



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**“Efecto de inhibición mutagénica del  
nitrito de sodio por acción quimiopreventiva  
de la capsaicina en ratón”**

**T E S I S**

Que para obtener el título de

**Licenciada en Nutrición**

**P R E S E N T A**

**Fabiola Martínez Fregozo**

Director

Q.F.B. Zurisaddai Betanzos Palmeros

Codirector

Dr. Ernesto Alanís García



Pachuca, Hidalgo, Abril 2008



Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Farmacología, Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, financiado por el M.C. David Martínez Gudiño, L.C Ma Del Carmen Fregozo Lira, Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán, Q.F.B. Zurisaddai Betanzos Palmeros y Dr. Ernesto Alanis García.

Este trabajo ha sido presentado en los siguientes eventos de difusión científica

- ❖ Jornada de seminarios de investigación en el Instituto de Ciencias de la Salud. Abril 2007.
- ❖ I Curso Internacional Teórico Práctico “Tópicos Selectos en Genética Toxicológica”. Noviembre 2007.
- ❖ XXIII Congreso Nacional de la AMMFEN Tuxtla Gutiérrez Chiapas. Febrero 2008

*Esta tesis se la dedico y agradezco a:*

*Dios, por darme un día más de vida y haber realizado una de mis metas, por concluir una etapa más en mi vida y sobre todo por darme una familia tan hermosa la cual es muy valiosa en mi vida.*

*A mis padres por todo su apoyo moral, físico, espiritual, económico... por su comprensión, por impulsarme a seguir adelante y sobre todo por su eterna amistad, cariño, confianza y amor.*

*A mis hermanas Karen e Ivonne por su amistad, confianza cariño y el apoyo incondicional en todo momento.*

*A mis abuelitos Enrique<sup>†</sup> y Raquel por todo su cariño, amor, paciencia y sobre todo por sus oraciones, consejos y enseñanzas,.*

*A Ulises por el cariño y amor que me ha brindado desde el inicio de mi carrera, por todos aquellos momentos que ha estado a mi lado buenos y difíciles, por su apoyo incondicional ...*

*Gracias por existir  
Los amo*

*At todo el jurado y amigos, por sus criticas constructivas, en especial el apoyo incondicional de Zurisaddai Betanzos Palmeros, Ernesto Alanis Garcia, Eduardo Osiris Madrigal Santillán, Patricia González Ramirez y Eli Mireya Sandoval Gallegos por apoyarme en realizar este proyecto tan importante para mi, y transmitirme sus conocimientos, enseñanzas y por su amistad que me brindaron.*

*Gracias*

---

## Índice

	<i>Pág.</i>
Índice de Figuras y Tablas .....	iv
Abreviaturas .....	vi
Resumen .....	1
Abstract .....	3
2. Marco teórico.....	5
2.1 Género <i>Capsicum</i> .....	5
2.1.1 Propiedades fisicoquímicas de la capsaicina .....	7
2.1.2 Usos cotidianos y efectos farmacológicos atribuidos a la capsaicina .....	7
2.1.3 Farmacocinética de la capsaicina .....	10
2.1.4 Mecanismo de acción terapéutico de la capsaicina .....	10
2.2 Nitratos y nitritos .....	12
2.2.1 Nitrosación .....	14
2.2.2 Toxicidad .....	15
2.2.3 Mecanismos de acción de las nitrosaminas .....	15
2.3 Carcinogénesis y mutagénesis .....	16
2.3.1 Pruebas de mutagénesis en bacterias <i>in vitro</i> .....	17
2.3.4 Modelo experimental de micronúcleos.....	19
2.3.5 Prueba de micronúcleos en ratón.....	20
2.4 Quimioprevención de la capsaicina.....	22
3. Problema de Investigación .....	24
4. Justificación.....	25
5. Objetivo General .....	26
5.1 Objetivos Específicos .....	26
6. Hipótesis.....	26
7. Metodología.....	27
7.1 Esquema general de la metodología .....	27
7.2 Tipo de estudio .....	28
7.3 Criterios de inclusión.....	28

---

7.4 Criterios de exclusión .....	28
7.5 Criterios de eliminación.....	28
7.6 Adquisición de animales y población de estudio.....	28
7.7 Acondicionamiento.....	28
7.8 Pesado y marcaje .....	29
7.9 Formación de lotes.....	29
7.10 Tratamiento.....	29
7.11 Toma de muestra .....	31
7.12 Frotis sanguíneo.....	31
7.13 Tinción de Giemsa.....	31
7.14 Conteo de eritrocitos.....	32
7.15 Análisis estadístico .....	32
<b>8. Resultados .....</b>	<b>33</b>
8.1 Comparación del Testigo negativo contra Testigo positivo .....	34
8.2 Comparación del Testigo negativo contra el Control de Capsaicina.....	35
8.3 Comparación del Testigo positivo contra el lote de Control Capsaicina 10 mg/kg .....	36
8.4 Comparación del lote combinado de NaNO <sub>2</sub> (15 mg/kg) y CAP (2 mg/kg) contra el lote Control de CAP (10 mg/kg). .....	37
8.5 Comparación del lote combinado de NaNO <sub>2</sub> (15 mg/kg) y CAP (6 mg/kg) contra el lote Control de CAP (10 mg/kg). .....	38
8.6 Comparación del lote combinado de NaNO <sub>2</sub> (15 mg/kg) y CAP (10 mg/kg) contra el lote Control de CAP (10 mg/kg).....	39
8.7 Comparación del lote combinado de NaNO <sub>2</sub> (15 mg/kg) y CAP (2 mg/kg) contra el Testigo positivo (15 mg/kg de NaNO <sub>2</sub> ).....	40
8.8 Comparación del lote combinado de NaNO <sub>2</sub> (15 mg/kg) y CAP (6 mg/kg) contra el Testigo positivo (15 mg/kg de NaNO <sub>2</sub> ).....	41
8.9 Comparación del lote combinado de NaNO <sub>2</sub> (15 mg/kg) y CAP (10 mg/kg) contra el Testigo positivo (15 mg/kg de NaNO <sub>2</sub> ).....	42
8.10 Comparación de todos los lotes y su efecto quimiopreventivo de la CAP.....	43
8.11 Relación de ENC/EPC inducidos por la administración de NaNO <sub>2</sub> y Capsaicina .....	44

---

9. Discusión.....	45
10. Conclusiones.....	49
11. Referencias bibliográficas .....	50
12. Anexo .....	56

---

## Índice de Figuras y Tablas

	<i>Pág.</i>
<b>Figuras</b>	
Figura 1. Estructura química de la capsaicina	7
Figura 2. Formación de metabolitos inestables a partir de la capsaicina	11
Figura 3. Formación de nitrosamina	13
Figura 4. Producción del ion carbonio a partir de dimetilnitrosamina	16
Figura 5. Eritrocito policromático (EPC), eritrocito policromático micronucleado (EPCMN), eritrocito normocrómico (ENC) y eritrocitos normocrómicos micronucleados (ENCMN).	21
Figura 6. Formación de eritrocitos micronucleados en sangre periférica	21
Figura 7. Administración por vía oral	30
Figura 8. Administración por vía intraperitoneal	30
Figura 9. Toma de muestra sanguínea	31
Figura 10. Eritrocito normocrómico micronucleado	33
Figura 11. Eritrocitos policromáticos y normocrómicos	33
Figura 12. Frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de NaNO <sub>2</sub> (15 mg/kg)	34
Figura 13. Frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos en el testigo y por la administración de CAP 10mg/kg	35
Figura 14. Frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de NaNO <sub>2</sub> y CAP	36
Figura 15. Frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de CAP y NaNO <sub>2</sub> con CAP en la menor dosis	37
Figura 16. Frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de CAP y NaNO <sub>2</sub> a dosis media	38
Figura 17. Frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de CAP y NaNO <sub>2</sub> a dosis mayor	39
Figura 18. Frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de NaNO <sub>2</sub> y NaNO <sub>2</sub> a dosis menor	40



---

Figura 19. Frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de NaNO <sub>2</sub> y CAP a dosis media	41
Figura 20. Frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de NaNO <sub>2</sub> y NaNO <sub>2</sub> a dosis mayor	42
Figura 21. Frecuencia de ENCMN Y EPCMN por la administración de NaNO <sub>2</sub> y CAP	43
Figura 22. Relación de ENC/EPC inducidos por la administración de NaNO <sub>2</sub> y CAP	44

### **Tablas**

Tabla 1. Variedades de chile en México	6
Tabla 2. Alimentos con alto contenido en nitritos y nitratos de sodio	14
Tabla 3. Sistemas de pruebas más utilizados para identificar la acción de agentes mutagénicos y carcinogénicos	18
Tabla 4. Productos cárnicos procesados	60

---

## Abreviaturas

<b>CAP</b>	Capsaicina
<b>CYP2E1</b>	Citocromo P450 coenzima 2E1
<b>DMN</b>	Dimetil Nitrosamina
<b>ENC</b>	Eritrocitos normocrómicos
<b>ENCMN</b>	Eritrocitos normocrómicos micronucleados
<b>EPC</b>	Eritrocitos policromáticos
<b>EPCMN</b>	Eritrocitos policromáticos micronucleados
<b>i.p.</b>	Administración vía intraperitoneal
<b>MN</b>	Micronúcleo
<b>NaNO<sub>2</sub></b>	Nitrito de sodio
<b>p.o.</b>	Administración vía oral
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>ppb</b>	Partes por billón
<b>SP</b>	Sustancia P

## Resumen

La dieta mexicana se compone básicamente de maíz, frijol y chile, siendo este último un componente emblemático de la gastronomía nacional. El chile se caracteriza por presentar un sabor picante, propiedad atribuida a la presencia de la capsaicina (CAP). En los últimos años se han estudiado los efectos de la capsaicina en el organismo y recientemente se le ha atribuido capacidades quimiopreventivas. Sin embargo, existen contradicciones en cuanto a la dosis empleada para ejercer dicha capacidad; ya que algunos autores mencionan que a dosis bajas presenta actividad antimutagénica pero en cantidades elevadas se convierte en una sustancia potencialmente carcinogénica y mutagénica. Por otra parte, en nuestro país también se consumen grandes cantidades de alimentos procesados, los cuales contienen conservadores como el nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) que desafortunadamente presenta un elevado potencial tóxico; lo que incrementa la posibilidad de desarrollar enfermedades en el ser humano, como es el cáncer. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antígenotóxico y anticitotóxico de la capsaicina contra el daño producido por el  $\text{NaNO}_2$  en ratones CD-1. Los grupos experimentales fueron organizados de la siguiente manera: a) se incluyó un grupo de animales que se les administró agua (testigo negativo), b) un testigo positivo en donde a los ratones se les administró  $\text{NaNO}_2$  por vía oral en una dosis de 15 mg/kg, c) un lote control de capsaicina con la dosis más alta y d) tres lotes combinados de  $\text{NaNO}_2$  más capsaicina con dosis de 2, 6 y 10 mg/kg, vía oral. Se realizaron frotis sanguíneos a las 0, 48 y 96 h y posteriormente las laminillas fueron teñidas con Giemsa y observadas al microscopio para cuantificar los micronúcleos presentes en 1000 eritrocitos normocrómicos (ENC). Los resultados indicaron que el  $\text{NaNO}_2$  incrementó significativamente la frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados (ENCMN) con respecto al testigo negativo, además mostró una ligera disminución en el número de EPC a las 48 horas de tratamiento, recuperándose este parámetro a las 96 h por lo que se considera un agente moderadamente citotóxico bajo las condiciones empleadas en este experimento. Por otro lado, la capsaicina no fue un

agente genotóxico ni citotóxico a las dosis empleadas y que además presentó un efecto antígenotóxico dosis-dependiente contra el NaNO<sub>2</sub>; obteniéndose el mayor efecto protector (60%) a las 96h con la dosis de 10 mg/kg. Dichos resultados sugieren que la capsaicina puede considerarse un método alternativo para disminuir la genotoxicidad producida por este conservador e incrementa la posibilidad de evaluar este potencial quimioprotector contra otros conservadores y/o mutágenos presentes de manera cotidiana en la dieta mexicana.

**Palabras clave:** capsaicina, NaNO<sub>2</sub>, mutagénesis, quimioprevención, micronúcleos, eritrocitos.

**Abstract**

Mexican diet is basically made of corn beans and chilli, this one is the main component and its like an emblem of the National gastronomy. The chilli is characterized by presenting a hot flavor due to the capsaicin (CAP). The effects of CAP in the organism have been recently attributed to a chemical-preventative capacity. There are some contraindications due to the dose used to exercise this capacity. Some authors have mentioned that a low dose antimutagenesis activity is presented, but in a high amount it becomes to potential carcinogenic and mutagenic. We also consume large amounts of processed foods, which contain conservatives like (NaNO<sub>2</sub>) sodium nitrite unfortunately with large toxic potential elevated, which produces diseases in humans like cancer. The objective of this study is to determine the antigenotóxico and anticitotoxicity of capsaicin against the illness effects produced by NaNO<sub>2</sub> in mice CD-1. The experimental groups were organized as follows a) animals groups which consumed water (negative test), b) a positive test where mice were administered whit NaNO<sub>2</sub> orally in dose of (15 mg/kg), c) in a control of capsaicin with a higher doses, d) three lots combined NaNO<sub>2</sub> plus capsaicin with dose of 2, 6 and 10 mg/kg. Blood draws at 0, 48, and 96 hours and afterwards. The slides were painted whit Giemsa and observed under the microscope to notice about the micronucleus in 1000 erythrocytes normocromic (ENC). The results indicated NaNO<sub>2</sub> high in a notable incrementation of the frequency or erythrocytes normocromics micronucleus (ENCMN), according to the negative witness, besides showing a slight decrease in the number of EPC at 48 hours of treatment, recovering this parameter of 96 hours what is considered a moderate citotoxic agent under conditions employed in this experiment. On the other hand the capsaicin was not a genotoxic or citotoxic agent by the portion employed and presents an antigenotóxico portion dependent against NaNO<sub>2</sub> obtaining a major protector effect (60%), to the 96 hours with a dose of 10 mg/kg. Such results suggest that capsaicin can be considered an alternative method to diminish the genotoxicity produced by this

conservative and increase the possibility of evaluating this potential chemopreventive produced against other conservatives and/or mutagenesis in the daily diet of Mexican people.

**Key words:** capsaicin, nitrites, mutagenesis, chemopreventive, micronuclei, erythrocytes.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Género *Capsicum*

La dieta mexicana se compone básicamente de maíz, frijol y chile, este último es el componente emblemático de la gastronomía nacional e imprescindible su consumo en la mayoría de los hogares desde los tiempos prehispánicos (Tabla 1). Se emplea en diversos platillos y por tener la capacidad de darle un sabor diferente a los alimentos se ha incrementado su consumo, rebasando las fronteras de nuestro país, a tal grado que hoy en día es uno de los condimentos más ingeridos en todo el mundo (Salazar-Olivo, 2004). Este fruto contiene propiedades sensoriales muy características, en cuanto a sabor, olor y color (Zarco, 2004).

Además de las características sensoriales específicas en cada especie, el chile tiene la capacidad de acumular grandes cantidades de calcio, fósforo, hierro, tiamina, riboflavina, niacina y vitamina A, E y C. En general, se considera que el contenido de vitamina C es, por lo menos, 8 veces superior en los chiles que en los frutos cítricos (Zarco, 2004).

Este fruto se ha caracterizado por presentar un sabor pungente, propiedad que se atribuye a la presencia de la capsaicina (CAP), compuesto aislado por Thresh en 1846, en cuyo estudio menciona que puede recolectarse por extracción acuosa o alcohólica y que dicha molécula está estrechamente relacionada con el grupo vainillil (Zarco, 2004).

El género *capsicum*, es un término que se deriva del griego *capsa* cuyo significado es caja; ya que hace referencia a que es un hueco en donde se almacenan las semillas. Los capsaicinoides son las principales sustancias pungentes encontradas en los chiles, están formadas por seis componentes naturales que han sido identificados como capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina, homodihidrocapsaicina y nonivamida (Reilly *et al.*, 2003).

La capsaicina es el capsaicinoide de mayor abundancia, constituye aproximadamente del 40 al 60% del contenido total de este grupo de moléculas en el fruto, se forma en la pared del ovario del chile, se transporta a las placentas y semillas en donde se almacena y concentra (Reilly *et al.*, 2003).

El chile habanero es uno de los más picosos en la República Mexicana y con mayor contenido de capsaicina debido al sabor pungente. Es una planta herbácea que produce frutos que, al madurar, son de color amarilla-limón o rojizos de sabor muy picante (*Capsicum-chinese*) (Tabla 1). De sabor muy característico y muy incitante, por lo picante y perfumado, este proviene de la península de Yucatán (Long, 2004).

