

36
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**ESTUDIO IN VITRO E IN VIVO DE GENOTOXICIDAD
DE LA PIMIENTA NEGRA (*Piper nigrum*) EVALUADO
POR EL INCREMENTO DE INTERCAMBIOS ENTRE
CROMATIDES HERMANAS**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A N
ROGELIO TOMAS GUZMAN LINARES
PATRICIA MOTA MORALES**

**DIRECTOR DE TESIS :
M EN C SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO
ASESOR :
DR. EDUARDO MADRIGAL BUJAI DAR**

CUAUTITLAN IZCALLI EDO. DE MEX.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

INDICE GENERAL

	PAGINA
INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRAFICAS.....	4
RESUMEN.....	6
GLOSARIO.....	7
I.-INTRODUCCION.	
1.-Genotoxicologia.....	8
2.-Carcinogenesis y mutagenesis.....	10
3.-Metodos de estudio de mutagenicidad.....	14
4.-Intercambio entre Cromatides Hermanas.....	16
5.-Pimienta negra.....	21
5.1.-Historia.....	22
5.2.-Economia de la Pimienta negra.....	25
5.3.-Usos.....	27
5.4.-Componentes.....	28
5.5.-Antecedentes.....	30
II.-OBJETIVOS.....	32
III.-HIPOTESIS.....	33
IV.-METODOLOGIA.....	34
1.-Preparacion del extracto de la Pimienta negra.....	36
2.-Pruebas de toxicidad "In vitro" e "In vivo"....	36
2.1.-DL50.....	36
2.2.-Prueba de toxicidad "In vitro" en cultivo celular de linfocitos a 72 hrs.....	39
3.-Ensayo "In vitro" a 92 hrs con y sin S9.....	40
4.-Ensayo "In vivo".....	42
5.-Fijacion de laminillas y tincion diferencial.....	42

6.-Observacion al microscopio y cuenta de ICH's.....	43
7.-Procesamiento estadistico de los resultados.....	43
V.-RESULTADOS	
1.-Estudio ''In vitro''.....	45
2.-Estudio ''In vivo''.....	46
VI.-DISCUSION.....	62
VII.-CONCLUSIONES.....	66
VII.-REFERENCIAS.....	67

INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRAFICAS

pagina

TABLAS:

No 1 Tipos de mutaciones.....	11
No 2 Clasificación de los métodos de estudio de la mutagenicidad.....	15
No 3 Importación de especies diversas INEGI.....	26
No 4 Tabla para la administración primaria de prueba de Lorke.....	37
No 5 Prueba de Lorke para la determinación de DL50.....	38
No 6 Tabla de administración secundaria de la prueba de Lorke.....	38
No 7 Ensayo en cultivo de linfocitos a 92 hrs con y sin S9.....	41
No 8 Resultados de cultivo de linfocitos a 72 hrs.....	47
No 9 Resultados del ensayo a 92 hrs con S9.....	48
No 10 Resultados del ensayo a 92 hrs sin S9.....	49
No 11 Resultados de activación metabólica de CCF con S9..	50
No 12 Resultados del ensayo "In vivo".....	58

FIGURAS:

No 1a Cromosomas de primera división con 5-BrdU.....	19
No 1b Cromosomas de segunda división con 5-BrdU.....	19
No 1c Cromosomas de tercera división con 5-BrdU.....	19
No 2 Tipos de ICH.....	20
No 3 Modelo de Painter.....	20

No 4 Principales componentes quimicos de Pimienta negra..29
No 5 Diagrama de procedimiento general.....35

GRAFICAS:

No 1 Promedio de ICH vs dosis "In vitro" a 72 hrs.....51
No 2 Promedio de ICH vs dosis "In vitro"
a 92 hrs con y sin S9.....52
No 3 IR contra dosis "In vitro" a 72 hrs.....53
No 4 IR contra dosis "In vitro" a 92 hrs con y sin S9..54
No 5 Cinetica celular contra dosis "In vitro"
a 72 hrs.....55
No 6 Cinetica celular contra dosis "In vitro"
a 92 hrs sin S9.....56
No 7 Cinetica celular contra dosis "In vitro"
a 92 hrs con S9.....57
No 8 Promedio de ICH contra dosis "In vivo".....59
No 9 TPG contra dosis "In vivo".....60
No 10 Cinetica celular contra dosis "In vivo".....61

GLOSARIO

5-BrdU.- 5-Bromo-2-deoxiuridina.

DNA.- Acido desoxirribonucléico.

IARC.- International Agency for research on Cancer.

ICH.- Intercambio entre cromátides hermanas.

INEGI.- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.

R.- Índice de replicación.

NM.- Número de mitosis 1, 2 y 3 (primera, segunda y tercera división)

S9.- Fracción microsomal extracto de hígado de rata.

TPG.- Tiempo promedio de generación.

RESUMEN

La pimienta negra por ser uno de los condimentos más utilizados a nivel mundial, ha despertado el interés de algunos investigadores para conocer el posible daño que podría provocar esta especia, encontrándose un efecto carcinogénico y clastogénico.

De ahí nuestro interés para la realización del presente trabajo, en el cual se estudió la genotoxicidad de la pimienta negra. Este estudio se dividió en dos partes: una parte "in vitro" utilizando cultivos de linfocitos humanos a 72 y 92 hrs con y sin la fracción microsomal S9 con dosis de 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/ml}$; y otra, "in vivo" empleando médula ósea de ratón NIH, con dosis de 7.07, 14.141, 28.282 y 56.565 mg/kg de peso. En ambos ensayos se empleó un liofilizado de un extracto de pimienta negra.

Para el estudio de la genotoxicidad de la pimienta negra se utilizó la metodología de intercambio entre cromátides hermanas (ICH), encontrándose un incremento moderado y constante en los ICH's proporcional a la dosis, así como también una disminución de la proliferación celular en el estudio "in vitro", y en el estudio "in vivo" no se encontró ninguna diferencia.

I.-INTRODUCCION

1 GENOTOXICOLOGIA

El ácido desoxirribonucleico (DNA) es una molécula que controla las características estructurales y metabólicas de los seres vivos y las transmite de una generación a otra. Para cumplir con esta función es necesario que se duplique exactamente; sin embargo, debido a su misma estructura química, posee una elevada tendencia a interactuar con ciertos agentes físicos, químicos y biológicos del medio ambiente, los cuales alteran su configuración o impiden su duplicación correcta (6).

La genotoxicología es una subespecialidad de la toxicología que identifica y analiza la acción de agentes con toxicidad directa sobre el material hereditario de los sistemas vivos. El objetivo principal de la genotoxicología es detectar y comprender las propiedades de un grupo de agentes relativamente pequeño con una alta especificidad por los ácidos nucleicos, que producen efectos de deterioro en los elementos genéticos a concentraciones subtóxicas (6)

La genotoxicología puede ser dividida en tres categorías, toxicología aguda, subaguda y crónica para su mejor estudio (6).

El segundo objetivo de la genotoxicología es la elucidación de la relación entre la genotoxicología y la iniciación de una neoplasia. En esta última apreciación, la genotoxicología ha sido aplicada como una herramienta con la cual podemos saber cuales son los agentes químicos con propiedades para producir carcinogénesis

(6).

En los últimos años, la genotoxicología continúa creciendo como una especialidad legítima del área de la toxicología y la influencia de esta disciplina permite evaluar la seguridad de sustancias químicas en general obteniéndose resultados significativos(28).

2. CARCINOGENESIS Y MUTAGENESIS.

El gen es la unidad de la herencia. Cada gen es una secuencia de ácidos nucleicos que lleva la información para un péptido determinado. Un gen es una entidad estable, pero sujeta a cambios ocasionales en su secuencia. Tales cambios son llamados mutaciones (27) (29).

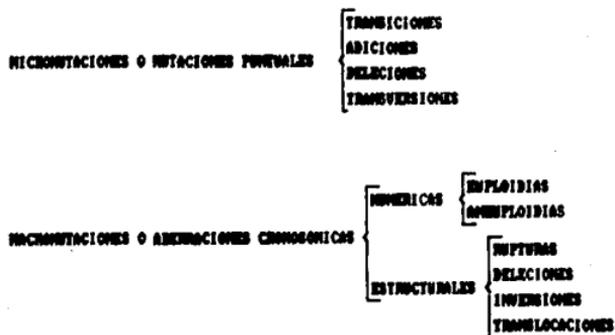
Una de las primeras observaciones acerca de las mutaciones la dió Thomas Hunt Morgan al trabajar con la conocida mosca *Drosophila melanogaster*, quien después de revizar un millón de reproducciones de un cromosoma hechas a lo largo de un año, encontró una mosca con los ojos blancos, donde solo había moscas de ojos rojos (las mutaciones son raras pero pueden dar cambios en la herencia). Posteriormente Müller en 1920 comenzó sus trabajos sobre mutagénesis, utilizando a *Drosophila melanogaster* como modelo experimental y probando diversos agentes para provocar mutaciones. Después de varias pruebas, principalmente con rayos X a diferentes dosis, notó que el número de mutaciones que había sobre *Drosophila* aumentó en 15000%. También encontró que las mutaciones solo se presentaban en la segunda o tercera generación después de ser dosificadas las moscas, por ello concluyó que la mayoría de las mutaciones eran recesivas, así como también demostró que la radiación natural o artificial podían provocar mutaciones que sujetas a la selección natural, podían a su vez, constituir una fuente de variabilidad de las especies como un factor de la evolución(16).

Las mutaciones pueden ser divididas en dos grandes grupos como

puede verse en la tabla No 1 (6)

Tabla No 1

TIPOS DE MUTACIONES



Los seres vivos del planeta están en constante cambio debido al entorno que les rodea, el cual provoca un número determinado de mutaciones que pueden ser consideradas como normales. El aumento poblacional ha provocado un avance industrial, y ha creado sustancias capaces de modificar la información genética, lo cual en organismos superiores puede provocar la aparición de cáncer.

