



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

ESTUDIO DEL EFECTO CLASTOGENICO DE UN  
EXTRACTO DE PIMIENTA NEGRA EN CELULAS  
DE SANGRE PERIFERICA DE RATONES TRATADOS  
DURANTE SEIS SEMANAS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

LEONARDO DAVID MEDINA ARIAS

ASESOR. M. EN C. SANDRA DIAZ BARRIGA.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

270132



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

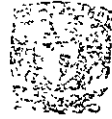
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U N A M.  
 FACULTAD DE ESTUDIOS  
 SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
 Exámenes Profesionales

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 PRESENTE

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estudio del efecto clastogénico de un extracto de pimienta negra en células de sangre periférica de ratones tratados durante 6 semanas.

que presenta el pasante: Leonardo David Medina Arias.  
 con número de cuenta: 8636210-0 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.  
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 5 de Octubre de 199 8.

PRESIDENTE QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda.

VOCAL MenC. Sandra Díz Barriga Arceo.

SECRETARIO Q. Arcadia Hernández Beltrán.

PRIMER SUPLENTE QFB. Rosalba Bonilla Sánchez.

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Gabriel Escalante Reynoso.

## DEDICATORIAS.

### A mi mamá:

No hay palabras suficientes para agradecerte todo lo que haz hecho por mi y de mi, tus consejos, apoyo y principalmente la comunicación que tenemos, ha sido el motivo que me impulsa a seguir adelante y es la mejor herencia que me haz podido dar y que nunca se terminará porque no es algo material, es algo mucho más espiritual y el espíritu vive siempre, para siempre, por siempre. Por esto y muchas otras cosas más GRACIAS.

### A Juan Estrada:

Doy las gracias por ser la pareja de mi mamá, por el apoyo que nos ha brindado a mi familia y a mi cuando lo hemos necesitado, por ser una persona con amor, un ser humano con errores y virtudes y como ser humano de errores y virtudes te acepto, te estimo y respeto.

### A mis padres (Juanita y Raúl):

Doy gracias por haber tenido unos abuelos que en realidad son mis padres; gracias por hacerme pasar una infancia feliz y enseñarme la importancia de la integración familiar; de los mejores momentos que he vivido muchos han sido en su compañía y como recordar es vivir ustedes vivirán por siempre en mí.

### A mis tíos:

Carmen, Ernesto, Raúl, Ma.Elena, Ana María y Edgar, por haber tenido su apoyo directa e indirectamente para terminar mis estudios y principalmente por formar parte de mi familia GRACIAS.

### A mis primos:

Gabriela, Carlos; Verónica y Edgar, por ser mis hermanos que no tuve en la niñez y a Gabriela en especial por no estar cerca de nosotros, aunque cuando hay cariño sincero y recuerdos no hay distancias ni fronteras para estar cerca de los seres queridos, yo te quiero y te extraño.

A la familia Canedo:

Por considerarme como un miembro más de su familia, por la unión familiar que tienen y que ha sido un ejemplo claro de admiración, y por compartir conmigo sus alegrías GRACIAS.

A la familia garduño:

Por darme su cariño incondicional, por inculcarnos el buen camino que un niño, adolescente y hombre debe seguir en la vida, por todo esto y mucho más GRACIAS.

A Rafael y Víctor:

Por la mejor amistad que he tenido en la vida, son muchos años que hemos compartido juntos, mi vida está rodeada de recuerdos y acontecimientos inolvidables, solo me resta darles las gracias y decirles que han sido mis mejores amigos, mis únicos amigos, y por siempre AMIGOS.

A la maestra Sandra:

Por ser la mejor maestra que he tenido, por haber sido parte de mi formación profesional, por haberme dado todo el apoyo y la paciencia que necesité para concluir este trabajo, por todo esto y muchísimas cosas más la admiro, quiero y respeto. MUCHAS GRACIAS.

Al Dr. Madrigal:

Por haber permitido mi estancia en el laboratorio de genética de la ENCB IPN y hacerla más agradable.

A mis compañeros del laboratorio de genética de la ENCB:

Paty, Tenoch, Ale, Isela, Lolita, Marco, Sergio, etc. Por los buenos y agradables momentos que me hicieron pasar a lo largo de mi estancia, diciéndoles no un adiós sino un hasta luego.

A Claudia C. Calzada Mendoza: ??????

# INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRAFICAS	3
RESUMEN.	4
I.- GENERALIDADES DEL TEMA.	
I.1.- Antecedentes de la carcinogénesis química.	6
I.2.- Etapas de desarrollo del cáncer.	9
I.2.1.- Iniciación.	10
I.2.2.- Promoción.	10
I.2.3.- Progresión.	13
I.3.- Metabolismo y modo de acción de agentes carcinogénicos.	14
I.4.- Factores de la dieta humana relacionados al proceso neoplásico.	20
I.5.- La pimienta negra.	23
I.5.1.- Historia.	25
I.5.2.- Economía de la pimienta negra.	26
I.5.3.- Composición química de la pimienta.	29
I.5.4.- Usos de la pimienta negra.	31
I.6.- Antecedentes genotóxicos de la pimienta negra.	33
I.7.- Importancia de la técnica de micronúcleos.	35
II.- OBJETIVOS.	39
II.1.- OBJETIVO GENERAL.	39
II.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.	39
III.- HIPOTESIS	39
IV.- MATERIAL Y METODOS.	40

IV.1.- MATERIAL BIOLÓGICO.	40
IV.2.- MATERIAL DIVERSO.	40
IV.3.- REACTIVOS.	41
IV.4.- METODOS.	41
IV.4.1.- Preparación del extracto alcohólico de pimienta negra.	41
IV.4.2.- Pruebas de solubilidad del extracto alcohólico liofilizado.	41
IV.4.3.- Preparación de las concentraciones.	42
IV.4.4.- Administración y distribución de los ratones.	42
IV.4.5.- Pesado de los ratones y medición del consumo de pimienta negra.	42
IV.4.6.- Toma de muestra.	43
IV.4.7.- Fijación de laminillas.	43
IV.4.8.- Tinción con Giemsa Merck al 8%.	43
IV.4.9.- Observación al microscopio.	43
IV.4.10.- Análisis estadístico.	44
V.- DIAGRAMA GENERAL DE PROCEDIMIENTOS.	45
VI.- RESULTADOS.	46
VII.- DISCUSION.	52
VIII.- CONCLUSIONES.	58
IX.- BIBLIOGRAFIA.	59

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

### TABLAS.

Nº1.- Importación de los principales productos alimenticios (INEGI).	27
Nº2.- Consumo mundial de pimienta negra.	28
Nº3.- Análisis químico de las pimientos negra y blanca.	29
Nº4.- Comparación de la composición química de las pimientos negra y blanca.	30
Nº5.- Solubilidad de la pimienta negra.	42
Nº6.- Pesos promedio.	46
Nº7.- Consumo aproximado de pimienta negra.	47
Nº8.- Frecuencia de ENCMN.	48
Nº9.- Proporción porcentual de EPC / ENC.	49

### FIGURAS.

Nº1.- Estructuras representativas de algunos agentes químicos carcinógenos.	7
Nº2.- Estructuras químicas de los principales agentes promotores.	11
Nº3.- Ejemplos de algunos agentes procarcinógenos ó carcinógenos secundarios.	19
Nº4.- Componentes de la pimienta negra.	32

### GRAFICAS.

Nº1.- Frecuencia de ENCMN.	50
Nº2.- Proporción porcentual de ENC / EPC.	51



## RESUMEN.

El empleo de plantas ya sea con fines medicinales ó alimenticios se ha practicado desde la antigüedad, y en algunos casos no se ha comprobado de manera científica su eficacia. Sin embargo, desde hace algún tiempo se ha despertado el interés por estudiar los constituyentes de la dieta humana para determinar cual es el responsable de la actividad benéfica ó tóxica. Debido al uso frecuente de ciertos condimentos en los alimentos hacen que sean de interés para la investigación, como ejemplo de ellos tenemos a la pimienta negra, la cual tiene como principales constituyentes al safrol, miristicina y piperina entre otros.

Con respecto a la pimienta negra se han realizado estudios en los que se ha observado que la aplicación subcutánea del extracto a ratones induce tumores en hígado, pulmón y piel. En trabajos anteriores utilizando el ensayo de intercambio de cromátidas hermanas en células de mamífero tanto *in vivo* como *in vitro*, se encontró que en ambos hay un incremento que muestra la potencialidad del extracto para inducir daño genotóxico; sin embargo en dichos estudios las dosis y concentraciones empleadas del extracto de la pimienta fueron elevadas en relación con la consumida en una comida, además de que la vía de administración fué intraperitoneal, la cual no es la vía común de ingesta.

Por esta razón, en el presente trabajo se evaluó la acción clastogénica del extracto en células de sangre periférica de ratones administrados oralmente durante seis semanas.

En el experimento se utilizaron ratones machos de la cepa NIH con un peso promedio de 20 g, mismos que fueron distribuidos en 4 lotes con 8 animales cada uno siendo uno de ellos el control negativo y los 3 restantes recibieron en el agua de consumo las diferentes concentraciones

del extracto de pimienta, que para este fin se obtuvo mediante extracción alcohólica y liofilización. Las concentraciones probadas fueron de 70, 140 y 210  $\mu\text{g/ml}$ .

El consumo del agua y el peso de los animales se determinó 3 veces por semana. Cada semana se obtuvieron muestras de sangre periférica y se evaluaron 1000 ENC por ratón para determinar la frecuencia de células micronucleadas así como 1000 eritrocitos totales por animal para conocer la relación porcentual de EPC y ENC.

El consumo diario de líquido por animal estuvo entre 11 y 15 ml en todos los lotes, así mismo el peso de los animales se incrementó homogéneamente a lo largo de las 6 semanas que duró el experimento.

Por otra parte los resultados indican que el extracto incrementó la frecuencia de células micronucleadas a partir de la primera semana, pero el efecto más claro fué con una concentración más elevada, de modo que el promedio total fue 3 veces más elevado que el valor basal. Por otro lado la relación EPC / ENC no se vio modificada por ninguna de las concentraciones administradas.

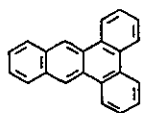
## I. GENERALIDADES DEL TEMA.

### I.1. ANTECEDENTES DE LA CARCINOGENESIS QUIMICA.

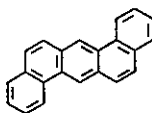
La primera fuente de conocimiento que se tiene de carcinogénesis química fué partir de las observaciones clínicas realizadas en seres humanos. En 1775 Percival **Pott**, un eminente médico cirujano inglés, descubrió el desarrollo de cáncer de escroto en varios de sus pacientes (Pott P. 1775). La historia común de estos pacientes era el trabajo que desempeñaban como limpiachimeneas cuando ellos eran jóvenes. Con base en estas observaciones, el Dr. Pott con remarcable insistencia, concluye que la ocupación de deshollinador de estos hombres estaba directamente relacionado a su enfermedad, y el hollín era el agente etiológico causal.

Los hidrocarburos policíclicos como el hollín y los alquitranes no son las únicas sustancias químicas existentes en el medio ambiente que exhiben una causa y pueden estar relacionados con cánceres específicos en los humanos; por ejemplo la industria química de tinturas, se desarrolló y floreció durante la segunda mitad del siglo XIX en Europa y antes de la 1ª Guerra Mundial, Alemania proveía al mundo más del 80 % de anilina y sus derivados relacionados con las aminas aromáticas. (Devita. V. T. 1989).

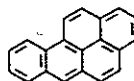
Algunos estudios epidemiológicos incriminan una principal relación de las aminas aromáticas, principalmente las naftilaminas y bencidina como carcinógenos en humanos; la diferente distinción en la naturaleza química del hollín puro y alquitranes implicados por Pott y Butlin (1892), comparadas con la pureza relativa de las aminas aromáticas sintéticas usadas en la industria de las tinturas, sugieren, que las diversas estructuras químicas son capaces de causar cáncer en los humanos Fig 1.



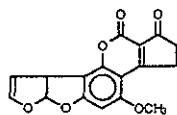
Dibenz(a,c)antraceno



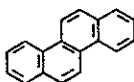
Dibenz(a,h)antraceno



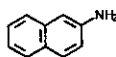
Benzopireno



Aflatoxina B1



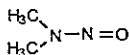
Querceno



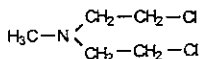
2-Naftilamina



Etil carbamato



Dimetilnitrosamina



Medoretamina



Etilenimina

Figura 1.- Estructuras representativas de algunos carcinógenos químicos

En 1925 Kennaway reporta el desarrollo de carcinogenicidad con compuestos del alquitrán por pirólisis orgánica simple, dichos compuestos estaban solamente constituidos por carbono e hidrógeno (Kennaway 1925). Posteriormente, en 1930 se sintetiza en el laboratorio la primera sustancia química carcinogénica (Kennaway 1930) el dibenz [a-h] antraceno, este compuesto posteriormente fué probado para ver su actividad carcinogénica de manera tópica en ratones, resultando ser una sustancia potencialmente carcinogénica.

Los hidrocarburos policíclicos tienen una variación en su potencia carcinogénica, por ejemplo el isómero del dibenz [ a-h ] antraceno, y el dibenz [ a-c ] antraceno presentan pequeños cambios en su actividad como sustancias químicas carcinogénicas.

Años más tarde Kinoshita demostró que el 4-dimetil aminoazobenceno, en la dieta también causa neoplasias en el hígado (Kinoshita R. 1936). Las nitrosaminas son una clase de compuestos en la que muchas de las cuales son efectivos carcinógenos químicos, y de una potencia importante en la génesis de neoplasmas humanos. Estas sustancias químicas son altamente carcinogénicas para el hígado y el riñón en ratones y otros mamíferos estudiados (Coulston F., Olajos EJ. 1982).

La carcinogénesis química (agentes químicos que causan cáncer), generalmente se debe a múltiples cambios en el material genético de las células.

Estos cambios confieren un selectivo avance ó aumento en el crecimiento sobre las células, comparado con las células normales, permitiendo la proliferación ó formación de tumores. Por lo tanto un carcinógeno es un agente que al ser administrado a animales de laboratorio induce un incremento estadísticamente significativo en la incidencia de neoplasias de uno ó más tipos histogénicos (Devita V.T. 1989).

Esta definición incluye la inducción de neoplasias que no son observadas, las que son usualmente observadas y usualmente encontradas. Aunque esta definición debiera ser importante para distinguir entre agentes que inducen neoplasias por acción directa y aquellos que producen neoplasia por acción indirecta.

Algunos agentes como los inmunosupresores, pueden incrementar la incidencia de neoplasmas en tejidos previamente expuestos a carcinógenos por efecto directo en el huésped.

Recientemente algunos cánceres pueden ser atribuidos a factores ambientales relacionados al estilo de vida; tales como el cigarro (tabaquismo), contacto con sustancias químicas en el lugar de trabajo y factores en la dieta (Anthony, J. et al. 1992).