Tabla 1. Variedades de chile en México

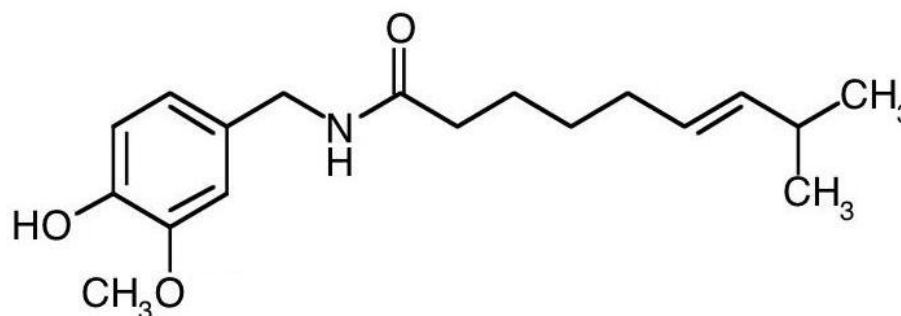
CHILE	NOM. CIENTIFICO	REGION
Ancho	<i>C. annuum</i>	Pacifico Norte
Caloro	<i>C. annuum</i>	Chihuahua
Canario	<i>C. pubescens</i>	Oaxaca
Cascabel	<i>C. annuum</i>	El Bajío
Chiltepin	<i>C. annuum</i>	Zonas costeras de México
Cuaresmeño	<i>C. annuum</i>	D. F. alrededores
Guajillo	<i>C. annuum</i>	Zacatecas y Aguascalientes
Habanero	<i>C. chinese</i>	Península de Yucatán
Manzano	<i>C. pubescens</i>	Michoacán, Chiapas, Edo. De México
Morita	<i>C. annuum</i>	Veracruz y Oaxaca
Mulato	<i>C. annuum</i>	Guanajuato Puebla y Jalisco
Peron	<i>C. pubescens</i>	Michoacan
Siete caldos	<i>C. annuum</i>	Chiapas

Fuente: Buenrostro y Barros, 2001



### 2.1.1 Propiedades fisicoquímicas de la capsaicina

La estructura química de la capsaicina fue descubierta en 1919 y químicamente recibe el nombre de 8-metil-N-vainillil-6-nonenamida (Figura 1); su forma física se reconoce por escamas o placas monocíclicas, es insoluble en agua y muy solubles en compuestos polares. Presenta un punto de fusión entre 57 y 66 °C ebulle a 210 - 220°C, su peso molecular es de 305, (Bamio y Josep-Francesc, 1999). Su fórmula molecular es  $C_{18}H_{27}NO_3$  (Surh y Lee, 1995).



**Figura 1.** Estructura química de la capsaicina (Surh y Lee, 1995)

### 2.1.2 Usos cotidianos y efectos farmacológicos atribuidos a la capsaicina

Aunque, generalmente la capsaicina se utiliza en forma de especia y condimento en los platillos nacionales e internacionales, también se usa en la medicina alternativa desde la época prehispánica (Buenrostro y Barros, 2001), atribuyéndosele propiedades analgésicas, principalmente relacionadas con el tratamiento del dolor. En este sentido, algunos estudios han confirmado dicha propiedad; por ejemplo, el estudio realizado por Zarco y colaboradores (2004) quienes después de aplicar de manera subcutánea en la cola de ratas un extracto de chiles machacados, observaron una prolongada insensibilidad al dolor en esa zona del cuerpo del animal. Posteriormente, extrajeron la CAP con éter y la oleoresina

obtenida se aplicó directamente al nervio ciático en donde se bloqueó la transmisión de los impulsos nerviosos (Zarco, 2004). Otro estudio, donde se inyectó intraperitonealmente capsaicina a ratas recién nacidas reportó que después de una excitación intensa de neuronas sensoriales se presenta un periodo prolongado de insensibilidad a los estímulos dolorosos (Jancso, 1964). Además, debido a que el dolor crónico también se puede controlar a nivel del SNC, existe la evidencia de Holtzer y colaboradores (1981) quienes aplicaron capsaicina a ratas neonatales produciendo un aumento de 5-hidroxitriptamina y de histamina en la piel, los pulmones y medula espinal, como respuesta de las células cebadas a la pérdida de neuronas sensoriales amielínicas las cuales están involucradas en el dolor crónico (Holtzer *et al.*, 1981).

La mayoría de la información sugiere que la capsaicina se ha usado mezclándose con azúcar para evitar la sensación de calor en la boca de pacientes con cáncer produciéndose un alivio posterior a los tratamientos con quimioterapia (Pamplona, 2004). Su uso normalmente ha sido en dosis bajas y a una concentración de 0.075 % para el alivio de neuralgias post herpéticas, neuropatía diabética, distrofia simpática refleja y neuralgia del trigémino. En México se usa a una concentración de 0.035 % en la presentación farmacéutica de crema. El uso tópico de cremas al 10 %, se recomienda para dolor crónico en enfermedades terminales como el cáncer. Además, se utiliza cotidianamente en distintas entidades del país para aliviar el dolor muscular después de ejercicios rigurosos (Reilly *et al.*, 2003).

También se ha usado en la instilación intravesical para el tratamiento de la vejiga hiperexcitable a consecuencia de algunos traumatismos o de esclerosis múltiple. Se ha aplicado en el escozor persistente como en la psoriasis, en la vestibulitis vulvar o intranasales para rinitis vasomotora o rinitis alérgica persistente (Wade *et al.*, 2002).

Existe evidencia de que la CAP atraviesa la barrera placentaria ya que en un estudio *in vivo*, donde se inyectó CAP a ratas en gestación durante 19 días (edad en la cual la distribución de sustancia P (SP) (químico mediador primario de los impulsos del dolor desde la periferia hasta el sistema nervioso central (SNC)), intracerebral es semejante a la del adulto), se observó que los animales recién nacidos presentaron retraso de maduración en el patrón de nado forzado y una clara hiperactividad motora que en las hembras persistió hasta las 6 semanas de edad. Otros autores también han descrito que después de la administración transplacentaria de la CAP en el asta posterior de la medula espinal, se reduce la fosfatasa alcalina y la SP, comprobando que esta molécula pungente atraviesa membrana y se transmite al feto durante el embarazo (Zarco, 2004). Debido a la capacidad de la CAP para disminuir o inhibir a la sustancia P se ha recomendado añadirla en los alimentos de pacientes geriátricos para evitar broncoaspiración y el reflejo de la tos, ya que esta última es mediada por la liberación de dicha sustancia.

Por otro lado, desde hace algunos años se administra a personas obesas debido a que incrementa la tasa metabólica, lo que a su vez produce un aumento del ingreso energético y actualmente se realizan estudios para determinar si la capsaicina puede incrementar el metabolismo de la grasa corporal al aumentar la velocidad metabólica y elevar la temperatura corporal (Salazar y Silva, 2004).

En general, las evidencias indican que tiene la capacidad de estimular las secreciones gástricas, que es capaz de actuar sobre las fibras no mielinizadas delgadas, activando a ciertas subpoblaciones de neuronas sensoriales. Posee cualidades descongestivantes, expectorantes, antibacterianas y en el cerebro favorece la producción de endorfinas (sustancias que promueven la sensación de bienestar) y dependiendo de su dosis puede provocar efectos analgésicos, antifúngicos, antiinflamatorios (Yoshika *et al.*, 1999). Se ha observado que tiene gran actividad antioxidante ya que evita la formación de radicales libres, sin embargo a

pesar de su diversas capacidades el consumo abundante y excesivo puede ocasionar inflamación (Ochi *et al.*, 2003).

### **2.1.3 Farmacocinética de la capsaicina**

El metabolismo de la capsaicina comienza en el tracto gastrointestinal (Kawada y Iwai, 1985), se absorbe en el intestino delgado principalmente en yeyuno e ileon (Komori *et al.*, 2007) y se distribuye de manera lenta; atraviesa las membranas celulares por difusión pasiva simple, se transforma en el hígado por acción de Citocromo P<sub>450</sub> (CYP450) dando lugar a distintos metabolitos (Figura 2). Se ha propuesto que las oxidasas microsomales de la función mixta son responsables de forma dichos intermediarios electrofílicos, los cuales se unen irreversiblemente a moléculas nucleofílicas en los tejidos blanco provocando efectos adversos como la necrosis; y dependiendo de la cantidad o dosis que se ingiera, algunos autores consideran que puede ser carcinogénica y mutagénica (Surh y Lee, 1995).

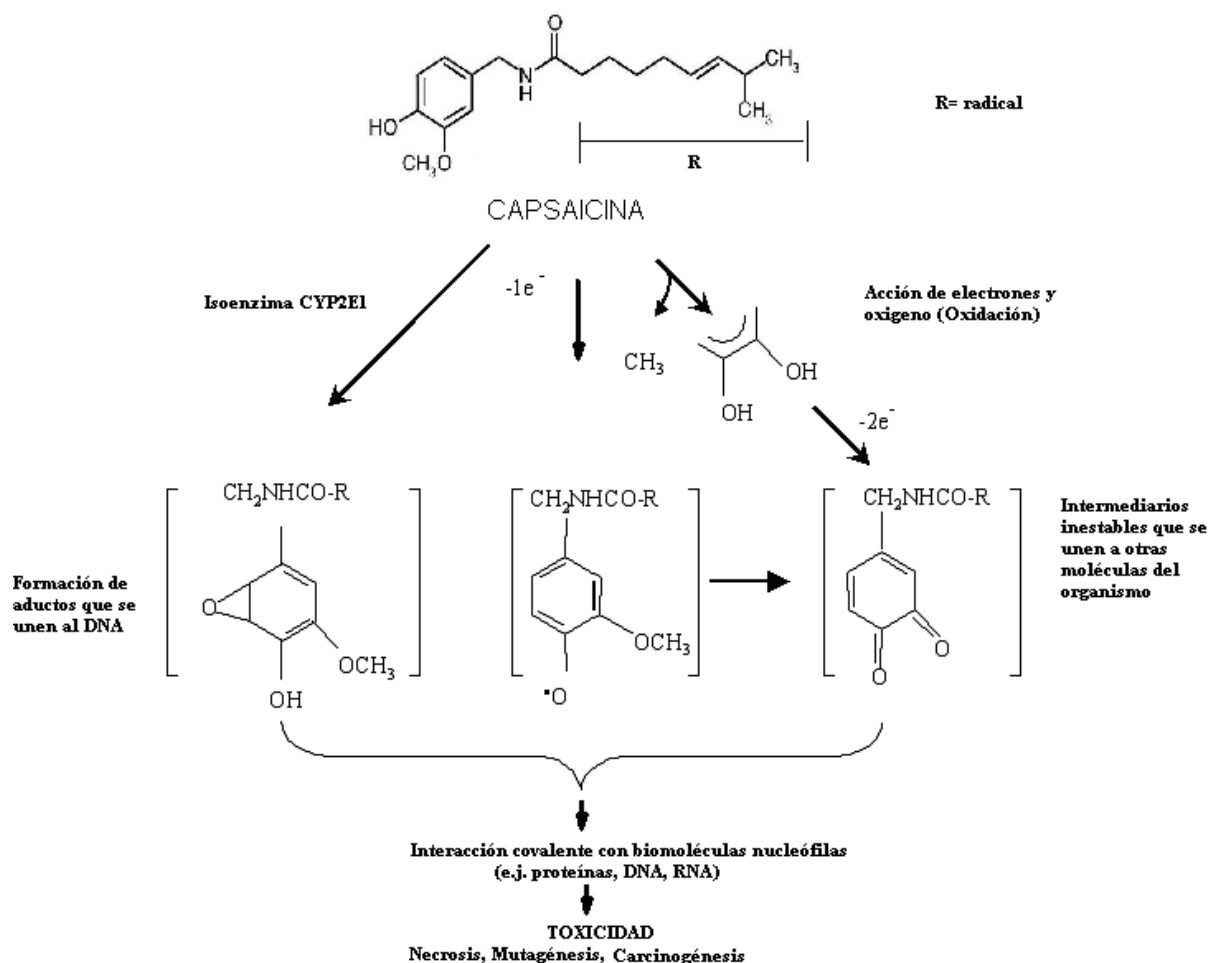
Surh y Lee (1995), mencionan que la actividad hepática del CYP450 y en especial la isoenzima CYP2E1 es la responsable de la formación de muchas especies reactivas de la capsaicina. CYP2E1 es propenso a ser inhibido por varios solventes como el dimetilsulfóxido que se utiliza frecuentemente para disolver compuestos en diversas pruebas *in vitro*. Además la enzima es inducida por agentes como el etanol, acetona y piridina, puede activarse durante el ayuno excesivo y por algunos estados patológicos, como la diabetes. Las actividades mutagénicas y carcinogénicas de la capsaicina se han atribuido a la inducción del CYP2E1. Aunque pequeñas cantidades de capsaicina han demostrado no producir efectos tóxicos; a concentraciones elevadas, mayores de 200 mg/kg se la ha asociado con necrosis, ulceración y en algunos casos tumorogénesis y carcinogénesis (Surh y Lee, 1995).

### **2.1.4 Mecanismo de acción terapéutico de la capsaicina**

Hasta la fecha, se desconoce el mecanismo exacto por el cual la CAP reduce el dolor; se han sugerido dos principales vías de acción: la primera esta relacionada

con la reacumulación de la SP en neuronas sensoriales periféricas (Zarco, 2004), que inervan la dermis y epidermis, este mediador también puede ser liberado en las articulaciones donde activa sustancias inflamatorias relacionadas con el desarrollo de artritis reumatoide (Salazar y Silva, 2004).

El segundo mecanismo sugerido se relaciona con la estimulación de un receptor tipo vanilloide de la CAP donde se facilita la entrada de iones calcio a las células a través de canales específicos (fenómeno de despolarización de las membranas celulares) que al ser transportado hasta el cerebro es traducido en forma de sensación de quemazón o ardor (Yoshika *et al.*, 1999).



**Figura 2.** Formación de metabolitos inestables a partir de la capsaicina (Surh y Lee, 1995).

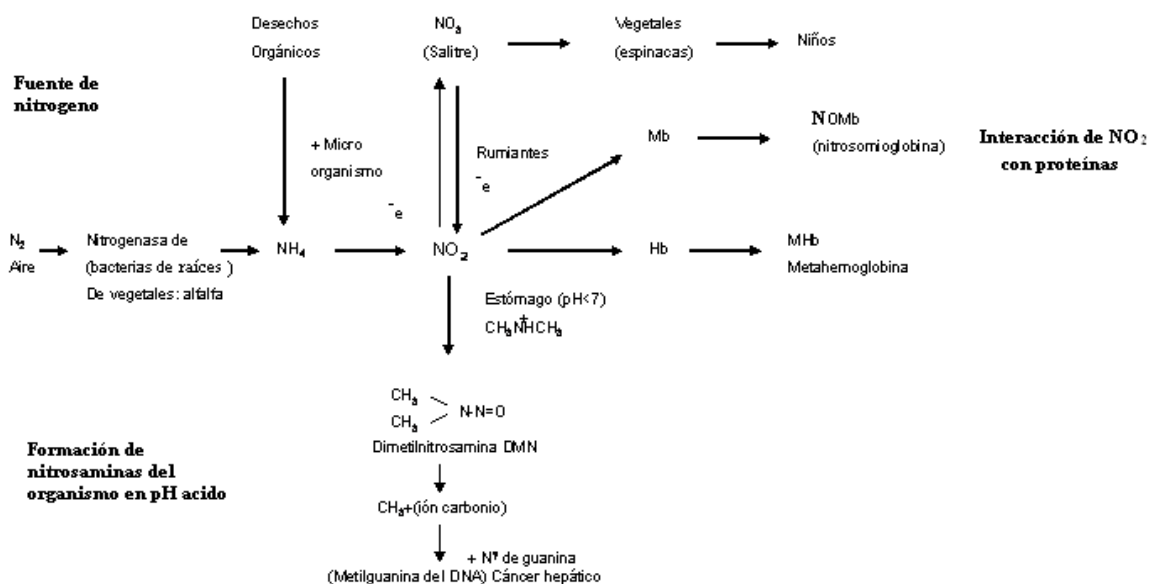
## 2.2 Nitratos y nitritos

Los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) son sustancias que se incorporan a los alimentos para aumentar su estabilidad y seguridad microbiológica, son capaces de retardar procesos de fermentación, inhibir el crecimiento de hongos evitando las alteraciones biológicas de alimentos o bebidas y la inocuidad de los alimentos o modificación de sus características sensoriales como es el sabor, el olor, el color y la textura del mismo (Hernández y Sastre, 1999).