A todas aquellas sustancias capaces de modificar al DNA se les conoce como agentes mutagénicos y a la rama de las ciencias biológicas que se encarga del estudio de la naturaleza de las mutaciones se le conoce como mutagénesis (17) (28)

No existe una definición de cáncer, pero en general el cáncer está considerado como un grupo de células subnormales, de crecimiento autónomo, sin el control usual del organismo, que tienen las células normales con respecto al crecimiento.

Las células cancerosas van a competir con las células normales por espacio y nutrición y eventualmente provocan la muerte del hospedador.

Las células cancerosas se caracterizan por su rápido crecimiento, por su alta proliferación mitótica, por su rápida expansión en el tejido sano y por su metástasis vía sanguínea o linfática, la cual las lleva a sitios distantes donde residen y proliferan (15).

Una de las primeras referencias médicas acerca del cáncer la dió Percivall Pott y Henry Eagle en 1775 al encontrar una relación entre el oficio de deshollinador y el cáncer de escroto (11).

Para que se desarrolle cualquier tipo de cáncer se debe pasar

por dos etapas: La iniciación que es la posible participación de cambios genéticos (mutaciones y modificaciones permanentes en la expresión de la información contenida en los genes). Y la promoción que es la proliferación de las células iniciadas bajo un estímulo promotor, para que se convierta en célula cancerosa (11).

Por ello podemos llegar a los siguientes razonamientos: Deben existir sustancias capaces de provocar un cambio permanente en el material genético en la fase de iniciación y la fase de promoción (42).

Pero existen también individuos que a pesar de estar en contacto con los agentes carcinogénicos no padecen el cáncer, esto nos hace pensar que existen genes que van a determinar la susceptibilidad a producir cáncer, estos genes se han denominado *oncogenes* (2).

Existen reportados cerca de 40 oncogenes. Los oncogenes en una célula normal (los cuales son llamados *protooncogenes*) son muy importantes dentro del crecimiento y proliferación celular, sobre todo en el estadio embrionario, también tienen un papel importante en el metabolismo celular (2).

Las condiciones más importantes para que una célula se transforme en cancerosa son: Múltiples copias de un gene, rearreglo genético, mutaciones puntuales y la participación viral (2).

3. METODOS DE ESTUDIO DE MUTAGENICIDAD

Estas son muchas pruebas de corto plazo y fueron propuestas para medir la actividad mutagénica de diferentes agentes sospechosos. Y se pueden clasificar en dos grupos: "in vivo" e "in vitro" (22) (39). Ver tabla No 2

Las pruebas "in vivo" utilizan un organismo vivo pudiendo ser este rata, ratón, hamster, sapo (14), *Drosophila melanogaster*. En este tipo de pruebas se disminuye la probabilidad de obtener un resultado falso negativo, ya que interviene la actividad metabólica del organismo en cuestión (13) (8).

Las pruebas "in vitro" emplean con mayor frecuencia cultivo de células de mamífero (fibroblastos y linfocitos humanos) y cultivos de *Salmonella typhimurium* (7) (32). En ambos cultivos, para simular el metabolismo de un organismo vivo, se utiliza la fracción microsomal S9, obtenida de hígado de rata (34) (36) (6). Estas técnicas permiten hacer una rápida evaluación de la mutagenicidad de sustancias sospechosas.

En general los cultivos de células "in vitro" o la observación directa de células provenientes de médula ósea, así como el estudio de los espermatozoides, permiten valorar, mediante el estudio del cariotipo, los efectos mutagénicos ocasionados sobre cromosomas y constituyen una valiosa herramienta que la citogenética ha aportado principalmente en los últimos años, para la detección de los efectos genotóxicos. Esta herramienta se ha perfeccionado con el desarrollo de la técnica del intercambio de cromátides hermanas que logra una valoración más objetiva del daño

Tabla No 2

CLASIFICACION DE LOS METODOS DE ESTUDIO
DE LA MUTAGENICIDAD

TIPO DE CELULAS	
CELULAS SOMATICAS	CELULAS GONADICAS
IN VITRO	IN VIVO
<u>I MUTACIONES GENICAS</u>	
-BACTERIAS	-PRUEBAS DE MANCHA (SPOT TEST)
-LEUCOCITOS	
-CELULAS EN CULTIVO	
<u>II CAMBIOS CROMOSOMICOS</u>	
-CULTIVO DE LINFOBLASTOS	-CROMOSOMOS -METAFASE
-CULTIVO DE LINFOCITOS	
	-CROMOSOMOS LITALES
	-CROMOSOMOS DE ESPERMATOCITOS
	(NO DISTINCION)
<u>III INDICADORES DE DAÑO BIOLÓGICO</u>	
-SISTEMAS DE DNA NO PROGRAMADO	-SISTEMAS DE DNA PROGRAMADO
-SISTEMAS DE DNA EN CÉLULAS	-SISTEMAS DE DNA EN CÉLULAS
-SISTEMAS DE DNA	-SISTEMAS DE DNA
-COMBINACION GENICA	-COMBINACION DE MEMORIAS

4. INTERCAMBIOS ENTRE CROMÁTIDES HERMANAS

En 1950 Taylor trabajando con timidina tritiada (H^3) y realizando estudios de replicación del DNA encontró accidentalmente que existía un intercambio entre fragmentos de cromátidas hermanas, las cuales eran simétricas y equivalentes con respecto al otro (41) (19).

Posteriormente R.J. Dufrain sustituyó a la timidina tritiada (H^3) por pirimidinas halogenadas (40). O'Neill y colaboradores, determinaron que el mejor análogo de bases para el estudio de ICH era la 5-Bromo-2-deoxiuridina (24) (33).

El proceso de ICH se lleva a cabo en la etapa de síntesis de DNA y se ha propuesto que ocurre donde se bifurca la cadena doble de DNA durante el proceso de replicación. Es posible que el fenómeno de ICH sea la consecuencia de un proceso que permite a la célula dividirse, aún en presencia de lesiones en su DNA; de ser así, pudiera haber una correlación entre el fenómeno y la mutación, dado que las lesiones persistentes aumentarían la probabilidad de esta última en el DNA. Lo anterior tiene importancia en relación con células cancerosas, debido a que existen pruebas que asocian la persistencia de lesiones en el DNA con las células malignas (31).

Para el estudio de los ICH es necesario saber diferenciar los dos primeros ciclos celulares después de la administración del mutágeno.

Para el análisis de los ICH se requiere de la incorporación de la 5-BrdU al DNA, esto hace que después de una primera división,

una de las cadenas de DNA tenga incorporado al análogo de base en ambas cromátides, como se muestra en la figura 1a.

En la segunda división, y siguiendo con la ley de la replicación semiconservativa, se observa que una de las cromátides va a tener ambas cadenas de DNA sustituidas con la 5-BrdU, mientras que la otra cromátide tendrá una cadena sustituida y la otra no, como nos muestra la figura 1b.

Siguiendo la cinética de proliferación celular, en una tercera división celular se tendrá como resultado 2 tipos de cromosomas distintos; el primero donde las dos cadenas de ambas cromátides estarán sustituidas con el análogo de base, y el segundo cromosoma donde una de la cromátidas tiene sustituidas ambas cadenas de DNA, y la otra cromátide en la que solo una de las cadenas esté sustituida. Figura 1c.

Para poder visualizar este fenómeno en sus diferentes fases celulares es necesario realizar una tinción diferencial. Utilizando el colorante fluorescente Hoechst, luz negra, solución salina de citratos caliente y Giemsa (20) (26).

Los ICH pueden ser clasificados en tres categorías: Sencillos, dobles y triples.

Dicha clasificación está dada de acuerdo a la cantidad de las recombinaciones que se llevan a cabo entre las cromátides hermanas (31). Figura 2.

El modelo que constituye la hipótesis más aceptada de la inducción de ICH, fué dada por Robert B. Painter en el año de 1980, proponiendo lo que llamó el modelo de replicación de ICH basado en la idea de que los rompimientos de doble cadena son

generados en la conjunción entre un replicón completamente duplicado y otro parcialmente duplicado (35).

Se denominan replicones a las unidades discretas de replicación del DNA separadas unas de otras por RNA y proteínas. Painter sugirió que el DNA en estas conjunciones o sitios de separación son susceptibles a rompimientos de doble cadena durante la replicación, lo cual es factible por la presencia de la enzima Topoisomerasa II, descubierta en células de *Drosophila*; dicha enzima es capaz de inducir rompimientos de doble cadena del DNA. De esta manera, el daño que involucra la detención en la progresión de los orígenes de replicación provoca una asincronía en la replicación de dichas unidades, lo que incrementa la posibilidad de dobles rupturas después de que una unidad haya terminado su replicación (35). Ver figura No 3.

En un principio se pensó que los ICH podrían ser el resultado de un proceso de reparación de lesiones en el DNA; sin embargo la observación de que algunos agentes pueden inducir un incremento en la frecuencia de ICH que se prolonga mucho tiempo después de su administración, sugiere que las lesiones no son reparadas; aunque no se descarta la posibilidad de que la frecuencia se mantenga alta debido a las lesiones secundarias que se expresan posteriormente como ICH (23) (35).

Figura 1a

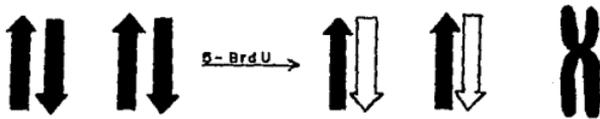


Figura 1b

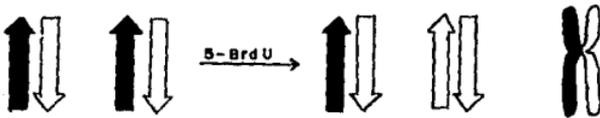


Figura 1c

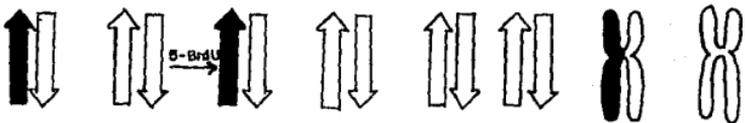
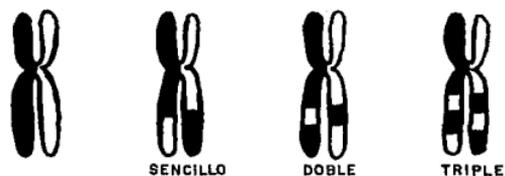


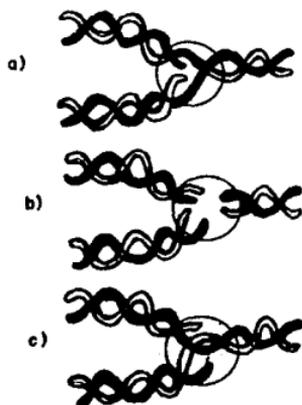
Figura 1a representa la incorporación de la 5-BrdU después de una primera división celular, la figura 1b representa la incorporación de la 5-BrdU en una segunda división y la 1c corresponde a una tercera división. Cada una de las flechas representa una cadena de DNA donde la flecha oscura indica la cadena original y la clara a la cadena sustituida (31).

