



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA

DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN

13  
0 ef

" Efecto genotóxico subagudo de la capsaicina  
sobre la frecuencia de intercambios de cromátides  
hermanas en células de médula ósea de ratón."

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A:  
BERNARDO DAVID DÍAZ GARCÍA

ASESORA : M. en C. SANDRA DÍAZ-BARRIGA ARCEO  
COASESOR : EDUARDO MADRIGAL BUJAJIDAR

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

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



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

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

"Efecto genotóxico subagudo de la capsaicina sobre la frecuencia de intercambios de cromátides hermanas en células de médula ósea de ratón".

que presenta el pasante: Bernardo David Díaz García  
con número de cuenta: 8028341-4 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 29 de agosto de 1995

PRESIDENTE	M. en C. Benito López Baños	
VOCAL	Q.F.I. Leticia Zúñiga Ramírez	
SECRETARIO	M. en C. Sandra Díaz-Barriga Arceo	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Virginia Oliva Arellano	

A G R A D E C I M I E N T O S

Quiero dar gracias  
a mi Señor Dios, por  
guiarme de su mano a  
terminar esta meta y  
decirle gracias Señor  
cumplí con gusto y te  
pido que me acompañes  
en mi próxima meta y  
que siempre estes conmigo  
en cada futura meta.

Este trabajo se lo dedico  
a mi primogénito Daniel, y espero  
que cuando tengas algún problema  
te acuerdes de esto:

Cuando en el caminar de  
tu vida te propongas un objetivo  
y se te cierran una y mil  
puertas, esfuerzate el 100%  
por lograr ese objetivo y aun  
así si todo parece que apunta  
hacia el fracaso pon tu fe en  
Dios y pon el 200% de tu esfuerzo  
por lograrlo y si Dios considera  
que es bueno para ti, tenlo  
por seguro que lo lograras,  
tu eres tu propio límite.

Cambia tu capricho por  
tenacidad, y siempre busca amigos  
ya que en ellos puedes encontrar  
en ocasiones pequeños testimonios  
de Dios.

Y recuerda que si tu vida  
no es fácil la tenacidad ayuda  
mucho.

Te quiero hijo.

También quiero dedicar  
este trabajo a mis padres  
a mi papá por su  
paciencia y apoyo, y  
en especial a mi mamá,  
porque en muchas  
ocasiones se privó  
económicamente de muchas  
cosas para poder apoyarme  
económicamente y por  
aguantar mi carácter, por  
su apoyo moral y por  
su gran amor. Y porque  
sé que de cierta forma  
esta meta cumplida  
también la es de ustedes.

A mis sobrinos (Harold,  
Berenice, Erick y Arlen) los  
quiero mucho.

Quiero agradecer  
a mis tres hermanas  
(Idalia, Yedzi y Nadia)  
por su apoyo moral y  
cariño y quiero decirles  
que cuando las necesite  
siempre me apoyaron y  
cuando ellas me necesiten  
encontrarán mi ayuda,  
toda la que recibí de  
ustedes me fue de mucha  
utilidad.

A mi directora de tesis,  
quiero decirle que si se lo  
agradesco  $1 \times 10^6$  quedo muy  
corto, y con todo el respeto  
que usted se merece :

busque una directora de tesis  
y encontré una maestra y una  
amiga, gracias otra vez por  
su apoyo académico y moral.  
Con su calidad humana ya casi  
no hay personas como usted.  
Y aunque usted diga otra cosa  
esto no lo hubiera logrado  
sin su ayuda.

A mi co-director el Doctor  
Eduardo M., le agradezco su  
paciencia, su apoyo académico  
y la libertad de trabajar  
en el servicio social y tesis  
muy agusto y sobre todo gracias  
con todo respeto por su  
amistad.

Cuando fui pequeño tenía la ilusión de ser muchas cosas y por eso recuerdo con gran cariño a todos mis maestros compañeros y amigos de la primaria República Mexicana, de la Sec.108 y del C.C.H.-Naucalpan.

A mis compañeros y amigos de la F.E.S.C a la 9º,10º,11º,12º y 13º y en especial a los " pitufos" de la 10º.

Gracias por su apoyo durante los años de mi carrera a: Lúlu, Martha, Paty, Karen, Eduardo etc., como amigos que conservé desde el CCH, y a Dulce, Pancho, Ernesto, Gilberto, Sonia, J. Antonio, Silvia, Taís, Marina etc., como mis amigos y compañeros durante la carrera.

Gracias a Lety D.S. por ese empujón final de tu apoyo.

Gracias por tu apoyo inicial en la computadora Edith.

Gracias por todo su compañerismo y amistad a Lic. y Edu. a Guadalupe Rivas a la Maestra Martha Casani, a Tenoch a Lolita al Dr. Piña y Rosalba tanto en la ENCB como en la FESC.



## RESUMEN

El chile es una planta con gran arraigo en nuestra cultura, hay evidencias de que ha estado presente desde 7000 años a. C., y se ha utilizado como alimento, tributo y medicamento. La capsaicina es su principal componente químico y se han encontrado evidencias de mutagenicidad por diversos autores.

Este trabajo comprendió el estudio *in vivo* de la capsaicina como agente inductor de ICH en forma subaguda en ratones NIH, formándose tres grupos para su estudio (control, dosis 1.46 mg/kg y dosis de 1.94 mg/kg) a los cuales se les realizó la evaluación de la frecuencia de ICH ya que es una prueba muy sensible para detectar el daño genotóxico. Los resultados de la frecuencia de ICH que se obtuvieron fueron analizados estadísticamente con un modelo totalmente aleatorizado en la prueba de análisis de varianza simple (ANOVA) y con la prueba de Tukey a  $p < 0.05$ . Y se encontró que la dosis mayor (1.94 mg/kg) presentó una diferencia estadísticamente significativa en cuanto al aumento de la frecuencia de ICH.

También se realizó el estudio de la cinética de proliferación celular con el porcentaje de metafases encontrados en 1º, 2º y 3º división y con estos datos se evaluó el tiempo promedio de generación (TPG) y mediante la prueba de  $\chi^2$  de Fridman a  $p < 0.05$  se determinó que el TPG no se altera con lo que se concluyó que el daño genotóxico se presenta mucho antes que el daño citotóxico.

Las dosis empleadas en este experimento están muy por encima de dosis de consumo humano y con esto podríamos suponer que en forma subaguda a las dosis que el humano está expuesto a través de los alimentos no sería apreciable algún efecto genotóxico.

## ABREVIATURAS

ADN = Ácido desoxirribonucleico

*in vivo* = en sistema biológico

*in vitro* = trabajo en condiciones de laboratorio.

ICH = Intercambio de cromátides hermanas.

BrdU = 5-Bromo-2'-desoxiuridina.

*ad libitum* = agua y bebida a su gusto .

DMS-Agua = Dimetilsulfóxido-Agua.

ANOVA = Análisis de varianza.

TPG = tiempo promedio de generación.

M1, M2 y M3 = Metafasas de 1º, 2º y 3º división respectivamente.