Tanto los nitritos como los nitratos son denominados en conjunto compuestos N-nitrosos (Hodgson y Levi, 1997), están asociados al desarrollo de carcinomas gástricos y esofágicos. Se sabe que los nitritos y los nitratos producen compuestos de nitrosación; como las nitrosaminas, las cuales se pueden formar de diferentes maneras, siendo las más frecuentes al ingerir estos compuestos en la dieta, durante la biotransformación del humo del tabaco o por la producción endógena en el medio gástrico. El compuesto de nitrosación, generalmente anhídrido nitroso, proviene del nitrito sódico que se adiciona a los alimentos como preservante o conservador (Navarro, 2003). Los nitritos que se ingieren generalmente se combinan con aminos y amidas naturales en los alimentos o dentro del organismo humano dando lugar a la formación de nitrosaminas, por lo que se cree que los altos niveles de nitritos/nitrosaminas presentes en la dieta contribuyen a la elevada incidencia de cáncer esofágico (Badui, 1999).

Los nitritos y nitratos de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NaNO}_3$ ) son aditivos usados en el curado de las carnes para generar un color rosado, también previenen las alteraciones sensoriales de los alimentos ocasionados por los microorganismos, desafortunadamente, juegan un papel relevante en el desarrollo carcinogénico y mutagénico en cualquier especie animal (incluyendo al humano) (Hodgson y Levi, 1997). Se ha observado que tienen la capacidad de dilatar a los vasos sanguíneos del organismo mediante un efecto relajante sobre los músculos lisos; pueden provocar metahemoglobinemia y dependiendo de la dosis o vía de exposición son

capaces de causar envenenamientos agudos o crónicos, el primero se presenta cuando existe una ingestión, inyección, inhalación o absorción excesiva mayor de 15 mg/kg a través de la piel, mucosas o intestino (Figura 3) y el segundo se ocasiona por la administración repetida de pequeñas dosis (menor de 150 ppb) en ambos casos, los síntomas son semejantes y van desde cefaleas, enrojecimiento de la piel, vómito, vértigo y colapso, hasta hipotensión arterial grave, convulsiones, parálisis respiratoria y coma (Dresbach y Robertson, 1998).



**Figura 3.** Formación de nitrosaminas (Esteva, 2007).

Las nitrosaminas tienen un pH ácido, se ha observado que a un pH entre 2 y 3 la relación de aminas y nitritos es de 1:10 (Navarro, 2003). Además de formarse a partir de aminas o nitrito de sodio, las nitrosaminas también puede reaccionar con amidas, ureas y carbamatos (Masuda, 2000). Por otra parte, las nitrosaminas preformadas en las carnes curadas a partir de residuos de plaguicidas nitrogenados,

que en combinación con el nitrito de sodio (adicionado deliberadamente a la carne) o presente en los alimentos de manera natural (vegetales o saliva humana) (Tabla 2), pueden constituir una fuente interna de compuestos carcinogénicos y mutagénicos (Seiller, 1977).

**Tabla 2.** Alimentos con alto contenido en nitritos y nitratos de sodio

VEGETALES	NITRATO	NITRITO	CARNICOS	NITRATO	NITRITO
	ppm	ppm		ppm	ppm
Alcachofa	12	0.4	Tocino de falda	134	12
Espárrago	44	0.6	Tocino de espalda	160	8
Fríjol verde	340	0.6	Tocino ahumado	52	7
Fríjol lima	54	1.1	Cecina de res	141	19
Remolacha	2400	4	Cecina cruda	852	9
Brócoli	740	1	Cecina falda de res	90	3
Vaina	6600	2.3	Cecina de res adobada	70	23
Col	520	0.5	Carne enlatada	77	24
Zanahoria	200	0.8	Jamón	105	17
Coliflor	480	1.1	Jamón ahumado	138	50
Apio	2300	0.5	Jamón curado	767	35
Maíz	45	2	Peperonni	149	23
Rábano	1900	NR	Chorizo	135	7
Espinaca	1800	2.5	Chorizo Veneciano	77	15
Tomate	58	NR	Chorizo German	71	17

NR=no reportado

Fuente: Kotsonis *et al.*, 1992

### 2.2.1 Nitrosación

El organismo humano generalmente puede quedar expuesto a nitrosaminas por dos vías y de esta manera puede incrementar la posibilidad de generar un potencial carcinogénico (Schmidt-Hebbel, 1986):



- a) La primera vía, es la denominada exógena y se presenta a través del medio ambiente que rodea al organismo. Es decir, en la atmósfera existen aminas libres que pueden reaccionar con óxidos de nitrógeno, generando condiciones ácidas. También, se han observado altas concentraciones de nitrosaminas (hasta 50 ppb de dimetilnitrosamina) en el humo de tabaco y en diferentes bebidas o alimentos como por ejemplo; cereales, carnes rojas y blancas, pescado y quesos.
- b) La segunda vía es la llamada endógena o *in vivo*, la cual es más significativa y común. Consiste en la posible formación de nitrosaminas en el tracto gastrointestinal del hombre, al reaccionar precursores no cancerígenos como son los compuestos amino (aminas de aminoácidos, proteínas y amidas) con los nitritos, gases nitrosos o nitratos.

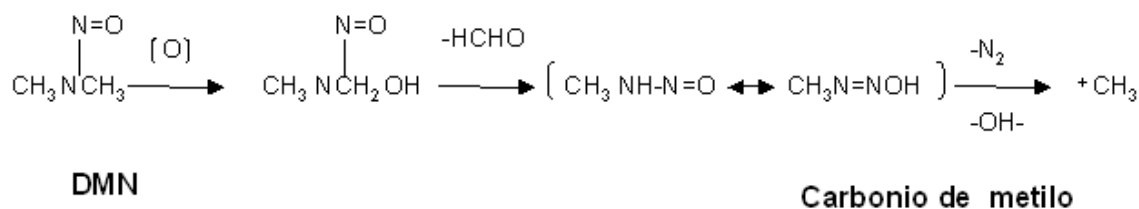
### **2.2.2 Toxicidad**

En comparación con los otros dos tipos de cancerígenos más potentes las aflatoxinas y los hidrocarburos policíclicos aromáticos, las nitrosaminas han demostrado ser carcinogénicas en el 80% de los ensayos realizados en animales. Hasta el momento, no se conoce algún mamífero, pez o ave que haya mostrado resistencia a la acción toxica de las nitrosaminas (Miller *et al.*, 1993; Teel, 1991). A diferencia de los cancerígenos químicos ya mencionados las nitrosaminas tienen un espectro muy amplio de acción y producen tumores en la mayoría de los órganos importantes con características patológicas semejantes a que se observan en el hombre (hígado, estomago, pulmón, riñón). En los roedores, las dosis para generar tumores son muy bajas, oscilan entre 1 y 5 ppm para la dietilnitrosamina y la nitrosopirrolidina, esta última usada en el forraje animal (Schmidt-Hebbel, 1986).

### **2.2.3 Mecanismos de acción de las nitrosaminas**

En general las nitrosaminas son potentes agentes alquilantes del material genético, presentan este efecto tanto en la posición del N<sup>7</sup> como en el O<sup>6</sup> de la guanina, siendo el más frecuente el primero (Figura 3). La habilidad de la célula para

reparar este error antes de la división celular es un factor crítico para evitar el desarrollo de tumores (Timbrell, 1991). El metabolito activo de la dimetilnitrosamina es producido por oxidación generando ion carbonio el cual es el principal agente alquilante que afecta al material genético (Figura 4) (Crosby, 1998).



**Figura 4.** Producción de ion carbonio a partir de dimetilnitrosamina.

En virtud de que las nitrosaminas son altamente tóxicas para el organismo y que suelen formarse a partir del  $\text{NaNO}_2$  durante la ingestión diaria de alimentos tratados con este compuesto, la probabilidad de desarrollar alguna neoplasia se incrementa considerablemente, por lo que es relevante buscar sustancias que puedan minimizar dicha toxicidad y de esta manera prevenir o disminuir la incidencia de mutaciones y por consiguiente del cáncer.

### 2.3 Carcinogénesis y mutagénesis

El cáncer constituye uno de los problemas biomédicos más frecuentes y graves, las estadísticas muestran que alguna forma de ésta enfermedad, afecta a más de una tercera parte de la población, provoca más del 20% de todas las muertes y, en países desarrollados, genera más del 10% del costo total de la atención médica. El cáncer no es una sola enfermedad sino un nombre aplicado a una gran variedad de tumores que se forman por el mismo proceso básico de crecimiento descontrolado. La proliferación celular genera una masa (*neoplasia*) que invade tejidos vecinos y puede producir también metástasis en lugares más distantes (Pacheco, 2006; Shahrin *et al.*, 2006)

La mayoría de los estudios concluyen que el cáncer tiene relación con alteraciones del material genético y que existe una correlación de un 90% entre carcinogénesis y mutagénesis (Marques *et al.*, 2002) Aunque es conveniente particularizar que la etiología del cáncer es multifactorial, una de las principales causas es la mutación génica y cromosómica. Las mutaciones que provocan cáncer afectan a los genes responsables de la proliferación celular, del desarrollo celular y las que controlan otras actividades celulares fundamentales. Las anomalías pueden presentarse en dos tipos de genes, los protooncogenes, que al mutar y activarse originan la oncogénesis y con ello propician la transformación maligna y los genes supresores que, bloquean el desarrollo del tumor regulando los genes que participan en el crecimiento celular (Deshpande, 2002).

Debido a esto, es justificable y necesario el creciente interés por desarrollar sistemas de prueba que detecten a todos aquellos agentes potencialmente tóxicos para el material genético así como, aquellas sustancias que protejan al DNA de dicha toxicidad. En general, las evaluaciones se realizan en bacterias, en células somáticas y/o gaméticas (Preston y Hoffmann, 2001), y se pueden realizar tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* (Tabla 3). A continuación se mencionan las características generales de algunas técnicas, incluyéndolo la que se utilizó en el presente trabajo

### **2.3.1 Pruebas de mutagénesis en bacterias *in vitro***

Esta se basa en la detección de bacterias que han sido afectadas por el mutágeno en un gen determinado, quedando la bacteria imposibilitada para sintetizar un compuesto vital para su existencia por lo que esta queda incapacitada para crecer en un medio carente de él, dentro de estas la más usada es conocida como la prueba de Ames. Este tipo de ensayos presentan ciertas restricciones; ya que todos los experimentos deben repetirse al menos dos veces, las sustancias de ensayo deben tener cierto grado de solubilidad, no pueden ser ni bacteriostáticas ni citotóxicas, se necesita en muchos casos la adición de fracciones microsomales para

detectar los mutágenos que necesitan activación enzimática, además se necesita manejar un gran número de muestras para obtener significancia en los resultados (Madrigal-Santillán, 2000).

**Tabla 3.** Sistemas de pruebas más utilizados para identificar la acción de agentes mutagénicos y carcinogénicos

Tipo de células		
Células somáticas <i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Células gaméticas
<b><u>I. MUTACIONES GÉNICAS</u></b>		
Bacterias	Prueba de la mancha (spot test)	Recesiva letales
Levaduras y hongos		Prueba de locus específico
Células en cultivo		Anomalías espermáticas
<b><u>II. CAMBIOS CROMOSÓMICOS</u></b>		
Cultivo de fibroblastos	Micronúcleos (MN)	Dominantes letales
Cultivo de linfocitos		Pérdida del cromosoma X Citogenética del espermatozoide
<b><u>III. INDICADORES DE DAÑO BIOLÓGICO</u></b>		
Síntesis de ADN no programada en células	Síntesis de ADN no programada en tejidos	Síntesis de ADN no programada
Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs)	ICHs	ICHs
Micronúcleos (MN)	MN	MN

Fuente: Preston y Hoffmann 2001.

### **2.3.2 Pruebas de cultivo celular**

Se fundamenta en los cultivos celulares estimulan la división celular adicionado a estos un agente mitógeno, posteriormente, las células se detienen en las metafases de la mitosis, al adicionar un agente que impida la migración de los cromosomas y así poder evaluar en ellos las aberraciones que se puedan presentar, tiene como principal desventaja el hecho de que el metabolismo de bacterias es totalmente diferente al de cualquier mamífero, es por ello que se han desarrollado pruebas para la evaluación del efecto mutagénico de las sustancias en células humanas y de diversos animales (Madrigal-Santillán, 2000).

### **2.3.3 Pruebas de mutagénesis *in vivo***

Se evalúa el efecto de una sustancia en un sistema completo y expuesto a las condiciones metabólicas normales. Entre este grupo de experimentos se encuentra la dominante letales, esta prueba esta diseñada para demostrar los efectos tóxicos en células germinales del animal macho intacto, por lo general ratón o rata. Los efectos se pueden manifestar en hembras apareadas como implantaciones muertas y/o pérdidas de preimplantación Estos efectos se deben en general a daños cromosómicos, que conducen a errores de desarrollo que son mortales para el cigoto.

La prueba de manchas o "Spot", esta prueba esta diseñada para detectar mutación genética en células somáticas, es un medio de preselección útil para detectar mutaciones germinales hereditarias en mamíferos y la prueba de micronúcleos que se explica mas adelante, (Lu, 1992).

### **2.3.4 Modelo experimental de micronúcleos**

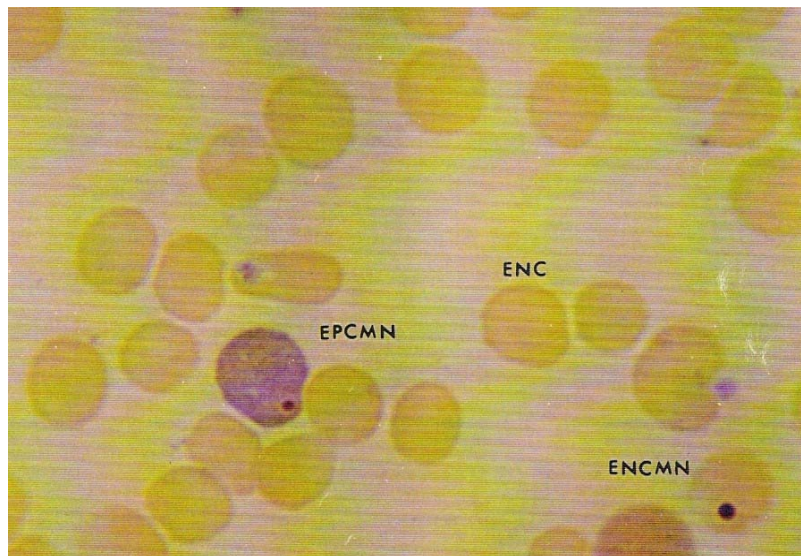
Los micronúcleos son fragmentos citoplasmáticos de cromatina, separados del núcleo principal y se forman a partir de la ruptura de fragmentos acéntricos o bien por

rezago anafásico, lo cual se traduce en la aparición de un pequeño núcleo en células anucleadas como los eritrocitos, o bien en el citoplasma de células nucleadas como los linfocitos o espermatogonias (Figura 5).

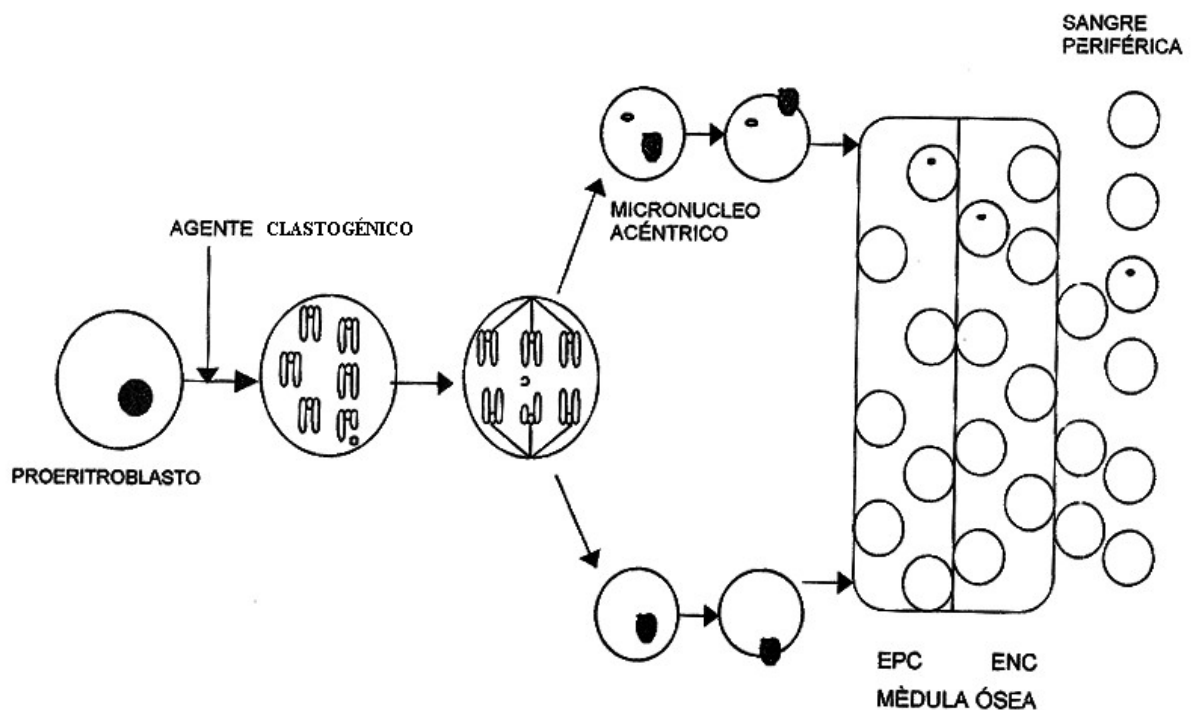
El daño ocurrido en algún estadio del ciclo celular puede ser observable como micronúcleos con solo un ciclo celular transcurrido y un tiempo de fijación simple. Durante la investigación esto es necesario para asegurar que la división celular no ha sido bloqueada, el tiempo permite que la forma mutagénica activa alcance la población de células blanco previa división próxima al conteo (Madrigal-Santillán, 2000).