Figura 2



Clasificación de ICH's (31)

figura 3



Modelo de replicación para el intercambio de cromatidas hermanas.
a) Unidad discreta de replicación del DNA (replicón). b) Discontinuidad de las cadenas de DNA que puede ser inducida por agentes genotóxicos. c) Intercambio entre una cadena de DNA recién sintetizada y una cadena original aún sin replicar (35).

5. PIMENTA NEGRA

El género *Piper* pertenece a la clase de las Dicotiledóneas, del orden de los Piperales y de la familia de las Piperáceas. Este género comprende más de 600 especies, una decena de las cuales dan productos más o menos utilizados, ya sea como especias o drogas medicinales (4).

Piper nigrum cuyo número cromosómico es $2n = 52$, se presenta bajo forma de liana perene, con hojas perenes, que trepa alrededor de un tutor y que puede alcanzar hasta 10 m de altura (21).

El condimento de la pimienta negra se presenta en forma de semillas relativamente pequeñas, de color grisáceo con corteza arrugada pero bien fija a la semilla; contiene pocos granos vacíos y posee un sabor más ardiente que aromático. El hecho de ser secada con frecuencia en el suelo le confiere su color y un poco de arena (38).

La pimienta negra se presenta en forma de granos casi esféricos cuyo diámetro está comprendido entre 3 y 6 mm (en general de 4 a 5), de superficie reticulada y más o menos rugosa. El color va del marrón obscuro al negro o al gris obscuro (21).

El olor es característico, penetrante y aromático, el sabor es calido, picante y muy ardiente (21).

5.1 HISTORIA

El nombre genérico de la pimienta deriva probablemente del Sanscrito Pippali, el cual hace referencia a la semilla seca y aromática de *Piper nigrum*. La familia de las piperaceas incluye 9 géneros y cerca de 1400 especies. Las especies de pimienta son hierbas altamente tropicales, pero algunas son arbustos (21).

Las primeras referencias del uso de la pimienta negra datan de hace 3000 años, y fueron reportadas en la literatura médica sanscrita. La pimienta larga (del norte de la India) fué conocida después de la pimienta negra (del sur de la India) en la Era Grecoromana, y por varias centurias fué relegada por la calidad superior de la pimienta negra, más tarde colonizadores de la India, introdujeron la pimienta negra a Indonesia alrededor del año 100 A.C. Los romanos introdujeron la pimienta negra y larga a occidente bajo la orden del emperador Marco Aurelio en el año 176 A.C, durante la toma de Alejandría como botín de guerra. La pimienta negra se abarató y fué excluida del tributo (presumiblemente por razones políticas en favor de las masas). Después de la conquista de Cesárea y Palestina en el año 1101 los soldados victoriosos de Genova 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 pimienta, y en algunos países de Europa se prefería este tipo de paga al dinero, el cual era llamado "Peppercorn rent", en la actualidad se sigue utilizando este término como una cosa nominal o trivial (38).

Shakespeare en su obra "Twelfth night" acto tercero escena 4, nos dice a través del personaje Aguecheek:

Aguecheek- Aquí esta la revancha; yo advierto que esto sera de vinagre y pimienta.

Durante la Edad Media las ciudades de Alejandría, Genova y Venecia fueron el centro comercial de la pimienta hasta que en 1498 Vasco de Gama descubre la "ruta de las Especies" que va de Lisboa hasta las costas de Malabar en la India, convirtiéndose Portugal en el centro comercial hasta que en 1595 los holandeses Houtman y Van Neeck comienzan sus viajes hacia Indonesia, compitiendo con 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 tratado 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 (38).

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. Isaac Asimov en su obra de ciencia ficción "Fundación" (3), en su parte V, PRINCIPES COMERCIANTES, capítulo 5; através de su personaje Hober Mallow nos dice:

COMERCIANTES- Con la inevitabilidad psichistórica, el control económico de la fundación creció. Los comerciantes se hicieron ricos; y con la riqueza llegó el poder...

A veces se olvida que Hober Mallow empezó su vida como un vulgar comerciante. Nunca se olvida que la terminó como el primero de los príncipes comerciantes...

Enciclopedia Galáctica.

Comodoro-¿Cómo ha dicho que quería que le pagáramos? ¿Con hierro? Mallow-Eso, y carbón y bauxita. También con tabaco, pimienta, magnesio, madera dura. Nada que usted no tenga en abundancia.

5.2 ECONOMIA DE LA PIMIENTA NEGRA

El primer tratado comercial de la pimienta negra directo con nuestro país fué en 1961 con Sarawak, Malasia, e Indonesia. El número de variedades fué de 25, de las que destacan por su producción, Sarawak-X, Sarawak-VI, Kaluvally, Balancotta y Belantung (21).

En México no existen plantaciones comerciales de pimienta negra, razón por la que se tiene que 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 enraizador comercial es muy bajo (21); aunado a esto la planta de pimienta negra es muy susceptible a ser infectada por el hongo *Phytophthora palmivora* (37).

Por estas razones la comercialización de la pimienta negra en México sigue siendo a base de importaciones, provenientes principalmente de la India, Indonesia y Brasil (21).

El INEGI por medio de la Comisión Nacional de Alimentos nos proporciona datos de la importación de diversas especies donde se incluye la pimienta negra (9). Ver tabla 3

Tabla No 3 (9)

**IMPORTACION DE LOS PRINCIPALES PRODUCTOS ALIMENTICIOS
POR TIPO DE BIEN SEGUN ACTIVIDAD
ECONOMICA DE ORIGEN 1986-1991
(CIFRAS EN MILES)**

ESPECIAS DIVERSAS	UNIDAD	TOTAL		BIENES DE ORIGEN CANARI.		BIENES DE ORIGEN EXTRANJERO	
		CANTIDAD	DOLARES	CANT.	DOL.	CANT.	DOL.
1986	Kg	6329	9891	3345	6306	984	3585
1987	Kg	6884	11278	3424	7398	1888	3688
1988	Kg	4185	11846	2698	6315	1487	4531
1989	Kg	5456	19317	3988	15778	1468	3439
1990	Kg	7864	23388	3845	23887	1199	2381
1991	Kg	11473	31971	7741	24888	3732	4571

5.3 USOS

El principal uso de la pimienta negra es como condimento en el arte culinario, más sin embargo también es utilizada en la medicina tradicional como tónico estomacal, pues aumenta 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 perecederos, pues sirve como conservador y preservador.(21) (1) (14).

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. Los frutos de algunas especies se han empleado en la medicina occidental por más de 11 siglos como remedio de enfermedades del tracto genitourinario, en la India las comadronas hacen uso de algunas especies de pimienta por sus propiedades oxitocínicas (4).

5.4 COMPONENTES

EL FRUTO CONTIENE:

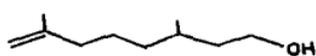
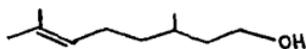
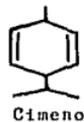
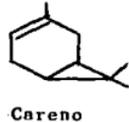
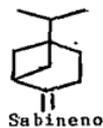
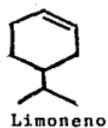
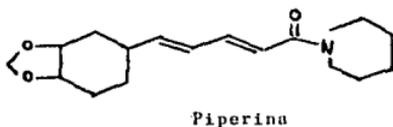
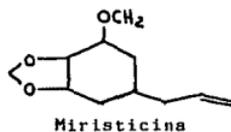
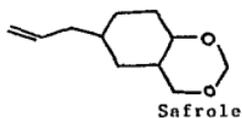
β -metil-pirrolin, piperitina, α y β -pineno, camfeno, sabineno, miristicina, limineno, α y β -terpinenos, p-cimeno, α -thujeno, Δ -careno, felandreno, α -bergamoteno, β -cariofileno, epoxi-dihidro cariofileno, ácido fenilacético, dihidro carveol, piperonal, criptona, citronenol.

LA SEMILLA CONTIENE:

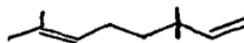
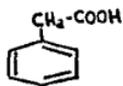
Piperina, chavicina, piperatina, miristicina, safrole, d-limoneno, l-pineno, linalol, felandrena, piperidina (14) (1) (4) (18) (5).

Ver figura No 4

Figura No 4



Mezcla citronelol



Linanolol.

Principales componentes químicos detectados en *Piper nigrum* (5)

(18)

5.5 ANTECEDENTES

La pimienta negra al ser el condimento más importante a nivel mundial en la cocina internacional y la segunda especie 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.

Tal es el caso de Concon et al, quién proporcionó la primera evidencia de la carcinogenicidad de la pimienta negra, al hacer uso de un extracto de esta aplicado subcutáneamente en ratones albinos Swiss, observando que había una inducción de tumores localizados en: pulmón, hígado y piel (10).

Siguiendo los estudios de Concon, El-Mofty et al 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, ileón y estómago (14).

Los tumores de hígado son diagnosticados como carcinomas hepatocelulares, y los 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 (14).

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 de ICH's y aberraciones cromosómicas (rupturas

cromosómicas y gaps) observando que éstos tenían un aumento proporcional a la concentración del extracto utilizado, además observaron una disminución del índice mitótico proporcional a la concentración (1).

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, cocarcinogénicos y promotores de tumores, entre los que destacan: d-limoneno, l-pineno, linanolol y felandreno (1) (4) (14).