## **I.2. ETAPAS DE DESARROLLO DEL CANCER.**

La carcinogénesis química se define operacionalmente por su habilidad de inducir tumores: Generalmente son cuatro tipos de respuesta los que han sido aceptados como evidencia de tumorigenicidad (Weisburger, J.H.1991).

- 1).- Un incremento en la incidencia de tumores formados en controles.
- 2).- La formación de tumores tempranos en controles.
- 3).- El desarrollo de diferentes tipos de tumores no vistos en controles.
- 4).- Un incremento en la multiplicación de tumores en animales individuales.

Una de las características ubieuas en la historia natural del desarrollo de neoplasmas *in vivo*, es el tiempo extendido; periodo entre el desarrollo inicial de un cáncer “esto es físico, químico, ó biológico” y la aparición de una neoplasia. Actualmente se acepta como evidencia sustancial que los neoplasmas son el resultado de una alteración en una célula libre, quién desarrolla una progenie dentro de la lesión neoplástica, la cual comienza después a evidenciarse clínicamente (Brand K.G. et al. 1975).

El periodo latente que precede al desarrollo del cáncer puede ser simplemente el resultado del continuo crecimiento de cada clona celular, hasta una ó más es llamado cáncer. Los cambios que continuamente están ocurriendo en este proceso, determinan la progresión de la neoplasia.

Experimentalmente la carcinogénesis química involucra mínimo tres estados: Iniciación, Promoción y Progresión (Anthony, J. et.al 1992)

### **I.2.1. INICIACION.**

Este estado es el mejor entendido y estudiado, el cual se puede dividir en tres pasos:

- a).- El carcinógeno es metabolizado (el agente es químicamente alterado dentro de la célula).
- b).- El carcinógeno químicamente alterado daña el material genético de la célula por medio de un ataque en sitios específicos a la molécula del DNA.
- c).- Este daño es convertido en un defecto genético, el cual puede ser heredado (una mutación), por toda la progenie de la célula mutada.

Este proceso ocurre intracelularmente y se da como el resultado de la acción de un agente físico, químico ó biológico, que altera de una manera irreversible la estructura de la herencia de la célula, provocando de esta manera que la célula tenga un potencial para desarrollar una clona de células neoplásicas (Devita V.T. et al 1989).

Algunos químicos que pueden causar cáncer no son por sí mismos carcinogénicos, pero sí dan riesgo de carcinogenicidad los derivados químicos que se forman durante su proceso metabólico. Un organismo no hace metabolitos potencialmente carcinogénicos para efectuar un daño, sino que la función de este proceso es formar metabolitos más hidrosolubles para ser fácilmente excretados por el riñón.

Desgraciadamente los derivados químicos producidos durante estados intermediarios de este metabolismo pueden dañar al DNA por ataque a él, formando así los llamados productos de adición, mejor conocidos como aductos (Anthony J. et al 1992).

### **I.2.2. PROMOCION.**

La promoción es el paso siguiente de la iniciación. Después de que la célula neoplásica se ha generado, esta lleva a cabo un proceso progresivo para formar un tumor

Este proceso de la carcinogénesis parece ser un proceso ininterrumpible y dicho proceso parece resultar de una variedad de factores, entre los que se encuentra la citotoxicidad, inhibición de la diferenciación celular, inmunosupresión, e inhibición de la comunicación intercelular. La principal característica del estado de promoción que lo distingue de la iniciación y la progresión, es la reversibilidad, este fenómeno es característico del estado de promoción. Las células neoplásicas en estado de promoción, que se desarrollan de células iniciadas, realmente son dependientes de la presencia de agentes promotores para su existencia en ese tejido. Los agentes promotores por definición no pueden iniciar pero sí pueden promover las células que han sido iniciadas por una diversidad de factores tales como las radiaciones ionizantes, contaminantes en la dieta, toxinas ambientales, sustancias químicas, etc. Por lo tanto, los agentes promotores son carcinogénicos en el sentido de que ellos pueden promover espontáneamente a la neoplasia, a una célula iniciada. Fig2.

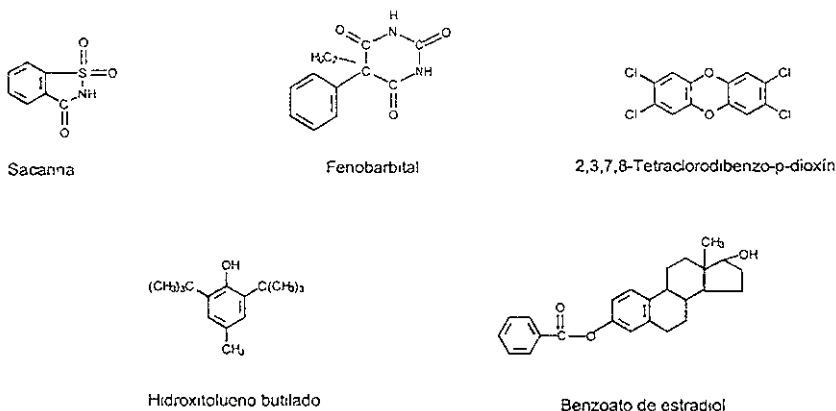


Figura 2.- Estructuras químicas de agentes promotores activos de carcinogénesis en varios tejidos y especies.

Cada promoción tumoral es inducida por diversas clases de sustancias químicas como los barbitúricos y carburos hidroclorados, alcohol y hormonas en adición con elevados o bajos



niveles de constituyentes de la dieta que algunas veces han mostrado tener ó exhibir actividad para promover tumores.

Los promotores tumorales no parecen tener interacción directa con el DNA, sin embargo, los tumores promovidos se potencializan con la habilidad para inducir división celular y para ejercer profundos cambios en la expresión génica, con lo cual se altera el control del crecimiento celular.(American Institute for Cancer Research 1997).

Los promotores tumorales también pueden incrementar indirectamente el stress-oxidativo ( ataque por radicales libres) y la lipo-peroxidación, los cuales provocan mayor daño sobre el DNA.

Estos eventos se manifiestan aparentemente por cambios en la estructura y organización de las células (morfología), por un incremento en su tasa de crecimiento ó mitosis.

En conjunto, hablar de promoción es considerar que se origina como una consecuencia de la continua exposición a las sustancias químicas carcinogénicas, las cuales pueden producir en determinado tiempo un daño al DNA ó promocionar la formación de tumores.(American Intitute for Cancer Research 1997).

Los agentes que son capaces de la iniciación, promoción y progresión al cáncer se conocen como **carcinógenos completos**.

Por otro lado la promoción de tumores puede ser modulada por varios factores ambientales, incluyendo la dieta, edad, balance hormonal y sexo. Por lo tanto con base en las características de la promoción tumoral, se puede definir el proceso como sigue (Devita V. T. et al. 1989):

La promoción es el estado existente de desarrollo neoplásico, el cual se caracteriza por:

- 1).- La reversible expansión de la población de células iniciadas.
- 2).- La reversible alteración de la expresión genética.

### **I.2.3. PROGRESION.**

El estado de progresión del desarrollo neoplásico todavía no se ha definido claramente, de cualquier manera el modo de acción conocido de los agentes iniciadores y agentes promotores, que conllevan a la formación de las neoplasias irreversibles ya sean benignas ó malignas, son características de este estado de desarrollo neoplásico.

La progresión se ha definido como aquel estado de carcinogénesis exhibida y medible y/o cambios morfológicos y cariotípicos en la estructura del genoma celular; además, los cambios vistos en el cariotipo en este estado son un reflejo de inestabilidad cariotípica, los cuales en turno pueden conducir a una serie de cambios característicamente vistos en neoplasias malignas incluyendo una menor diferenciación morfológica, incremento en la velocidad de crecimiento, invasión y metástasis, amplificación génica, translocaciones cromosómicas y anomalías relacionadas a diversas alteraciones en la expresión génica.

De las características y definiciones de los tres estados de desarrollo neoplásico, es obvio que dos de ellos, iniciación y progresión, parecen involucrar cambios en la estructura del genoma de la célula.

La iniciación es el resultado de múltiples puntos mutacionales relacionándose a agudas alteraciones genómicas; mientras que la progresión, es resultado de anomalías genéticas incluyendo principalmente translocaciones cromosómicas, inestabilidad cariotípica y deleciones. Por lo tanto, esto hace posible que un carcinógeno completo, especialmente en altas dosis, pueda

transformar directamente una célula normal e inducirla a entrar al estado de progresión completándose así la neoplasia (Devita . V.T. et al 1989).

### **I.3. METABOLISMO Y MODO DE ACCION DE AGENTES CARCINOGENICOS.**

Es bien sabido que no todos los agentes químicos tienen el mismo modo de acción para causar mutagénesis y cáncer, la mejor manera de estudiar los mutágenos y carcinógenos químicos es la interacción y formación de aductos con el DNA. La interacción de algunos compuestos con estructura plana consiste en la fusión de anillos aromáticos que comienzan a acomodarse electrostáticamente dentro de la cadena de los pares de bases del DNA (Stich H. F. et al. 1981). Estos químicos planos causan mutaciones al gen que se caracteriza por la adición ó deleción de pares de bases durante la síntesis del DNA. .

En el caso de la formación de aductos, muchas sustancias químicas modifican al DNA e interfieren potencialmente con la información mediada del DNA durante su replicación

Entre las sustancias químicas que son metabolizadas por bacterias intestinales, se incluyen algunos carcinógenos como:

- 1,2-Dimetil Hidracina.
- Fármacos como la ciclosporina.
- Aditivos alimentarios como los nitritos.
- Ciclamato.
- Colorantes alimentarios.

Como anteriormente se mencionó, algunos mutágenos y carcinógenos químicos pueden ser activados dando especies altamente reactivas como radicales libres, por la función mixta de oxidasas en el núcleo. Presumiblemente una localización por la activación actual, permitiría esta

corta vida de especie para llegar hasta el DNA y por medio de eso causar mutaciones e inducir cáncer (Stich H. F. et al. 1981).

Los grupos metabolizados de los carcinógenos químicos conllevan a la formación de compuestos altamente reactivos que pueden reaccionar no enzimáticamente con sitios nucleofílicos en proteínas, aminoácidos específicos y ácidos nucleicos. Esto propone que las sustancias químicas carcinogénicas son ó están transformadas dentro del metabolismo, reaccionando electrofílicamente (compuestos químicos con sitios deficientes de electrones) y que ejercen sus efectos biológicos por medio de una interacción covalente con macromoléculas celulares, siendo la molécula de interacción más probable el DNA.

La formación de epóxidos intermediarios en el metabolismo de los hidrocarburos policíclicos, reaccionan con ácidos nucleicos y proteínas en ausencia de muchos sistemas enzimáticos para metabolizarlos (Devita V.T. et al. 1989).

Evidencias recientes, también indican que los radicales libres derivados de sustancias químicas carcinogénicas pueden ser producidos metabólicamente y no enzimáticamente.

Los radicales libres no llevan cargas, pero poseen un par libre de electrones, que hacen al radical extremadamente reactivo, por lo tanto éstos pueden jugar un papel importante en el proceso de promocionar el desarrollo del cáncer. Todas estas investigaciones explican como una sustancia que no es carcinogénica puede llegar a ser potencialmente carcinogénica, dependiendo de la capacidad metabólica de la misma sustancia dentro de la célula.

No todos los agentes carcinógenos requieren de un metabolismo intracelular para llegar a producir cáncer, por ejemplo algunos agentes alquilantes como las mostazas nitrogenadas tienen una acción directa en el DNA sin la necesidad de llegar a metabolizarse.

Un aspecto importante de estos agentes químicos carcinógenos es la naturaleza de las interacciones críticas moleculares entre estos últimos carcinógenos y sus componentes de la célula, quienes reaccionan con el carcinógeno conduciendo al cambio neoplásico.

Muchos de los procesos involucrados en la reparación del DNA son importantes para el proceso de carcinogénesis; experimentos substanciales, han demostrado la evidencia de daño químico al DNA después de la administración de sustancias químicas carcinogénicas a bajas dosis. Otras evidencias, sugieren que la persistencia de daño irreparable del DNA, inducen la formación de aductos químico-DNA, y que esta interacción puede ser la causa de la mutación, teniendo como resultado la iniciación de la célula afectada (Devita, V. et al. 1989).

La interacción y reacción de carcinógenos químicos con el DNA, parece ser el principal mecanismo para sus efectos carcinogénicos y la probabilidad de que cada evento mutacional puede ocurrir en uno ó más sitios genéticos específicos ha sido extensamente considerado con la demostración de virus oncogénicos específicos, especialmente retrovirus que contienen dentro de su genoma genes directamente involucrados con el proceso oncogénico.

Los estudios que se han realizado directamente en virus y humanos, han servido para investigar la estructura y expresión de los oncogenes celulares (proto-oncogenes) tanto en células neoplásicas como en células normales tratadas con carcinógenos químicos; todo esto es una considerable evidencia de que cierto número de **proto-oncogenes** son expresados con mayor frecuencia en muchos neoplasmas humanos que en sus tejidos normales de origen.

El mecanismo por el cual se incrementa la expresión, o "activación" se ha estudiado e incluido en el radio de acción del mecanismo genético de la base mutacional ó deleciones en secuencias para alterar la expresión resultante del aumento de transcripciones, amplificación genética, ó cambios por metilaciones al gen. Por lo tanto el mecanismo involucra la activación del

**proto-oncogen** el cual puede ser mutacional, transcripcional, ó ambos (Weisburger. J. H. et al. 1991).

Estos estudios sugieren que la activación mutacional, de un **proto-oncogen** específico, puede estar involucrado en la iniciación ó la promoción de la carcinogénesis en estos sistemas. Por lo tanto los estudios en el humano sugieren un importante papel de la activación de los **proto-oncogenes** en el estado de progresión, y de igual manera se sigue determinando la activación mutacional de **proto-oncogenes** representando la mutación, el principal blanco carcinógeno-DNA que inicia el proceso total de la carcinogénesis química en general.

El descubrimiento importante de que el agente carcinógeno interactúa con el DNA proviene de la base de que el estado permanente neoplásico, podría ser manifestado por una alteración directa en el genotipo. Cierta número de consideraciones determinan que el DNA es un excelente blanco para los agentes carcinógenos.

Los carcinógenos que interactúan y alternan con el DNA, son clasificados como **genotóxicos**, ésta categoría contiene todos los carcinógenos orgánicos clásicos, que son reactivos electrofílicos durante o después de su metabolismo.

Los carcinógenos de esta categoría pueden ser identificados por sus efectos genotóxicos a través de ensayos *in vitro* y de corto tiempo; estas mismas interacciones que alteran el DNA son la base para la carcinogenicidad de estos compuestos.