### **2.3.5 Prueba de micronúcleos en ratón**

En este modelo se sugiere que los eritrocitos constituye la manera mas eficaz de evaluar en ellos la afección de la actividad medular, así como la capacidad clastrogénica de los compuestos en corto tiempo (Chandra y Aruna,1998). La razón de que en un estudio agudo se “monitorea” por la presencia de micronúcleos en EPC, estas son células jóvenes (reticulocitos) recientemente libera la circulación (Figura 5), presentan una coloración mezclada de basófila y eosinófila, por lo que presentan un tinte azulado violáceo, su tamaño es un poco mayor al de los eritrocitos normocrómicos (ENC) la coloración de los EPC se debe a la presencia de ácido ribonucleico, ya que en el momento de su diapédesis hacia la circulación falta aproximadamente 20% del contenido final de Hb por lo que aun conserva parte del aparato ribosómico para terminar la síntesis y constituir de esta manera una célula madura. Proceden de normoblastos que pierden su núcleo antes de que la hemoglobinización del protoplasma sea completa, generalmente un aumento en su número con respecto a los valores normales indica una eritropoyesis aumentada. De tal forma que además de identificar el potencial genotóxico de cierto xenobiótico con la prueba de micronúcleos, realizando el conteo de la relación que existe entre los EPC y ENC, es posible sugerir la citotoxicidad del xenobiótico (Figura 6).



**Figura 5.** Eritrocito Policromático (EPC), Eritrocito Policromático Micronucleado (EPCMN), Eritrocito normocrómico (ENC) y Eritrocitos normocrómicos Micronucleados (ENCMN) (Madrigal-Santillan, 2002).



**Figura 6.** Formación de eritrocitos micronucleados en sangre por un agente xenobiótico (Madrigal –Santillan, 2002).

## 2.4 Quimioprevención de la capsaicina

El término quimioprevención expresa el intento deliberado de frenar o revertir el progreso de las células premalignas hacia la malignidad. Algunas de las sustancias hasta ahora investigadas corresponden a compuestos farmacológicos sintéticos y otras a sustancias comunes; como las vitaminas, iones metálicos, fenoles, tocoferoles, tioles y proteínas (Moon y Mentha, 1989; Kelloff *et al.*, 1999). El concepto “antimutágeno” se usa para describir a aquellos agentes que tienen la capacidad de reducir la frecuencia de mutaciones espontáneas o inducidas, y por consiguiente, disminuir la incidencia de cáncer en el humano (Waters *et al.*, 1996).

En el caso particular de la capsaicina, existen algunos estudios que evidencian su capacidad quimiopreventiva (Surh, *et al.*, 1996) quienes demostraron usando queratinocitos humanos y de ratón que la capsaicina inhibe la formación de la enzima arilhidrocarbonado hidrolasa responsable en el metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos, como el benzo[ $\alpha$ ]pireno (Surh *et al.*, 1995). También, se han obtenido efectos protectores de la capsaicina contra algunos carcinógenos como son la aflatoxina B<sub>1</sub>, y nitrosaminas presentes en tabaco como la 4-(metilnitrosamino)-1-(3piridil)-1-butanona, aunque estos estudios se valoraron *in vitro* (Miller *et al.*, 1993; Teel, 1991). En 1990 se demostró que la dihidrocapsaicina (análogo saturado de la capsaicina) es un inhibidor del CYP2E1, este último compuesto es una isoforma que tiene un importante papel en la activación metabólica en carcinógenos químicos de pequeño tamaño molecular. Por analogía la CAP también inhibe la actividad hepática *in vitro* del CYP2E1 (Surh y Lee, 1995).

Se conoce que el pretratamiento de capsaicina tópica en ratones atenúa la carcinogénesis en piel producida por el carbamato de vinilo (Surh y Lee, 1996) y que además reduce significativamente la mutagenicidad bacteriana del carbamato de vinilo y de la N-nitrosodimetilamina (Surh, 1998).



Por otro lado, existen datos que indican que la CAP mejora los cambios peroxidativos en los tejidos hepáticos y pulmonares de rata inducidos por cloroformo, tetracloruro de carbono y diclorometano. Un estudio donde se administró la capsaicina, se observó que disminuye la formación de radicales libres en pulmón de rata expuesta a irritantes como el dióxido de sulfuro y dióxido de nitrógeno. También se observó atenuación en la lipoperoxidación de membranas inducida por radiación ultravioleta (Surh, 1999). Sin embargo, existe la controversia si la capsaicina es una sustancia carcinogénica, co-carcinogénica o anticarcinogénica ya que se le atribuyen efectos genotóxicos, citotóxicos y quimiopreventivos (Surh, 2002).

### 3. Problema de Investigación

Se sabe que en México es alto el porcentaje de individuos que consumen alimentos tratados y conservados con nitritos. Dentro de los alimentos más comunes que se ingieren están los embutidos, las carnes crudas y fritas, y algunos vegetales de hoja verde oscura (brócoli, acelgas, espinacas), el maíz y el rábano (Kotsonis *et al.*, 1992.) lo que incrementa la posibilidad de producirse alguna neoplasia en el organismo como resultado del efecto tóxico de dichos conservadores. Por otra parte en algunos países del mundo y principalmente en el nuestro, se consumen grandes cantidades de chile o fruto Capsicum (Navarro, 2003). Ya sea en forma de salsa o como condimento y aditivo en algunas comidas; las cuales, pueden variar en cada región dependiendo de sus tradiciones y costumbres.

El chile contiene en abundancia una sustancia llamada capsaicina; la cual ha mostrado en algunos estudios ser tóxica a elevadas concentraciones (Surh y Lee, 1995) pero en otros, los resultados han sugerido que a bajas dosis puede ser benéfica para la salud y suprimir algunos efectos no deseados (Surh, 1999).

Por otro lado, debido a que los nitritos de sodio pueden formar nitrosaminas y nitrosamidas, ambos compuestos ejercer un efecto genotóxico en el organismo (Masuda, 2000), es importante evaluar la capacidad de algunas sustancias para disminuir dicha toxicidad, en especial, aquellas que se encuentren en la dieta. En este sentido, existen distintos antecedentes que consideran a la capsaicina como candidato idóneo para ser un agente antígenotóxico, por lo que es importante evaluar la capacidad de la capsaicina para reducir el daño al material genético ejercido por el nitrito de sodio mediante la técnica de micronúcleos *in vivo*, la cual tiene la ventaja de ser sencilla y económica, a diferencia de los ensayos *in vitro*. Además, los resultados se pueden correlacionar con el efecto que se presentaría en el organismo humano y de esta manera abriría la posibilidad de realizar otros estudios que orientarían a la población mexicana en su plan de alimentación, mejorando su salud y previniendo algunas mutaciones.

#### 4. Justificación

El aporte de la toxicología alimentaria es de gran importancia, ya que como se mencionó anteriormente en México se consume con gran frecuencia el fruto del chile, y al realizar el ensayo de micronúcleos como indicador de daño genotóxico contribuye a establecer si la CAP es una sustancia quimiopreventiva; este último término expresa el intento deliberado de frenar o revertir los daños ocasionados al material genético. Algunas de las sustancias, hasta ahora investigadas, se encuentran como nutrientes comunes y compuestos farmacológicos (Béliveau y Gingras, 2007). En este trabajo se estudió la potencialidad antígenotóxica de la capsaicina, considerando que el uso de agentes antígenotóxicos ha abierto una excelente alternativa para prevenir algunas enfermedades en el ser humano, como el cáncer (Béliveau y Gingras, 2007); en el caso específico de la capsaicina, existen antecedentes que han mostrado que presenta dicha capacidad protectora (Surh, 2002), por lo que se le podría considerar un método alternativo para reducir la genotoxicidad inducida por los conservadores como es el caso del  $\text{NaNO}_2$ , éste es un conservador ampliamente usado en los alimentos mexicanos que tiene la capacidad de alterar el material genético (Luca *et al.*, 1987; Díaz-Barriga *et al.*, 2002). En virtud de que la población mexicana consume grandes cantidades de chile (López-Carrillo *et al.*, 1995), los resultados de nuestro estudio permitirán aportar información para el adecuado consumo de estos conservadores.

## 5. Objetivo General

Determinar el efecto antigenotóxico y anticitotóxico de la capsaicina contra el daño producido en el material genético por el  $\text{NaNO}_2$  en ratón CD-1 por medio de la técnica de micronúcleos.

### 5.1 Objetivos Específicos

- 1.- Determinar la frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por el tratamiento con  $\text{NaNO}_2$ .
- 2.- Evaluar si la capsaicina disminuye el número de micronúcleos en eritrocitos normocrómicos en ratones tratados con  $\text{NaNO}_2$ .
- 3.- Evaluar el cambio de la actividad de medula ósea ocasionado por el  $\text{NaNO}_2$  mediante la variación en la relación de eritrocitos policromáticos con respecto a los eritrocitos normocrómicos y determinar si la capsaicina es capaz de reducir dicho efecto.

## 6. Hipótesis

La capsaicina ha demostrado en estudios *in vitro* tener capacidad quimiopreventiva contra algunos carcinógenos, probablemente también reducirá la toxicidad del  $\text{NaNO}_2$  al disminuir la frecuencia de micronúcleos.

## 7. Metodología

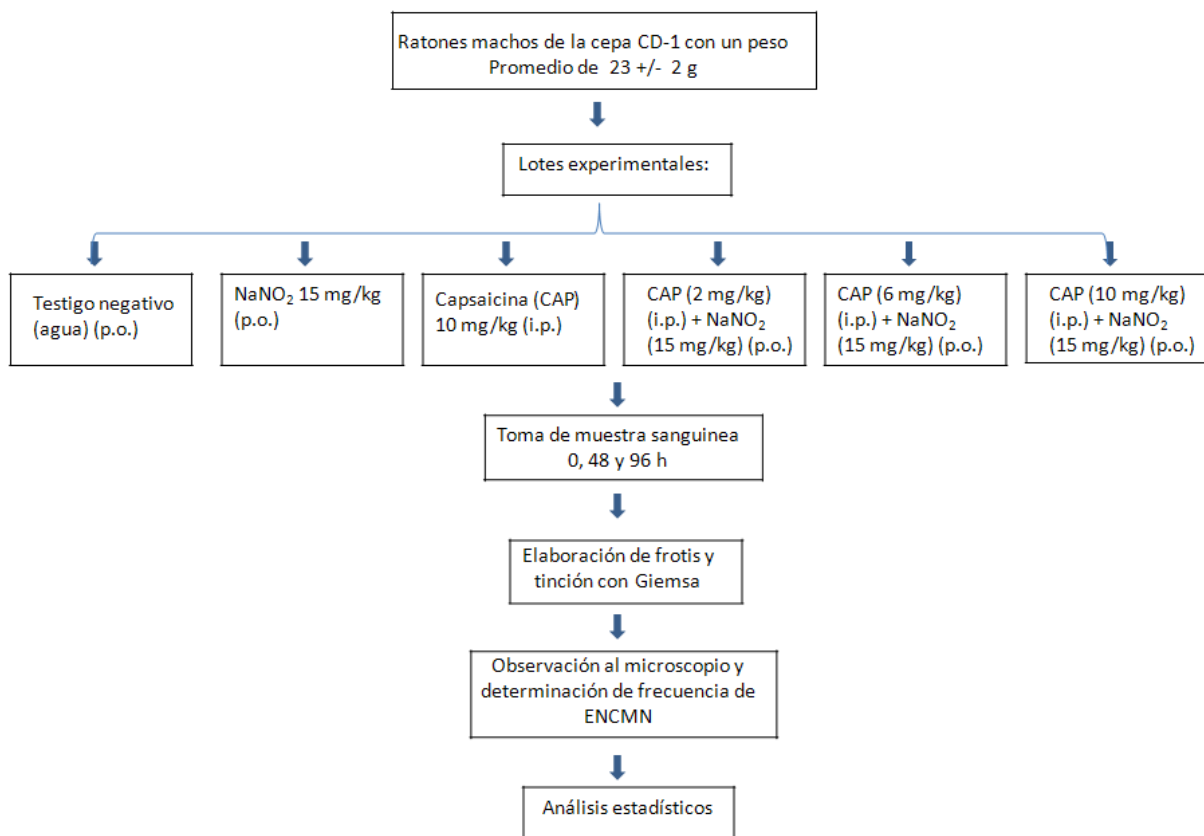
Material biológico, reactivos y equipos:

Se usaron ratones machos CD1 con un peso aproximado de  $23 \pm 2$  g.

Los reactivos utilizados fueron capsaicina,  $\text{NaNO}_2$ , dimetilsulfoxido y colorante Giemsa todos de Sigma-Aldrich (EUA).

Se utilizó una balanza analítica y granataría de triple brazo ambas (OHAUS, EUA) y un microscopio binocular (Carl-Zeiss, Mod. KF2, Alemania).

### 7.1 Esquema general de la metodología



## **7.2 Tipo de estudio**

Estudio fue de tipo experimental, prospectivo y longitudinal

## **7.3 Criterios de inclusión**

Ratones machos de la cepa CD-1 con un peso aproximado de  $23 \pm 2$  g.

## **7.4 Criterios de exclusión**

Se eliminaron todos los animales enfermos y que durante el periodo de adaptación bajaron de peso.

## **7.5 Criterios de eliminación**

Ratones que se enfermaron o murieron durante el periodo experimental.

## **7.6 Adquisición de animales y población de estudio**

Se usaron 60 ratones machos (cepa CD-1) de cinco semanas de edad con un peso aproximado de  $23 \pm 2$  g, procedentes del Bioterio de la Escuela Superior de Medicina, IPN.

Los animales fueron trasladados al Laboratorio de Farmacología (ICSa-UAEH) e instalados en jaulas de acero inoxidable con bebedero y cama de aserrín. No se utilizaron ratones hembras debido a los cambios hormonales que pudieran presentar a lo largo del experimento.

## **7.7 Acondicionamiento**

Una vez instalados los animales, se dejaron sin alimento y sin agua durante tres horas aproximadamente; después se aclimataron por una semana con agua y

alimento *ad libitum*, durante este tiempo se colocaron 10 ratones por jaula, éstas fueron de acero inoxidable, el experimento se realizó bajo condiciones controladas, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. El aserrín de las jaulas se cambio diariamente para prevenir infecciones.

### **7.8 Pesado y marcaje**

Al término de la semana de aclimatación, los animales fueron marcados en la cola con plumones indelebles y posteriormente se pesaron individualmente utilizando una balanza granataría de triple brazo.

### **7.9 Formación de lotes**

Los ratones se organizaron en seis lotes experimentales con 10 animales cada uno por medio de una distribución aleatoria.

- ❖ Lote 1: Testigo Negativo (Agua) (p.o.).
- ❖ Lote 2: Testigo Positivo NaNO<sub>2</sub> 15 mg/kg (p.o.).
- ❖ Lote 3: Control de Capsaicina 10 mg/kg (i.p.).
- ❖ Lote 4: CAP 2 mg/kg (i.p.) + NaNO<sub>2</sub> 15 mg/kg (p.o.)
- ❖ Lote 5: CAP 6 mg/kg (i.p.) + NaNO<sub>2</sub> 15 mg/kg (p.o.)
- ❖ Lote 6: CAP 10 mg/kg (i.p.) + NaNO<sub>2</sub> 15 mg/kg (p.o.)

### **7.10 Tratamiento**

El NaNO<sub>2</sub> se administró diariamente por vía oral, para esto se sujeto al animal de la cola y el dorso con la mano izquierda y con la derecha se introdujo una cánula que depositaba en el estómago la dosis, teniendo cuidado de no introducir a vías aéreas (Figura 7).



**Figura 7.** Administración por vía oral.

La capsaicina se administró igualmente a dosis diarias por vía intraperitoneal (i.p.), para esto se sujeto al animal de la cola y el dorso con la mano izquierda y con la derecha se introdujo la jeringa en la zona del peritoneo con las dosis establecidas para cada lote, cuidando de no puncionar vísceras y lastimar al roedor (Figura 8).



**Figura 8.** Administración por vía intraperitoneal.

En el caso de los lotes combinados, se administró primero la capsaicina y después de cinco minutos se aplicó la dosis de  $\text{NaNO}_2$ .