II.- OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

-Determinar la genotoxicidad de la pimienta negra (*Piper nigrum*), evaluada por el aumento en los intercambios entre cromátidas hermanas (ICH).

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Obtener un extracto de pimienta negra (*Piper nigrum*).
- 2.-Determinar la DL₅₀ en ratones NH y realizar una prueba de citotoxicidad con dicho extracto.
- 3.-Una vez encontrada la DL₅₀ en ratones y evaluada la toxicidad en cultivo celular, determinar las concentraciones de trabajo para los ensayos genotóxicos "in vitro" e "in vivo".
- 4.-Determinar la frecuencia de ICH's en cultivo de linfocitos inducido por el extracto de pimienta en presencia y ausencia de la fracción microsomal S9.
- 5.-Determinar la frecuencia de ICH's en médula ósea de ratones tratados con las diferentes dosis del extracto

III.- HIPOTESIS

La acción de un agente mutagénico, en nuestro caso, un extracto de pimienta negra, aumentará la frecuencia de intercambios entre cromátidos hermanas en forma proporcional a la concentración.

IV.- METODOLOGIA

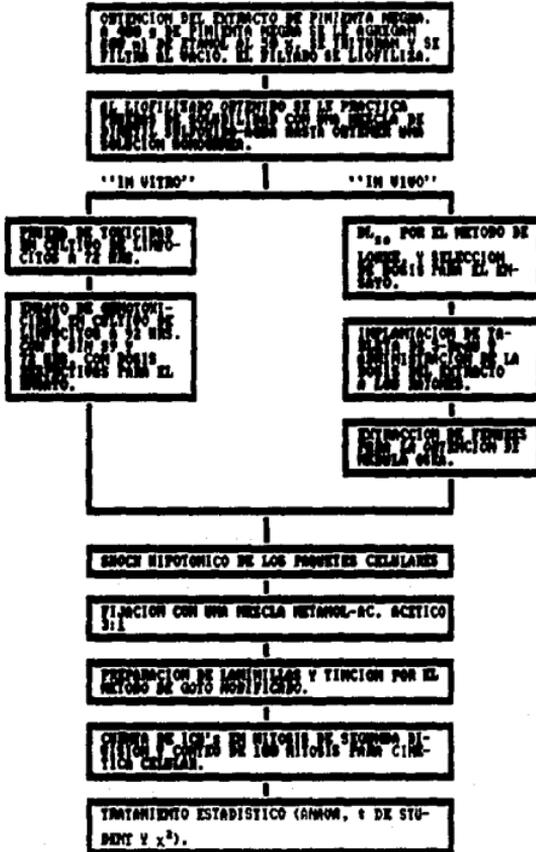
Para evaluar el incremento de ICH provocados por la pimienta negra. El trabajo fué dividido en siete etapas:

- 1.-Preparacion de un extracto alcohólico de pimienta negra.
- 2.-Pruebas de toxicidad "in vitro" e "in vivo"
 - 2.1.-DL₅₀ en ratones.
 - 2.2.-Prueba de toxicidad en cultivo de linfocitos (72 hrs).
- 3.-Ensayo "in vitro" en cultivo de linfocitos a 92 horas con y sin la fracción S9.
- 4.-Ensayo "in vivo"
- 5.-Fijación de laminillas y tinción diferencial.
- 6.-Observación al microscopio y cuenta de ICH
- 7.-Procesamiento estadístico de los resultados.

Dicho procedimiento general puede observarse en la figura 5.

Figura No 5

DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL ESTUDIO DE LA GENOTOXICIDAD DE LA PIMIENTA NEGRA "IN VITRO" E IN "VIVO"



1.-Preparación de un extracto alcohólico de pimienta negra.

A 400 g. de pimienta negra se le añadieron 800 ml. de etanol al 50%. Se trituraron y se guardó por un lapso de 48 horas cubierto de la luz. Pasado ese tiempo, se filtró al vacío. La solución resultante se liofilizó y se obtuvo una masa seca del extracto con un peso de 8,3446 g. que corresponde a 2.086 % de la masa total.

Se hicieron pruebas de solubilidad del liofilizado con dimetil sulfóxido a diferentes concentraciones (50, 75 y 100%), diluyendo con agua. Finalmente se decidió para el ensayo "in vivo" una solución al 100 %, y para el ensayo "in vitro" una solución al 50 %

2.-Pruebas de toxicidad "in vitro" e "in vivo".

2.1.-DL₅₀ en ratones por el método de Lorke (30).

2.2.-Prueba de toxicidad en cultivo de linfocitos (72 hrs) (1).

2.1.-En el procedimiento de DL₅₀

Se tomaron 1250 mg del liofilizado y se les adicionaron 20 ml, de dimetil sulfóxido con ayuda de un sonicador, teniendo una solución cuya concentración es de 62.5 mg/ml. a la cual llamaremos solución A. De la solución A se toma 1 ml y se lleva a 10ml, teniendo una solución con una concentración de 6.25 mg/ml. a la cual llamaremos solución B. Tomamos 1 ml de la solución B y lo llevamos a 10 ml. teniendo una solución cuya concentración será de 0.625 mg/ml. a la cual llamaremos solución C.

Siguiendo la técnica de Lorke (30), Para la determinación de

la DL₅₀ se utilizan las siguientes dosis: 10, 100 y 1000 mg/kg de peso, utilizándose 3 ratones para cada dosis, cuyos pesos y ml utilizados de cada solución se muestran en la tabla No 4 (Todas las dosis fuerón administradas intraperitonealmente):

Tabla No 4

PESO (G)	SOLUCION	ML UTILIZADOS	CONCENTRACION
25.9	C	0.41	10 mg/kg
32.7	C	0.52	10 mg/kg
25.0	C	0.4	10 mg/kg
25.8	B	0.41	100 mg/kg
30.0	B	0.48	100 mg/kg
24.5	B	0.39	100 mg/kg
26.0	A	0.41	1000 mg/kg
25.0	A	0.4	1000 mg/kg
26.2	A	0.42	1000 mg/kg

Los resultados de la administración del extracto fueron los que se muestran en la tabla No 5.

-De la solución A ninguno de los ratones sobrevivió, de la solución B sobrevivió un ratón y de los ratones de la solución C sobrevivieron dos ratones por lo que siguiendo la tabla 5 de Lorke se eligieron las dosis de 20, 40, 80 y 160 para el paso siguiente:

Tabla No 5

			DOSIS PARA LA 2a PRUEBA (mg/kg)				
10	100	1000					
0/3	0/3	0/3		1600	2900	5000	
0/3	0/3	1/3	600	1000	1600	2900	
0/3	0/3	2/3	200	400	800	1600	
0/3	0/3	3/3	140	225	370	600	
0/3	1/3	3/3	50	100	200	400	
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160*	
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60	
1/3	3/3	3/3	5	10	20	40	
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16	
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8	

Metodo de Lorke para DL₅₀ (30)

La administración se realizó como puede verse a en la tabla No 6:

Tabla No 6

PESO	SOLUCION	ML UTILIZADOS	DOSIS UTILIZADA
24.8g	A	0.0625	20 mg/kg
25.2g	B	0.08	40 mg/kg
28.4g	B	0.182	80 mg/kg
27.7g	B	0.355	160 mg/ml

De acuerdo de a lo establecido por Lorke se debe obtener la media geométrica de la multiplicación de la primera dosis mortal y la última dosis donde hubo sobrevivientes en nuestro caso correspondería a 160 y 80 mg/kg de peso respectivamente, siendo

la DL₅₀ en nuestro ensayo de 113.13 mg/kg de peso.

2.2.-Prueba de toxicidad

Para esta prueba es necesario realizar un cultivo de linfocitos a 72 horas y probar altas y bajas concentraciones del extracto de pimienta, mismas que fueron preparadas pesando 10mg del liofilizado y se llevaron a un volumen de 10 ml, obteniéndose una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$. Se esterilizó por filtración (con filtros millipore de poro 0.22 μm) y se protege de la luz.

Se emplearon 10 frascos para cultivo celular distribuidos de la siguiente manera por duplicado:

TESTIGO NEGATIVO

250 $\mu\text{g/ml}$

500 $\mu\text{g/ml}$

750 $\mu\text{g/ml}$

1000 $\mu\text{g/ml}$

Una vez obtenidas las laminillas y hechas las observaciones al microscopio se puede deducir que las concentraciones a utilizar para el ensayo "in vitro" deben ser menores a la más baja, ya que a mayores concentraciones, existe una gran mortalidad celular y a la concentración más baja se observa un ligero crecimiento celular.

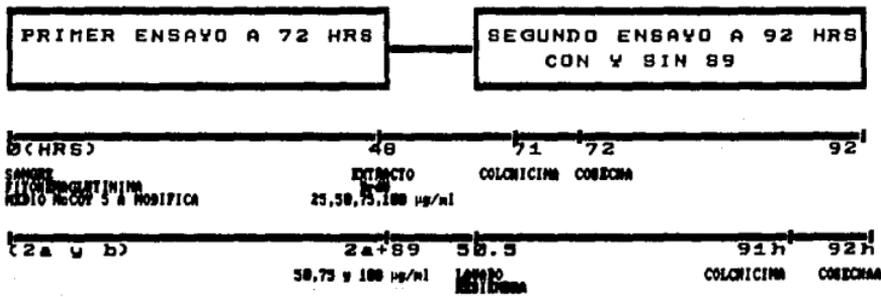
Con los resultados anteriores y la reportado en el estudio de Abraham (1) decidimos emplear un intervalo de concentraciones entre 25 y 100 $\mu\text{g/ml}$. utilizaremos cuatro concentraciones del extracto, las cuales son: 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$, para el primer ensayo de genotoxicidad de la pimienta negra en un

cultivo de linfocitos. La dosis del extracto empleado permaneciendo en contacto con los linfocitos hasta su cosecha al igual que la 5-BrdU.