## INDICE.

1. Introducción.....	1
1.1 Aspectos Generales .....	1
1.1.1 Antecedentes del Chile.....	1
1.1.2 Taxonomía.....	3
1.1.3 Capsaicina.....	4
1.1.3.1 Características Físico-Químicas y usos de la capsaicina.....	5
1.1.3.2 Propiedades Farmacológicas Generales y Toxicología de la capsaicina.....	8
1.1.3.3 Estudio Genotoxicológico de capsaicina.....	10
2. Hipótesis y Objetivos.....	19
2.1 Hipótesis.....	19
2.2 Objetivos.....	19
2.2.1 Objetivo Primario.....	19
2.2.2 Objetivo Secundario.....	19
3. Material y Métodos.....	20
3.1 Material.....	20
3.1.1 Material Biológico.....	20
3.1.2 Soluciones administradas a los ratones.....	20
3.1.2.1 Solución DMS-Agua.....	20
3.1.2.2 Capsaicina (Sigma Chemical).....	20
3.1.2.3 Solución de Colchicina.....	21
3.1.2.4 Tabletas de BrdU.....	21
3.2 Métodos.....	21
3.2.1 Inoculación de capsaicina.....	21
3.2.2 Implantación de tableta.....	22
3.2.3 Tinción.....	23
3.2.4 Análisis estadístico.....	24
4. Resultados .....	26
5. Discusión.....	31
6. Conclusiones.....	37
6.1 Conclusión .....	38
6.2 Conclusión.....	38
6.3 Conclusión.....	38
7. Bibliografía.....	38

# 1. INTRODUCCION

# I. INTRODUCCION

## 1.1 Aspectos generales.

### 1.1.1 Antecedentes del Chile.

El chile es una planta de origen americano con gran arraigo en nuestra cultura, en la que ha tenido implicaciones como tributo, religiosas, terapéuticas y alimenticias. En México se han encontrado evidencias arqueológicas de su cultivo con una antigüedad mayor a los 7000 años a.C(25,27). A partir del descubrimiento de América, Cristóbal Colón lo llevó a España y de allí se diseminó a los trópicos y a los subtropicos del mundo en los que se ha desarrollado adquiriendo varios nombres que dependen del sitio específico, así lo conocemos como chili, chili paper, páprica, aji, pimienta pimentado picante, o piment enrage.(14,25,27)

Durante la época colonial continuó la cultura prehispánica del chile. En este sentido una frase de Fray Bartolomé de las Casas ilustra bien aquella tendencia "sin el chile los mexicanos no creen que están comiendo" (27).

En la actualidad, los nombres de las especies de chile que se conocen en México son 154 lo que indica que su presencia sigue siendo vigente hasta nuestros días.(9)

Los frutos maduros del chile, especialmente *Capsicum annuum* son la fuente principal de la capsaicina. El chile tiene gran importancia económica en nuestro país ya que se consume usualmente en la alimentación cotidiana, de manera que su uso es comparable al del frijol y el maíz, que pareciera ser la alimentación fundamental en México. En el mundo entero se conoce la cocina mexicana como la de los "alimentos picantes" porque básicamente todo se sazona con chile entre otras cosas. Y lo más significativo es que sin importar el estrato social alguna variedad de chile sazonará siempre los alimentos de los mexicanos. (12)

A través de las épocas el chile ha tenido diferentes usos, no solo en la alimentación si no también en la medicina.(12)

En la época prehispánica como medicina se utilizó para aliviar ciertos malestares como: Tos, dolor de oídos, oídos infectados, dolor de caries, contra la formación de sarro, sangre en esputo, tisis, sangre en heces y en orina, dolor de estómago, diarrea, estreñimiento, obstrucción del bazo, iniciar parto retardado, control del flujo vaginal, moretones, mareos y hemorroides.(12)

También en la época moderna se han encontrado algunas propiedades terapéuticas como: La de aliviar dolores musculares, reumatismo, lumbago, inflamación del nervio

ciático, neuralgia. A nivel linfático se ha visto que es un estimulante cardíaco, actúa en problemas de presión arterial y circulación sanguínea, rubefaciente, tos, resfriados, bronquitis, asma, garganta irritada y congestionada, acidez estomacal, secreción gástrica, eliminación de las lombrices, antidisentérico, dolores de hemorroides, efectos de la embriaguez (12,25).

### 1.1.2 Taxonomía del Chile.

La familia de las solanáceas incluye, según se ha dicho, varias plantas importantes como la papa, el jitomate, la berenjena, el tabasco y el chile. Los chiles presentan ciertos atributos que son comunes a la familia y otros que son específicos al género *capsicum*.(12)

Entonces la planta de chile (*capsicum*) pertenece a la familia de las solanáceas (cuadro 1), que es la de mayor importancia dentro del orden (5).

Aunque existe controversia respecto a la separación especies de chile se pueden considerar dos principales (*C.annuum* y *C.frutescens*) de las que se derivan sus múltiples variedades. Los frutos de *capsicum* se llaman en México de distintas formas, depende de la zona geográfica de que se trate: Se llama chili (Nahuatl), its (Huasteco), cucúni

(Huichol), ic (maya), cori (Tarahumara), etc., y a lo largo del mundo se le conoce como: Aji, pimiento paprika, pimiento picante, peperoni, chili peper o piment enrage (112,27).

Se caracteriza popularmente el *Capsicum* por ser un condimento picante. Este factor está determinado por la cantidad de capsaicina en el fruto, donde se encuentra principalmente en la placenta del chile.(12)

### 1.1.3 Capsaicina

La capsaicina esta controlada por un gene dominante; los que carecen de este gene son los chiles dulces, como el pimiento morrón. Su grado de acritud cambia según la variedad del chile y la relación del tejido placental de sus paredes. Por lo tanto, los pequeños pueden ser más picosos que los de fruto grande . Y actualmente se controla la cantidad de capsaicina por métodos de selección.(5)

#### CUADRO 1 CLASIFICACION TAXONOMICA DEL CHILE(5)

División	Angiospermatofitos
Clase	Dicotiledoneas
Orden	Tubiflorales
Familia	Solanáceas
Género y especies	<i>Capsicum annum</i> L. (Plantas anuales con frutos solitarios) <i>Capsicum frutescens</i> L. (Planta perenne con frutos agrupados.)



### 1.1.3.1 Características Físico-Químicas y Usos de la Capsaicina.

Uno de los principales componentes del chile es la capsaicina, un derivado ácido decilénico de la vainillilamina que tiene como fórmula 8-metil-n-vainillil-6-nonenamida (fig.1), y cuya propiedad principal es la de proporcionar el picor del fruto. Su presencia en el chile varía entre 0.1 y 1.0 % y el umbral para detectar su sabor es alrededor de 10 ppm (9,18)

La capsaicina se aisló en 1876 mediante una extracción con petróleo y tratamiento con álcali y dióxido de carbono para precipitar sus cristales (31). Presenta un aspecto de plaquetas incoloras, funde entre los 63-65°C, tiene un punto de ebullición entre 210-220°C y un peso molecular de 305.4 daltons. Es insoluble en agua fría y es soluble en benceno, alcohol, éter, dimetilsulfóxido, y ácido acético glacial. Tiene una absorción máxima en ultravioleta a 227 y 281 nm., y su propiedad picante no se afecta por el calentamiento con solución de hidróxido de sodio pero se destruye por oxidación con dicromato o permanganato de potasio (18,31).