### 7.11 Toma de muestra

Se inmovilizaron a los animales procurando que la cola pudiera ser manipulada para tomarles muestras sanguíneas de manera individual en tres diferentes tiempos (0, 48 y 96 h), la obtención de la muestra sanguínea se realizó, haciendo una limpieza aséptica con etanol al 70 % y cortando aproximadamente 3 mm de la punta de la cola con tijeras de disección previamente desinfectadas. Se tomaron las muestras por duplicado (Figura 9).



**Figura 9.** Toma de muestra sanguínea.

### 7.12 Frotis sanguíneo

La primera gota de sangre se eliminó ya que puede contener diversos contaminantes, la segunda gota fue depositada en una laminilla de vidrio y con otra laminilla se procedió a realizar un frotis, se dejó secar al aire y se fijó con metanol absoluto por cuatro minutos. Las laminillas se marcaron con una pluma punta de diamante.

### 7.13 Tinción de Giemsa

Se colocaron los frotis en un vaso de Coplin con colorante Giemsa el cual se preparó con amortiguador de fosfatos 0.3 M a un pH de 6.8 (5.0 mL), 2.0 mL de

colorante Giemsa y 43 mL de agua destilada (Anexo 2). Las laminillas quedaron totalmente cubiertas durante 17 a 19 minutos, al terminar se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente (Brown, 1993)

#### **7.14 Conteo de eritrocitos**

Los frotis teñidos se observaron al microscopio óptico con el objetivo de 100X, se contaron 1000 eritrocitos totales, anotando cuantos eran eritrocitos policromáticos (EPC) y cuantos eran eritrocitos normocrómicos, al mismo tiempo, se cuantificaron los eritrocitos normocrómicos que presentaran micronúcleos.

#### **7.15 Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como la media de cada grupo. Las diferencias entre los lotes y tiempos, fueron evaluados por un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ , teniendo como variables independientes al tiempo y al tratamiento. El análisis estadístico fue realizado con el programa Sigma Stat 2.03 con la prueba de Tukey-Kramer.

El análisis se dividió de la siguiente manera:

- El análisis se aplicó para encontrar la diferencia significativa con respecto a la frecuencia de ENCMN y relación de EPC/ENC., para cada tiempo (0, 48 y 96 horas) en los diferentes lotes
- También se aplicó a cada lote a diferentes tiempos (0, 48 y 96 horas) con respecto a la frecuencia de ENCMN y relación de EPC/ENC.

## 8. Resultados

Se determinó la frecuencia de ENCMN y la relación de EPC con respecto a los ENC (Figura 10 y 11), con la finalidad de evaluar el daño genotóxico y citotóxico, respectivamente.

Los lotes experimentales ( $\text{NaNO}_2$ , capsaicina y los combinados) se analizaron y compararon de acuerdo a las dosis empleadas en cada uno de ellos y al tiempo de exposición.

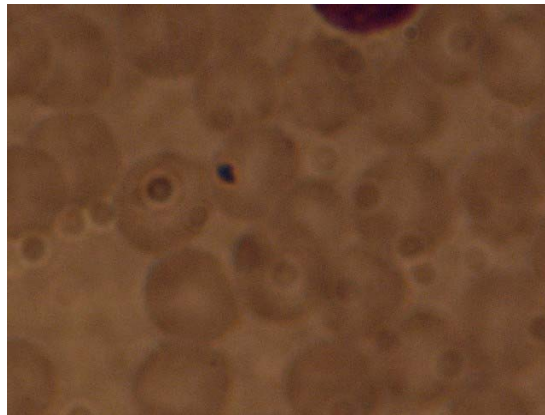


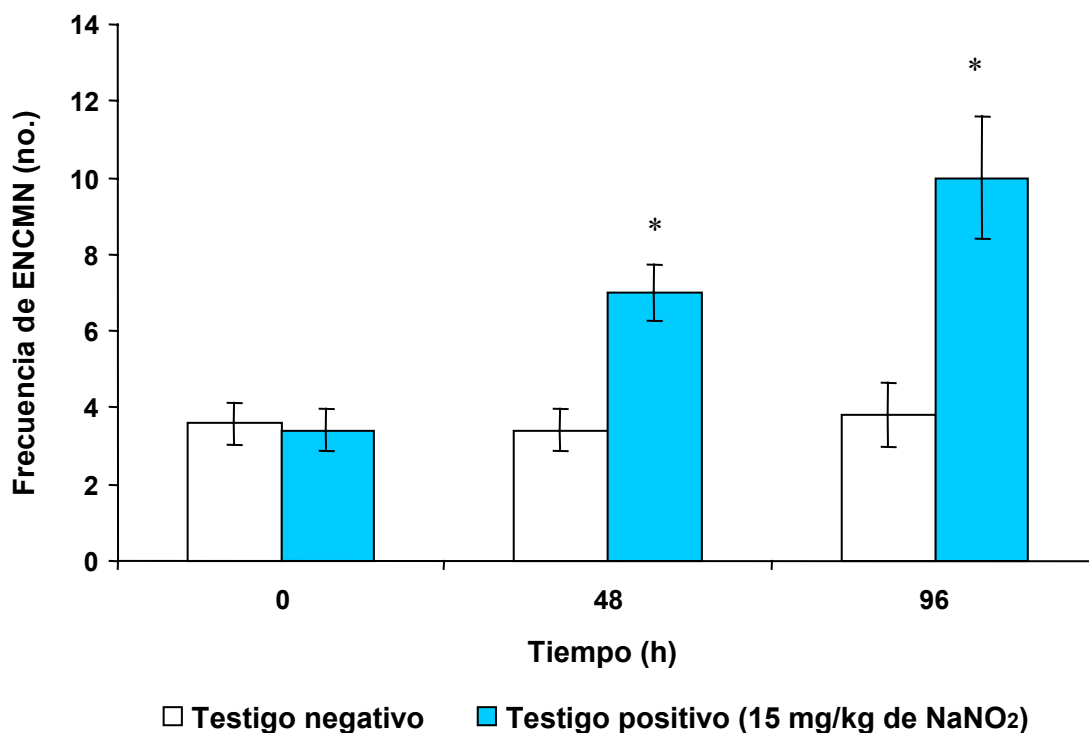
Figura 10. Eritrocito normocrómico micronucleado



Figura 11. Eritrocitos policromáticos y normocrómicos

### 8.1 Comparación del Testigo negativo contra Testigo positivo

Como se muestra en la figura 12 se observa que el testigo negativo se comportó de manera similar a lo largo de todo el experimento (0, 48 y 96 horas), por el contrario el testigo positivo ( $\text{NaNO}_2$ ) presenta un incremento en la frecuencia de ENCMN a partir de las 48 horas, obteniéndose el mayor daño a las 96 horas, lo cual indica que en estos tiempos existieron alteraciones y que fueron estadísticamente significativas en comparación al lote negativo ( $P < 0.05$ ).

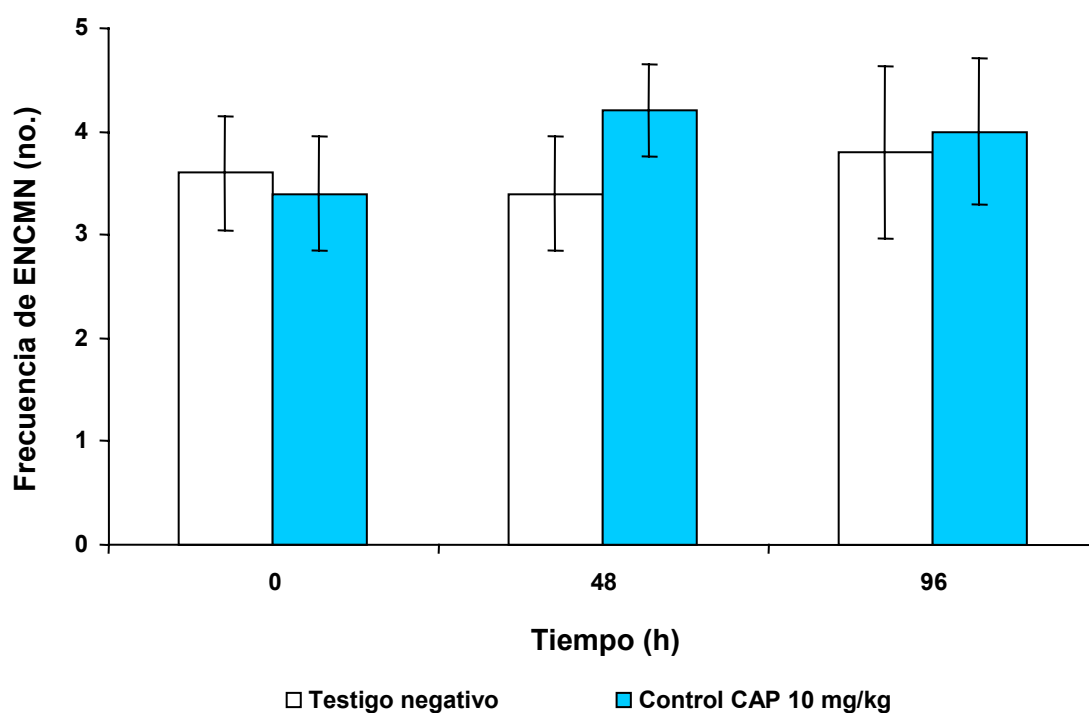


**Figura 12.** Comparación de la frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos en el testigo negativo y por la administración de  $\text{NaNO}_2$  (15 mg/kg).

\* Diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

## 8.2 Comparación del Testigo negativo contra el Control de Capsaicina

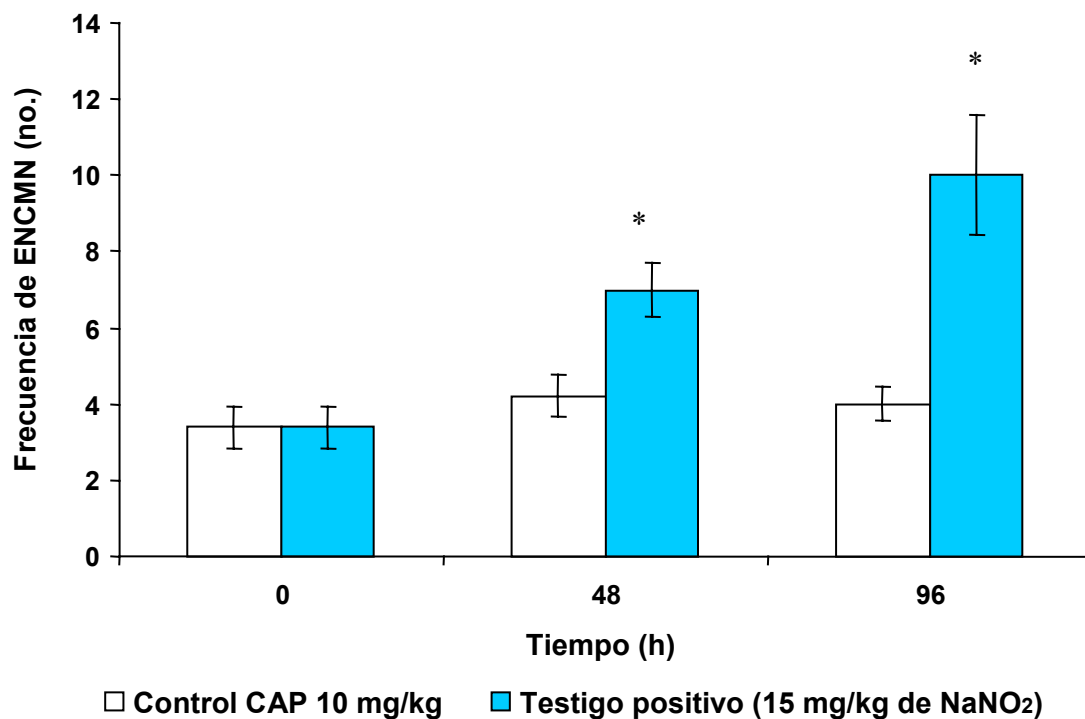
En la figura 13 se presentan los resultados de la comparación entre el testigo negativo y el lote control de capsaicina con la dosis más alta (10 mg/Kg). Durante el experimento los dos lotes se comportaron de manera semejante, se observa que a las 48 y 96 h la frecuencia de ENCM es ligeramente mayor en el tratamiento de capsaicina.



**Figura 13.** Comparación de la frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos en el testigo negativo y por la administración de CAP a una dosis de 10 mg/kg.

### 8.3 Comparación del Testigo positivo contra el lote de Control Capsaicina 10 mg/kg

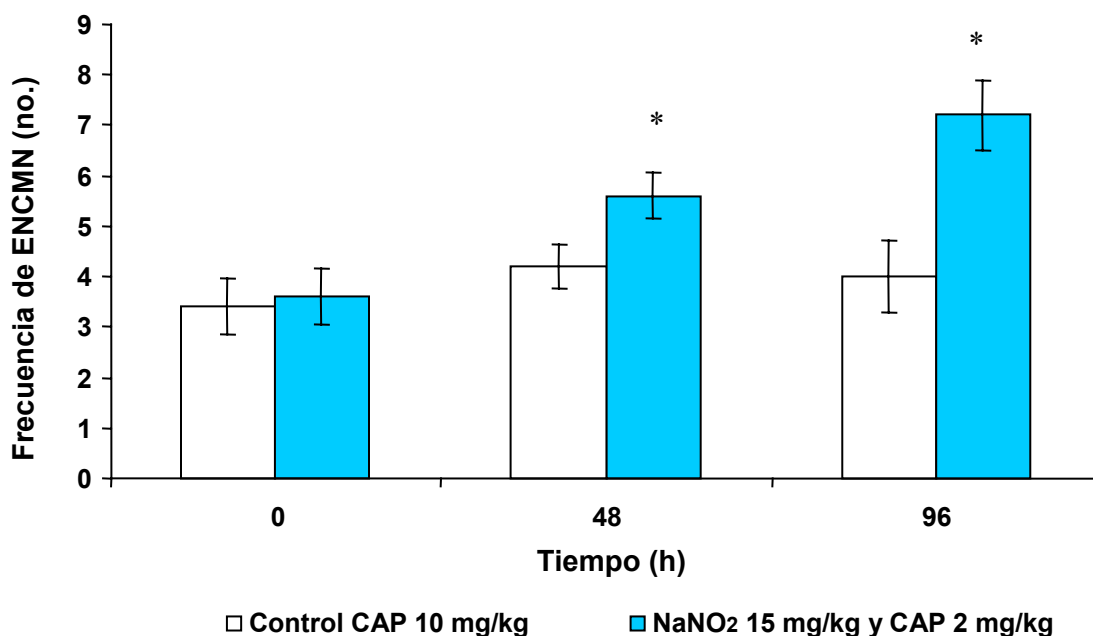
En la figura 14 se observa el efecto de la capsaicina en comparación con el testigo positivo ( $\text{NaNO}_2$ ) en los tres tiempos de evaluación (0, 48 y 96 horas). Se observa que el lote de control de CAP no presentó incremento significativo en el número de ENCMN, a diferencia de los animales del testigo positivo que mostró un incremento en la frecuencia de ENCMN desde las 48 h, observándose el mayor daño genotóxico a las 96 h.



**Figura 14.** Comparación de la frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de CAP y  $\text{NaNO}_2$ . \* Diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

#### 8.4 Comparación del lote combinado de NaNO<sub>2</sub> (15 mg/kg) y CAP (2 mg/kg) contra el lote Control de CAP (10 mg/kg).