3.-Ensayo "in vitro" en cultivo de linfocitos a 92 horas con y sin la fracción S9.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de toxicidad, y basandonos en el estudio previo a 72 hrs, se realizó un nuevo cultivo de linfocitos, obtenidos a partir de una donadora sana a 92 horas, las concentraciones más adecuadas para el estudio, las cuales fueron de 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$, y se corrió un blanco y un testigo del solvente utilizado. Se prueban las mismas concentraciones en otro cultivo de linfocitos de la misma donadora a 92 horas y se adiciona la fracción microsomal S9. El tiempo de contacto del extracto con los linfocitos fué de 2.5 hrs, posteriormente se lavó con el medio de cultivo utilizado y se realizó una resiembra agregando 5-BrdU, que permaneció hasta su cosecha. Como lo explica la siguiente tabla No 7.

TABLA No 7:
ENSAYO DE CULTIVO DE LINFOCITOS A 72 Y 92 HRS CON Y SIN S9



*NOTA: 2a es el cultivo de linfocitos con fraccion
 MICROSOMAL S9.
 2b es el cultivo de linfocitos sin fraccion
 microsomal S9.

4.-Ensayo "in vivo".

Una vez determinada la DL₅₀ se establecieron para el estudio las siguientes concentraciones: 1\2, 1\4, 1\8, 1\16 de la DL₅₀, las cuales correspondieron a las concentraciones de 56.565, 28.282, 14.141, y 7.07 mg\kg de peso respectivamente corriendo conjuntamente determinaciones químicas y un testigo negativo con el solvente utilizado.

Se emplearon 6 lotes de cinco ratones (cepa NIH, donados por la ENCB y se alimentaron ad libitum) cada uno. Para obtener una tinción diferencial de las cromátides hermanas se implantó subcutáneamente en un costado del ratón una tableta de 5-bromo-2-deoxiuridina parcialmente cubierta con parafina. Una hora después se administró la dosis correspondiente. Al término de las 24 horas se les sacrificó y se extrajeron los fémures para obtener la médula ósea.

5.-Fijación de laminillas y tinción diferencial.

Una vez obtenidas las células (tanto "in vitro" como "in vivo"), se les realizó un Shock hipotónico con KCl 0.075M y se centrifugó para obtener el paquete celular. A este paquete se le añadió una solución fijadora de metanol-ac. acético con una proporción 3:1 dejándose reposar por un lapso de 15 minutos. Este procedimiento se repitió tres veces con el paquete celular obtenido.

Se fijaron las laminillas sobre portaobjetos previamente desengrasados y limpios. Se observaron al microscopio para comprobar si existían metafases con el objetivo de 25X.

Se dejarón reposar las laminillas por un día en un lugar limpio y fresco, protegidas de la luz. Transcurrido ese tiempo de reposo se hizo una tinción diferencial con el colorante de Hoescht, luz negra, una solución salina de citratos caliente y Giemsa.

6.-Observación al microscopio y cuenta de ICH

Con objetivo de 25X se localizarón las metafases que se encontraban en segunda división y se procedió a contar los intercambios.

Se realizó un conteo de 25 metafases por cada ratón y 30 metafases para cada cultivo correspondiente a la concentración utilizada.

Por último se contarón 100 metafases para cada concentración (junto con los testigos y los blancos) para obtener la cinética de proliferación celular. De este resultado se obtuvo también el índice de replicación por medio de la siguiente fórmula:

$$I.R. = \frac{NM1(1) + NM2(2) + NM3(3)}{100}$$

Así como el tiempo promedio de generación cuya fórmula es:

$$T.P.G. = \frac{\text{Hrs BrdU a las que estuvo expuesto el animal.} \times 100}{NM1(1) + NM2(2) + NM3(3)}$$

7.-Procesamiento estadístico de los resultados.

Se realizó el análisis de varianza a los resultados obtenidos en los ICH, en ambos ensayos, así como se le realizó la prueba de distribución t.

A la cinética de proliferación celular se le realizó la prueba

de λ^z al igual que al índice de replicación y al tiempo promedio de generación (25) (12).

V.- RESULTADOS

1.- Estudio "in vitro":

En la tabla número 8 se muestra el incremento de ICH's obtenido en el primer ensayo a 72 hrs. Como puede observarse el extracto de pimienta negra indujo un incremento en función de la concentración empleada y con la mayor dosis que es de 100 $\mu\text{g/ml}$. Se presenta un marcado efecto citotóxico, representado por un retraso en la cinética celular.

En el segundo ensayo con y sin la fracción S9 se puede observar la misma tendencia de aumento moderado de ICH's y un retraso del ciclo celular (Tabla 9 y 10). Realizando una analogía de ambos resultados obtenidos para los cultivos con y sin fracción microsomal S9, en el cultivo donde se empleo la fracción S9 no se presentó un número elevado de ICH's como podría esperarse en el caso de que los componentes de la pimienta negra se metabolizaran a compuestos más mutagénicos.

Un análisis en general de los resultados muestra que existe un incremento significativo de ICH's gradual a la dosis empleada de pimienta negra y un efecto citotóxico.

La tabla número 11 muestra la activación metabólica que tiene la ciclofosfamida en función a la fracción microsomal S9, y el aumento de ICH's. Esto nos da una idea del buen funcionamiento de la fracción microsomal así como de la estandarización de las condiciones de trabajo para los cultivos de linfocitos a 92 hrs donde se hace uso de esta fracción microsomal.

2.- Estudio "in vivo".

En la tabla 12 podemos observar que existe un incremento en los CH's conforme va aumentando la dosis empleada en cada lote. Aquí podemos observar que este incremento es moderado pero constante conforme va aumentando la dosis. Por otro lado podemos ver que no existe una diferencia estadísticamente significativa en la cinética celular, pues no varía con respecto al testigo. El tiempo promedio de generación tampoco se ve influenciado por las dosis empleadas.

Tabla 8

CUADRO DE RESULTADOS DEL ESTUDIO GENOTOXICO DEL EXTRACTO DE PIMIENTA NEGRA EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS A 72 HRS

DOSES $\mu\text{g/ml}$	# CELULAS	INTERVALO	PROM.ICH	CINETICO			IR
				10	20	30	
T(-)(-)	30	4 - 15	7.5	27	36	37	2.1
25	30	6 - 20	9.94 *	33	40	27	1.94
50	30	6 - 13	10.36*	23	43	34	2.21
75	30	7 - 19	12.2*	57	32	11 ^	1.54 ^
100	30	9 - 26	13.4*	69	23	8 ^	1.39 ^

* DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON t DE STUDENT
 ^ DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON χ^2

Tabla 9

CUADRO DE RESULTADOS DEL ESTUDIO GENOTOXICO DEL EXTRACTO DE PIMIENTA NEGRA EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS A 92 HRS CON S9

DOSIS $\mu\text{g/ml}$	N CELULAS	INTERVALO	PROB. ICH	CINETICA			IR
				1a	2a	3a	
T(-)000	30	9 - 29	0.83	50	32	0	1.00
T(-)059	30	6 - 16	9.64	15	35	30	2.15
50	30	5 - 14	9.54	29	40	31^	2.14^
75	30	7 - 23	9.07	29	40	31^	2.14^
100	30	7 - 28	10.67	25	40	17^	1.02^

* DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON t DE STUDENT

^ DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON χ^2

Tabla 10

CUADRO DE RESULTADOS DEL ESTUDIO GENOTOXICO DEL EXTRACTO DE PIMIENTA NEGRA EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS A 92 HRS SIN S9

DOSIS $\mu\text{g/ml}$	N CELULAS	INTERVALO	PROM. ICH	CINETICA			IR
				1a	2a	3a	
T(-)(-)	30	4 - 10	7.82	21	58	21	1.98
T(-)DMS	30	4 - 13	8.64	49	33	18	1.69
50	30	5 - 14	9.34	22	53	25^	2.83^
75	30	9 - 16	10.66 *	37	58	13^	1.76^
100	30	9 - 17	11.36 *	51	36	13	1.62

* DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON t DE STUDENT

^ DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON χ^2

Tabla 11

**CUADRO DE RESULTADOS DE LA ACTIVACION METABOLICA DE LA
CICLOFOSFAMDA CON LA FRACCION MICROSOMAL S9.**

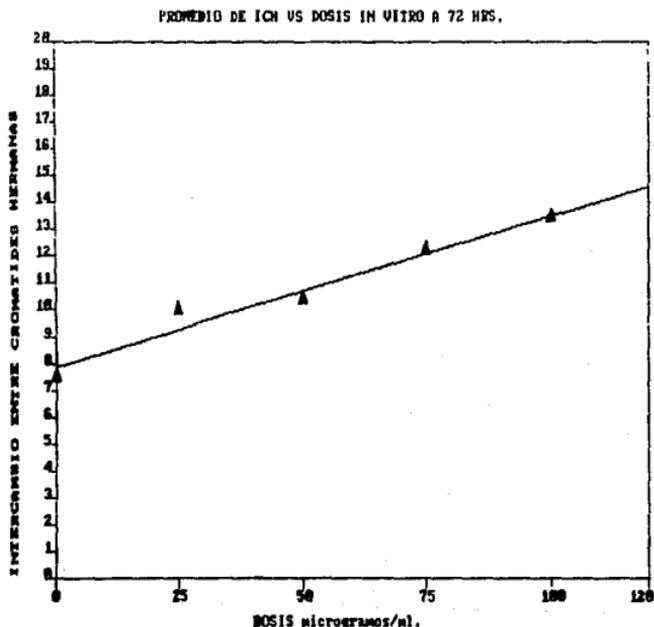
DOSIS $\mu\text{g/ml}$	N CELULAS	INTERVALO	PROM. ICH	CINETICA			IR
				1a	2a	3a	
Y(-)C77	30	1 - 9	5.30 *	16	34	49	2.31
Y(-)S9	30	5 - 15	12.96	20	56	24	2.00
0.3 (2h)	30	9 - 40	17.06 *	15	43	42	2.27

* DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON t DE STUDENT

^ DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON χ^2

Gráfica 1

GRAFICA DE PROMEDIO DE ICH CONTRA DOSIS IN VITRO A 72 HRS



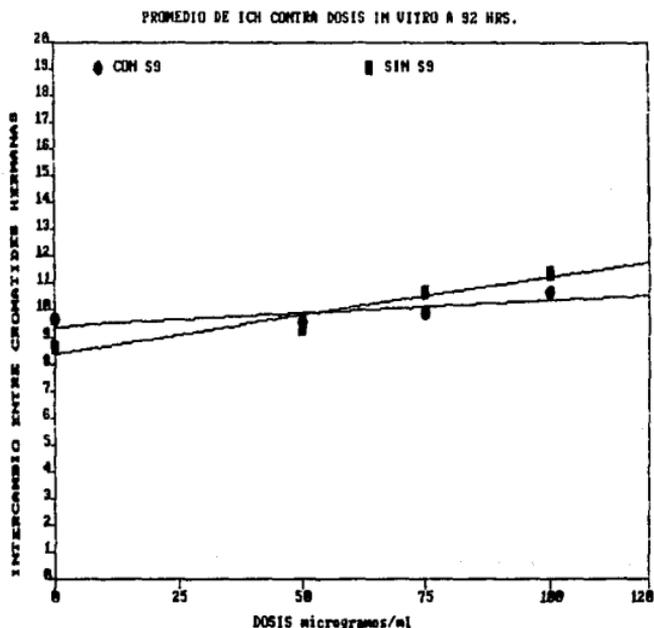
LA REGRESION POLINOMIAL DE LINEA 1 -

$$(7.868E+00) + (5.624E-02) * X$$

LA VARIANZA - 1.406E-01

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 2
GRAFICA DE PROMEDIO DE ICH CONTRA DOSIS IN VITRO
CON Y SIN S9



LA REGRESION POLINOMIAL DE LINEA 1 -

$$(9.418E+00) + (9.063E-03) * X$$

LA VARIANZA - 8.087E-02

LA REGRESION POLINOMIAL DE LINEA 2 -

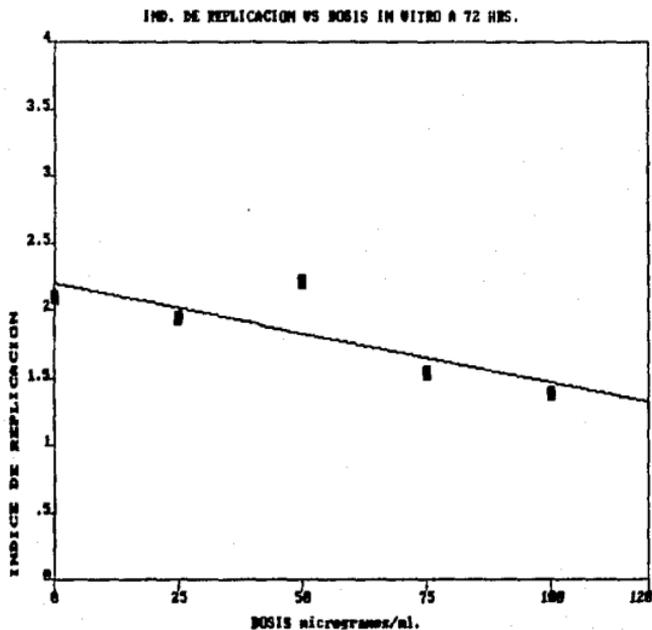
$$(8.431E+00) + (2.789E-02) * X$$

LA VARIANZA - 7.946E-02

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 3

GRAFICA DE INDICE DE REPLICACION CONTRA DOSIS IN VITRO
A 72 HRS



LA REGRESION POLINOMIAL DE LINEA 1 -

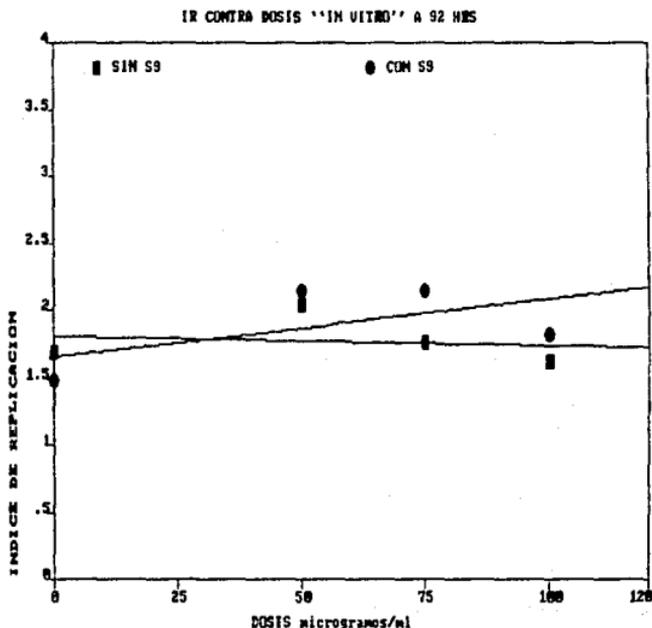
$$(2.200E+00 + (-7.280E-03)*X$$

$$LA VARIANZA - 3.514E-02$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 4

**GRAFICA DE INDICE DE REPLICACION CONTRA DOSIS A 92 HRS
CON Y SIN S9**



LA REGRESION POLINOMIAL DE LINEA 1 -

$$(1.815E+00) + (-7.086E-04)*X$$

LA VARIANZA - 2.44E-02

LA REGRESION POLINOMIAL DE LINEA 2 -

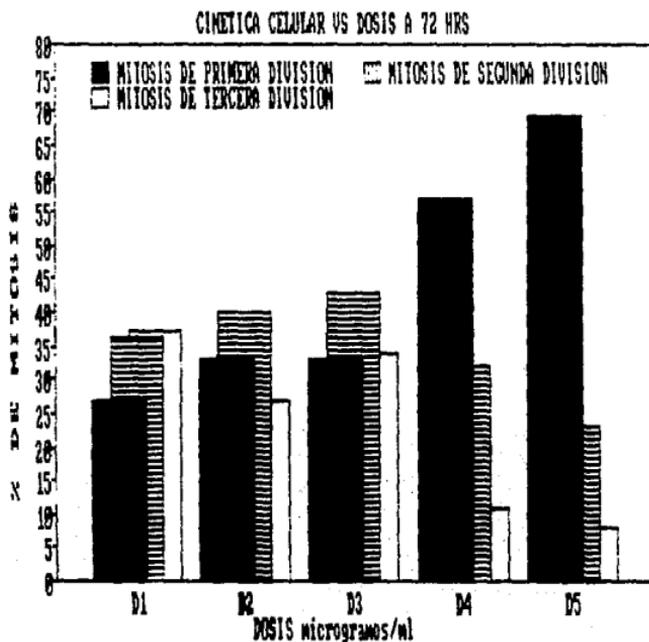
$$(1.657E+00) + (4.229E-03)*X$$

LA VARIANZA - 5.003E-02

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 5

**GRAFICA DE CINETICA CELULAR CONTRA DOSIS IN VITRO
A 72 HRS**



D1-TESTIGO NEGATIVO

D2-25 μ G/ML

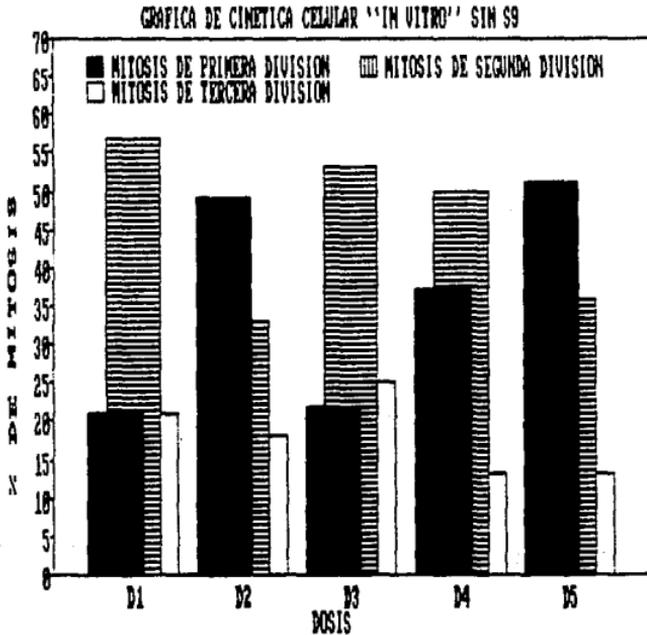
D3-50 μ G/ML

D4-75 μ G/ML

D5-100 μ G/ML

Gráfica 6

**GRAFICA DE CINETICA CELULAR CONTRA DOSIS IN VITRO A 92 HRS
SIN 89**



D1-TESTIGO NEGATIVO

D2-TESTIGO DMS

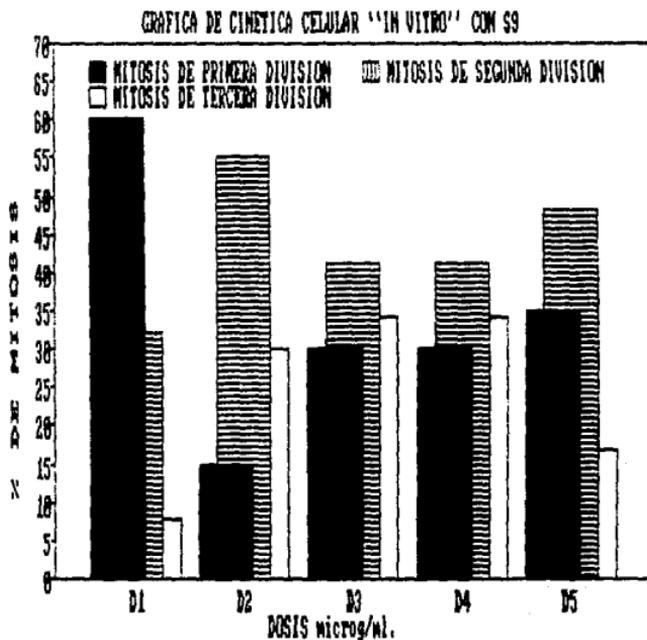
D3-50 μ G/ML

D4-75 μ G/ML

D5-100 μ /ML

Gráfica 7

GRAFICA DE CINETICA CELULAR CONTRA DOSIS IN VITRO
A 92 HRS CON S9



D1 • TESTIGO DMS

D2 • TESTIGO S9

D3 • 50 µG / ML

D4 • 75 µG / ML

D5 • 100 µG / ML

Tabla 12

CUADRO DE RESULTADOS PARA EL ESTUDIO 'IN VIVO'