El sabor característico de la capsaicina influye en el consumo de chile en la dieta del mexicano, que es su uso más común, sin embargo, con el fruto también se hacen preparaciones curativas contra diversas afecciones particularmente para el reumatismo(9).

Por lo que se refiere a la capsaicina, su obtención en forma de oleoresina tiene numerosas aplicaciones, entre ellas, como aditivo de los cigarrillos, la irritación en la garganta que sucede en los fumadores se debe a la capsaicina no al tabaco en sí. En las bebidas alcohólicas, en los alimentos para gallinas, en los embutidos, y como integrante de productos cosméticos y faciales. En la industria farmacéutica la oleoresina se aplica principalmente como estimulante. Sin embargo, investigaciones médicas recientes comprueban su valor para bloquear la transmisión del dolor y es probable que en el futuro aumente su uso en la medicina (9,12,29,32).

La capsaicina es un ácido débil que contiene un grupo fenol (figura 1). No se precipita, o solo muy escasamente por el uso de reactivos con alcaloides. El grupo fenólico puede ser mezclado para formar la metil capsaicina, que es un derivado mucho menos picante. Lo picante no se destruye con NaOH al 2 % en solución, pero se destruye por oxidación con  $\text{KMnO}_4$  o con  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ . Sin embargo la capsaicina sintética, se ha saturado con una cadena, y no es fácilmente oxidable.(31)

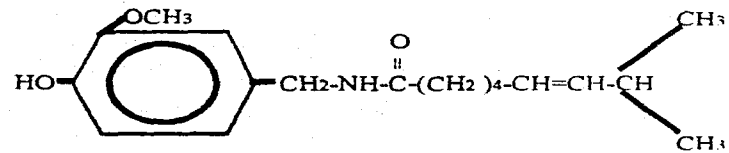


Fig.1 Estructura química de capsaicina (8-metil-N-vainilil-6-nonenamida). (31)

### 1.1.3.2 Propiedades Farmacológicas Generales y Toxicología de la capsaicina.

El peculiar picor de los " pimientos rojos " es responsable de su extenso uso como condimento, en una gran variedad de platillos, especialmente en chili, curries, salsa tabasco, y bebidas como el ginger ale. El efecto local irritante se siente desde las membranas nasales en las que causa por tiempo prolongado tos, estornudos con acción alérgica, y esto es un efecto bien conocido por quienes trabajan con capsaicina. De característico y también bien conocido es la sensación de quemadura producida cuando se aplica localmente en piel.(36)

Cuando se administra por vía intravenosa se han observado efectos cardiovasculares y respiratorios principalmente en gatos y perros de experimentación, en los que se ha demostrado la tríada formado por bradicardia, disminución de la presión cardíaca y apnea, notándose que la intensidad del efecto es proporcional a la dosis empleada (5,32). En la termorregulación se ha observado que la administración subcutánea de dosis bajas en ratones induce una disminución de la temperatura rectal hasta en 5°C, por lo que se

supone que la capsaicina excita a los receptores de calor que activan el centro hipotalámico ya que no se presenta hipotermia (5,32).

En el sistema gastrointestinal la capsaicina induce la producción de saliva y un moderado incremento en la secreción gástrica, sin alterar los niveles de la secreción pancreática o biliar. Se ha sugerido que el compuesto puede excitar quimiorreceptores duodenales, estimular receptores estomacales de histamina o estimular el control vagal de la secreción gástrica (17).

Se ha estudiado la toxicidad de la capsaicina en distintos animales, principalmente ratones y ratas, los resultados demostraron que el efecto depende, además de la especie utilizada, de la vía de administración. La letalidad es mayor cuando se inyecta intraperitonealmente y es mucho menor por las rutas dérmicas y rectal. Después de la administración, los animales ( ratas y ratones ) quedan excitados y se convulsionan de 1 a 3 minutos, la recuperación se logra después de 30 a 60 minutos; pero en los que fallecen seguramente se produce una parálisis respiratoria (6,9)

En animales vagotomizados o también en los pretratados con atropina, cuando se inyecta vía intravenosa capsaicina se produce hipertensión. Las razones para este incremento no es muy clara. Pero una posible explicación es la acción directa sobre los

vasos sanguíneos o a nivel de corazón. Pero es también especular sobre dos receptores que regulan los dos efectos. (9)

### 1.1.3.3 Estudio Genotoxicológico de Capsaicina.

En la actualidad es necesario conocer todos los aspectos de los agentes químicos y en este trabajo uno de los aspectos enfocados es el de conocer los efectos genotóxicos, y en particular si se trata de sustancias que se encuentran en la dieta humana y aún más en aspectos tan importantes como los cosméticos y los medicamentos. Y esto origina la necesidad de considerar ciertos factores, pero quizás los más relevantes sean; 1.- La demostración de que los agentes químicos pueden interactuar con el ácido desoxirribonucleico (ADN) en diferentes formas y en consecuencia ocasionar mutaciones génicas o cromosómicas, 2.- La de que generalmente, una o más de las mutaciones se presentan durante el desarrollo del cáncer y 3.- El conocimiento de que los compuestos químicos pueden ocasionar trastornos en la fertilidad y malformaciones congénitas en la descendencia (3,21).

La genotoxicología, es una subespecialidad de la toxicología que identifica y analiza la acción de los agentes con toxicidad dirigida hacia los elementos hereditarios de los sistemas vivos. Algunas sustancias producen toxicidad generalizada, inespecífica y la

muerte, en tanto que otras solo dañan el material hereditario: y este es el objeto de la genética toxicológica o genotoxicología, también llamada por algunos toxicología molecular; que tiene por objetivo entender y detectar las propiedades del compuesto que son altamente específicos de los ácidos nucleicos y producen efectos deletéreos en los elementos genéticos a concentraciones subtóxicas (2). La exposición de los compuestos para estudios de la genética toxicológica va de aguda a crónica, este tipo de pruebas cae dentro de las tres subdivisiones de las pruebas toxicológicas. ( 2 )

Los agentes que específicamente producen alteraciones genéticas a niveles subtóxicos de exposición son llamados genotóxicos. Las sustancias genotóxicas usualmente tienen propiedades químicas y/o físicas que facilitan su interacción con los ácidos nucleicos (12).

Una función de la genética toxicológica es la implantación de las pruebas y métodos de estimación de riesgos para definir el impacto de los agentes genotóxicos que son encontrados en el medio ambiente y cuya presencia puede alterar la integridad del material genético humano. Otra función es el descubrimiento de las relaciones entre la genotoxicidad y la iniciación de neoplasias (26).

Si bien las pruebas de elección para evaluar compuestos presumiblemente genotóxicos son muchas y muy variadas, existen dos etapas primordiales en cualquier ensayo de esta naturaleza que debe de tomar en cuenta (12):

- I) La detección del poder genotoxicológico del compuesto y
- II) La estimación del riesgo genotóxico.

La primera etapa puede ser evidente como un daño primario al ADN, mutación de punto, o efectos cromosómicos. La selección de pruebas para esta etapa con estos puntos no puede ser cubierta únicamente por sistemas microbianos, debido a la incapacidad de detectar efectos cromosómicos de éstos. Por lo tanto deben de realizarse a través de varios niveles filogenéticos. Los ensayos se realizan en especies inferiores, y pruebas *in vitro* con células de mamíferos.(12)

La estimación del riesgo genotóxico es un análisis cuantitativo de la expresión de la actividad genotóxica inherente a un compuesto, bajo condiciones de pruebas definidas en un modelo apropiado, seguido de la extrapolación de resultados a condiciones de exposición humana.(12)



Los datos de las investigaciones citogenéticas no sugieren ningún grado de diferencia significativa entre especies o líneas celulares con respecto a agentes genotóxicos o clastogénicos (15).