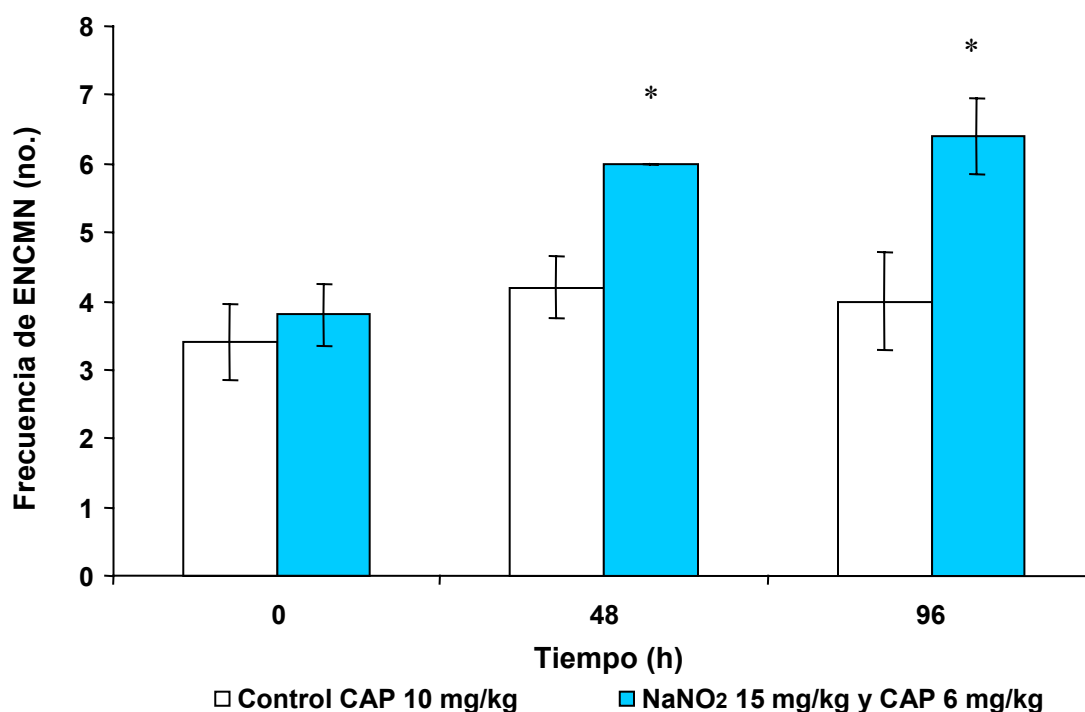
La figura 15 representa la frecuencia de ENCMN a diferentes tiempos, del lote control de CAP de 10 mg/kg comparado con el lote combinado de 15 mg/kg de NaNO<sub>2</sub> y 2 mg/kg de CAP; existe un incremento entre las 48 y 96 horas entre el control de CAP y el lote combinado a los horarios de las muestras sanguíneas. Además existe diferencia entre los tres tiempos en el lote combinado.



**Figura 15.** Comparación de la frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de CAP y NaNO<sub>2</sub> con CAP en la dosis menor. \*Diferencia significativa (P<0.05).

### 8.5 Comparación del lote combinado de NaNO<sub>2</sub> (15 mg/kg) y CAP (6 mg/kg) contra el lote Control de CAP (10 mg/kg).

El lote combinado de 16 mg/kg de NaNO<sub>2</sub> mas 6 mg/kg de capsaicina, se observa que existe un incremento de ENCMN del tiempo 0 contra 48 y 96 horas. Sin embargo no hubo incremento de ENCMN en el lote de control de CAP entre los diferentes 0, 48 y 96 horas, como se muestra en la figura 15.

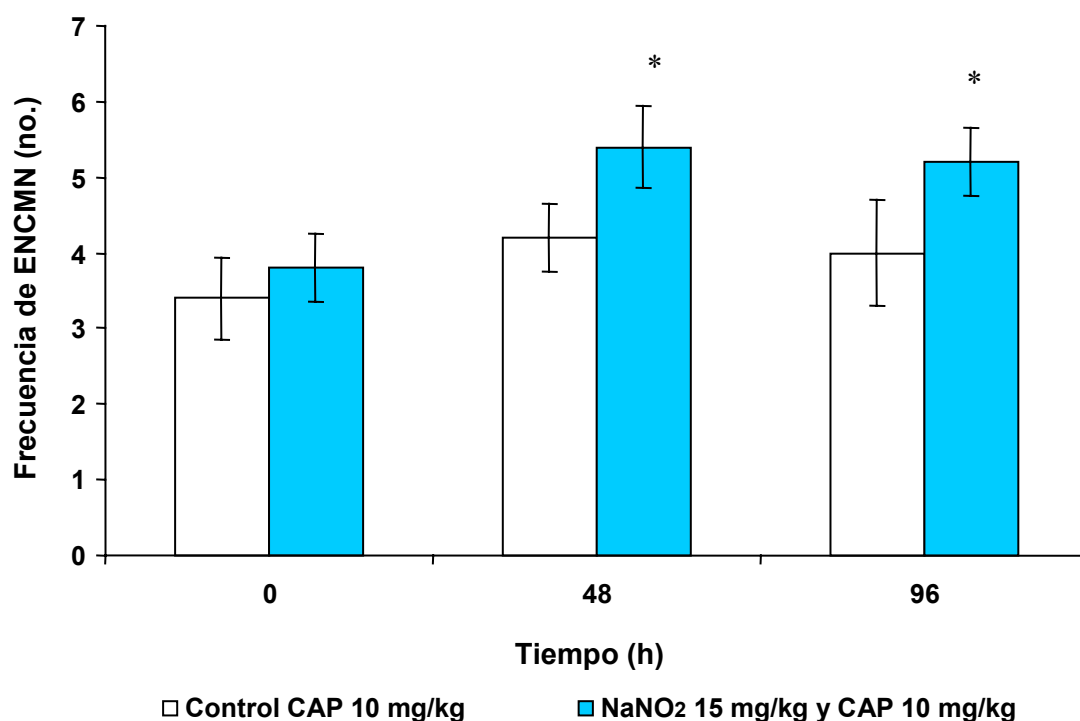


**Figura 16.** Comparación de la frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de CAP y NaNO<sub>2</sub> con CAP a dosis media. \* Diferencia significativa(P<0.05).



### 8.6 Comparación del lote combinado de NaNO<sub>2</sub> (15 mg/kg) y CAP (10 mg/kg) contra el lote Control de CAP (10 mg/kg).

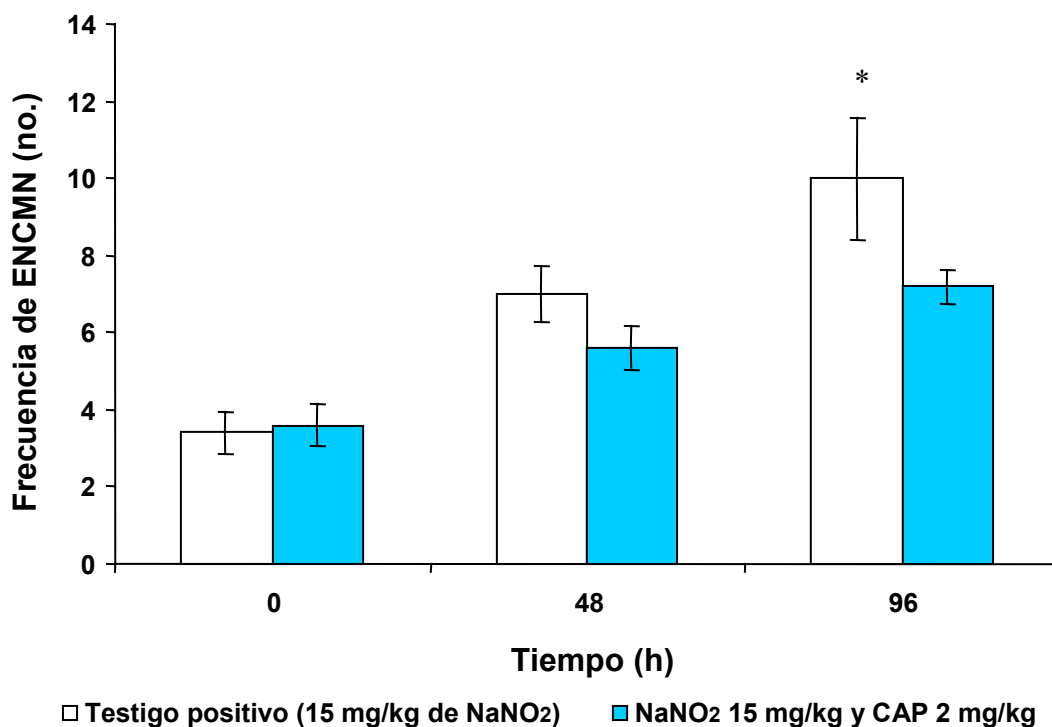
En la figura 17 el lote combinado de 15 mg/kg de NaNO<sub>2</sub> mas 10 mg/kg de capsaicina, se observa que existe un incremento de ENCMN del tiempo 0 contra 48 y 96 horas. Sin embargo no hubo incremento de ENCMN en el lote de control de CAP entre los diferentes 0, 48 y 96 horas,



**Figura 17.** Comparación de la frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de CAP y NaNO<sub>2</sub> con CAP a dosis mayor. \* Diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

### 8.7 Comparación del lote combinado de NaNO<sub>2</sub> (15 mg/kg) y CAP (2 mg/kg) contra el Testigo positivo (15 mg/kg de NaNO<sub>2</sub>).

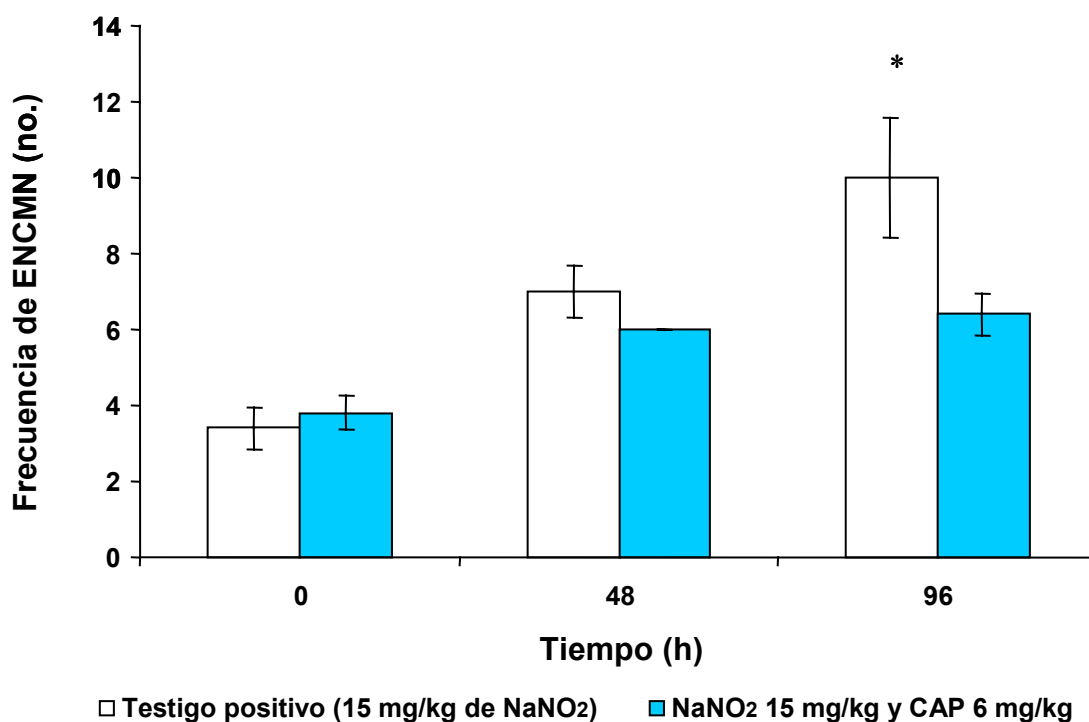
En la figura 18 el lote combinado representa una disminución de ENCMN en comparación con el testigo positivo, pero si existe un incremento de ENCMN entre ellos a la hora 0, 48 y 96. También se observa que en la hora 48 no existe incremento de micronúcleos entre el testigo positivo y el lote combinado, por el contrario en la hora 96 aumento el numero de frecuencia de ENCMN entre ambos lotes.



**Figura 18.** Comparación de la frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de NaNO<sub>2</sub> y NaNO<sub>2</sub> con CAP a menor dosis. \* Diferencia significativa (P<0.05).

### 8.8 Comparación del lote combinado de NaNO<sub>2</sub> (15 mg/kg) y CAP (6 mg/kg) contra el Testigo positivo (15 mg/kg de NaNO<sub>2</sub>).

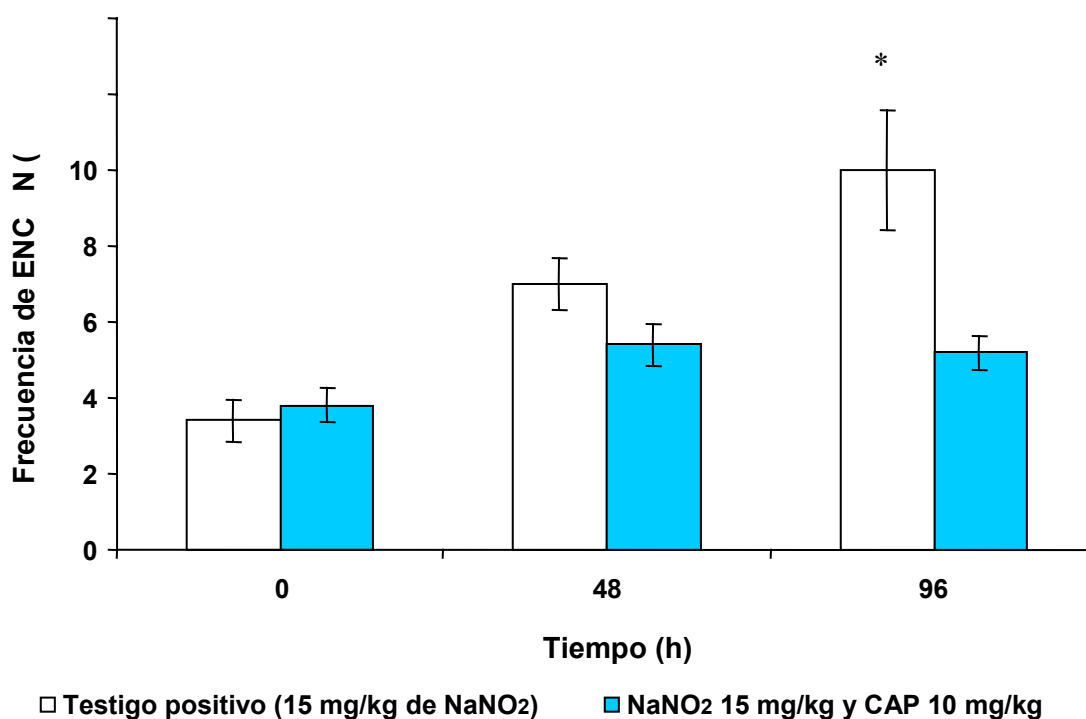
En la figura 19 se observa que existe un incremento en la de frecuencia de ENCMN en el testigo positivo (15 mg/kg de NaNO<sub>2</sub>) de las 0 horas contra la hora 48 y 96. Sin embargo no existe incremento de micronúcleos del lote combinado (15 mg/kg de NaNO<sub>2</sub> con 6 mg/kg de CAP) a las 48 y 96 horas contra testigo positivo.



**Figura 19.** Comparación de la frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de NaNO<sub>2</sub> y NaNO<sub>2</sub> con CAP a dosis media. \* Diferencia significativa (P<0.05).

### 8.9 Comparación del lote combinado de NaNO<sub>2</sub> (15 mg/kg) y CAP (10 mg/kg) contra el Testigo positivo (15 mg/kg de NaNO<sub>2</sub>).

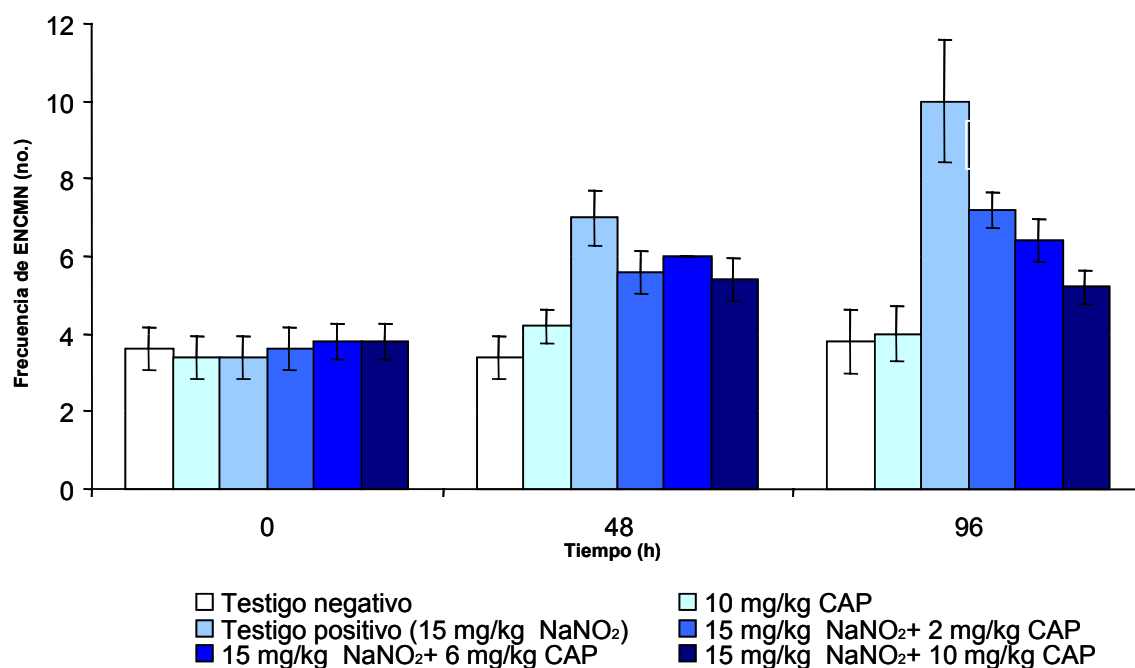
La figura 20 representa que existe un incremento en la de frecuencia de ENCMN en el testigo positivo (15 mg/kg de NaNO<sub>2</sub>) de las 0 horas contra la hora 48 y 96. Sin embargo no existe incremento de micronúcleos del lote combinado (15 mg/kg de NaNO<sub>2</sub> con 6 mg/kg de CAP) a las 48 si no por el contrario Se observa una disminución de ENCMN al tiempo 96 h con la dosis de 15 mg/kg de NaNO<sub>2</sub> con 10 mg/kg de capsaicina.