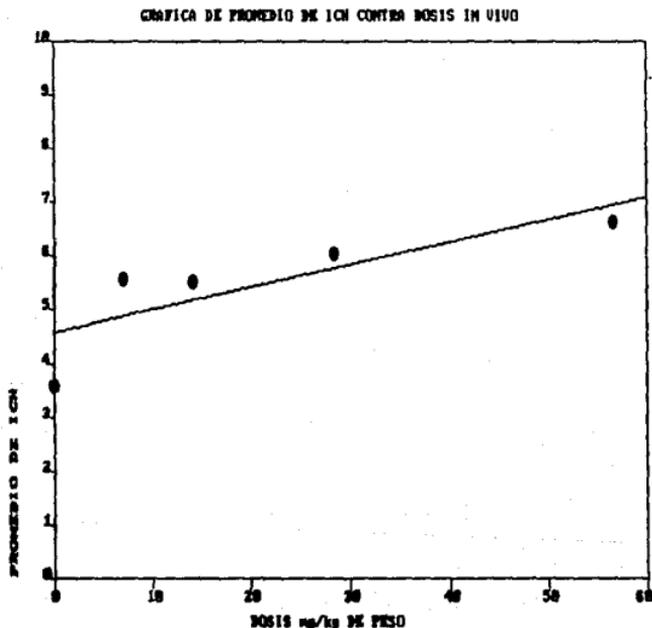
DOSES mg/kg	# CELULAS	INTERVALO	PROMEDIO ICM	CINETICA			TPG
				10	20	30	
I(-)DMS	125	2-6	3.50	20	51.4	20.0	11.27
7.07	125	2-9	5.552 *	25	52.4	22.4	11.00
14.141	125	3-10	5.512 *	27.2	57.6	15.4	11.13
28.282	125	4-9	6.032 *	26.6	54	19.4	11.29
56.565	125	5-10	6.632 *	24.6	62.6	12.8	11.13

* DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON t DE STUDENT

^ DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON χ^2

Gráfica 8

GRAFICA DE PROMEDIO DE ICH CONTRA DOSIS IN VIVO



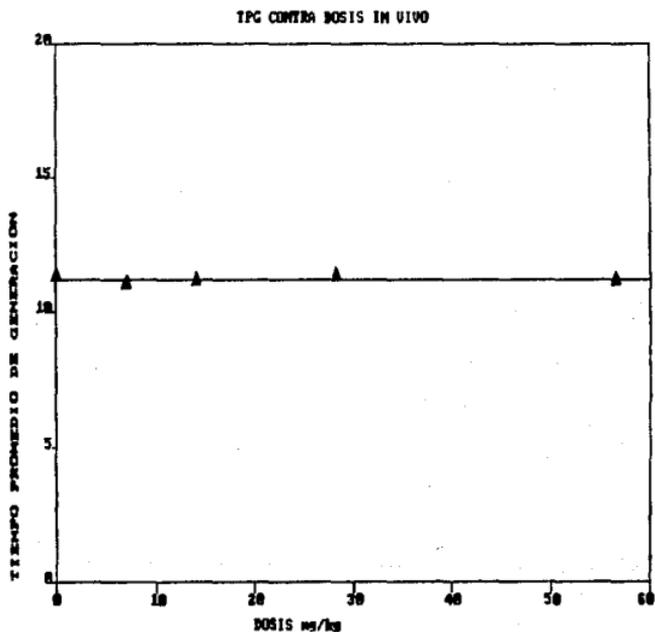
LA REGRESION POLINOMIAL DE LINEA 1 -

$$(4.574E+00) + (4.185E-02)*X$$

LA VARIANZA - 3.488E-01

Gráfica 9

GRAFICA DE TIEMPO PROMEDIO DE GENERACION CONTRA DOSIS IN VIVO



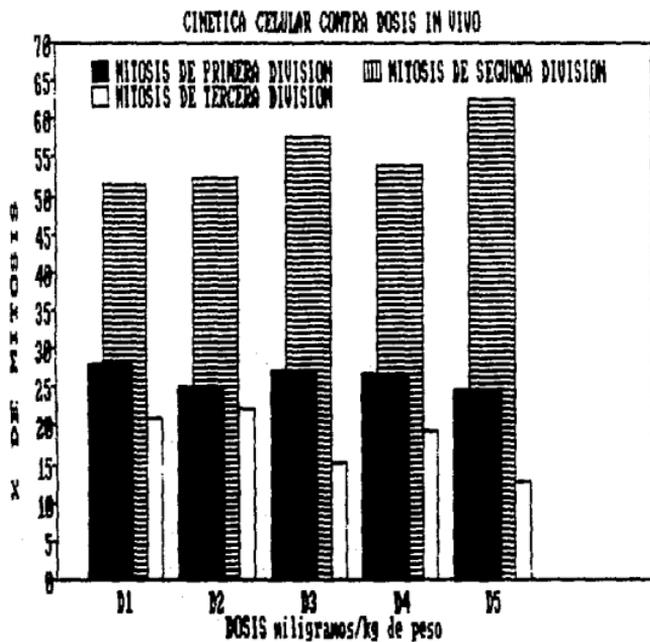
LA REGRESION POLINOMIAL DE LINEA 1 -

$$(1.116E+01) + (0.000E+00) * X$$

LA VARIANZA - 1.126E-02

Gráfica 10

GRAFICA DE CINETICA CELULAR CONTRA DOSIS IN VIVO



D1-TESTIGO DMS

D2-7.07MG/KG

D3-14.14MG/KG

D4-28.28MG/KG

D5-56.56MG/KG

VI.-DISCUSION

Como se mencionó anteriormente, la pimienta negra tiene compuestos considerados carcinogénicos, como son el safrole, d-limoneno, l-pineno, linanolol, y miristicina; además de la existencia de carcinogenicidad en un modelo experimental (10). Para que un agente sea considerado carcinogénico, primeramente tiene que provocar una mutación; sabiendo de antemano que no todas las mutaciones nos desencadenan un proceso de carcinogénesis.

El-Mofty et. al.(14) en un estudio realizado en anfibios (*Bufo regularis*). Encontró que un extracto de pimienta negra provocó una inducción de tumores primarios en hígado y tumores secundarios en riñón, bazo, pulmón y piel. Los tumores secundarios son el resultado de la metástasis de los tumores primarios (hígado) y son proporcionales a la dosis, sin importar la vía de administración.

Abraham et. al.(1) trabajando con células mitóticas de *Vicia faba*, encontró un efecto clastogénico, evaluado por aberraciones cromosómicas (rupturas cromosómicas y gaps) e ICH's, proporcionales a la dosis del extracto. Además observó una disminución del índice mitótico conforme se aumenta la dosis.

Si observamos con detenimiento el desarrollo de los estudios anteriores, podemos notar que el estudio de El-Mofty es un ensayo donde se pretende implementar un modelo experimental nuevo (*Bufo regularis*) para el estudio de la carcinogénesis. El ensayo de Abraham es el único que estudió la mutagenicidad de la pimienta negra.

La importancia del estudio de Abraham es que efectivamente

existió un efecto mutagénico sobre células de *Vicia faba*, pero *Vicia faba*, es un organismo perteneciente al reino Vegetal. Nuestro interés es conocer este efecto mutagénico sobre células de mamífero. Sabemos que una mutación nos puede desencadenar un proceso carcinogénico, por ende, utilizamos células humanas (cultivo de linfocitos) y médula ósea de ratón NH.

Lo que nosotros observamos fué un incremento de ICH's que es proporcional a la dosis y se manifestó en ambos ensayos ("in vitro" e "in vivo"), como puede verse en las gráficas 1, 2 y 8.

Estudios realizados con la fracción microsomal S9, indican que ésta puede ser utilizada como un simulador de activación metabólica en sistemas cerrados, que carecen de las enzimas necesarias para la misma. En un sistema vivo las sustancias administradas sufren modificaciones que las activan y/o las inactivan metabólicamente con cualquier otra sustancia que entra al organismo de forma natural o artificial. Como resultado de estos procesos metabólicos cabría esperar una mayor o menor actividad mutagénica de los agentes sospechosos. En el caso del extracto de pimienta negra los productos de esta metabolización (metabolitos secundarios), no son más genotóxicos que el extracto total, ya que no existen diferencias estadísticamente significativas realizadas con y sin la fracción microsomal S9.

En cuanto a la cinética celular pudimos constatar lo conveniente que es la realización de ambos ensayos "in vitro" e "in vivo", ya que si bien en el primero se observó un marcado efecto citotóxico, en el ensayo "in vivo" no fué así, ya que no existió una diferencia estadísticamente significativa con respecto

al testigo (gráficas 5, 6, 7 y 10).

Por otra parte, en los resultados de cinética celular "in vitro" el índice de replicación se observó una disminución proporcional a la dosis, la cual no es influenciada por el tiempo de permanencia del extracto en el cultivo, ni por la presencia de la fracción microsomal S9 (gráficos 3 y 4).

En el estudio "in vivo" observamos que el tiempo promedio de generación no presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo, lo cual nos indica que la proliferación celular no está influenciada por las dosis empleadas del extracto (gráfica 8).

En lo que se refiere a la proliferación celular para el estudio "in vitro", existe un efecto citotóxico más notorio comparado con el estudio "in vivo". Esto puede deberse a que el organismo intacto cuenta con un sistema para la excreción, así como mecanismos de defensa, que podrían hacer menos citotóxica a la pimienta negra, en relación con un cultivo de linfocitos, porque a pesar de simular un sistema metabólicamente activo (por la utilización de la fracción microsomal S9), no cuenta con estos factores.