Entre las pruebas de escrutinio frecuentemente se recomienda la detección del incremento de la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) que sumada al estudio de aberraciones cromosómicas ofrecen un panorama fidedigno de la capacidad genotóxica de diversas sustancias ya que ambas pruebas detectan daño al material hereditario producido por mecanismos diferentes (13).

Cuando las investigaciones de ICH se realizan en modelos animales (preferentemente mamíferos), nos permiten evaluar el riesgo genotóxico de las sustancias de estudio. De esta manera se podrán determinar los niveles no deseados o definir condiciones de uso donde el riesgo sea aceptable. (12)

La evaluación del riesgo asociado con la exposición bajo condiciones normales de uso permitiría establecer el rechazo total o definitivo de un compuesto genotóxico. (15)

Un intercambio de cromátides hermanas se puede definir como un intercambio de segmentos homólogos o casi homólogos, y equivalentes entre las cromátides de un mismo cromosoma.(20)

Para detectar la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y junto con ella la de los ICH, se emplean técnicas que se basan en la incorporación, en el ADN, de un átomo polarizable como el ( Br ) en la forma de análogo de base, la 5-bromodesoxiuridina ( 5BrdU ). Perry y Wolf en 1974 propusieron un método en el que además de la BrdU se emplea el colorante de Giemsa y la exposición de las preparaciones de un buffer a 60°C.(24)

Aunque todavía no se establece el significado biológico de los ICH, desde el punto de vista molecular, éstos consisten en el intercambio de doble banda entre las moléculas de ADN de las cromátides hermanas; esto ha dado pie para que propongan modelos que explican como ocurre el fenómeno, basados fundamentalmente en los modelos de la recombinación bacteriana. Un aspecto interesante en relación con los ICH es que se han observado en las células de todos los organismos estudiados, lo que sugiere que los ICH son un fenómeno o la expresión de un fenómeno, fundamental para la célula. Otro aspecto de interés es de que la mayor parte de los mutágenos conocidos son capaces de inducir ICH en mayor o menor grado.(19)

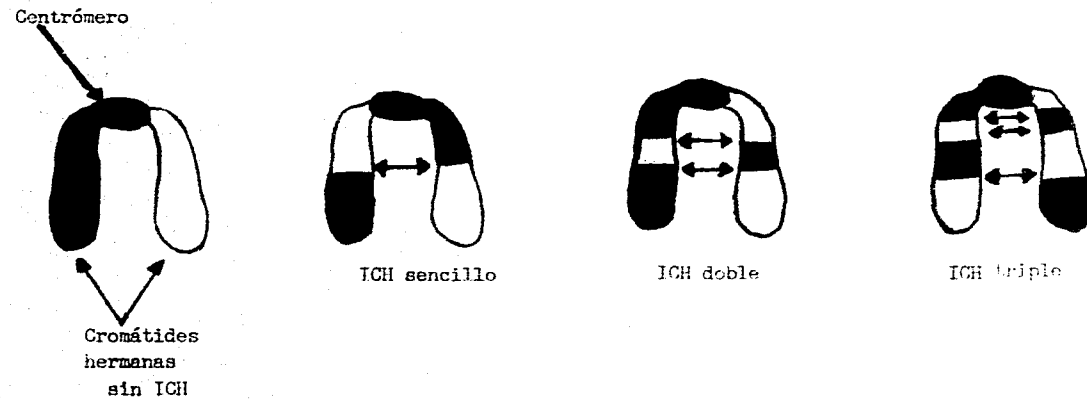


Figura 2. Representación esquemática de un ICH sencillo, doble y triple, en cromosoma de ratón. ( 19 )

Se han realizado varios estudios con el objeto de establecer si los ICH suceden normalmente en condiciones naturales y, si así es, con qué frecuencia. El principal problema para resolver esta cuestión es que para el análisis de los ICH se requiere de la incorporación previa de bromodesoxiuridina al ADN; se ha demostrado que tanto la presencia de la BrdU en el medio como su incorporación en el ADN provocan ICH. Además de que los estudios realizados *in vitro* se ha observado que los medios de cultivo y el suero usado en ellos también ocasiona ICH. Una dificultad adicional es que mediante el protocolo usual del análisis no es factible determinar la frecuencia espontánea de los ICH en cada ciclo de división, si no en cada dos.(19).

El estudio de los ICH primeramente concierne al mecanismo por medio del cual las técnicas con BrdU detectan los ICH. En segundo término se centra en la utilización de los ICH como una prueba a corto plazo para estudiar tanto a los agentes mutagénicos como a los carcinogénicos y en tercer lugar se refiere al mecanismo de formación de los ICH y su relación a ciertas enfermedades hereditarias en el humano como el síndrome de Bloom, que se caracteriza a su vez, por una predisposición a diferentes tipos de neoplasias (7,24).

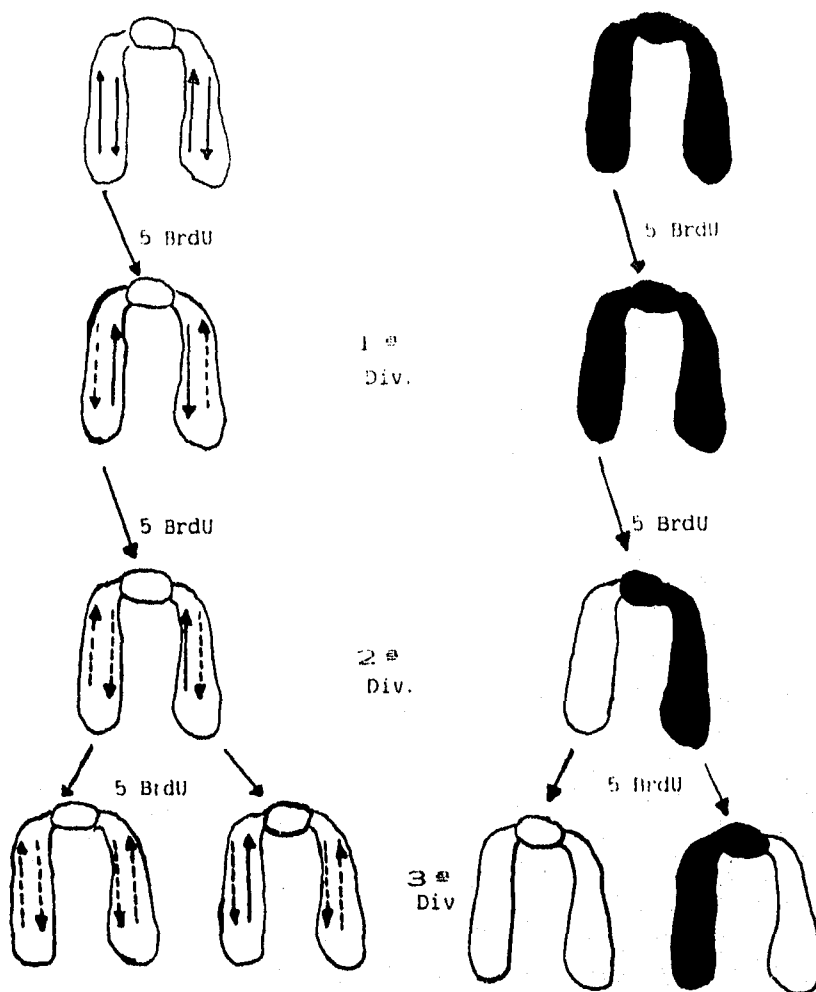


Figura 3. Representación esquemática, para observar la tinción diferencial de los ICH, a la izquierda se observa la silueta del cromosoma y en el interior, la doble banda del ADN se representa con flechas y la cadena sustituida con BrdU durante la síntesis, con una línea quebrada. Y a la derecha siluetas de cromosoma que se deben observar de acuerdo al ciclo de división (1ª, 2ª o 3ª). ( 19 )