**Figura 20.** Comparación de la frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados inducidos por la administración de NaNO<sub>2</sub> y NaNO<sub>2</sub> con CAP a mayor dosis. \* Diferencia significativa (P<0.05).

### 8.10 Comparación de todos los lotes y su efecto quimiopreventivo de la CAP.

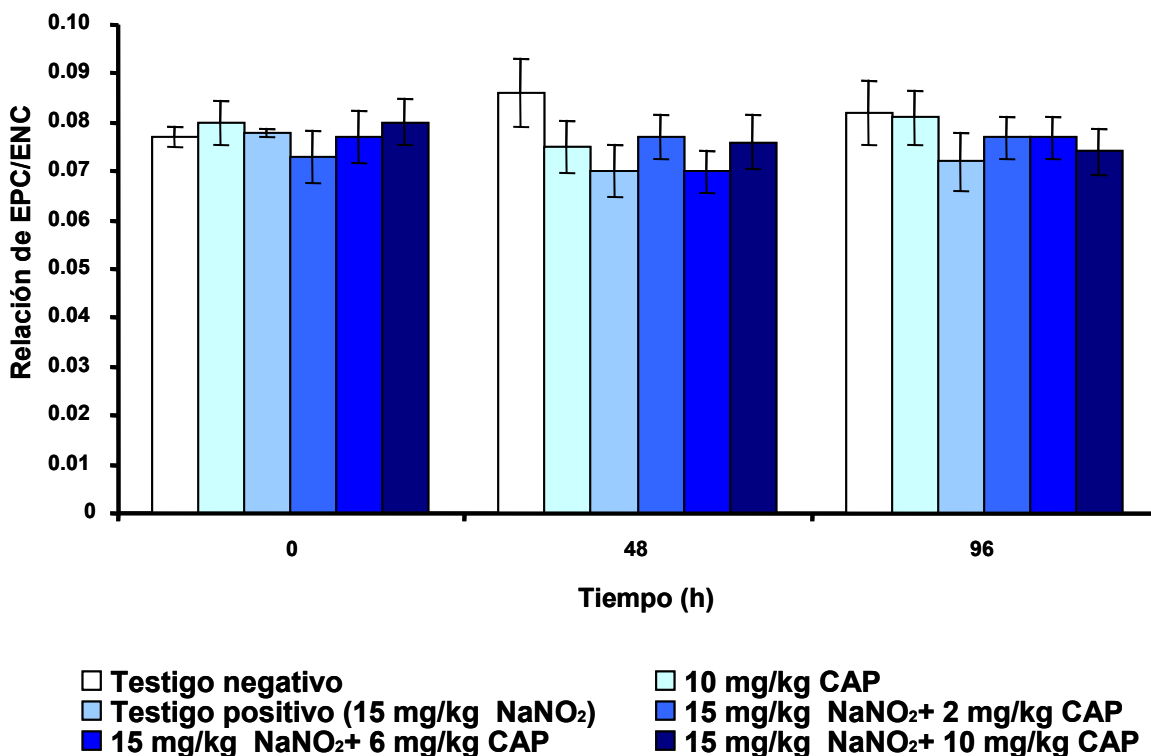
En la figura 21, observamos que la protección del efecto antigenotóxico de la capsaicina a las 48 h no fue significativa en ninguna dosis, en comparación de las 96 horas ya que en esta última fue protegiendo el efecto dosis dependiente, por lo tanto los resultados obtenidos con la dosis de 10 mg/kg protegió un 60% el daño que se produjo por el  $\text{NaNO}_2$ . Sin embargo, el lote positivo se incrementó de manera significativa desde las 48 h del tratamiento hasta las 96 h.



**Figura 21.** Frecuencia de ENCMN Y EPCMN inducidos por la administración de  $\text{NaNO}_2$  y Capsaicina. \* Diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

### 8.11 Relación de ENC/EPC inducidos por la administración de NaNO<sub>2</sub> y Capsaicina

En la figura 22 observamos los resultados en relación de las células jóvenes con células maduras, se observa que el testigo negativo y la capsaicina no presentaron diferencias significativas durante el experimento ( $P < 0.05$ ), por el contrario se observa una ligera tendencia de citotoxicidad pero no significativa producida por el NaNO<sub>2</sub> a las 48 horas, finalmente a las 96 h obtiene una recuperación en los animales tratados con NaNO<sub>2</sub> y capsaicina con respecto al testigo negativo.



**Figura 22.** Relación de ENC/EPC inducidos por la administración de NaNO<sub>2</sub> y Capsaicina.

## 9. Discusión

Diversos estudios, incluyendo el presente estudio, coinciden que el análisis de los micronúcleos en los eritrocitos constituye la manera más eficaz de evaluar la afección de la actividad medular, así como la capacidad clastogénica de los compuestos a corto, mediano y largo plazo (Oliveira-Martins y Grisolia, 2007). En este contexto, se considera que el tiempo de exposición es determinante para el tipo de célula a evaluar, por lo que se ha sugerido que los reticulocitos o eritrocitos policromáticos (EPC) son los mejores indicadores de daño en un estudio agudo debido a que el ciclo celular de los eritrocitos dura entre 10 y 20 horas, que la enucleación ocurre aproximadamente en 6 horas y que los EPC al ser células jóvenes tienen un tiempo de vida de 24 horas en la médula ósea; a diferencia de que en un estudio crónico o subcrónico, las células a examinar deben ser las maduras (ENC), por presentar una vida media en circulación sanguínea de 30 días y por consiguiente indicarían el efecto acumulado por el xenobiótico (Madrigal-Santillán, 2000).

Se ha establecido que normalmente la frecuencia espontánea de micronúcleos es baja y en el caso de la cepa de roedores usada en el experimento, se ha observado que los ENCMN oscilan entre 0 y 3 MN por cada 1000 ENC, por lo que si este valor se incrementa significativamente indicaría un efecto tóxico al material genético producido durante la maduración de los eritrocitos. En este sentido, nuestros resultados indicaron que la dosis del NaNO<sub>2</sub> (15 mg/kg) incremento el número de eritrocitos normocrómicos micronucleados y es semejante al estudio de otros autores (Luca, 1987 y Diaz- Barriga *et al.*, 2002) a las 48 y 96 horas, observándose el mayor efecto genotóxico en el último horario de tratamiento. Esta observación concuerda con algunos estudios en donde se administró la misma dosis de NaNO<sub>2</sub> pero a diferencia del nuestro fueron estudios agudos por lo que el análisis de MN fue en los EPC, lo que sugiere que se admistre la misma dosis del

conservador durante 5 días muy probablemente el efecto genotóxico se mantenga o incremente la frecuencia de MN.

Es importante mencionar que el efecto del NaNO<sub>2</sub> en el organismo generalmente sucede después de su biotransformación pero no quiere decir que sea el único factor, en el primer caso se sabe que el NaNO<sub>2</sub> se transforma en nitrosamina por acción de las bacterias propias del organismo y tanto el NaNO<sub>2</sub> como las nitrosaminas han demostrado ser tóxicas para el cuerpo (Victorin, 1994; Masuda, 2000). Esto lo ha observado en células en ensayos *in vivo*. Tal es el caso de un estudio realizado *in vivo* al introducir a diferentes dosis de NaNO<sub>2</sub> (0.6- 80 mg/kg) por vía oral observan que a 12, 24 y 36 h hubo aumento en la frecuencia de micronúcleos, llegando a la conclusión que es una sustancia genotóxica (Chandra y Aruna, 1998).

Otro estudio refiere que al administrar intragástricamente NaNO<sub>2</sub> diferentes dosis de 78.5 mg/kg, 235.5 mg/kg y 706.6 mg/kg a ratas durante 10 semanas y mediante el conteo de eritrocitos normocrómicos y policromáticos por la técnica de micronúcleos llegan a la conclusión que es una sustancia citotóxica (Luca *et al.*, 1985). Sin embargo, en este trabajo al emplear una dosis de 15 mg/kg de NaNO<sub>2</sub> se logró observar después de 48 h una ligera citotoxicidad, lo cual se recuperó a las 96 h lo que indica que no es una sustancia citotóxica a las dosis empleadas y el tiempo de nuestro experimento. La diferencia de estos resultados se debe a que en el primer estudio mencionado son dosis de cinco veces mayor que al presente estudio.

Uno de los análisis realizados en el presente indicaron que a las dosis usadas (2, 4 y 10 mg/kg) y bajo las condiciones experimentales empleadas no fue una sustancia genotóxica ni citotóxica, sino por el contrario presentó un efecto protector dosis dependiente desde las 96 hrs.

Es importante mencionar que en la literatura consultada, los estudios son de tipo agudo, por lo que resulta difícil realizar una comparación exacta con los resultados, sin embargo algunos de estos experimentos presentan ciertas



características comparables con el ensayo, tal es el caso del realizado por Nagabhusan y Bhide.

En un estudio evaluaron en ratas la capacidad de la capsaicina sobre la inflamación gástrica provocada por la carragenina y la inhibición carcinogénica producida por el carbamato de vinilo (Surh, *et al.*, 1998 ). Sus resultados indicaron que la inflamación disminuye en un 29% con una dosis de 5 mg/kg de CAP administrada por vía oral se reduce en un el proceso carcinogénico inducido por el mutágeno. Este mismo investigador, pero en el año de 1999, reporto que la CAP a la misma dosis 5 mg/kg es capaz de inhibir los tumores pulmonares inducidos por benzo[ $\alpha$ ]pireno así como los efectos tóxicos producidos durante el metabolismo de la aflatoxina B<sub>1</sub>. Existen antecedentes de que la CAP puede evitar la toxicidad del N-nitroso; un compuesto conocido por su efecto mutagénico (Ferguson, 1994).

Otro estudio reportó que al administrar de manera intraperitoneal a ratones albinos tres dosis de capsaicina (0.4, 0.8 y 1.6 mg/kg) durante cinco días, observaron que a ninguna dosis incremento la incidencia de alteraciones o anomalías en las cabezas de los espermatozoides, llegan a la conclusión que la capsaicina no es una sustancia citotóxica ni genotóxica (Muralidhara y Narasimhamurthy, 1988).

Se ha demostrado que hay una acción quimiopreventiva contra la formación de N-nitroso un compuesto conocido por su efecto mutagénico (Ferguson, 1994). Otro estudio realizado que utiliza las dosis de 2-10 mg/kg por vía oral altera el metabolismo de NNK(4-metilnitrosamino-1,3-piridil-1-butanona) hepático y pulmonar inhibiendo  $\alpha$ -hidroxilación, que es la responsable de la activación de NNK. Todos estos estudios llegan a la conclusión de que la CAP es una sustancia quimiopreventiva (Surh, 1999).

En el presente estudio se observó que a dosis bajas de CAP (2 mg/kg) hubo una disminución de la presencia de ENCMN al emplearse contra el nitrito de sodio,

conforme fue aumentando la dosis hasta 10 mg/kg fue mayor la protección contra efectos mutagénicos, se demuestra que la quimioprevención fue dosis-dependiente a un 60%, demostrando que la capsaicina no es genotóxica.

En este sentido, existen contradicciones en cuanto considerar a la CAP como un agente quimioprotector ya que algunos autores mencionan que a dosis bajas presenta actividad antimutagénica (Surh, 2002), pero en cantidades elevadas se convierte en una sustancia potencialmente carcinogénica y mutagénica. Tal es el caso del estudio realizado por Nagabhushan y Bhide en 1985 quienes introdujeron intraperitonealmente a ratones albinos y ratas wistar 7.6 mg/kg y 155.6 mg/kg de capsaicina durante seis semanas y llegaron a la conclusión por medio de la técnica de micronúcleos que esta sustancia causa mutación. Asimismo, observaron que con las dosis de 200, 400 y 800 mg/kg via oral, de CAP durante 0, 24, y 48 h en ratones de la cepa CD-1 causa clastogenicidad en linfocitos, concluyendo que la CAP es una sustancia genotóxica (Chanda *et al.*, 2003).

Se reportó en un estudio *in vitro* que la capsaicina es una sustancia citotóxica y genotóxica al evaluarla por medio del análisis de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos a una concentración de 10-200  $\mu$ M disueltas en dimetil sulfoxido (Marques *et al.*, 2002).

Por otro lado durante el experimento no hubo alteración de EPC de ninguna de las dos sustancias utilizadas (CAP y NaNO<sub>2</sub>) por lo cual no mostraron ser sustancias citotóxicas a las dosis empleadas y a las condiciones del experimento que se comportaron de manera semejante.

## 10. Conclusiones

- 1.- Con la dosis empleada del NaNO<sub>2</sub> (15 mg/kg) se incrementó la frecuencia de ENCMN, lo que confirma su capacidad para alterar el material genético.
- 2.- En virtud de que el NaNO<sub>2</sub> mostró una ligera disminución en el número de EPC a las 48 horas de tratamiento pero a las 96 horas a una dosis de 15 mg/kg, se mantiene este parámetro, se considera a este compuesto como un agente ligeramente citotóxica bajo las condiciones y dosis empleadas en este trabajo.
- 3.- La dosis máxima de capsaicina empleada (10 mg/kg) no fue genotóxica ni citotóxica a la largo de todo el experimento.
- 4.- La capsaicina mostró un efecto antígenotóxico dosis-dependiente contra la toxicidad del NaNO<sub>2</sub>, por lo que la mejor protección fue con la dosis de 10 mg/kg equivalente a un 60% de protección.
- 5.- Los resultados indicaron que la capsaicina a la dosis empleada en el experimento tiene capacidad quimioprotectora y sugieren considerarla como un método alternativo para reducir la genotoxicidad inducida por los conservadores como es el caso del nitrito de sodio.
- 6.- Es necesario realizar mas para proponer la posibilidad de prevenir algunas mutaciones inducidas por el consumo de las carnes frías y algunos vegetales de hoja verde oscuro entre otros (Tabla 2) con el consumo de chile a dosis moderadas, condición que no es difícil de promover ya que este alimento es consumido en salsas o guisos por la mayoría de la población mexicana, a su vez es necesario invitar a la población a que disminuya el consumo de conservadores debido a las alteraciones que estos generan y sus consecuencias a largo plazo.

---

## 11. Referencias bibliográficas

- Badui, D. S. 1999. Aditivos. En: *Química de los alimentos*, Pearson Educación, México, pp. 467-469.
- Bamio, A. y Josep-Francesc, M. 1999. Información técnica capsaicina. Asociación de Cooperativas Farmacéuticas. <http://www.acofarma.com/home.htm>. Fecha de consulta: 19-09-2006.
- Béliveau, R. y Gingras, D. 2007. Role of nutrition in preventing cáncer. *Cancer Fam Physician*. 53(11):1905-1911
- Brown, A. y Febiger L. 1993. Principle and procedures. En: *Hematology*, Philadelphia, Editorial MC Graw Hill. pp 101.
- Buenrostro, M. y Barros, C. 2001. Chile. *Cuadernos de Nutrición*. 24(6): 255-259.
- Chanda, S., Erexson, G., Riach, C., Innes, D., Stevenson, F., Murli, H. y Bley, K. 2004. Genotoxicity studies whit pure trans-capsaicin. *Mutation Reseach*. 557: 85-97.
- Chandra, J. G. y Aruna, R. 1998. Effect of various concentrations of leal nitrate on the induction of micronuclei in mouse bone marrow. *Mutation Reseach*. 415, 131-137
- Crosby, G. D. 1998. Reactive pollutants. *Enviromental Toxicology and Chemestry*, Oxford University Press. pp 290.
- Deshpande, S. 2002. Carcinogenesis, mutagenesis, and teratogenesis. En: *Handbook of Food Toxicology*, New York, Ed. Marcel Dekker incorporated. pp 64-68.
- Diaz-Barriga, A., Hernandez-Ceruelos, A., Madrigal-Bujaidar, E., y Chamorro, G. 2002. Inhibitory effect of chlorophyllin on the frecuency of micronuclei induced by sodium nitrite in mice. *Phytother Reseach*. 16(8): 754-757.