La categoría de agentes carcinógenos **epigenéticos** contiene todas las clases de carcinógenos por las cuales la evidencia de genotoxicidad no ha sido encontrada, estos nuevos estudios confirman la carencia de la interacción con el DNA de estos químicos. Otro posible mecanismo puede involucrar tejidos crónicos dañados, desbalance humoral, efectos inmunológicos ó actividad promocional en las células que son genéticamente alteradas ó han sido independientemente alteradas por carcinógenos genotóxicos.

La clasificación propuesta de los agentes carcinógenos se ha dividido en dos categorías generales “genotóxicos y epigenéticos”.

La categoría genotóxica contiene a los agentes que funcionan como reactivos electrofilicos, mientras que la amplia, segunda categoría designada como carcinógenos epigenéticos, comprende aquellos agentes carcinógenos para los cuales no se evidencia la interacción directa con el material genético existente (Weisburger J.H. et al. 1991).

Cada año un gran número de químicos son introducidos en los alimentos y el medio ambiente. Por lo tanto esto mismo es de gran importancia para identificar potentes carcinógenos y mutágenos (Ajay K. Jain. 1989).

La última acción directa de carcinogenicidad también resulta de la activación bioquímica metabólica de compuestos precursores, frecuentemente llamados pre ó procarcinógenos; de esta manera, a la larga clase de procarcinógenos se incluyen los típicos agentes químicos como los hidrocarburos aromáticos polinucleares, ciertas aminas aromáticas, alquil nitrosaminas, y compuestos relacionados a las micotoxinas como las aflatoxinas  $\beta_1$ , y toxinas de plantas como el safrol. Este agente químico es un compuesto relacionado a metilendioxiálquil ó alil bencenos, los cuales son agentes saborizantes naturales y sintéticos (Weisburger J.H. et al. 1991). Fig 3.

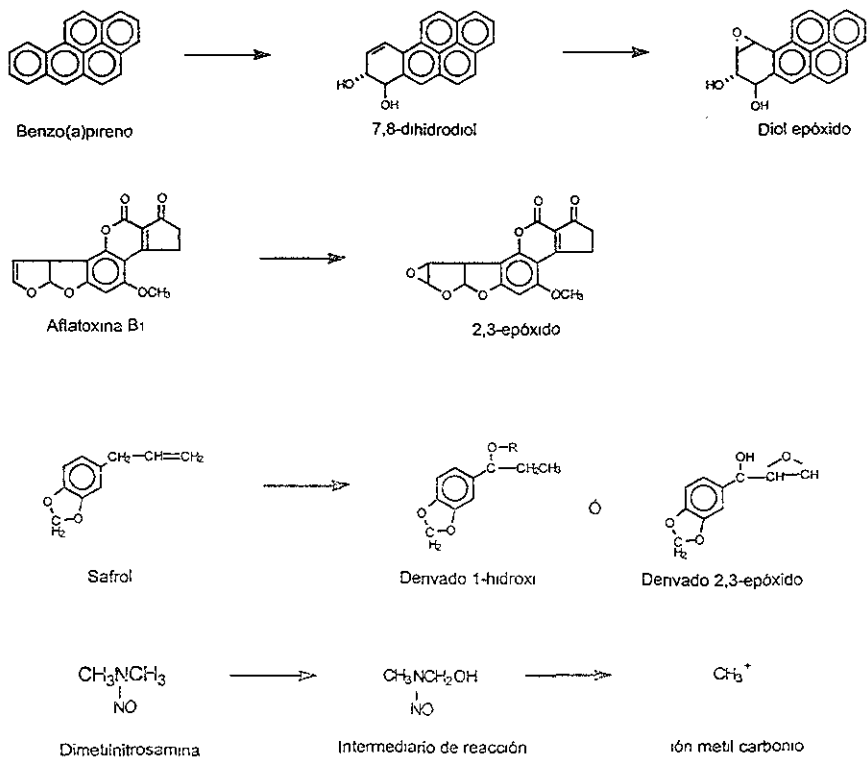


Fig 3.- Ejemplos de algunas estructuras representativas de procarcinógenos ó carcinógenos secundarios.

Hasta ahora solo el **safrol** ha sido estudiado en algunos elementos de la dieta, apreciándose cerca del 0.5 % en la dieta , teniendo así la necesidad de demostrarse su carcinogenicidad junto con otros compuestos. Todo esto es importante porque la reacción de activación involucra 1-hidroxilación y probablemente también epoxidación (Miller. 1978).

El **safrol** es un agente potencialmente genotóxico que se le ha encontrado comúnmente en los productos naturales, y puede actuar como cofactor en intercambios geno-toxicológicos de



otros agentes químicos ambientales (Aja y K. Jain. 1989). Entre las anormalidades cromosómicas que se le atribuyen están:

- Formación de aductos.
- Rompimientos en el DNA.
- Intercambios.
- Cromosomas dicéntricos.

El safreí, el estragol, el metil eugenol y otros compuestos relacionados, están presentes en muchas plantas comestibles y se ha observado que son agentes carcinogénicos en roedores y sus metabolitos principales son altamente mutagénicos (Ames. 1983).

#### 1.4. FACTORES DE LA DIETA RELACIONADOS AL PROCESO DE CÁNCER.

Actualmente se han realizado estudios básicos de carcinogénesis en las poblaciones, para evaluar el posible efecto de la dieta como un posible factor de etiología del cáncer debido al creciente compromiso que se tiene para investigar este campo.

Muchos compuestos que, marcadamente influyen en el crecimiento y desarrollo de cánceres en los modelos animales y cultivos celulares han sido aislados de los alimentos. Estas sustancias representan una diversidad de grupos estructurales con múltiples efectos biológicos, amplia variedad en eficacia de su toxicidad y mecanismos de acción. Recientemente se ha encontrado que una variedad de sustancias son el origen principal de mutagénesis y carcinogénesis dentro de la dieta del ser humano, un gran número de estas sustancias son sintetizadas en las plantas comestibles (Devita V.T. et al. 1989).

Las plantas en la naturaleza, sintetizan agentes químicos tóxicos, aparentemente como defensa primaria contra una multitud de bacterias, hongos, insectos y otros animales depredadores. Las plantas de la dieta de los humanos no son la excepción y el número que se ha

incrementado de casos de cáncer debido a ellas, ha contribuido a la identificación de muchos mutágenos naturales, teratógenos y carcinógenos que están constituidos dentro de la dieta de los humanos.

Sin embargo, esta disponible muy poca información acerca de la toxicología de algunas de las toxinas de las plantas en la dieta; no obstante, siempre estamos expuestos a muchas de estas toxinas que pueden ser nuevas para los seres humanos, en el sentido de que la dieta del humano ha tenido cambios drásticos en el transcurso del tiempo (Ames. 1983).

Los derivados genotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos que se han encontrado dentro de la dieta y cuyo efecto se ha demostrado en modelos animales, contemplan compuestos como Fenoles, Alcaloides, Glicocalcoides, Isotiocianatos, Alcohol, Quinonas, Acidos grasos y Aminas heterocíclicas aisladas del proceso de cocción de las proteínas.

Existen otros carcinógenos naturales dentro de los cuales se incluyen los taninos encontrados en las hierbas del Té, hidracinas detectadas en los hongos comestibles, y por último el safrol junto con alquil bencenos los cuales se han encontrado en saborizantes y especias (Korpassy. 1961; Toth. 1979; Miller. 1979).

Otro notable origen de carcinógenos en la dieta del hombre, son las nitrosaminas, las cuales son derivadas de la interacción de nitritos con aminas secundarias y terciarias. Las nitrosaminas como la dimetil nitrosamina, son potentes carcinógenos que generan diversos tipos de cánceres en muchas especies de animales, entre ellas el hombre (Palmer S. 1985).

Muchos derivados alimenticios que son mutagénicos y carcinogénicos, y que han sido estudiados detenidamente, requieren de una activación metabólica para reactivar la especie electrofílica, algunas de las cuales como el mutágeno cafeína se cree que actúa a través de la inhibición del proceso de reparación del DNA (Ames 1983). Al evaluar el riesgo que puede sufrir el hombre en la exposición de estos agentes químicos, es importante considerar que la

carcinogénesis química es un proceso de multiestados, que ocurren durante un prolongado periodo de tiempo.

Las exposiciones individuales con carcinógenos y mutágenos de la dieta, son variables en términos de dosis, frecuencia y duración; aún así a través de la exposición, el riesgo que tiene el hombre de contraer cáncer por los carcinógenos y mutágenos de la dieta es incierto.

Las primeras líneas de evidencia que sugieren que los alimentos y la nutrición afectan y conllevan a un riesgo de desarrollar cáncer, vienen del examen de los patrones de la dieta en los sitios y lugares específicos. Los índices de cáncer pueden cambiar rápidamente, por ejemplo, en los países desarrollados, el cáncer de estómago ha ido disminuyendo, mientras que los índices de cáncer de colon, próstata y seno han ido ascendiendo. También los patrones de cáncer están cambiando rápidamente dentro de estos mismos países económicamente desarrollados que empiezan a industrializarse y a urbanizarse; factores como el tiempo de residencia, la migración y urbanización, evidencian que el índice de cáncer, está raramente influenciado por factores ambientales, incluyendo la dieta.

La dieta que se consume en países económicamente desarrollados y áreas urbanas, son realmente bajas en cereales, tubérculos y otros alimentos con almidón, y es relativamente alta en azúcar, grasa y proteína de origen animal, sal, alcohol y carne, con sus respectivos derivados.

En 1980 Doll y Peto intentaron la primera cuantificación relativa de la contribución ambiental de varios de los factores de riesgo en la dieta, tabaco y alcohol, resaltando que la dieta puede ser una de las causas de cáncer; identificando a varios de sus constituyentes como agentes que pueden contribuir a incrementar el riesgo de desarrollarlo.

Muchos estudios de dieta y cáncer, examinan la posible relación de algunos de sus constituyentes con el riesgo de presentar cáncer, estos constituyentes no solo incluyen

macronutrientes y micronutrientes, sino a compuestos bioactivos que no han sido considerados tradicionalmente relevantes para la salud pública.

Prácticamente todas las dietas incluyen sazoadores, saborizantes y salsas hechas a partir de hierbas, especias y otras sustancias comestibles que tienen aroma y color. El consumo de hierbas, especias y condimentos, varía ampliamente en diferentes partes del mundo. Mucha de la cocina tradicional es tipificada por el uso de hierbas, especias y condimentos ya sean solas o en combinaciones mezcladas con los alimentos. Las hierbas de especias ó condimentos, pueden tener funciones específicas, éstas pueden hacer de otro modo deliciosa la comida y también pueden ser de carácter conservativos.

El estudio epidemiológico del cáncer en humanos dependiente de la dieta es limitado por la dificultad de cuantificar la variada alimentación de los individuos, otros casos están dirigidos a poblaciones que tienen una relativa similitud en el uso de hierbas, especias y condimentos que generalmente consumen por sus tradiciones culinarias.

Una de las especias ó condimentos más ampliamente usados en el ámbito mundial es la **Pimienta negra** (*Piper nigrum*), la cual contiene una serie de compuestos con características altamente carcinogénicas, convirtiéndola en una especie de gran interés para el estudio de su potencial mutagénico, carcinogénico y teratogénico.

## **I.5. PIMIENTA NEGRA.**

La costa sudoeste de la India, actualmente llamada Malabar, era antes conocida como Malichabar (tierra de la pimienta), del sánscrito *malicha* (pimienta) y del árabe *bar* (tierra). De hecho, esta franja litoral, relativamente estrecha, constituye la patria original del pimentero, una liana que puede alcanzar hasta seis metros de altura.

En nuestros días el cultivo de la pimienta es común a todas las regiones tropicales, pudiéndosele encontrar en plantaciones donde los renuevos, trepan por las estacas hasta cuatro metros de largo (Maistre J. 1969).

El género *Piper* pertenece a la clase de las *dicotiledóneas*, del orden de los piperales y familia de las piperáceas. Este género comprende a más de 600 especies, una decena de las cuales dan productos más o menos utilizados, ya sea como especias o plantas medicinales (Atal C.K. et al. 1975).

*Piper nigrum* cuyo número cromosómico es  $2n = 52$ , se presenta bajo una forma de liana perene, con hojas perennes, que trepa alrededor de un tutor y que puede alcanzar una altura de hasta 10 metros.

La presentación de la pimienta es a través de granos casi esféricos cuyo diámetro está comprendido entre 3 y 6 milímetros ( en general de 4 a 5 milímetros), de superficie reticulada y más o menos rugosa; el color va del marrón oscuro al negro ó al gris oscuro (Hidalgo C. 1983).

Las plantas jóvenes no empiezan a producir sino hasta el tercer año, y proporcionan la cosecha máxima (hasta 3.5 kg de bayas por pic) entre el séptimo y el noveno año. Se recolectan las bayas verdes ó amarillas antes de su madurez, marcada por una coloración roja (Maistre. 1969).

La pimienta es la especia más utilizada en el mundo, como así lo sugiere la diversidad de su empleo y como lo atestigua el hecho de que está siempre presente, junto a la sal, en las mesas de todos los restaurantes. Se emplea entera ó molida en el último momento, sola o en mezclas, para acompañar la carne, los embutidos, el pescado, para condimentar las sopas, las salsas, las verduras, las ensaladas etc., debido a que su olor es muy picante y ardiente (Maistre. 1969).

### I.5.1. HISTORIA.

El nombre genérico de la pimienta, deriva probablemente del sánscrito, Pippali, el cual hace referencia a la semilla seca y aromática de *Piper nigrum*. La familia de las piperáceas incluye 9 géneros y cerca de 1400 especies. Las especies de pimienta son plantas preferentemente tropicales, pero algunas son arbustos (Hidalgo. 1983).

Las primeras referencias del uso de la pimienta negra, datan desde hace 3000 años, y fueron reportados en la literatura médica sánscrita.

Después de la conquista de Cesárea y Palestina, en el año 1101 los soldados victoriosos de Génova recibieron dos porciones de pimienta por una parte de lo perdido. En la Edad Media, las rentas, las aportaciones y los tributos, eran pagados frecuentemente con la pimienta, y en algunas partes de Europa se prefería este tipo de pago que el recibir dinero; el cual era llamado "Pappercom rent", que en la actualidad se sigue utilizando este término como una cosa nominal ó trivial (Rosengarten).

Durante la Edad Media, las ciudades de Alejandría, Génova y Venecia, fueron el centro comercial de la pimienta, hasta que en 1498 el navegante portugués Vasco de Gama descubre la "Ruta de las Especias"; la cual recorre desde Lisboa, hasta las costas de Malabar en la India, convirtiéndose Portugal en el principal centro comercial, hasta que en 1595, los holandeses Houtman y Van Neeck comienzan sus viajes hacia Indonesia, compitiendo por el monopolio creado por Portugal.

En el siglo XIX Inglaterra se convierte en el centro mundial de las especias, incrementando la producción, bajando los precios y aumentando el consumo de la pimienta negra. Con la caída de la compañía Holandesa del Este de la India, (The Dutch East India Company) coincide la entrada de la especia a los Estados Unidos. El primer trato comercial de la especia en

América, data de 1797 por el capitán Jonathan Carnes de Salem Massachusetts; el cual compró a un Rajha de Sumatra un embarco de la especia por un valor de 100 000 dólares (Rosengarten).