Ahora bien para nuestro estudio se utiliza la capsaicina la cual se sospecha puede producir daño al material hereditario. Es decir que la capsaicina produce un efecto genotóxico, que se manifestará con un aumento de los ICH.(9,18,21)

Además esta evaluación de la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas forma parte de una serie de estudios que tienen por objetivo evaluar el daño genotóxico que la capsaicina pudiese tener.(4)

## **2.HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

## **2. HIPOTESIS Y OBJETIVO**

### **2.1 HIPOTESIS.**

La capsaicina induce el aumento en la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas en células de médula ósea de ratón .

### **2.2 OBJETIVOS**

#### **2.2.1 OBJETIVO PRIMARIO.**

Evaluar los cambios sobre la frecuencia de intercambios de cromátides hermanas, a diferentes dosis de capsaicina en células de médula ósea de ratón.

#### **2.2.2 OBJETIVO SECUNDARIO.**

Evaluar si además la capsaicina produce alguna modificación en la proliferación celular.



### **3.MATERIAL Y METODOS**

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 Material.

##### 3.1.1 Material biológico.

Se utilizaron 18 ratones machos de 25 +/- 3 g. de peso y de 5 a 7 semanas de edad, de la cepa NIH, procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salud, los cuales fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum* antes y durante el experimento.

##### 3.1.1.2 Soluciones administradas a los ratones.

3.1.1.2.1 Solución de DMS-agua destilada en proporción 1:5 v/v para ser administrada por vía intraperitoneal (0.5 ml. de solución por cada 30 g. de peso).

3.1.1.2.2 Capsaicina (Sigma Chemical) disuelta en solución de DMS al 20 % en dos dosis: 1.46 mg/Kg y 1.94 mg/Kg Para ser administrados por vía intraperitoneal (0.5 ml de solución por cada 30 g de peso ).

3.1.1.2.3 Solución de colchicina al 0.04 % preparada en agua destilada, para administrar una dosis de 5 ug/g de peso por vía intraperitoneal.

3.1.1.2.4 Tabletas de 5-bromodesoxiuridina de 40 mg ( con un espesor de 1.7 mm y de 4.8 mm de diámetro ), comprimidas en un punzón de acero de dichas dimensiones, a una presión de 23 Kg/cm<sup>2</sup> durante 3 segundos en una prensa con manómetro, (diseñada para este propósito en el departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas durante este experimento) recubiertas con parafina (p.f. 58-60°C) en un 70 % (con el objeto de controlar la liberación de la tableta dentro del organismo del animal (25)), para ser implantadas subcutáneamente en área abdominal, una en cada ratón.

### 3.2 Métodos.

#### 3.2.1 Inoculación de Capsaicina

El siguiente proyecto forma parte de un estudio genotóxico muy amplio sobre la capsaicina, de donde se evaluaron diferentes parámetros. En el presente estudio se realizó la evaluación de la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas; procedimiento que a continuación se describe:

Se dividieron los lotes de la cepa NIH en tres lotes de seis ratones cada uno, a los cuales se les alimentó con cuadricubos Purina y agua *ad libitum*.

Dos de los lotes recibieron capsaicina, uno de ellos 1.94 mg/Kg (1/15 de la DL<sub>50</sub>) y el otro lote una dosis de 1.46 mg/Kg (1/20 de la DL<sub>50</sub>) ambas dosis por inoculación intraperitoneal ( estas dosis fueron elegidas de un ensayo anterior que aquí no se describe con el fin de obtener una dosis máxima tolerable durante los 32 días de experimentación que fue determinada a partir de la DL<sub>50</sub> ) y el tercer lote que sirvió como control recibió intraperitonealmente una solución de DMS-agua en una relación de 1.5 v.v . Que precisamente es el vehículo en que fue disuelta la capsaicina.

Durante 32 días siguió el siguiente esquema ; durante tres días consecutivos se administró y un día se descansó como se indica a continuación:

TABLA I .

DIA							
1	2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32
<b>INOCULACION</b>		<b>DESCANSO</b>		<b>INOCULACION</b>		<b>DESCANSO</b>	

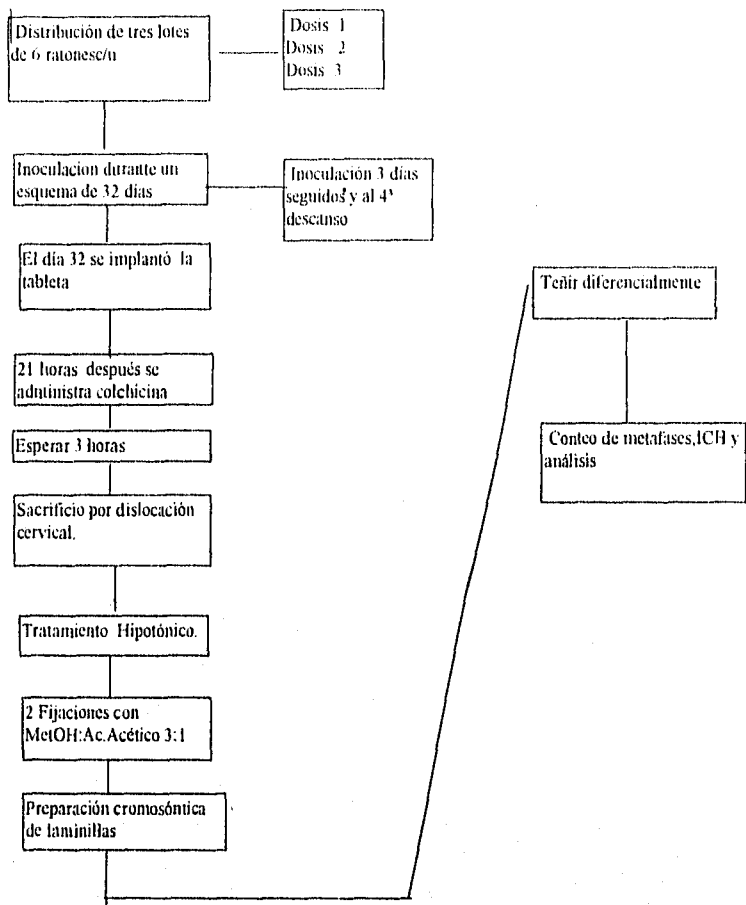


Figura 4. Diagrama de flujo del procedimiento de este experimento

### 3.2.2 Implantación de tableta

Al día 32 se realizó solo a cinco ratones de cada lote la implantación subcutánea de una tableta de 5-bromodesoxiuridina en la región abdominal a cada ratón, que se cierra con grapa quirúrgica. Al día siguiente se le administra colchicina a una concentración de 5 ug por gramo de peso, y tres horas después se procede a sacrificar a los animales por dislocación cervical se extraen ambos fémures y se toma la médula ósea. El paquete celular que se obtuvo se trabajó de la siguiente manera:

Cuando se tuvieron ambos fémures se les cortaron las epífisis y se les hace pasar un mililitro de una solución de KCl 0.075 M, el cual se recibió en otros 7 ml de la misma solución. Este es un tratamiento hipotónico que dura 25 min., a 37°C. Posteriormente el paquete celular se fijó por dos ocasiones a 20 min., cada una en solución de metanol:ácido acético en proporción 3:1

Con esta suspensión celular se realizaron las preparaciones cromosómicas correspondientes para cada ratón, goteando esta suspensión en portaobjetos humedecidos en etanol al 50 % y flameando unos segundos las laminillas. Después de

uno o dos días se procede a teñir diferencialmente las células de acuerdo a la técnica de Goto y col. modificada descrita a continuación (26) :

### 3.2.3 Tinción

1) Se sumergieron las laminillas en bisbenzimidá (Hoechst 33258) a una concentración de 100 ug/ml en agua destilada durante 40 minutos.

2) A continuación se lavaron las laminillas con agua destilada y se secaron al horno a 60°C durante 15 minutos.

3) Una vez secas, se montaron en una solución reguladora de fosfatos-citratos a pH=7, con un cubreobjetos, para así ser expuestos durante hora y media en luz negra (luz ultravioleta cercana a 10-7) a una distancia de 2 cm.

4) En seguida se enjuagaron con agua destilada y se secaron, durante 15min., nuevamente en el horno a 60°C.

5) Posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se secaron en el horno a 60°C durante 15 min., y se teñieron con colorante de Giemsa al 4 % en una solución reguladora de fosfatos pH=6.8 .

### 3.2.4 Análisis estadístico.

1) Se hizo un conteo del número de intercambios de cromátides hermanas de 30 metafases por cada ratón y a estos datos se les evaluó con un modelo totalmente aleatorizado de análisis de varianza :

$$Y_{ij} = \mu + t_i + E_j$$

Donde  $Y_{ij}$  es el número de intercambios de cromátides hermanas en el  $i$ -ésimo tratamiento.  $\mu$  = media general y  $E_j$  es el error aleatorio experimental. A los resultados se les realizó la prueba de Tukey.

2) También se evaluó a 100 células de médula ósea de ratón el porcentaje de células de primera, segunda y tercer división para poder evaluar el tiempo promedio de generación (TPG) donde la fórmula se describe posteriormente. A estos resultados se efectuó la evaluación de la prueba de Chi cuadrada de Friedman.

$$\text{TPG} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de horas de BrdU}}{M1(1) + M2(2) + M3(3)} \times 100$$



## **4.RESULTADOS**

#### 4. RESULTADOS

En la tabla II se encuentran los valores promedio de 30 metafases por ratón de la frecuencia de ICH en cada lote formado por cinco animales. Estos datos fueron sometidos a un modelo totalmente aleatorizado de análisis de varianza, lo que demostró (como puede verse en el cuadro de ANOVA tabla III), que existen diferencias estadísticamente significativas  $p < 0.05$  entre los tres lotes. Posteriormente para obviar las diferencias entre los grupos se realizó la prueba Tukey con una significancia de  $p < 0.05$ , donde el control y la dosis menor (1.46 mg/Kg) no mostraron diferencia significativa, pero cuando se comparó la dosis mayor (1.94 mg/Kg) con el control se observó que si existe diferencia significativa al igual que con la dosis menor (1.46 mg/Kg) de esta manera se puede ver la influencia de las diferentes dosis en la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas.

Los resultados de la cinética de proliferación celular obtenidos de la clasificación de 100 metafases de primera, segunda y tercer división se observan en la tabla IV. Estos datos fueron utilizados en la prueba de Chi cuadrada de Friedman para comparar estadísticamente el comportamiento de dicho parámetro. Sin embargo no se

observaron diferencias estadísticamente significativas a  $p < 0.05$  respecto al control. esto puede observarse gráficamente (gráfica 1).

Y estos datos también fueron utilizados para calcular el tiempo promedio de generación donde no se encontró que exista variación alguna entre los lotes comparados .

Tabla II  
FRECUENCIA DE ICH EN RATONES TRATADOS CON CAPSAICINA

DOSIS mg/kg	Xmed.de ICH	Varianza	± Error Estándar
0	3.46	0.31	0.25
1.46	2.92	0.07	0.12
1.94	5.62*	0.47	0.31

\*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control a  $p < 0.05$  para la prueba de "Tukey".

Xmed. De ICH= promedio de intercambio de cromátides hermanas de 30 metafases por ratón.

TABLA III  
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

PROCEDIMIENTO DE FISHER

	SC	GL	CM	F	P-Valor	F-crit.
ENTRE GRUPOS	20.412	2	10.206	35.519	$9.11 \times 10^{-6}$	3.885
DENTRO DE GRUPOS	3.448	12	0.2873			
TOTAL	23.86	14				

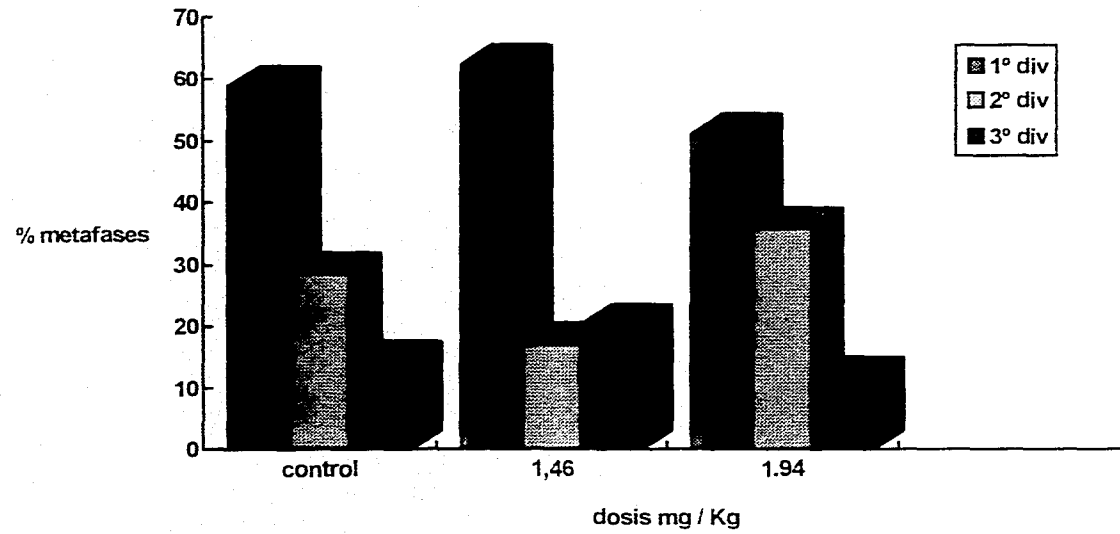
SC=suma de cuadrados      GL= grados de libertad      CM=cuadrados medios  
F=valor experimental de Fisher      P-valor=valor probabilístico  
F-crit.=valor de tablas de Fisher

TABLA IV  
CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR

DOSIS	CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR			TPG
	1°	2°	3°	
0	58.8	28.6	14.4	13.2
1.46	62.4	17.2	20.2	13.3
1.94	52.2	36.2	12.3	13.0

TPG= tiempo promedio de generación.