La pimienta negra debe ser considerada como un agente potencialmente genotóxico y carcinogénico, puesto que en nuestro trabajo encontramos un incremento de ICH's moderado pero constante y proporcional a la dosis, y aunque las dosis utilizadas para nuestro ensayo son muy altas en relación a lo que un ser humano pudiera consumir en sus alimentos. Nuestro interés fué observar el efecto mutagénico máximo, por lo que decidimos realizar un estudio

genotóxico agudo.

A pesar de que se requieren más estudios, en donde se empleen dosis que puedan extrapolarse a la cantidad consumida por un ser humano en su dieta, así como la farmacocinética que sigue este condimento; nosotros recomendamos el uso moderado de este condimento para disminuir uno de los factores que pueden desarrollar un proceso carcinogénico, y con ello aumentar el estado de salud en la población humana.

VII.-CONCLUSIONES

El extracto de pimienta negra provoca un incremento en el intercambio entre cromátides hermanas, de forma moderada pero constante y proporcional al aumento de dosis empleada, en ambos ensayos; e "in vitro", esto fué independiente al tiempo de permanencia del extracto de pimienta negra en el cultivo linfocitos humanos.

"In vitro" la cinética celular se vió afectada por el aumento de la dosis del extracto utilizado, mientras que en el ensayo "in vivo" no se observó dicho efecto.

La utilización de la fracción microsomal no influyó en los resultados obtenidos por lo que deducimos que los posibles metabolitos secundarios no presentan mayor actividad genotóxica que el extracto de pimienta negra.

VIII.-REFERENCIAS

- 1.- Abraham, Susan and Annet, John
CLASTOGENIC EFFECTS PRODUCED BY BLACK PEPPER IN MITOTIC CELLS OF VICIA FABA.
Mutation Research 224 (1989), 281-285.
- 2.- Adame de León, F. Ulises y Gariglio V., Patricio
LOS GENES DEL CANCER.
CYT. Vol 11, No 152, Mayo 1989, 43-47.
- 3.- Asimov, Isaac
FUNDACION
Plaza y Janes Editores, 6ª Edición, 1989, España. 204.
- 4.- Atal, C. K. Dhar, K. L. and Singh, Jagdev.
THE CHEMISTRY OF INDIAN PIPER SPECIES.
J of Natural Products. Vol 38, No 3, May-Jun 1975, 256-262.
- 5.- Barcelo.
DICCIONARIO TERMINOLOGICO DE QUIMICA.
Ed. Alhambra. 2ª Edición, España 1976.
- 6.- Brusick, David.
FUNDAMENTALS OF GENETICS TOXICOLOGY.
Ed. Plenum Press. N.Y. 1980, USA, 32-37.
- 7.- Buchanan, R. L. Goldestein, S. and Budroe, J. D.
EXAMINATION OF CHILI PEPPER AND NUTMEG OLEORESINS USING THE SALMONELLA/MAMMALIAN MICROSOMES. MUTAGENICITY ASSAY.
J. of Food Science. Vol 47 (1981) 330-331.

- 8.- Chen, C.
ADVANCES IN FOOD AND NUTRITION RESEARCH
Ed. Academic Press. WC. Vol 34, USA. 1990, 338-397.
- 9.- Comisión Nacional de Alimentos. NEGI
EL SECTOR ALIMENTARIO EN MEXICO.
Edición 1992. 213-255, 262-263.
- 10.- Concon, J. M. Newburg, D. S. and Swerczel, T. W.
BLACK PEPPER (PIPER NIGRUM) EVIDENCE OF CARCINOGENICITY.
Nutr. Cancer. 1 (1986), 22-26.
- 11.- Cortinas de Navajas, Cristina.
ACTUALIDAD DEL TERRIBLE MAL.
ICYT. Vol 11, No 152, Mayo 1989. 36-41.
- 12.- Daniel, Wayne W.
BIOESTADISTICA
Ed. Limusa, Mexico 1984. 74-89, 193-237, 325-354.
- 13.- Dipaolo, Joseph A.
**EVALUATION OF CARCINOGENIC POTENTIAL OF CHEMICALS SHORT-TERM
TEST OF INDUCTION OF NEOPLASIA.**
JEP.T.O. Vol 7, No 1-2. (1986), 115-122.
- 14.- 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.
- 15.- Fisher, David S. and Knobf M., Tish.
THE CANCER CHEMOTHERAPY HANDBOOK.
Ed. Mosby Year Book. St. Louis MO. USA, (1989) 1-3

16.- García F., Horacio.

EL BAILE DE LOS CROMOSOMAS.

KYT. Vol 10. No 138. Marzo 1988. 6-8

17.- García F., Horacio

RADIACION Y MUTACIONES.

KYT. Vol 10. No 143, Agosto 1988 28-33.

18.- Gessener, Hawley.

DICCIONARIO DE QUIMICA Y DE PRODUCTOS QUIMICOS.

Ed. Omega. Barcelona 1975.

19.- Gibson, D. Ann and Prescott, D. M.

**INDUCTION OF SISTER CHROMATID EXCHANGES IN CHROMOSOMES
OF RAT KANGAROO CELLS BY TRITIUM INCORPORATED INTO DNA.**

Experimental Cell Research. 74 (1972) 397-402

20.- Goto, Keiko. Akematsu, T. Shimazu, H. and Sugiyama, T.

**SIMPLE DIFFERENTIAL GIEMSA STAINING OF SISTER CHROMATIDS
OFTER TREATMENT WITH PHOTSENSITIVE DYES AND EXPOSURE TO
LIGHT AND THE MECHANISM OF STAINING.**

Chromosoma (Berl). 53 (1975) 223-230.

21.- Hidalgo Cano, Héctor.

PIMENTA NEGRA

Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo
México 1983. 1-15.

22.- International Agency for Research on Cancer Monogr. Eval.

Carcinog. Risk.Chem Hum. 1980 Suppl. 2

23.- Kato, Hatao.

**SISTER CHROMATID EXCHANGES IN AGEING AND REPAIR-DEFICIENT
HUMAN FIBROBLASTS.**

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Nature. Vol 260 (1976) April 1. 447 'a'apa'a
Oncology. 44-45, (1985), 247-252.

15.- Fisher, David S. and Knobf M., Tish.

THE CANCER CHEMOTHERAPY HANDBOOK.

Ed. Mosby Year Book. St. Louis MO. USA, (1989) 1-3

16.- García F., Horacio.

EL BAILE DE LOS CROMOSOMAS.

ICYT. Vol 10. No 138. Marzo 1988. 6-8

17.- García F, Horacio

RADIACION Y MUTACIONES.

ICYT. Vol 10, No 143, Agosto 1988 28-33.

18.- Gessener, Hawley.

DICCIONARIO DE QUIMICA Y DE PRODUCTOS QUIMICOS.

Ed. Omega. Barcelona 1975.

19.- Gibson, D. Ann and Prescott, D. M.

**INDUCTION OF SISTER CHROMATID EXCHANGES IN CHROMOSOMES
OF RAT KANGAROO CELLS BY TRITIUM INCORPORATED INTO DNA.**

Experimental Cell Research. 74 (1972) 397-402

20.- Goto, Keiko. Akematsu, T. Shimazu, H. and Sugiyama, T.

**SIMPLE DIFFERENTIAL GIEMSA STAINING OF SISTER CHROMATIDS
OFTER TREATMENT WITH PHOTSENSITIVE DYES AND EXPOSURE TO
LIGHT AND THE MECHANISM OF STAINING.**

Chromosoma (Berl). 53 (1975) 223-230.

21.- Hidalgo Cano, Héctor.

PIMENTA NEGRA

Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma

CARCINOGENS SHOWING FALSE-NEGATIVE IN SALMONELLA ASSAY.

Chem. Pharm. Bull. Vol 37. No 2. (1989) 407-409.

- 33.- O'Neill, J.P. Heartlein, M.W. and Preston, R.J.

**THE REPLICATION OF UNSUBSTITUTED AND 5-BRDU O
5-CHLORODEOXYURIDINE-SUBSTITUTED DNA REGULATES THE RATE OF
INDUCTION OF SISTER CHROMATID EXCHANGES.**

25 Years of Experimental Research. Plenum press (1980)

Part A. New York and London.

- 34.- Ong, Tong-man. Mukhtar, M. Wolf, C.R. and Zeiger, E.

**DIFFERENTIAL EFFECTS OF CYTOCHROME P-450 INDUCERS ON
PROMUTAGEN ACTIVATION CAPABILITIES AND ENZYMATIC ACTIVITIES
OF 8-9 FROM RAT LIVER.**

J. of Environmental Pathology and Toxicology. 4 (1980) 55-65.

- 35.- Paiter, Robert B.

A REPLICATION MODEL FOR SISTER-CHROMATID EXCHANGED.

Mutation Research. 70 (1980) 337-341

- 36.- Powrie, William D. Wu, Chiu H. Rosin, P. and Stich, F.

**CLASTOGENIC AND MUTAGENIC ACTIVITIES OF MAILLARD REACTION
MODEL SYSTEMS.**

J. of Food Science. Vol 46 (1981) 1433-1438.

- 37.- Rodríguez M. de Oca, Roberto.

**EVALUACION DE DIFERENTES FUNGICIDAS PARA EL CONTROL DE
PHYTOPHTHORA PALMIVORA EN PIMENTA NEGRA PIPER NIGRUM.**

Memorias Congreso Regional de clase 2 Veracruz, Veracruz.
1973. 1-4.

- 38.- Rosengarten, F.

THE BOOK OF SPICES.

Piramid Books. N.Y. USA (1975) 337-350.

39.- Salamanca, Fabio.

CITOGENETICA HUMANA.

Ed. Panamericana. México. 1990.

40.- Taylor, J.H.

A BRIEF HISTORY OF THE DISCOVERY OF SISTER CHROMATID EXCHANGES.

25 Years of Experimental Research. Plenum press (1980)

Part A. New York and London

41.- Tice, Raymond R. et al.

SISTER CHROMATID EXCHANGES.

25 Years of Experimental Research Plenum press (1980)

Part A. New York and London

42. Travis, Curtis C. and Belefant, Helen.

PROMOTION AS A FACTOR IN CARCINOGENESIS.

Toxicology letters 60 (1992) 1-9.