Como podemos constatar la pimienta negra ha tenido un papel relevante en el pasado, y en el presente de la economía mundial, y lo más probable es que en el futuro siga teniendo la misma importancia.

### **I.5.2. ECONOMIA DE LA PIMIENTA NEGRA.**

El primer trato comercial de la pimienta negra directo con nuestro país fué en 1961 con Sarawak, Malasia e Indonesia, siendo las variedades sarawak-X, sarawak-VII, kaluvally, balancotta, belantung. las que destacan por su producción: (Hidalgo. 1983). En México no existen plantaciones comerciales de pimienta negra, razón suficiente por la que se tiene la necesidad de importar.

La introducción de la pimienta negra a los campos agrícolas mexicanos se presenta como una alternativa para disminuir el gasto de importación. En México existen centros de investigación, dedicados a la propagación de la pimienta negra, como tal es el caso de “El Palmar”.

Nuestro país cuenta con las condiciones adecuadas de clima y suelo para el cultivo de pimienta negra; actualmente el problema más grande para su propagación, es que su comportamiento enraizado comercial es muy bajo; aunado a esto la planta de la pimienta negra es muy susceptible a ser infectada por el hongo *Phytophthora palmivora* (Rodríguez M. 1973). Por estas razones la comercialización de la pimienta negra en México sigue siendo a partir de importaciones, proveniente principalmente de la India, Indonesia y Brasil (Hidalgo. 1983).

El INEGI por medio de la Comisión Nacional de Alimentos nos proporciona datos acerca de la importación de diversas especias donde se incluye a la pimienta negra (Comisión Nacional de Alimentos INEGI 1997). Tabla 1.

**IMPORTACION DE LOS PRINCIPALES PRODUCTOS ALIMENTICIOS POR TIPO DE BIEN  
SEGUN ACTIVIDAD ECONOMICA DE ORIGEN 1986-1996  
(CIFRAS EN MILES).**

ESPECIAS	UNIDAD	TOTAL Dólares	BIENES DE CONSUMO Dólares	BIENES DE CONSUMO INTERNO Dólares
1986	KG	9891	6306	3585
1987	KG	11270	7590	3680
1988	KG	11846	6515	4531
1989	KG	19217	15778	3439
1990	KG	25386	23087	2301
1991	KG	31971	24400	4571
1996	KG	27537	23649	3888

TABLA 1.- Valores estadísticos de consumo y cantidades importadas en México incluyendo los bienes de capital de diferentes especias, entre las que se encuentra la pimienta negra.



“CONSUMO DE PIMIENTA NEGRA “PER CAPITA”

(GRAMOS POR HABITANTE Y POR AÑO).

PAIS.	1937-1939	1950-1953	1954-1958	1954-1958 Porcentaje de antes de la Guerra.
Argelia.		22.68	59.42	
Argentina.	57.45	8.62	37.65	66
Australia.		37.20	72.57	
Austria.	7.26	22.23	45.34	626
Bélgica.	42.18	23.13	49.90	118
Brasil.	50.35	19.05	24.49	49
Canadá	81.65	63.50	81.65	100
China continental.	4.08		0.91	
Dinamarca.	66.68	34.93	67.58	102
Francia	60.33	33.57	49.90	83
Alemania.	79.83	32.66	63.50	80
Grecia.	49.90	17.69	40.82	82
India.	57.15	21.77	34.02	59
Indonesia.	70.31	14.06	72.57	103
Irán.	20.87	8.17	13.15	63
Italia.	41.73	17.69	31.75	76
Japón.		0.91	3.18	
Países Bajos.	63.95	14.97	35.38	
Perú.		5.90	27.22	
Suecia.	136.99	44.90	83.46	61
Túnez.			<b>220.90</b>	
R.A.U.	49.90	28.12	19.50	39
Reino Unido.	58.97	33.11	57.61	98
Estados Unidos.	120.65	78.47	99.79	83
Rusia.			22.68	
Yugoslavia.	19.96	3.18	10.43	52

TABLA 2.- Consumo mundial estimado de la pimienta negra. (Maistre 1969).

### I.5.3. COMPOSICION QUIMICA DE LA PIMIENTA.

La composición química de las pimentas varía no solamente según sea blanca o negra, sino también según la calidad , la procedencia, etc. Kõning cita las proporciones que aparecen en la tabla 3: (Maistre 1969).

#### ANALISIS QUIMICO DE LAS PIMIENTAS BLANCAS Y DE LAS PIMIENTAS NEGRAS.

(VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJES).

	PIMIENTA NEGRA		PIMIENTA BLANCA	
	MAXIMA	MINIMA	MAXIMA	MINIMA
HUMEDAD	15.60	9.56	16.50	9.90
TOTAL DE MATERIAS PROTEICAS	12.66	10.80	12.40	9.80
ACEITES ESENCIALES	2	1	2	1
ALMIDON E HIDRATOS DE CARBONO	50	32.1	69.0	54.3
CELULOSA	15.05	11.9	7.8	4.2
CENIZAS	5.9	3.4	3.0	0.8
EXTRACTOS DE ALCOHOL SECO	13.3	6.5	11.9	8.5

TABLA 3.- Análisis químico y comparativo entre la pimienta negra y la pimienta blanca; mostrando que ambas especias contienen la misma cantidad porcentual de aceites esenciales; sustancias que son las responsables del olor y sabor característico de ambas especias.

La composición química de las pimientos negras y blancas presentan diferencias muy notables. Estas últimas contienen más almidón y en consecuencia menos celulosa, cenizas y resinas, como lo muestra la tabla 4 (Maistre. 1969).

COMPOSICION QUIMICA COMPARADA DE LAS PIMIENTAS NEGRAS Y DE LAS  
PIMIENTAS BLANCAS.

(VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJES).

	PIMIENTA NEGRA.	PIMIENTA BLANCA.
CENIZAS.	4.51	1.62
NITROGENO.	1.61	1.56
CELULOSA.	16.49	6.35
SACARINAS.	42.45	62.30
MATERIAS GRASAS.	8.10	9.22
EXTRACTOS ALCOHOLICOS.	14.66	11.04
PIPERINA.	9.20	8.59
ESENCIA.	1.56	1.86
RESINA.	1.53	1.15

TABLA 4.- Valores porcentuales de los diferentes componentes de la pimienta negra y pimienta blanca; mostrándose que la pimienta negra contiene un mayor porcentaje de resinas lo que le da un sabor más picante.

La diferencia que existe entre las cifras que se refieren a los dos tipos de pimienta tiene dos causas principales:

- a).- eliminación de una parte de las envolturas del fruto para la preparación de la pimienta blanca.
- b).- las condiciones de la recolección según el tipo de pimienta a preparar.

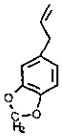
En cuanto a los componentes que se encuentran en el fruto de la pimienta negra se pueden mencionar a:  $\beta$ -metil-pirrolin, piperitina,  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno, camfeno, sabineno, miristicina, limoneno,  $\alpha$  y  $\beta$ -terpinenos, p-cimeno,  $\alpha$ -tujeno,  $\delta$ -careno, felandreno,  $\alpha$ -bergamoteno,  $\beta$ -cariofileno, epóxi-dihidro cariofileno, ácido fenilacético, dihidro carveol, piperonal, criptona y citronelol. Fig4

Con respecto a la semilla ésta contiene: Piperina, chavicina, piperatina, miristicina, felandrena, piperidina, safrol,  $\alpha$ -limoneno, l-pineno, y linalol; estos últimos se han encontrado que son agentes potencialmente carcinogénicos en ratas (El-Mofly 1985.; Abraham 1989.; Atal 1975.; Gessener 1975.; y Barcelo. 1976).

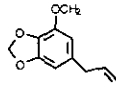
#### 1.5.4. USOS DE LA PIMIENTA NEGRA

El principal uso de pimienta negra es como condimento en el arte culinario, sin embargo también es utilizada en la medicina tradicional como tónico estomacal, pues estimula a la mucosa estomacal aumentando las secreciones gástricas, de ahí la conveniencia de añadirla en la elaboración de carnes frías. Así mismo es utilizada en la elaboración de alimentos manufacturados y precederos, pues sirve como conservador y preservador (Hidalgo. 1983; Abraham. 1989; El-Mofly. 1985).

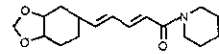
También existen reportes de que las raíces de algunas especies de pimienta previenen la concepción, otros han dicho que las hojas y el tallo tienen efecto de antifertilidad.



Safrol



Misticina



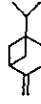
Pipenna



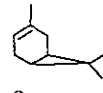
Limoneno



beta-terpineno



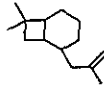
Sabineno



Careno



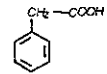
Cimeno



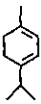
Carofileno



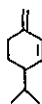
beta-pineno



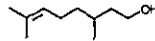
Acido fenil acético



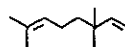
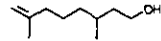
alfa-Felandreno



beta-Felandreno



Mezcla citronelol



Linanolol

Figura 4.- Principales componentes de la pimienta negra

Los frutos de algunas especies se han utilizado en la medicina occidental por más de once siglos como remedio de enfermedades del tracto genitourinario; en la India, las comadronas hacen uso de algunas especies de pimienta por sus propiedades oxicínicas (Atal . et al. 1975).

## **I.6. ANTECEDENTES GENOTÓXICOS DE LA PIMIENTA NEGRA.**

La pimienta negra al ser considerada el principal condimento a nivel mundial en la cocina internacional y la segunda especia más utilizada en el arte culinario mexicano después del chile, ha despertado el interés de algunos científicos para conocer los posibles efectos nocivos sobre la salud humana.

La pimienta negra contiene pequeñas cantidades de safrol (10 % por peso ), los extractos de pimienta negra, causan tumores de piel en ratones y sapos egipcios. De acuerdo a los estudios antes mencionados, una estimación de daño por la pimienta negra en la ingesta del humano, sería cerca de 160 mg/Kg por día consecutivos durante 3 meses (Concon. et al. 1979). Tal es el caso de Concon, quién proporcionó la primera evidencia de carcinogenicidad de la pimienta negra, al hacer uso de un extracto de la misma y aplicarlo subcutáneamente en ratones albinos Swiss, observando que había una inducción de tumores localizados en pulmón, hígado y piel (Concon. et al. 1986).

Siguiendo los estudios de Concon, El-Mofty. et al. en los que se administraron a un anfibio (Bufo regularis) por tres vías diferentes, (subcutánea, intraperitoneal y por forzamiento de ingestión), un extracto de pimienta negra, observando la formación de tumores primarios en hígado y la formación de tumores secundarios en riñón, bazo, ileon, y estómago (El-Mofty 1985).

Los tumores de hígado son diagnosticados como carcinomas hepatocelulares, y los tumores de los demás órganos son diagnosticados como la metástasis de los tumores primarios.

El-Mofty concluye que no importa la vía de administración del extracto de pimienta negra, ya que siempre se observó la aparición de tumores (El-Mofty.1985).

Por otra parte, Susan Abram et. al, realizaron estudios sobre el posible efecto clastogénico provocado por un extracto de pimienta negra en células mitóticas de *Vicia faba*, expresados por un incremento del intercambio de cromátidas hermanas más aberraciones cromosómicas (rupturas cromosómicas y formación de aductos), observando que éstos tenían un aumento proporcional a la concentración del extracto utilizado, además de que observaron una disminución del índice mitótico proporcional a la concentración (Abraham S. 1989).

Por el interés de encontrar más efectos genotóxicos de este importante condimento, Guzman y Mota. 1993, en una tesis de licenciatura para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, trabajaron de igual modo un extracto alcohólico liofilizado de pimienta negra, haciendo un estudio *in vitro e in vivo*, evaluando el incremento del intercambio de cromátidas hermanas. Dicho estudio se realizó administrando por vía intraperitoneal el extracto de pimienta negra en ratones y en un cultivo de linfocitos a 92 horas con y sin la fracción microsomal S9, encontrando en dicho estudio, que el extracto de pimienta negra induce un incremento en el intercambio de cromátidas hermanas de forma moderada pero constante y proporcional al aumento de las dosis empleadas, y que la cinética celular se vio afectada por el aumento de la dosis del extracto de pimienta negra.

La pimienta negra es considerada como carcinogénica, ya que entre sus componentes se encuentran varias sustancias reportadas como carcinógenos, probados por varios investigadores de manera individual, entre las que destacan por sus propiedades carcinogénicas se encuentran el safrol, los taninos, piperina, miristicina, chavicina, y piperitina, además existen terpenos que son considerados como agentes potencialmente carcinogénicos y promotores de tumores entre los que

destacan el d-limoneno, l-pineno, linalol, y felandreno (Abraham. 1989; Atal. 1975; y El-Mofty 1985).

En vista de la importancia de este condimento alimenticio y de los antecedentes genotóxicos antes mencionados, el presente trabajo se decidió evaluarlo en un estudio más prolongado por la vía oral y a dosis menores que estén más cercanas al consumo humano , apoyándonos en la técnica de micronúcleos en eritrocitos normocrómicos de sangre periférica, tomando como referencia para el estudio genotóxico el país de Túnez como el más alto consumidor de este condimento. Tabla 2.

### **I.7. IMPORTANCIA DE LA TECNICA DE MICRONUCLEOS.**

Con la actual preocupación por el potencial genotóxico y efectos carcinogénicos de exposiciones a los agentes ambientales en aire, agua, dieta, lugar de trabajo, etc.; cada vez es más necesario el empleo de indicadores sensitivos de daño al DNA para determinar la extensión por la cual las exposiciones contribuyen a un daño genotóxico a los humanos (Smith, D.F. and MacGregor. 1990).

La evaluación de micronúcleos, en eritrocitos humanos y linfocitos son uno de los marcadores para determinar los efectos genotóxicos a las exposiciones anteriormente mencionadas (Vainio H. 1985).

La medición de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea ha comenzado a establecerse como una rutina de búsqueda de daño citogenético con pruebas realizadas *in vivo* (Heddle, J.A., MacGregor, J.T. 1983), y han sido aplicadas a los humanos con exposiciones a diferentes drogas



químicas ó exposición a agentes genotóxicos dentro de los lugares de trabajo.(Goetz, P., Sram, R. J. 1975; Abe, T.; Isemura, T.1984) . Este ensayo puede ser realizado en 2 poblaciones de eritrocitos:

Los eritrocitos policromáticos (inmaduros) EPC, los cuales se tiñen positivamente por el RNA residual y que comúnmente son conocidos como reticulocitos, y los eritrocitos normocrómicos (maduros) ENC los cuales no son teñidos debido a que carecen del RNA residual.