Gráfica 1. Cinética de Proliferación Celular



## **5.DISCUSION**

## 5. DISCUSION

Aunque aún no se sabe con exactitud el significado biológico de los ICH, este fenómeno ha demostrado ser un claro reflejo del daño genotóxico. La mayor parte de los mutágenos conocidos son capaces de incrementar la frecuencia de los ICH (19) y diversos autores han corroborado la sensibilidad de este ensayo al compararlo con pruebas como la mutagenicidad de AMES (23) en procariotes ó en modelos mamíferos como la de dominantes letales (21). Además también se tienen claras evidencias de que cuando una sustancia resulta ser mutagénica se le puede considerar potencialmente carcinogénica.

En 1985 se demostró que tanto el extracto de chile como la capsaicina son mutagénicas con la prueba de AMES (21,23). En estudios anteriores Toth (33) en 1984 encontró bajos niveles de actividad mutagénica en la prueba de AMES y baja incidencia de adenocarcinoma inducida por capsaicina en el duodeno. También Nagabushan y Bhide reportaron a la capsaicina como clastogénica por la inducción del incremento significativo en micronúcleos en ratones NIH (23).



En la prueba de dominantes letales que hicieron Muralidhara y Norasimhamarty (21) se evaluó el poder mutagénico de la capsaicina en ratones albinos swiss (suizos) durante 8 semanas con dosis altas y no encontraron que se produjeran efectos significativos en la frecuencia de embarazos de los animales de prueba .

De los antecedentes antes expuestos puede observarse un gran interés por evaluar el poder genotóxico de la capsaicina ya que continúa siendo un componente importante en la dieta del mexicano y además se tiende a explotar sus efectos farmacológicos .

En el presente estudio utilizamos los ICH como un parámetro confiable que permitió establecer el daño genotóxico de la sustancia problema . Para hacer evidente la diferencia entre las cromátides hermanas se hace necesario utilizar el análogo de la timina , la BrdU que es una sustancia que por si misma puede inducir un incremento de la frecuencia de los ICH ( 11,30 ) , los procedimientos experimentales ya establecidos que toman en cuenta la dosis de BrdU , la utilización de un grupo experimental control y el hecho de que *in vivo* la frecuencia de los ICH es más cercana al lote basal por extrapolación aseguran lo fidedigno de los resultados .

Los resultados de la frecuencia de ICH obtenidas del promedio de 25 metafases de 2ª división por cada ratón se analizaron con un modelo totalmente aleatorizado de

análisis de varianza ANOVA, dado que el valor de probabilidad de que los resultados obtenidos de los diferentes grupos fuera cuestión del azar resultó ser muy pequeño, inferimos que la diferencia que existe en el comportamiento de los resultados de cada grupo, se debió a las diferentes concentraciones que se trabajaron de capsaicina.

Cuando se hizo un análisis más detallado de estas diferencias con la prueba de Tukey con  $p < 0.05$  se observó diferencia significativa en la dosis de 1.94 mg/Kg que fue la dosis mayor, esta diferencia se observó cuando se comparó con el grupo de animales control. Y posteriormente la dosis mayor (1.94 mg/Kg) se comparó con la dosis menor (1.46 mg/Kg). Donde no se observó diferencia significativa fue con los resultados de la dosis menor (1.46 mg/Kg) comparada con la del grupo control.

Haciendo uso de los mismos animales de este experimento otros investigadores estudiaron la frecuencia de micronúcleos a partir de muestras de sangre durante cuatro semanas y se observó que a partir de la segunda semana el incremento de micronúcleos se hizo significativa en la dosis de (1.94 mg/Kg), siendo evidente el daño clastogénico. Y de igual manera la dosis (1.46 mg/Kg) y el grupo control no muestra una diferencia significativa en sus resultados.(4).

Con nuestros resultados de la frecuencia de ICH se puede decir que existe un daño genotóxico a altas concentraciones. Con los resultados que aquí no se exponen de la prueba de micronúcleos (4) se reportó un daño clastogénico y un daño mutagénico que reportó AMES y col., en otro experimento(1), que tampoco se expone aquí.

Un agente genotóxico es aquel que su actividad biológica primaria como compuesto químico o como un metabolito es la alteración de la información codificada en el ADN; y eso puede ser en forma de mutaciones puntuales, inserciones, deleciones o cambios de la estructura del cromosoma y también afectar el número cromosómico (3). Por lo tanto estos agentes son genotóxicos y potencialmente carcinogénicos.

En cambio cuando se habla de una sustancia promotora quiere decir que es no inductora de una carcinogénesis por sí misma, pero pudiese potencializar el efecto inductor de la carcinogénesis de otra sustancia.

Se observó que la capsaicina produce en concentraciones muy altas mutaciones (AMES) y un incremento en los ICH, y como en la dieta normal es prácticamente imposible tomar esa cantidad de capsaicina ya que se toma en promedio un miligramo por kilogramo de peso de acuerdo a estudios realizados en la India(22), por lo que se le

podría clasificar como una sustancia promotora de la carcinogénesis (3), de acuerdo a la clasificación de Byron E. Butter Worth.

En cuanto a la cinética de proliferación celular no se observó ningún cambio que haya sido estadísticamente significativo en ninguno de los tres grupos, por lo que no se vio alterado de alguna forma el tiempo promedio de generación. Y al efectuar la prueba de Chi cuadrada de Friedman no se observó alguna diferencia significativa que fuera indicativa de algún cambio de la relación porcentual de células de 1ª división, 2ª división y 3ª división de los tres grupos.

Esto nos da indicio de considerar que primeramente se observa un daño genotóxico, ya que con la concentración de 1.94 mg/Kg hubo diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de los ICH se refiere, pero en cambio el parámetro del tiempo promedio de generación se observa que no se afectó, es decir que la capsaicina no produjo un efecto citotóxico en ese rango de dos dosis que se manejaron, con lo que en estas dosis se puede observar que el daño genotóxico evaluado por los ICH es evidente antes que el daño citotóxico y que en estas concentraciones aún no fue posible verlo de acuerdo al TPG.

Se realizó una gráfica que no aparece en el texto tomando como puntos los tres grupos (testigo, 1.46 mg/kg y 1.94 mg/kg) vs. media de los ICFI. Pero en los primeros 2 puntos son tan similares en cuanto a su pendiente, que no se podía suponer que la capsaicina ejerciera algún efecto visible que se pudiese determinar por algún método matemático. Pero al comparar la pendiente entre la dosis de 1.94 mg/kg y 1.46 mg/kg se puede observar que si existe alguna función matemática y lo que se puede proponer para determinar si existe, es el estudio de dosis intermedias (para que se lleve a cabo por otro investigador) para tener 5 puntos que son los suficientes para lograr determinar la fórmula matemática de la gráfica.