- 
- Dresbach H. R. y Robertson W. O. 1998. Nitritos y Nitratos. En: *Manual De Toxicología Clínica*. Prevención, diagnóstico y tratamiento; 6a edición editorial, El manual moderno, S.A de C.V pp.347.
- Esteva, M. R. 2007 Aditivos Alimentarios: Conservantes. Nitritos y Nitratos. [http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/eeymar/default\\_archivos/Trabajostoxicologiaalimentaria0607/aditivosrebecaesteva.pdf](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/eeymar/default_archivos/Trabajostoxicologiaalimentaria0607/aditivosrebecaesteva.pdf) Documento disponible en PDF Fecha de consulta: 18 de Agosto del 2007.
- Ferguson, L., R. 1994. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet *Mutation Reseach*. 307: 395-410.
- Hernández, R., M. y Sastre, G., A. 1999. Tratado de nutrición, Ed. Diaz de Santos España, pp. 468.
- Hodgson, E. y Levi, P. 1997. *A Textbook of Modern Toxicology Nitrates and Nitrites*, Appleton and Lange, EUA, 2da edición . Editorial, Mc Graw Hill, pp 245.
- Holtzer, P. A., Saira, G., Skofitsch, F. y Lembeck. 1981. Increase in tissue concentrations of histamine and 5-hidroxytryptamine following capsaicin treatment of newborn rats. *Life science*. 29: 1099-1105.
- Jancso, N. 1964. Neurogenetic inflammatory responses. *Acta Physiologica Academiae Scientiae Hungaricae*. 3: 2444.
- Kawada, T. y Iwai, K. 1985. *In Vivo* and *in vitro* metabolism of dihydrocapsaicin a pungent principle of hot pepper, in rats. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(2): 441-448.
- Kelloff G., Boune C., Crowell J., Vernon F., Lubert R. y Sigman C. 1994. Chemoprevention drug development. Perspectives and progress. *Cancer Epidem*. 8: 85-98.
- Komori, Y., Aiba, T., Sugiyoma, R., Nacai, C., Kawasaki, H. y Kurosak, Y. 2007. Effects of capsaicin on intestinal cephalixin absorption in rats. *Biological & pharmaceutical Bulletin*. 30(3): 5477-551.

- 
- Kotsonis, N. F., Burdock, A. G. y Flammy G.W. 2001. Food Toxicology. En: *Casarett and Doulls Toxicology the basic science of poisons*. Klaassen D. C.(ed). Mc Graw Hill E.U. pp 1076.
- Long, J. 2004. La ruta del chile habanero, *Cuadernos de Nutrición*. 27(2): 77-81.
- Lopez-Carrillo, L., Fernandez-Ortega, M., Costa-Diaz, R., Franco-Marina, J., y Alejandro-Badillo, T. 1995. Creencias sobre el consumo de chile y la salud en la ciudad de México. *Salud Publica de México*. 37(4): 339-343.
- Lu, F, C. 1992. Mutagenia. En: *Toxicología Básica*. Ed, Harla. Miami, EUA. pp 139-141.
- Luca, D., Raileanu, L., Luca, V. y Duda, R. 1985. Chromosomal aberrations and micronuclei in rat and Mouse bone marrow cells by sodium nitrate. *Mutation Reseach*. 155: 121-125.
- Luca, D., Luca, V., Cotor, F., y Raileanu, L. 1987. *In vivo* and *in vitro* cytogenetic damage induced by sodium nitrite. *Mutation Reseach*. 189(3): 333-339.
- Lunch, M., Raphael, S., Mellor, L., Spare, P. y Inwood, M. 1997. Preparación y tinción de frotis de sangre periférica y medula osea. En: *Métodos de Laboratorio, Interamericana*. pp 723-725.
- Madrigal-Santillán, E. 2000. Efecto Inhibitorio del manano contra el daño genotóxico producido por la aflatoxina B1 *in vivo*. Tesis Doctoral Instituto Politécnico Nacional. Mexico. pp. 9-12, 88-95.
- Marques, S., Olivera, N., Chaveca, T. y Rueff, J. 2002. Micronuclei and sister chromatid exchanges induced by capsaicin in human lymphocytes *Mutation Reseach*. 517: 39-46.
- Masuda, M., Mower, H., Pigatelli, B., Celan, I., Friesen, M., Nishino, H., y Ohshima, H. 2000. Formation of N-nitrosamines and N-nitramines by the reaction of secondary amines with peroxyxynitrite and other reactive nitrogen species:

- 
- comparison with nitrotyrosine formation. *Chemical Reseach Toxicology*. 13(4): 301-308.
- Miller C. H., Zhang Z., Hamilton S. M. y Teel R. W. 1993 Effects of capsaicin on liver microsomal metabolism of the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Letters*. 75: 45-52.
- Moon R. y Mentha R. 1989. Chemoprevention of experimental carcinogenesis in animals. *Preventive Medicine*. 18: 576-591.
- Muralidhara y Narasimhamurthy, K. 1988. Non-Mutagenicity of capsaicin in albino mice. *Food Chemical Toxicology*. 26(11-12): 955-958.
- Nagabhushan, M. y Bhide, S. 1985 Mutagenicity of chili extract and capsaicin in short-term. *Test*. 7: 881-888.
- Navarro, A. 2003. Efecto del ambiente de la génesis del cancer. *Gastr. Latinoamérica*. 14(3): 163-166.
- Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Ochi, T., Takaishi, Y., Kogure, K. y Yamauti, I. 2003. Antioxidant activity of a capsaicin derivative from capsicum annum. *American Chemical and American Society of Pharmacognosy*. 66: 1094-96.
- Olivera-Martins, C.y Grisolia, C. 2007. Determination of micronucleus frequency by acredine orange fluorescent staining in peripheral blood reticulocytes of mice treated tropically whith different lubricant oils and cyclophosphamide. *Genetic Molecular Reseach*. 30;6(3): 566-574.
- Pacheco, L. D. 2006. Ácidos Nucleicos y biosíntesis de proteínas En: *Bioquímica médica*. Instituto Politécnico Nacional. Ed. Limusa. Mexico. pp 549.
- Pamplona, R. J. 2004. Enciclopedia de los Alimentos y su poder curative. En: *Tratado de Bromatología y Dietoterapia*, Madrid España. pp 340.

- 
- Preston, J. y Hoffmann. R. G. 2001. Genetic Toxicology. En: *Casarett and Doulls Toxicology the basic science of poisons*. Klaassen D. C.(ed). Mc Graw Hill pp 331-340.
- Reilly, A. C, J., Enhardt W; A., Jackson, D, y Kulanthaivel, P. 2003. Metabolism of capsaicin by cytochrome p450 produces novel dehydrogenated metabolites and the decreases cytotoxicity to lung and liver cells. *American Chemical Society*. 16: 336-349.
- Salazar O. L. y Silva O. C., 2004. Efectos farmacológicos, El principio pungente del chile. *Biología Scripta*. 1: 7-14.
- Schmidt-Hebbel, H. 1986. Tóxicos químicos en alimentos, avances en su identificación, previsión y desintoxicación. Edit. F m m, Chile, pp 23, 52-56.
- Shahrim, Z., Noor, P. M., Ashikin, Y. N., Muhammad, H., Bakar, R., y Zakiah, I. 2006. The *in vivo* rodent micronucleus assay of Kacip Fatimah (*Labisia pumila*) extract. *Tropical Biomedicine*. 23(2): 214-219.
- Seiller, J. P. 1977. Nitrosation *in vitro* and *in vivo* by sodium nitrate, and mutagenicity of nitrogenous pesticides. *Mutation Research*. 48: 225-236.
- Surh, Y. J., 2002. More than spice: Capsaicin in hot chilli peppers makes tumor cells commit suicide. *Journal of the National Cancer Institute*. 94: 1263-1265.
- Surh, Y.J., 1999. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of select dietary and medicinal phenolic substances. *Mutation Research*. 428: 305-327.
- Surh, Y. J. y Lee, S.S., 1995. Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Science*. 56: 1845-1855.
- Surh, Y. J. y Lee, S.S., 1996. Capsaicin in hot chili pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen?. *Food and Chemical Toxicology*. 34: 313-316.
- Surh, Y. J., Lee, J. E. y Lee, J.M. 1998. Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. *Mutation Research*. 402: 259-267.



- Surh, Y. J., Lee, C. J., Park, K.K., Taylor, M. S., Liem, A. y Miller, A. J. 1995. Chemoprotective effects of capsaicin and diallyl sulfide against mutagenesis or tumorigenesis by vinyl carbamate and N-nitrosodimethylamine. *Carcinogenesis*. 16(10): 2467-2471.
- Teel R. W. 1991. Effects of capsaicin on rat liver S9- mediated metabolism and DNA binding of aflatoxin. *Nutrition and Cancer*. 15: 27-32.
- Timbrell, A. J. 1991. Biochemical mechanisms of toxicity: specific examples. En *Principles of Biochemical Toxicology*, Taylor and Francis, pp. 292.
- Victorin, K. 1994. Review of the genotoxicity of nitrogen oxides, *Institute of Environmental Medicine*. 317: 43-55.
- Wade, S. K., Geeta S. A., Guo T. Z., Frances M. D., Clark J. D. y Maze M. 2002. Capsaicin sensitive afferents mediate the development of heart hyperalgesia and hindpaw edema after sciatic section in rats. *Neuroscience Letters*. 318: 39-43.
- Waters, D., Stock F., Jackson A., Brockman E. y De Flora S. 1996. Activity profiles of antimutagens: *In vitro* and *in vivo* data. *Mutat. Res*. 350: 109-129.
- Zarco, P. I. 2004. La capsaicina del molcajete al cerebro. *Cuadernos de Nutrición*. 27(2): 69-75.

## 12. Anexo

### I Glosario

**Aditivos:** Las sustancias que se adicionan directamente a los productos durante su elaboración, para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o para su conservación, entre otras funciones

**Antioxidante:** es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, son un conjunto heterogéneo de sustancias formado por vitaminas, minerales, pigmentos naturales y otros compuestos vegetales

**Capsaicina:** Componente activo del chile (*Capsicum*). Es irritante para los mamíferos; produce una fuerte sensación de ardor en la boca

**Carcinogénesis:** Proceso biológico del cáncer (CA) ocasionado por: señales químicas, físicas y biológicas en una o varias fases del ciclo celular provocando modificaciones moleculares y estructurales que alteran el proceso vital de la célula. En la carcinogénesis existe multiplicación y crecimiento anormal e incontrolable de las células se le conoce como "ciclo celular enfermo (enfermedad del cáncer).

**Carcinógeno:** Un agente carcinógeno tanto físico, químico como biológico es aquél que puede actuar sobre los tejidos vivos de tal forma que produce cáncer

**Carcinoma:** Tumor o neoplasia maligna formada por células epiteliales neoformadas con capacidad para hacer metástasis a distancia en cualquier momento de su evolución. Puede ocurrir en cualquier parte de organismo donde haya epitelio. Cuando deriva de un epitelio de revestimiento puede haber diferenciación escamosa (carcinoma escamoso) o derivar de células basales (carcinoma basal). Cuando deriva de un epitelio glandular se denomina adenocarcinoma

**Citotóxico:** Tiene efectos tóxicos sobre ciertas células y provoca muerte celular.

**Calstogénico:** Son cambios estructurales de los cromosomas fácilmente observables en la metafase del ciclo celular y que tienen su origen en roturas (procesos clastogénicos) de las cadenas de ADN no reparadas o mal reparadas.

**Expectorar:** Arrancar y arrojar por la boca las flemas y secreciones que se depositan en la faringe, la laringe, la tráquea o los bronquios

**Hipertrofia:** Desarrollo exagerado de los elementos anatómicos de una parte u órgano sin alteración de la estructura de los mismos, que da por resultado aumento de peso y volumen del órgano.

**Genotóxico:** Tiene efectos tóxicos y daña el material genético

**Micronúcleos:** son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, se corresponden con material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por roturas cromosómicas, por errores durante la replicación y posterior división celular del ADN y/o por la exposición a agentes genotóxicos.

**Mutación:** Alteración producida en la estructura o en el número de los genes o de los cromosomas de un organismo transmisible por herencia se produce de forma espontánea o inducida y que modifica la expresión original del gen.

**Mutagénesis:** acto de inducir una mutación. Las pruebas de mutagénesis que se realizan durante las investigaciones pre-clínicas de un nuevo fármaco constituyen una serie de ensayos "*in vitro*" e "*in vivo*"

**Mutagenicidad:** Propiedad de una sustancia química de causar cambios permanentes en las características genéticas de un organismo

**Mutagénico:** compuesto o agente que induce mutaciones, como la luz UV o algunos compuestos químicos.

**Necrosis:** Degeneración de un tejido por muerte de sus células.

**Neuralgia:** Término general para las afecciones cuyo principal síntoma es el dolor intenso, intermitente, a lo largo de un nervio o nervios, sin cambios estructurales demostrables en estos, dependientes de un gran número de estados morbosos.

**Nitrosaminas:** Las nitrosaminas son aminas que contienen un grupo funcional nitroso ( $-N-N=O$ ). Estos compuestos se forman cuando un nitrógeno (N) y un oxígeno (O) de un compuesto “nitrosante” se unen al nitrógeno del grupo amino (N) de un compuesto amínico. Las nitrosaminas se forman también *in vivo* durante el metabolismo de los alimentos que contienen nitratos o nitritos.

**Quimioprevención:** intento deliberado de frenar o revertir el progreso de las células premalignas hacia la malignidad.

**Teratogénesis:** Desarrollo celular anormal durante el crecimiento fetal.

**Teratogénico:** Que produce malformaciones en el embrión o feto.

**Toxicidad:** Grado de efectividad de una sustancia tóxica.

**Tóxico:** Cualquier sustancia que incorporada al organismo es capaz de producir graves alteraciones orgánicas o funcionales e incluso la muerte.

## II Tinción de Giemsa

En este método se reemplazan los colorantes policromáticos empíricos por distintos compuestos de azur (tionina y sus derivados metilados) con eosina y azul de metileno. Los frotis deben fijarse durante tres minutos en alcohol metílico. Luego se secan y se sumergen en colorante de Giemsa diluido (un volumen de colorante para nueve a 15 volúmenes de agua destilada o de amortiguador de pH 6.8) en frasco de Copling, durante 15 minutos a una hora. Luego se lava en agua destilada y se seca al aire, sin montar (Lunch, 1977).

El procedimiento de tinción que se realizó fue el descrito por Giemsa May-Grünwald, con las siguientes modificaciones.

1. Los frotis secados al aire se fijan durante cuatro minutos de alcohol metílico.
2. Se pasan a colorante de May-Grünwald diluido recientemente con un volumen de agua destilada 43 mL, una solución reguladora de fosfatos 0.3 M (pH 6.8) y 2 mL de colorante de Giemsa, se deja actuar durante 15-17 min.
3. Lavar con agua destilada, secar al aire y evaluar en el microscopio a 100x con aceite de inmersión (Brown, 1993)

### III. Contenido de nitratos y nitritos, permitido por la Norma Oficial Mexicana

Tabla 4. Cantidades en ppm permitidas en producto cárnico procesados

	Cocidos	Curados Crudos	Curados Madurados	Empanados o rebozados congelados	Desecados, secos, marinados o en salmuera
Acido algínico y sus sales de sodio, potasio y propilenglicol	4000	4000	4000	4000	N.P.
Acido eritórico y sus sales de sodio	500	N.P.	500	N.P.	N.P.
Acido fosfórico	3100	3100	3100	3100	N.P.
Acido L (+) tartárico y sus sales de sodio y potasio	2400	2400	2400	N.P.	N.P.
Acido sórbico y sus sales de sodio y potasio	1000	1000	1000	N.P.	N.P.
Alfa tocoferol	3000	N.P.	3000	N.P.	N.P.
Butil hidroxianisol	100	N.P.	100	N.P.	100
Butilhidroquinona terciaria	100	N.P.	100	N.P.	100
Butilhidroxitolueno	100	N.P.	100	N.P.	100
Fosfato disódico	3100	3100	3100	3100	N.P.
Hexametáfosfato de sodio	3100	3100	3100	3100	N.P.
Mezcla de tocoferoles concentrados	50	N.P.	50 <sup>6</sup>	N.P.	N.P.
<b>Nitratos o nitritos de sodio o potasio</b>	<b>156</b>	<b>156</b>	<b>156</b>	<b>N.P.</b>	<b>N.P.</b>
Propil-p-hidroxibenzoato	1000	1000	1000	N.P.	N.P.
Pirofosfato ácido de potasio	3100	3100	3100	3100	N.P.
Pirofosfato ácido de sodio	3100	3100	3100	3100	N.P.
Pirofosfato disódico	3100	3100	3100	3100	N.P.
Pirofosfato tetra-sódico	3100	3100	3100	3100	N.P.
Polifosfato de sodio	3100	3100	3100	3100	N.P.
Propionato de sodio	1000	N.P.	100 <sup>5</sup>	N.P.	N.P.
Rojo allura	100	100	100 <sup>5</sup>	N.P.	100
Trifosfato pentasódico	3100	3100	3100	3100	N.P.

Fuente. NORMA Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002

N.P. No publicado