Los reticulocitos recién formados, maduran dentro de la circulación a ENC después de 1-2 días (Harris, J. W., and Kellermeyer, R. W. 1970); por lo tanto los reticulocitos micronucleados, demuestran reciente exposición genotóxica. Los ENC maduros tienen una vida media de 120 días (Harris, J. W. et al. 1970), por lo tanto estos eritrocitos reflejan exposiciones genotóxicas subcrónicas ó crónicas ya que se mantienen aproximadamente 4 meses antes de ser depurados por el sistema retículo-endotelial.

Diversos agentes como la Mitomicina C y la Colchicina, son capaces de causar daño citogenético en animales de experimentación, el potencial que éstos poseen para causar efectos similares en el humano es obvio. El método clásico para evaluar daño citogenético es el estudio de preparaciones de metafases de células tratadas con un agente, lo cual proporciona una rápida comparación así como la indicación de aberraciones cromosómicas y pérdida de cromosomas que llevan a anomalías numéricas de éstos (Heddle. et al. 1983).

La existencia de micronúcleos ya ha sido reconocida desde hace muchos años; su asociación con daño cromosómico fué estudiada en trabajos del campo de la radiación en donde se menciona su frecuencia. El primer intento serio del uso de la frecuencia de micronúcleos como monitor de daño citogenético aparece reportado por Evans en 1959, pero fué en los años de 1966 y 1970 cuando Schroeder recomendó el uso de frotis de médula ósea para detectar daño *in*

*vivo* de mutágenos químicos, demostrando la presencia de micronúcleos en las células de dicha médula en relación con daño citogenético (Heddle. et al. 1983).

Otros investigadores también comenzaron a utilizar a los micronúcleos en estudios citogenéticos, pero sólo el trabajo de Von Ledebur y Schmid es de importancia histórica porque condujo directamente al desarrollo de la prueba *in vivo* basada en la identificación de micronúcleos en los EPC de médula ósea de ratón. Este ensayo en la actualidad es utilizado ampliamente y es comúnmente llamado “la prueba de micronúcleos” (Schmid. 1975).

En el año de 1980, MacGregor y cols, realizaron experimentos para observar la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica y probar que ésta podría ser utilizada como un indicador de daño citogenético en eritroblastos, (MacGregor. et al. 1980). Los resultados que se obtuvieron fueron que los eritrocitos micronucleados no son eliminados selectivamente de la circulación periférica del ratón (Schlegel y MacGregor. 1982) y se demostró que la incidencia de micronúcleos en la sangre periférica es igual que la observada en médula ósea y que puede por lo tanto ser un índice útil de daño citogenético, por lo que en la actualidad la frecuencia de EPCMN en sangre periférica es utilizada por numerosos investigadores (Shlegel y MacGregor. 1983 y 1984; Barale. et al. 1985; Choy. et al. 1985; Luke. et al. 1988).

La posibilidad de que algunos aditivos de alimentos, medicamentos ú otros compuestos químicos a los que la gente está expuesta sean genotóxicos es una cuestión de interés general (Heddle. 1973), ya que se implica un daño al DNA, esto indica que una lesión sobre éste podría tener algún efecto sobre la progenie de las células. El daño al DNA parece relacionarse de alguna manera a la carcinogenicidad de algunos químicos particulares, aunque no todas las formas de enlace al DNA tienen un efecto similar.

Para la detección de compuestos genotóxicos existen diversas metodologías *in vivo* e *in vitro*, y entre éstas tenemos a la técnica llamada de micronúcleos. El aumento de ensayos de

micronúcleos desde 1973 indudablemente sirvieron para detectar las primeras ventajas de este estudio, como son: rapidez y simplicidad. Heddle puntualizó que se destaca el conteo de micronúcleos ya que es considerablemente diez veces más rápido que el conteo de metafases con un poder similar de prueba.

Con respecto a la prueba de EPC y ENC en roedores, los eritrocitos micronucleados de médula ósea han sido reconocidos como indicadores de daño citogenético agudo y crónico ó subcrónico (Schmid. 1976; Heddle. 1973), ya que a unas pocas horas después de la terminación de la mitosis, los eritroblastos expulsan el núcleo principal de ellos, pero por razones hasta hoy desconocidas, los micronúcleos permanecen en el citoplasma del eritrocito joven (policromático) y maduro (normocrómico), siendo reconocidos fácilmente (Shmid. 1975; Hayashi. et al. 1984).

Hasta hace poco se creyó que los clastógenos de médula ósea, no incrementaban la frecuencia de EPCMN en sangre periférica ya que el bazo se encargaría de eliminar a estas células anormales (Von Ledebur y Schmid. 1973). Lo contrario se ha demostrado recientemente en ratones por medio de tratamientos agudos con clastógenos de médula ósea, con los cuales, se incrementó la frecuencia de micronúcleos en EPC de sangre periférica (Barale. et al. 1985).

Algunos compuestos genotóxicos como la mostaza nitrogenada y la ciclofosfamida han sido probados hasta ahora con resultados positivos y alentadores, sugiriendo el uso de esta metodología para el análisis de compuestos ambientales probados crónicamente. La frecuencia de células micronucleadas en sangre periférica puede ser un indicador sensible de daño cromosómico que provee una medida directa de genotoxicidad en ratones sometidos a bioensayos de carcinogenicidad ( Schlegel y MacGregor. 1982 y 1983; Choy. et al. 1985).

## **II. OBJETIVOS.**

### **II.1. OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar la frecuencia de células micronucleadas provocadas por un extracto de pimienta negra (*Piper nigrum*) a diferentes concentraciones en eritrocitos de sangre periférica de ratones administrados oralmente durante 6 semanas.

### **II.2. OBJETIVOS PARTICULARES.**

- 1).- Determinar en qué semana y a qué dosis de administración hay un aumento significativo en la frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados (ENCMN).
- 2).- Establecer si la administración del extracto de pimienta, produce alguna modificación significativa en la relación porcentual entre EPC y ENC.

## **III. HIPOTESIS.**

Si se sabe que el extracto de pimienta negra posee agentes clastogénicos al administrarlos por la vía oral a ratones, entonces, se observara un aumento de ENCMN en sangre periférica.

## **IV. MATERIAL Y METODOS.**

### **IV.1. MATERIAL BIOLÓGICO.**

Se utilizaron 32 ratones machos de la cepa NIH recién destetados pesando en promedio 20 g provenientes de los laboratorios del Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salud.

### **IV.2. MATERIAL DIVERSO.**

- 1.- 12 cajas de Bioterio.
- 2.- 12 bebederos con tapón de corcho.
- 3.- 1 balanza granataria.
- 4.- 4 probetas de 100 ml.
- 5.- 1 balanza analítica.
- 6.- 3 matraces Erlenmeyer de 250 ml.
- 7.- 2 vasos de precipitados de 100 ml.
- 8.- 2 pipetas graduadas de 10 ml.
- 9.- 2 pipetas graduadas de 5 ml.
- 10.- 2 pipetas graduadas de 1 ml.
- 11.- Portaobjetos.
- 12.- Cubre objetos del número 1.
- 13.- 3 vasos Copplin.
- 14.- Tijeras.
- 15.- Pinzas de presión.
- 16.- Algodón.

### IV.3. REACTIVOS.

- 1.- Extracto de pimienta negra liofilizado.
- 2.- Agua destilada.
- 3.- Giemsa Merck al 8 %.
- 4.- Metanol absoluto.
- 5.- Alcohol etílico del 96 %.
- 6.- Dimetil sulfóxido Sigma Chemical.
- 7.- Resina para montaje de laminillas.

### IV.4. METODOS.

Para evaluar el incremento de ENCMN, inducidas por el extracto de pimienta negra (*Piper nigrum*) se procedió a realizar los siguientes pasos:

#### IV.4.1.- PREPARACION DE UN EXTRACTO ALCOHÓLICO DE PIMIENTA NEGRA.

A 400 g de pimienta negra, se le añadieron 800 ml de alcohol etílico al 50 %. Se trituraron y se guardaron por un lapso de 48 horas protegido de la luz. Pasado ese tiempo, se filtró al vacío. La solución resultante, se liofilizó y se obtuvo una masa seca del extracto.

#### IV.4.2.-PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO DE PIMIENTA NEGRA.

Se hicieron pruebas de solubilidad del extracto liofilizado en Agua destilada, Dimetil sulfóxido, y una mezcla de Agua / Dimetil sulfóxido, resultando ésta última el disolvente ideal.

TABLA 5.- Grado de solubilidad de la Pimienta Negra.

	SOLUBILIDAD.	RELACIÓN.
AGUA	+	10 ml
DMS	++	10 ml
AGUA/DMS	++++	1 / 0.65 ml

+ = grado de solubilidad

#### IV.4.3.- PREPARACION DE LAS CONCENTRACIONES.

Posteriormente se procedió a la preparación de las soluciones del extracto a administrar que fueron de 210  $\mu\text{g/ml}$ , 140  $\mu\text{g/ml}$  y 70  $\mu\text{g/ml}$ .

#### IV.4.4.- ADMINISTRACION Y DISTRIBUCION DE LOS RATONES.

La administración se llevó a cabo en el agua vertida en los bebederos. Los ratones se distribuyeron en cuatro lotes con ocho ratones cada uno, en una distribución de 3,3,2, para controlar el consumo del líquido sirviendo el primer lote como control, al cual se le administró únicamente agua; realizando de ésta manera un ensayo de tipo subagudo con una duración de 30 días.

#### IV.4.5.- MEDICION DEL PESO Y CONSUMO DE PIMIENTA NEGRA.

Cada tres días se midió el peso y el consumo de agua de cada lote para determinar el consumo aproximado de pimienta por día por ratón.

#### IV.4.6.- TOMA DE MUESTRA.

Cada semana se tomaron muestras de sangre periférica de la parte terminal de la cola del ratón con la que se realizaron frotis sanguíneos, los cuales se realizaron por duplicado de cada ratón.

#### IV.4.7.- FIJACION DE LAS LAMINILLAS.

Se procedió a la fijación de las laminillas durante 5 minutos en metanol absoluto, dejando secar al aire.

#### IV.4.8.- TINCION CON GIBMSA MERCK AL 8%.

Para la tinción se sumergieron las laminillas en un vaso Copplin que contenía el colorante Giemsa Merck al 8 %, con buffer de fosfatos pH de 6.8, dejando las laminillas en la solución colorante durante 20 minutos aproximadamente para una buena tinción.

#### IV.4.9.- OBSERVACION AL MICROSCOPIO.

Las observaciones que se realizaron consistieron en evaluar los siguientes parámetros:

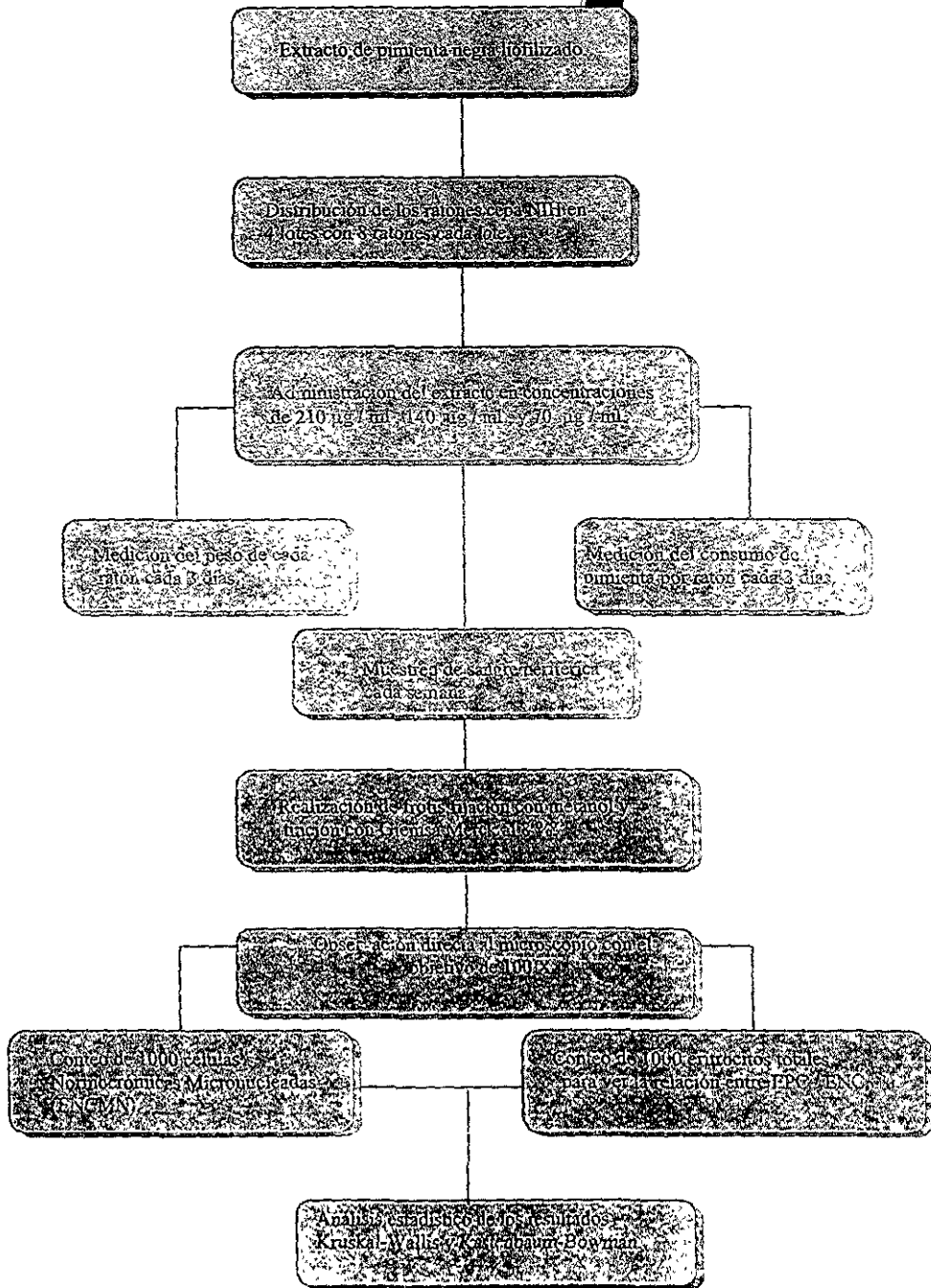
- a).- Se contaron 1000 células normocrómicas (ENC) para observar la frecuencia de células micronucleadas.
- b).- Se contaron 1000 eritrocitos totales para ver la relación entre EPC y ENC. Cabe mencionar que ambas lecturas se realizaron a doble ciego.



#### IV.4.10.- ANALISIS ESTADISTICO.

A los resultados obtenidos de la frecuencia de ENCMN, se les aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y se usaron las tablas de Kastenbaun -Bowman a un valor de  $p \leq 0.05$ ; ambas pruebas nos permitieron hacer la comparación entre los lotes tratados con respecto al control para poder ver la significancia del estudio.