## **6.CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

6.1 La capsicina elevó la frecuencia de Intercambio de cromátides hermanas con la dosis mayor (1.94 mg/kg ) en las células de médula ósea de ratones tratados produciendo un efecto que es estadísticamente significativo  $p < 0.05$  , en la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas.

6.2 Al evaluar la cinética de proliferación se observó que no hubo modificación estadísticamente significativa que pudiera reflejarse en un daño citotóxico.

6.3 Con ambos parámetros evaluados ( Intercambio de cromátides hermanas y Cinética de proliferación celular ) se pudo concluir que el daño genotóxico se observa aún antes que el posible daño citotóxico.

## 7. BIBLIOGRAFIA



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Ames ,B.N., J. McCanann and E. Yamasaki (1975): " Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian* microsome mutagenicity test." Mutation Res. 31 :347-364.
2. Brusick, D.: Principles of Genetic toxicology cap.1 Plenum Press, New York 1980.
3. -Butterworth, Byron E. (1990). Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential. Mut.Res.239: 117-132.
4. -Calderon M.,E.E. Ramírez H.,L. " Efecto mutagénico inducido por capsaicina sobre eritrocitos policromáticos de sangre periférica detectado mediante la prueba de micronúcleos en un estudio subagudo *in vivo*" Tesis Q.F.B. de la F.E.S.- Cuautitlán 1992.
5. -El mundo de la Naturaleza (1978). Grijalbo, Tomo I p.129-130.

6. -Chamorro, G., Espinoza. L., Salazar. S., Madrigal, E. (1993). Ausencia de efectos dominantes letales en ratón por administración prolongada de capsaicina. XIV Congreso Nacional de Farmacología . Guanajuato, Gto.
7. -Chaganty,R.S.K., S. Sconberg and J. German (1974). A many fold increase in sister chromatid exchange in Bloom's Syndrome Lymphocytes . Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,71 : 4508-4512.
8. -García R. , ( 1960 ) Entre la verdad Mexicalt y el embuste español p 21.
9. -Glinukon,T.,Stitmunnaith,V., Toskulkao, C., Buranawui.T., Tankrisanavinant,V., (1980). Acute toxicity of capsicum in several animal species , 'Toxicon 18:215-220.
- 10.-Gotto,K,Akematsu,T.,Shimasu, H., and Sugiyama, T. (1975) Simple differential giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and mechanism of staining chromosome. 53 : 223-230.
- 11.-Kato H.and Sandberg A.A.(1977).The effect of sera on sister Chromatid exchange *in vitro*. Exp. Cell Res.109:445-448.

- 12.-Kilbey, B.J.; y col.(1978) Mutagenicity Screening General Principles and Minimal Criteria. *Mut.Res.* 53:361-367
- 13.-Latt,S.A.; Schereck, R.R.; Loveday, K.S. and Shuler, Ch.F.(1979): *In vitro* and *in vivo* analysis of sister chromatid exchange . *Pharmacol.Rev.* 30 : 501-535.
- 14.-Long-Solís, J. ( 1986 ) *Capsicum y Cultura, La Historia del Chili.* Fondo de cultura Económica . México 181 p.p.
- 15.-Matheson, D.W.: Brusick, D. and Jagannath, D.R.(1980): Commercial Screening of Environmental chemicals. In chemical mutagens. Vol. 6 de Serres y Hollander eds. Plenum Press, New York .
- 16.-McFee and Col.Lowe,K.W.,San Sebastian, J.R.,(1983): Improved Sister Chromatid differentiation Using paraffin -coated Bromodeoxyuridin tablet in mice. *Mut. Res.* 119:83-88.
- 17.-Monsereenusorn, Y.,Glinsukon, T.(1979). The inhibitory effect of capsaicin on intestinal glucose absorption *in vitro*. Effect of capsaicin on the serosal side of everted intestinal sacs , *Toxicol., Lett.* 4:393 .

- 18.-Monsereenusorn,Y.,Konganut.S.,Pezalla,P.(1982).Capsaicin. A literature survey.  
C.R. Toxicol. 90: 321-339.
- 19.-Morales, P.(1988) : El daño de la información genética y los intercambios entre las cromátides hermanas. Ciencia y desarrollo. 81 : 65-72. vol. XIV julio-agosto.
- 20.-Morales-Ramírez P., Rodríguez-Reyes R., and Valerino-Kelly, T(1987). Analysis of spontaneous sister chromatid exchange *in vivo* by three-way differentiation  
Mut.Res.,178: 49-56.
- 21.-Muralidhara and Narasimhamurty (1988) . Non-mutagenicity of capsaicin in albino mice. Fd. Chem.toxic.,26:955-958.
- 22.-Nopanitaya, W. and Nye, S.W.(1974). Duodenal mucosal response to the pungent principles of hot pepper (capsaicin) in the rat : Light and electron microscopy study  
. Toxicol. Appl. Pharmacol 30: 149-161.

- 23.-Nagabhushan, M. and Bhide (1985).Mutagenicity of extract and capsaicin in Short - Term test. Environmental Mutagenesis 7:881-888.
- 24.-Perry, P. and Wolf,S.,(1974).New Method for differential Staining of Sister chromatids. Natura 261 : 156-158.
- 25.-Purseglove, J.W., (1972) Tropical corps. Dicotyledons.Longmon Group Limited London p.524-530.
- 26.-Sasaki, M. (1982): Role of Chromosomal Mutation in development of cancer. Cytogenet. Cell. Genet. 33: 160-168.
- 27.-Schery, R.W. Plants for man Prentice - Hall Inc. New Jersey , USA.1980.
- 28.-Schvartzman, J.B., and Goyanes, U. (1980). A new method for identification of BrdU substituted chromosomes, Cell Biol. Int.Rep., 4: 415-423.
- 29.-Tandom, G.L., David,S.V.,Siddappa, G.S. (1964). Oleoresin of Capsicum ( red chilies ). Some technological and chemicals aspects. J.Food SCI. 29: 1-5.

- 30.-Tice, R.J., Chaillet and E.L.Schneider (1976). Demonstration of spontaneous sister Chromatid exchange *in vivo* Exp. Cell Res. 102 :426-429.
- 31.- The Index Merck. 8º Edición Publicado por Merck and Co. Inc. Rahway N.J. USA 1968.
- 32.-Toda,N., Usui, H., Nishino, N. Fujiwara, M. (1972) Cardiovascular effects of capsaicin in dogs and rabbits,J. Pharmacol. Exp Ther. 181:512-521.
- 33.-Toth B. Rogan E. & Walter (1984). Tumorigenicity and mutagenicity studies with capsaicin of hot pepper. Anticancer Res. 4, 117 .
- 34.-Trease-Evans,F.Farmacognosia. Editorial C.E.C.S.A.México 1984.
- 35.-Wayne W. Daniel . " Bioestadística" Base para el análisis de las ciencias de la Salud . 3er. Edi. Editorial Noriega limusa p. 283-287.

36.-Yamasaki H. (1988) Tumor promotion : From the view point of cell society. In :  
O.H. Inverson (Ed.) Theories of carcinogenesis. Hemisphere Publishing Corp.,  
Washington, D.C., pp.143-157.