I, Wess J, Gomeza J, Dudel J, Parnas I, y Parnas H. Use of knockout mice

reveals involvement of M2-muscarinic receptors in control of the kinetics of acetylcholine release. *Journal of Neurophysiology*. (2003); 89: 1954-67.

Sousa IMN, Morgan PJ, Mitchel JR, Hording SE, y Hill SE. Hidrodinamic characterization of lupin proteins; solubility, intrinsic; viscosity and molar mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (1996); 44: 3018-3021.

Sterin-Borda L, Ganzinelli S, Berra A, y Borda E. Novel insight into the mechanisms involved in the regulation of the m1 muscarinic receptor, iNOS and nNOS mRNA levels. *Neuropharmacology*. (2003); 45(2):260-269.

Strasburger E., Noll H.F. y Schinper A.F.W. Tratado de botánica. Ed. Marin. Barcelona (1994).

Tak T, Lin SL, Gamage N, Mahler C, Steen SN, Colletti P, y Rahimtoola SH, Chandraratna PA. Ultrasonic tissue characterization of acute canine myocardial infarction. *Canadian Journal of Cardiology*. (1989); 5:195-200.

Tsiodras S, Shin RK, y Christian M. Anticholinergic toxicity associated with lupine seeds as a home remedy for diabetes mellitus. *Ann Emerg Med*. (1999); 33: 715-717.

Uzieblo L., Gulewicz K., Tarasewicz. Z., Bednarezyk M., Szczerbinska D, y Ligocki. M. Effect of lupin alkaloid fractions level on performance and blood parameters in chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences* (1996); 5; 261-271.

Valentine SC, y Bartsch BD. Production and composition of milk by dairy cows fed common vetch or lupin grain as protein supplements to a silage and pasture based diet in early lactation. *Australian Journal of Agricultural Research* (1996); 36: 633-636.

Valentine SC, Bartsch BO Production and composition of milk by dairy cows fed lupin or blood meal as protein supplements to hay or silage based diets in early lactation. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. (1996); 36: 523-527.

Van Der Poel AFB. Effects of processing on antinutritional factors (ANF) and nutritional value of legume seeds for non ruminants feeding. In advances of research in antinutritional factors in legume seeds. *Animal Nutrition, Feed Technology, Analytical Methods Proceedings of the First International Workshop on Antinutritional Factors (ANF)*. In *Legume Seeds*, (1989); 213-229.

Vivaldi MT, Kloner RA, y Schoen FJ. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rat. *Am Journal Pathology* (1985); 121: 522-30.

Wink M, y Hartmann T. Localization of the enzymes of quinolizidine alkaloid biosynthesis in leaf chloroplasts of *Lupinus poliphyllus*. *Plant Physiol*. (1982); 70: 47-77.

Wink M, y Witte L. Storage of quinolizidine alkaloid in *Macrosiphum albifrons* and *Aphis genistae* (Homoptera: Aphidae). *Entomology Gener*. (1991); 15: 237-254.

Wink M. Methods in plant Biochemistry Alkaloids and Sulphur compounds. Ed. By P. Waterman, Academic Press, London. (1993); 8: 197- 239.

Wink M, Meibner C, y Witte L. Patterns of quinolizidina alkaloids in 56 species of genus lupinus *Phytochemistry*. (1995); 38:139-153

Wink M, y Margaret F. Alkaloids Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. Plenum Press. New York and London. (1998); 301-325.

Yang H, Pettigrew JE, Johnston LJ, Shurson GC, Wheaton JE, White ME, Koketsu Y, Sower AF, y Rathmacher JA. Effects of dietary lysine intake during lactation on blood metabolites, hormones, and reproductive performance in primiparous sows. *Journal Animal Science*. (2000); 78:1001-9.

Yovo KS, Huguet F, PothierJ, Durand M, Breteau M, y Narcisse G. Comparative Pharmacological Study of Sparteine and its Ketonic Deivative Lupanina from Seeds of lupinus albus *Planta Medica*(1984); 420-424.

Zaklad-Fizjologii R, Uniwersytet B, y Bialystok M. Cyanogenesis in plants. *Postepy Biochem*. (1998); 44: 325-33.

Zdunczyk Z, Juskieviej J, y Flis M., Effect of dehulling white lupin (lupinus albus) on protein utilization by rats. *Journal of Animal and Feed Science* (1996); 5: 281-288.