De igual manera a los resultados de la relación ENC / EPC se les aplicaron el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para realizar comparaciones entre los grupos tratados y saber de ésta manera si existe alguna diferencia significativa.



## VI. RESULTADOS

### PESOS PROMEDIO DE LOS RATONES ADMINISTRADOS CON EL EXTRACTO

#### LIOFILIZADO DE PIMIENTA NEGRA

(REGISTRO SEMANAL, PESO EN GRAMOS)

CONC. µg/ml	S E M A N A S													
	INICIAL		1a		2a		3a		4a		5a		6a	
	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD
CONTROL 00	21.4	1.05	22.6	1.78	26.4	1.08	27.8	0.45	28.9	0.47	29.9	0.25	30.0	0.80
210	21.4	1.13	22.0	0.69	25.6	1.13	27.5	0.32	28.1	0.53	29.0	0.50	29.5	0.54
140	21.1	0.37	22.9	1.69	26.5	0.88	27.9	0.27	29.0	0.61	29.9	0.53	30.2	0.38
70	22.1	0.73	23.5	1.36	26.5	1.16	27.7	0.30	28.9	0.27	29.3	0.30	29.5	0.66

TABLA 6.- Pesos en los que se aprecia un aumento homogéneo entre los tres grupos tratados con el extracto de pimienta negra liofilizado, que de acuerdo al ANOVA a un valor de  $\alpha = 0.05$ , los valores representados aquí, no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al lote control.

CONSUMO APROXIMADO DE PIMIENTA NEGRA EN MG / DIA / RATON.

(REGISTRO SEMANAL)

CONC. µg/ml	S E M A N A S						
	INICIAL	1a	2a	3a	4a	5a	6a
CONTROL 0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
210	0.0	1.87	1.44	1.4	1.43	1.57	1.66
140	0.0	1.04	1.04	0.99	1.02	1.07	1.18
70	0.0	0.54	0.47	0.42	0.42	0.49	0.63

TABLA 7.- Consumo de pimienta negra en la que se aprecia la cantidad aproximada de pimienta en mg/día/ratón que tomaron los lotes tratados , resaltando que el consumo es proporcional a las dosis administradas en todos los grupos tratados.

FRECUENCIA DE ERITROCITOS NORMOCROMICOS MICRONUCLEADOS DE SANGRE  
 PERIFERICA DE RATON ADMINISTRADOS CON EL EXTRACTO LIOFILIZADO DE  
 PIMIENTA NEGRA.

CONC. µg/ml	S E M A N A S													
	INICIAL		1a		2a		3a		4a		5a		6a	
	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD
CONTROL 0.0	2.6	0.74	3.5	0.92	4.1	1.46	5.9	1.64	4.2	1.16	6.0	1.41	6.0	2.0
210	4.1	1.36	10.3	3.02	11.6	2.97	18.5	6.80	17.9	2.23	17.6	5.85	21.9	2.36
140	5.7	2.81	6.7	2.25	3.2	2.12	5.6	2.92	7.6	6.86	7.7	3.33	8.4	3.92
70	6.6	3.16	6.7	2.37	7.6	1.77	3.5	3.07	6.0	2.64	5.0	2.52	4.8	2.34

TABLA 8.- Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente con las tablas deKastembaun-Bowman a un valor de  $p \leq 0.05$  y por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis Resultando la dosis de 210 µg/ml con una diferencia altamente significativa con respecto al testigo y a las dosis de 140 µg/ml y 70 µg/ml respectivamente.

TABLA DE PROPORCION EN PORCENTAJE DE ERITROCITOS NORMOCROMICOS DE  
SANGRE PERIFERICA DE RATONES ADMINISTRADOS CON PIMIENTA NEGRA.  
( REGISTRO SEMANAL )

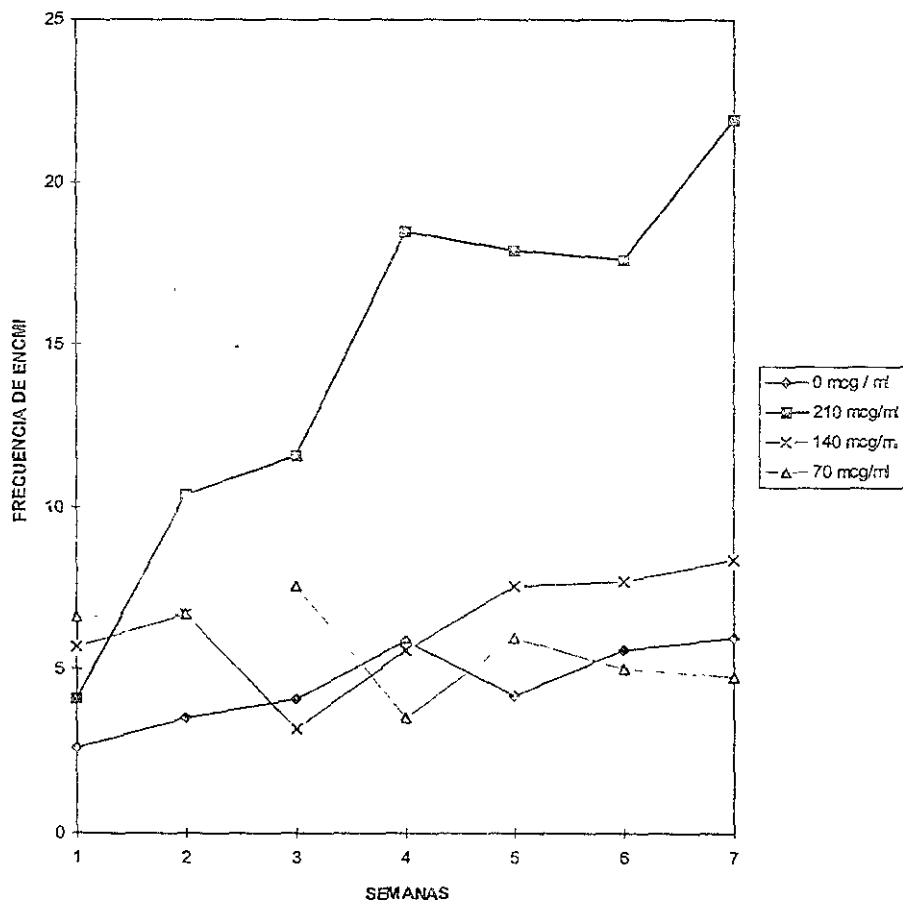
$$\frac{\bar{X}_{ENC} \times 100}{1000} \pm SD$$

1000

CONC µg/ml	S E M A N A S													
	INICIAL		1a		2a		3a		4a-		5a		6a	
	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD	$\bar{X}$	+/-SD
CONTROL 0.0	83.1	8.55	87.3	7.62	90.8	4.17	91.3	2.46	85.6	7.03	93.3	3.97	92.9	5.18
210	81.5	17.9	86.4	5.99	89.3	2.60	88.3	6.10	90.8	2.71	91.6	4.14	93.5	2.88
140	91.7	4.73	91.4	5.09	96.3	1.19	94.9	2.94	95.2	6.24	96.9	1.61	95.9	3.16
70	91.1	6.91	96.5	0.87	95.5	1.66	95.5	1.60	96.6	1.55	84.9	10.4	92.6	7.13

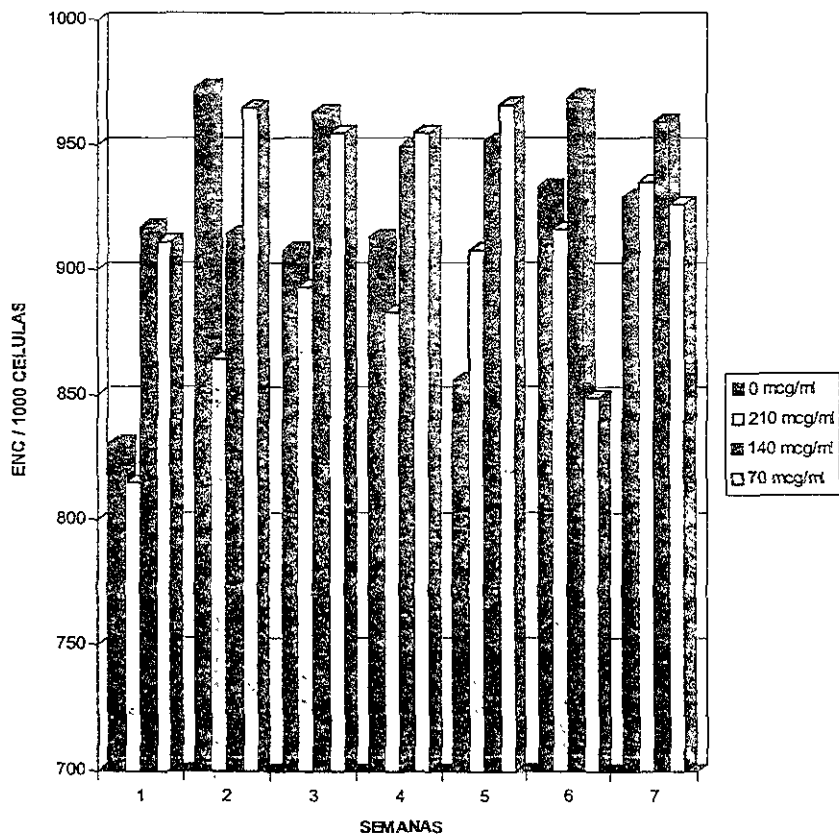
TABLA 9 - A los resultados obtenidos se les practicó las pruebas estadísticas de Kastembaun-Bowman y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis; demostrándose que en las comparaciones realizadas entre las dosis administradas no existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al lote control.

FRECUENCIA DE CELULAS MICRONUCLEADAS EN RATONES ADMINISTRADOS DURANTE SEIS SEMANAS



Gráfica 1.- Frecuencia de células micronucleadas, en la que se aprecia un aumento significativo de la dosis 1 (210  $\mu\text{g/ml}$ ), a partir de la segunda semana de tratamiento con respecto al grupo control y a las dosis de 140  $\mu\text{g/ml}$  y 70  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, las cuales se mantienen dentro de los parámetros normales sin alteración alguna y sin ninguna diferencia estadísticamente significativa de acuerdo a las tablas de Kastenbaun-Bowmana un valor de  $p \leq 0.05$ .

**PROPORCION DE ENC / EPC EN RATONES ADMINISTRADOS DURANTE SEIS SEMANAS CON EL EXTRACTO DE PIMIENTA NEGRA**



Gráfica 2- Proporciones de ENC con respecto a los EPC en la que se aprecian pequeñas variaciones a lo largo del ensayo, las cuales no resultaron ser estadísticamente significativas.



## VII. DISCUSION.

Ya se ha mencionado que la pimienta negra (*Piper nigrum*) ha sido considerada durante siglos la reina de las especias y que ha sido evaluada como un condimento y preservativo para carnes, pescados y otros alimentos comestibles. Algunas poblaciones pueden tolerar cantidades extremas de pimienta en su dieta, y el grado de tolerancia es muy variado dentro de estas mismas poblaciones.

Se sabe que la pimienta negra contiene diferentes alcaloides entre los que se conocen a la piperina, chavicina, y miristicina; algunos terpenos considerados importantes promotores tumorales y pequeñas cantidades del conocido carcinógeno safrol.

Para que un agente sea considerado carcinogénico , primeramente tiene que provocar una mutación, sabiendo de ante mano que no todas las mutaciones desencadenan un proceso de desarrollo neoplásico.

Es evidente que diversos estudios epidemiológicos han demostrado que muchos productos naturales son responsables de aumentar el riesgo de cáncer en los humanos. Durante muchos años un gran número de sustancias químicas han sido introducidas en los alimentos y al medio ambiente, ya sea que provengan de productos naturales ó sintéticos.

Una de las sustancias químicas presentes en las plantas y principalmente en las especias que ha sido ampliamente estudiada es el *safrol*. La importancia de esta sustancia radica en que se le han atribuido propiedades carcinogénicas e inducción de alteraciones cromosómicas tales como deleciones, intercambios cromosómicos y cromosomas dicéntricos así como la formación de aductos al DNA; por lo que se le ha considerado un peligroso agente genotóxico que ha sido encontrado en algunos productos naturales y que a

su vez puede tener acción como un co-factor sinérgico en la actividad genotóxica de otros agentes químicos ambientales (Ajay. K. Jaim 1989).

La pimienta negra contiene pequeñas cantidades de safrol, además de otros alcaloides entre los que se incluyen a la piperina; este compuesto es el componente principal del aceite esencial de la pimienta, a la que también se le ha atribuido alta toxicidad en diferentes mamíferos (Piyachaturawat. et al. 1983), actuando como un promotor de daño genotóxico debido a la alta afinidad de este epóxido con el DNA (Chu. et al. 1994).

Es de notarse que algunas sustancias químicas encontradas en los productos naturales comestibles, pueden conducir al desarrollo de una neoplasia, de ahí el gran interés que se tiene para estudiarlos y a qué dosis pueden ser capaces de ser genotóxicos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con investigaciones previas de efectos clastogénicos inducidos por la pimienta negra ( Abraham and John 1989 ; John y Abraham 1991); de igual manera se ha reportado que la pimienta negra incrementa la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (Madrigal. et al. 1997), aunque las dosis empleadas en estos estudios fueron muy elevadas en relación al consumo humano aún estando por debajo de la  $DL_{50}$  la cual fue de 113.13mg/Kg de peso.

Nosotros decidimos evaluar el mismo daño genotóxico empleando 3 concentraciones menores a las empleadas en los estudios anteriores siendo éstas de 210  $\mu\text{g/ml}$ , 140  $\mu\text{g/ml}$  y 70  $\mu\text{g/ml}$  estando más cercanas al consumo del humano y por la vía oral, ya que los estudios anteriores han recurrido a vías de administración tópicas, subcutáneas e intraperitoneales (Concon. et al. 1979; El-Mofly. et al. 1991; Madrigal. et al. 1997). Sobre todo, los resultados mencionados también están fundamentados por estudios que han evaluado los factores de riesgo en áreas donde se ha encontrado una elevada

frecuencia de cáncer de esófago y cáncer nasofaríngeo en los cuales se incluye el consumo de taninos y pimienta negra (Ghadirian, 1987 y 1993; Jeannel et al. 1990).

Los índices de cáncer de esófago son más elevados en el sur de Africa en comparación con el resto del continente principalmente con en el norte de Africa, no obstante los índices de cáncer de seno, colon, recto y próstata son bajos en toda Africa comparados con países del oeste de Europa y América del Norte, pero los habitantes africanos con estos tipos de cáncer tienen mayor índice de mortalidad que en Europa y Norteamérica.

La comparación de la frecuencia del cáncer entre los países de Africa de los que destaca Túnez es muy limitada debido a la escasez de registros que establecen la incidencia de cáncer en estos países.

La repercusión que tienen factores como la dieta en la salud humana pueden abordarse desde varios enfoques: desde estudios epidemiológicos y toxicológicos, estos últimos se dividen en varias ramas; una de ellas es la toxicología genética ciencia que se encarga de relacionar las mutaciones que pueden producir agentes químicos y su repercusión en la salud. En estos estudios se pueden emplear varias técnicas siendo una de ellas la prueba de micronúcleos

La frecuencia de ENC MN en sangre periférica, puede ser un indicador sensible de daño cromosómico; los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo están apoyados en la técnica de micronúcleos, ya que esta técnica esta considerada como un buen sistema de prueba para evaluar daño genotóxico (Daniel. et al. 1993).

Esta prueba ha sido empleada como una medida de rompimiento cromosómico en una variedad de tejidos y tipos de organismos como células en cultivo, tejidos de plantas etc. (Heddle et al. 1983).

Con la técnica anteriormente mencionada, en el presente estudio hemos encontrado que la pimienta negra resultó ser clastogénica por lo menos a concentraciones iguales o mayores a los 210  $\mu\text{g/ml}$  como así lo muestra la gráfica N°1, observándose también que hay un daño acumulativo al incrementarse proporcionalmente el número de células micronucleadas, con respecto a las semanas que transcurrieron a lo largo del ensayo genotóxico; efecto que no se observó con las concentraciones de 140  $\mu\text{g/ml}$  y 70  $\mu\text{g/ml}$ , las cuales siempre se mantuvieron muy cercanas al lote testigo, que recibió solamente agua.

Por otro lado, se determinó la relación proporcional de ENC con respecto a los EPC para saber si el extracto administrado por la vía oral afectaba de alguna forma la producción de la línea celular eritrocítica. Dicho efecto resultó negativo de acuerdo a los resultados observados en la gráfica N° 2, en la cual se aprecia una variación en la (segunda y quinta semanas ) entre las diferentes concentraciones en relación al grupo control, que de acuerdo con las pruebas estadísticas que se utilizaron en la comparación entre grupos, resultaron no tener diferencias estadísticamente significativa, resultados que nos indican que el extracto de pimienta negra no ejerce daño alguno sobre la cinética de la línea celular eritrocítica.

Con respecto a los pesos promedios de los ratones, se observó que no existe ningún efecto o alteración ejercida por el extracto liofilizado de la pimienta negra; todos los ratones aumentaron su peso homogéneamente , por lo que claramente no hay ninguna diferencia estadísticamente significativa.

Está bien reconocido que la dieta y nutrición juegan un papel importante en la etiología y prevención del cáncer, (MacGregor 1979; Sabine 1979; y Ames 1986), teniendo como base fundamental que hay varios estudios en los que se indican que la pimienta negra debido a los componentes de sus aceites esenciales pueden influir como un factor de

mutagenicidad o riesgo de cáncer, sin embargo hay trabajos reportados en los que también se ha determinado su actividad antimutagénica como lo ha indicado Higashimoto. et al. 1993.

Es evidente que con los estudios y experimentos epidemiológicos de cierto número de productos naturales se ha demostrado que éstos pueden causar mutagenicidad y cáncer en humanos; esta misma importancia es requerida para tomarse en cuenta e identificar el potencial mutagénico y carcinogénico para reducir el peligro de ataque al material genético de los agentes mutagénicos presentes en el medio ambiente. De acuerdo a la mayoría de los estudios genotóxicos con pimienta negra, y principalmente a nuestros resultados del presente trabajo, la pimienta negra debe considerarse como un agente potencialmente genotóxico y carcinogénico. En el presente trabajo encontramos que la concentración del extracto de 210 µg/ml resultó ser inductora de genotoxicidad y aunque esta concentración corresponde a un consumo de 4g/día/persona (mayor al promedio de ingesta), es interesante comentar que se pueden requerir dosis menores a la citada para provocar daño, ya que en los productos alimenticios se encuentran sustancias que son carcinogénicas; como ejemplo de ello tenemos a las nitrosaminas que son formadas a partir de los nitritos y que estos a su vez son utilizados como conservadores ó los radicales libres generados durante el proceso de cocción de aceites empleados para preparar los alimentos e inclusive el mismo saflrol que se encuentra como constituyente de algunos productos naturales de origen vegetal y cuyos efectos pueden ser de carácter aditivo y en consecuencia puede ocurrir una posible potenciación del efecto genotóxico. De lo anterior se deduce la importancia de estudiar la genotoxicidad de los diferentes compuestos que integran los productos del consumo humano y de esta manera predecir sus efectos a largo plazo y en la medida posible evitarlos

ó controlarlos. Las diferentes clases de sustancias químicas carcinogénicas no tienen una estructura común, la complejidad de varias sustancias químicas que pueden inducir cáncer, poseen un notable problema para tratar de entender el mecanismo de acción de estos agentes. Algunos experimentos se han examinado mediante la administración tópica de especias ó extractos de especias que pueden tener un efecto de modificar a un cáncer particular. La compleja composición química de estos productos naturales, hacen difícil el conocimiento de cual sustancia ó muchos de sus componentes son los responsables de dichas modificaciones (American Institute for Cancer Research 1997); por lo que todavía se requieren de más estudios, en donde se empleen dosis que puedan extrapolarse a la cantidad consumida por un ser humano en su dieta, así como la determinación y seguimiento de los mecanismos de acción o inhibición de los mutágenos y carcinógenos que puedan estar formando parte o ser constituyentes principales de este tipo de condimentos alimenticios.

## VIII. CONCLUSIONES.

1).- El extracto liofilizado de la pimienta negra incrementa significativamente la frecuencia de los eritrocitos normocrómicos micronucleados de sangre periférica de ratón a concentraciones mayores o iguales a los 210  $\mu\text{g/ml}$ , observándose que dicho efecto empieza a manifestarse a partir de la segunda semana de administración, resultando de esta manera que el efecto induce daños genotóxicos más no daños citotóxicos a la línea celular eritrocítica.

2).- Las concentraciones menores de 140  $\mu\text{g/ml}$  y 70  $\mu\text{g/ml}$  no tuvieron efecto alguno de clastogenicidad significativo con respecto al grupo control, manteniéndose dentro de los parámetros normales durante las seis semanas que transcurrió el experimento.

3).- El extracto liofilizado de la pimienta negra no produce ninguna modificación significativa con las tres concentraciones administradas en la relación porcentual de las células policromáticas con respecto a las células normocrómicas, probando con esto que los extractos de pimienta negra no ejercen daño citotóxico a la línea celular eritrocítica.

## IX. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Abe, T., Isemura, T., and Kikuchi, Y. "MICRONUCLEI IN HUMAN BONE MARROW CELLS: EVALUATION OF THE MICRONUCLEUS TEST USING HUMAN LEUKEMIA PATIENTS TREATED WITH ANTILEUKEMIC AGENTS". Mutation Research (1984). Vol. 130. 113-120.
- 2.- Abraham, Susan and Annet, John. "CLASTOGENIC EFFECTS PRODUCED BY BLACK PEPPER IN MITOTIC CELLS OF VICIA FABA". Mutation Research 224 (1989), 281-285.
- 3.- Adame de León, F. Ulises y Gariglio V, Patricio. " LOS GENES DEL CANCER". ICYT. Vol 11, N° 152, Mayo 1989, 43-47.
- 4.- Ajay K. Jain. "6-TIOGUANINE (6TG) RESISTANT MUTATION, CHROMOSOMAL ABERRATIONS AND SISTER CHROMATID EXCHANGES (SCE's) IN V79 CELLS . INDUCED BY SAFROLE". Cytologia (1989). Vol 54. 145-148.
- 5.- Alcantara, N. And E.W. Speckman. "DIET NUTRITION AND CANCER". American Journal Clinical Nutrition (1976) Vol 29, 1035-1047.
- 5.- Ames BN. "DIETARY CARCINOGENS AND ANTICARCINOGENS" Science (1983). Vol 221. 1256-1264.
- 6.- Ames BN., Magaw R, Gold LS. "RANKING POSSIBLE CARCINOGENIC HAZARDS". Science (1987). Vol 236. 271-280.
- 7.- Ames, B.N, J. McCann and E. Yamasaki . "METHODS FOR DETECTING CARCINOGENS AND MUTAGENS WITH THE SALMONELLA/MAMMALIAN MICROSOME MUTAGENICITY TEST." Mutation Research, (1975). Vol 31. 347-364.
- 8.- Annie T. John and Susan Abraham. "EFFECTS OF BLACK PEPPER ON THE INCIDENCE OF CHROMOSOMAL ABERRATION IN MOUSE BONE MARROW CELLS IN VIVO". Cytologia (1991). Vol 56. 43-46.
- 9.- Anthony J. Garro, Espina Noel and S. Charles. "ALCOHOL AND CANCER". Alcohol Health & Research World (1992). Vol 16. N° 1. 81-86.
- 10.- Atal, C, K. Dhar, K. L. And Singh, Jagdev. "THE CHEMISTRY OF INDIAN PIPPER SPECIES". Journal of Natural Products. Vol. 38, N° 3, May-Jun 1975, 256-262.



11.- Barale, R.F. Giorgelli, L.Migliore, R. Ciranni, D. Casini, D. Zuconni and N. Loprieno. "BENZENE INDUCES MICRONUCLEI IN CIRCULATING ERYTHROCYTES OF CRONICALY TREATED MICE". Mutation Research (1985). Vol 144. 193-196.

12.- Barcelo. "DICCIONARIO TERMINOLOGICO DE QUIMICA". Ed. Alhambra 2ª edición, España 1976.

13.- B. Ganesh Bhat and N. Chandrasekhara. "STUDIES OF THE METABOLISM OF PIPERINE : ABSORTION, TISSUE DISTRIBUTION AND EXCRETION OF URINARY CONJUGATES IN RATS". Toxicology (1986). Vol 40. 83-92.

14.-Brand KG., Buoen LC., Johnson KH. Et.al. "ETIOLOGICAL FACTORS, STAGES, AND THE ROLE OF THE FOREIGN BODY IN FOREIGN BODY TUMORIGENESIS". A review. Cancer Research (1975). Vol. 35. 279.

15.- Brusick, David. "FUNDAMENTALS OF GENETICS TOXICOLOGY". Ed. Plenum Press. N:Y., USA, 32-37. (1980)

16.- Bruce, W. R. And J. A. Heddle. "THE MUTAGENIC ACTIVITY OF 61 AGENTS AS DETERMINED BY THE MICRONUCLEUS SALMONELLA AND SPERM ABNORMALITY ASSAYS". Cancer Journal Genetic Citology, (1979). Vol 21. 319-334.

17.- Bucanan, R.L Goldestein, S. And Budroe, J.D. "EXAMINATION OF CHILI PEPPER AND NUTMEG OLEORESINS USING THE SALMONELLA/MAMMALIAN MICROSOMES. MUTAGENICITY ASSAY". Journal of Food Science. Vol.47 (1981) 330-331.

18.- Butlin HT. "CANCER OF THE SCROTUM IN CHIMNEY-SWEEPS AND OTHERS: II. WHY FOREIGN SWEEPS DO NOT SUFFER FROM SCROTAL CANCER". Br. Med. J. (1892). 2:1.

19.- Caris N., Schiestl R. H. "EVALUATION OF THE YEAST ASSAY WITH 10 COMPOUNDS SELECTED BY THE INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY FOR THE EVALUATION OF SHORT-TERM TEST FOR CARCINOGENS". Mutation Research (1994). Vol 320. 293-303.

20.- Chen, C."ADVANCES IN FOOD AND NUTRITION RESEARCH". Ed. Academic Press. Wc Vol 34, USA. 338-397 (1990).

21.- Choy, W. N. , J. T. MacGregor, M.D. Shelby and R. R. Maronpot. "INDUCCION OF MICRONUCLEI BY BENZENE IN B6C3F<sub>1</sub> MICE: RETROSPECTIVE ANALYSIS OF PERIPHERAL BLOOD SMEARS FROM THE NTP CARCINOGENESIS BIOASSAY". Mutation Research (1985). Vol 143. 55-59.

- 22.- Chu C. Y., Chang J. P., and Wang C. J. "MODULATORY EFFECT OF PIPERINE ON BENZO(A)PYRENE CYTOTOXICITY AND DNA ADDUCT FORMATION IN V-79 LUNG FIBROBLAST CELLS". Food and Chemical Toxicology (1994). Vol. 32. 373-377.
- 23.- Clayso, D. B. "COMPARISON BETWEEN IN VITRO AND IN VIVO TEST FOR CARCINOGENICITY". Mutation Research (1980). Vol 75. 205-203.
- 24.- Coffin, D. L. , D. E. Gardner, G. Y. Sidorenko and Pinigin. "ROLE OF TIME AS A FACTOR IN THE TOXICITY OF CHEMICAL COMPOUNDS IN INTERMITTENT AND CONTINUOUS EXPOSURES. PART II. EFFECTS OF INTERMITTENT EXPOSURE". Journal Toxicology Environ Health (1977). Vol 3. 821-823.
- 25.- Cole, R. J., N. Tylor, J. Cole and C. F. Arlett. "SHORT TERM TEST FOR TRANSPLACENTALLY ACTIVE CARCINOGENS. I . MICRONUCLEUS FORMATION IN FETAL AND MATERNAL MOUSE ERYHTROBLAS". Mutation Research (1981). Vol 80. 141-157.
- 26- Comisión Nacional de Alimentos. INEGI. "EL SECTOR ALIMENTARIO EN MEXICO". Edición 1992. 213-255, 262-263.
- 27.- Concon, J.M. Newburg, D.S and Swerczel, T.W. "BLACK PEPPER (*Pipper nigrum*) EVIDENCE OF CARCINOGENICITY". Nutrition Cancer. 1 (1986), 22-26.
- 28.- Cortina de Navaj, Cristina. "ACTUALIDAD DEL TERRIBLE MAL". ICYT. Vol 11, N° 152, Mayo 1989. 36-41.
- 29-. Coulston F., Olajos.EJ. "TOXICOLOGY OF N-NITROSO COMPOUNDS". Ecotoxicol Environ Safety (1982). 6:89.
- 30.- Countryman, P. I. And J. A. Heddle. "THE PRODUCTION OF MICRONUCLEI FROM CHROMOSOMA ABERRATIONS IN IRRADIATED CULTURES OF HUMAN LYMPHOCYTES". Mutation Research (1976) Vol 99. 321-332.
- 31.- Daniel, Wayne W. "BIOESTADISTICA".Ed. Limusa, México 1984. 74-89, 193-237, 325-354.
- 32.- Devita Jr. Vincen T. "CANCER PRINCIPLES AND PRACTICE OF ONCOLOGY". Ed. J.B Lippincott Company. 3' ed. Philadelphia USA 1989 Vol 1. 116-132, 167-179.
- 33.- Dipaolo, Joseph A. "EVALUATION OF CARCINOGENIC POTENTIAL OF CHEMICALS SHORT TERM TEST OF INDUCTION OF NEOPLASIA". J.E.P.T.O. Vol 7, N° 1-2. (1986). 115-122.

- 34.- El-Mofty, M.M and Soliman, A.A. "CARCINOGENICITY TESTING OF BLACK PEPPER (*Piper nigrum*) USING THE EGYPTIAN TOAD (*Bufo regularis*) AS A QUICK BIOLOGICAL TEST ANIMAL". Oncology. 44-45, (1985). 247-252.
- 35.- Farkas. J., Andrassy. E. And Incze K. "EVALUATION OF POSSIBLE MUTAGENICITY OF IRRADIATED SPICES". Acta Alimentaria (1981). Vol 10 (2). 129-135.
- 36.- Fisher, David S. And Knofb M, Tish. "THE CANCER CHEMOTERAPY HANDBOOK". Ed. Mosby Year Book. St. Louis MO. USA, (1989) 1-3.
- 37.- Galli A., Schiestl R. H. "SALMONELLA TEST POSITIVE AND NEGATIVE CARCINOGENS SHOW DIFFERENT EFFECTS ON INTRACHROMOSOMAL RECOMBINATION IN G2 CELL CYCLE ARRESTED YEAST CELLS". Carcinogenesis (1995). Vol 16. 659-663.
- 38.- García F, Horacio. "EL BA ILE DE LOS CROMOSOMAS". ICYT. Vol 10. N° 138. Marzo 1988. 6-8.
- 39.- García F, Horacio. "RADIACION Y MUTACIONES", ICYT. Vol 10. N° 143, Agosto 1988. 28-33.
- 40.- Gessener, Hawley. "DICCIONARIO DE QUIMICA Y DE PRODUCTOS QUIMICOS". Ed. Omega. Barcelona España 1975.
- 41.- Ghadirian P. "THERMAL IRRADIATION AND ESOPHAGEAL CANCER IN NORTHERN IRAN". Cancer (1987). Vol. 60. 129-136.
- 42.- Ghadirian P. "ESOPHAGEAL CANCER AND FOOD HABITS OF THE PEOPLE OF THE CASPIAN LITTORAL OF IRAN". Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for cancer research (1993). Vol. 34. A1534.
- 43.- Goetz, P., Sram, R. J., and Dohnalova, J. "RELATIONSHIP BETWEEN EXPERIMENTAL RESULTS IN MAMMALS AND MAN: CYTOGENETIC ANALYSIS OF BONE MARROW INJURY INDUCED BY A SINGLE DOSE OF CYCLOPHOSPHAMIDE". Mutation Research (1975). Vol. 31. 247-254.
- 44.- Gorla, N. B. And J. A. Castro. "MICRONUCLEUS FORMATION IN BONE MARROW OF MICE TREATED WITH NIFURTIMOX OR BENZNIDAZOLE". Toxicology Letter ( (1985). Vol 25. 259-263.
- 45.- Guzman,T., and Mota, P. "ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE GENOTOXICIDAD DE LA PIMIENTA NEGRA (*Piper nigrum*) EVALUADO POR EL INCREMENTO DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDES HERMANAS". Tesis de licenciatura para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. FES.Cuautitlan. UNAM. 1993.

- 46.- Harris, J. W., and Kellermeyer, R. W. **"THE RED CELL"**. De. Cambridge MA: Harvard University Press, 1970.
- 47.- Hart, J. W. And Berly Hartley-Asp. **"INDUCCION OF MICRONULEI IN THE MOUSE. REVISED TIMING OF THE FINAL STAGE OF ERYTHROPOIESIS "**. Mutation Research (1983). Vol 120. 127-132.
- 48.- Hayashi, M. T. Sofuni and M. Ishidate Jr. **"KINETICS OF MICRONUCLEUS FORMATION IN RELATION TO CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN MOUSE BONE MARROW"**. Mutation Research (1984). Vol 127. 129-137.
- 49.- Heddle, J. A. **"A RAPID IN-VIVO TEST FOR CHROMOSOMAL DAMAGE"**. Mutation Research (1973). Vol. 18. 187-190
- 50.- Heddle, J. A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavourmin, K., MacGregor, J. T., Newell, G. W., and Salomone, M. F. **"THE INDUCCION OF MICRONUCLEI AS A MEASURE OF GENOTOXICITY: A REPORT OF THE U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY GENE -TOX PROGRAM"**. Mutation Research (1983). Vol 123. 61-118.
- 51.- Heddle, J. A., M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavourmin, J. T. MacGregor, G. W. Newell and M. F. Salamone. **"THE INDUCCION OF MICRONUCLEI AS A MEASURE OF GENOTOXICITY"**. A report of the U.S. Enviromental Protection Agency. Gene-Tox Program. Mutation Research (1984). Vol 123. 61-118.
- 52.- Hidalgo Cano, Héctor."PIMIENTA NEGRA". Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. México 1983. 1-15.
- 53.- Higashimoto M. Purintrapiban J. Kataoka K. Kinouchi T. Vinitketkumnuen U. Akimoto S. Matsumoto H. And Ohnishi Y. **"MUTAGENICITY AND ANTIMUTAGENICITY OF EXTRACTS OF THREE SPICES AND A MEDICINAL PLANT IN THAILAND"**. Mutation Research (1993). Vol 303. 135-142.
- 54.- Hirayama T. **"DIET AND CANCER"**. Nutrition Cancer (1979) Vol 1. 67-81.
- 55.- Jeannel D., Hubert A., de Vathaire F., Ellouz R., Camoun M., Ben Salem M., Sancho-Garnier H. And de The G. **"DIET LIVING CONDITIONS AND NASOPHARYNGEAL CARCINOMA IN TUNISIA. A CASE-CONTROL STUDY"**. Journal of Cancer (1990). Vol. 46. 421-425.
- 56.- Kastenbaum M. A. and Bowman K. O. **"TABLES FOR DETERMINING THE STATISTICAL SIGNIFICANCE OF MUTATION FREQUENCIES"**. Mutation Research (1970). Vol 9. 527-549.
- 57.- Kennaway El. **"EXPERIMENTS ON CANCER-PRODUCING SUBSTANCES"**. Br. Med. J. (1925). 2:1

- 58.- Kennaway EL., Hieger I. **"CARCINOGENIC SUBSTANCES AND THEIR FLUORESCENCE SPECTRA"**. Br. Med. J (1930). 1:1044.
- 59.- Kinoshita R. **"RESEARCHES ON THE CARCINOGENESIS OF THE VARIOUS CHEMICAL SUBSTANCES"**. Gann (1936). Vol 30. 423.
- 60.- Kloner LN, Nomura AMY. **"ROLE OF DIET IN CANCER INCIDENCE IN HAWAII"**. Cancer Research (1983). Vol 43. 2397-2402.
- 61.- Korpasy B. **"TANNINS AS HEPATIC CARCINOGENS"**. Prog. Exp. Tumor Res. (1961). Vol. 2. 245-290.
- 62.- Lee J. K., Park B. J., Yoo K. Y. And Ahn-Yo. **"DIETARY FACTORS AND STOMACH CANCER"**. International Journal Epidemiology (1995). Vol 24. 33-41.
- 63.- Luca, D. L. Raileanu, V. Luca and R. Duda. **"CHROMOSOMAL ABERRATIONS AND MICRONUCLEI INDUCED IN RAT AND MOUSE BONE MARROW CELLS BY SODIUM NITRATE"**. Mutation Research (1985). Vol 155. 121-125.
- 64.- MacGregor, J. T., C. M. Wher and D. H. Gould. **"CLASTOGEN INDUCED MICRONUCLEI IN PERIPHERAL BLOOD ERYTHROCYTES : THE BASIS OF AN IMPROVED MICRONUCLEUS TEST"**. Environ Mutagenesis (1980). Vol 2. 509-514.
- 65.- Madrigal, E., Díaz Barriga, S., Mota, P., Guzman, R., and Cassani, M. **"SISTER CHROMATID EXCHANGES INDUCED *IN VITRO* AND *IN VIVO* BY AN EXTRACT OF BLACK PEPPER"**. Food and Chemical Toxicology (1997). Vol. 35. 567-571.
- 66.- Maistre Jaques., Carmona Asunción. **"LAS PLANTAS DE ESPECIAS"**. ed. Blume, 1969.
- 67.- Miller JA., Swanson AB, Miller EC. **"THE METABOLIC ACTIVATION OF SAFROLE AND RELATED NATURALLY OCCURRING ALKENYLBENZENES IN RELATION TO CARCINOGENESIS BY THESE AGENTS"**. Miller EC et al (eds). Naturally Occurring Carcinogens, Mutagens, and Modulators of Carcinogenesis. Baltimore, University park Press (1979). USA. 111-125.
- 68.- Miller AB, Kelly A., Choi NW. **"A STUDY OF DIET AND BREAST CANCER"**. American Journal Epidemiology (1978). Vol 107. 499-509.
- 69.- Maier, P. And W. Schmid. **"TEN MODEL MUTAGENS EVALUATED BY THE MICRONUCLEUS TEST"**. Mutation Research (1976). Vol 40. 325-338.

70.- Osawa Toshihiko, Ishibashi H. Namiki M. Yamanaka M. And Namiki K. **"FORMATION OF MUTAGENS BY PEPPER-NITRITE REACTION"**. Mutation Research (1981). Vol 91. 291-295.

71.- Palmer S. **"DIET, NUTRITION, AND CANCER"**. Prog Food Nutrition Science (1985). Vol 9. 283-341.

72.- Pott P. **"CHIRURGICAL OBSERVATION RELATIVE TO THE CATARACT, THE POLYPUS OF THE NOSE THE CANCER OF THE SCROTUM, THE DIFFERENT KINDS OF RUPTURES AND THE MORTIFICATION OF THE TOES AND FEET"**. London, Hawkes, Clarke and collins, 1775.

73.- Powrie, William D. Wu., Chiu H. Rosin, P. And Stich, F. **"CLASTOGENIC AND MUTAGENIC ACTIVITIES OF MAILLARD REACTION MODEL SYSTEMS"**. Journal of Food Science. Vol. 46 (1981) 1433-1438.

74.- Phillips RL. **"ROLE OF LIFE-STYLE AND DIETARY HABITS IN RISK OF CANCER AMONG SEVENTH-DAY ADVENTIST"**. Cancer Research (1975). Vol 35. 3513-3522.

75.- Piyachaturawat P., Glinsukon T., and Toskulkao C. **"ACUTE AND SUBACUTE TOXICITY OF PIPERINE IN MICE, RATS AND HAMSTERS"**. Toxicology Letters (1983). Vol. 16. 351-359.

76.- Rodrigez M. De Oca, Roberto. **"EVALUACION DE DIFERENTES FUNGICIDAS PARA EL CONTROL DE *Phytophthora palmivora* EN PIMIENTA NEGRA (*Piper nigrum*)"** Memorias Congreso Regional de clase 2 Veracruz. Veracruz. 1973. 1-4.

77.- Rosengarten, F. **"THE BOOK OF SPICES"**. De. Pyramid Books. N.Y. USA (1975). 337-350.

78.- Salamanca, Fabio. **"CITOGENETICA HUMANA"**. Ed. Panamericana. México. 1990.

79.- Schlegel, R. And J. T. MacGregor. **"THE PERSISTENCE OF MICRONUCLEI IN PERIPHERAL BLOOD ERYTHROCYTES : DETECTION OF CHRONIC CHROMOSOME BREAKAGE IN MICE"**. Mutation Research (1982). Vol 104. 367-369.

80.- Schlegel R., and MacGregor J. T. **"A RAPID SCREEN FOR CUMULATIVE CHROMOSOMAL DAMAGE IN MICE ACCUMULATION OF CIRCULATING MICRONUCLEATED ERYTHROCYTES"**. Mutation Research (1983). Vol 113. 481-487.

81.- Schlegel, R. And MacGregor, J. T. **"THE PERSISTENCE OF MICRONUCLEATED ERYTHROCYTES IN PERIPHERAL CIRCULATION OF NORMAL AND SPLENECTOMIZED FISHER 344 RATS: IMPLICATIONS FOR CYTOGENETIC SCREENING"**. Mutation Research (1984). Vol.127. 169-174.

- 82.- Schmid, W. "THE MICRONUCLEUS TEST". Mutation Research (1975). Vol. 31. 9-15.
- 83.- Schmid, W. "THE MICRONUCLEUS TEST FOR CYTOGENETIC ANALYSIS. HOLLANDER A: CHEMICAL MUTAGENS NEW YORK". Plenum (1976). Vol. 4. 31-53.
- 84.- Shwaireb M. H., Wrba H., el-Mofly M. M. And Dutter A. "CARCINOGENESIS INDUCED BY BLACK PEPPER (*Piper nigrum*) AND MODULATED BY VITAMIN A". Experimental Pathology (1990). Vol. 40. 233-238.
- 85.- Tan D., Reiter R. J., Chen L. D., Poeggeler B., Manchester L. C. "BOTH PHYSIOLOGICAL AND FARMACOLOGICAL LEVELS OF MELATONIN REDUCE DNA ADDUCT FORMATION INDUCED BY THE CARCINOGEN SAFROLE". Carcinogenesis (1994). Vol 15. 215-218.
- 86.- Toth B., Mushroom hydrazines: "OCCURRENCE, METABOLISM, CARCINOGENESIS AND ENVIROMENTAL IMPLICATIONS". In Miller EC et.al.(eds): Naturally Occurring Carcinogens, Mutagens, and Modulators of carcinogenesis, pp57-65. Baltimore, University Park Press 1979.
- 87.- Travis, Curtis C. And Belefant, Helen. "PROMOTION AS A FACTOR IN CARCINOGENESIS". Toxicology Letter 60 (1992) 1-9.
- 88.-Vainio, H. "CURRENT TRENDS IN THE BIOLOGICAL MONITORING OF EXPOSURE TO CARCINOGENS". Scan. J. Work Environ. Health (1985). Vol. 11. 1-6
- 89.- Von Ledebur, M. and W. Schmid. "THE MICRONUCLEUS TEST: METHODOLOGICAL ASPECTS". Mutation Research (1973). Vol. 19. 109-117.
- 90.- Wattenberg. LW. "INHIBITION OF NEOPLASIA BY MINOR DIETARY CONSTITUENTS". Cancer Research (1983). Vol. 43. 2448-2453.
- 91.- Weisburger J. H., Williams G. M. "CHEMICAL CARCINOGENS" IN: CASARETT & DOULL'S. Toxicology. Klaassen C. D. 4th.ed. McGraw-Hill. New York (1991).
- 92.- World Cancer Research Fund in Association with American Institute for Cancer Research. "FOOD AND THE PREVENTION OF CANCER: A GLOBAL PERSPECTIVE".U.S.A. (1997).
- 93.- Yamamoto, K. Y. and Y. Kikuchi. " A COMPARISON OF DIAMETERS OF MICRONUCLEI INDUCED BY CLASTOGENS AND BY SPINDLE POISONS". Mutation Research (1980). Vol 71. 127-131.