

CAPÍTULO 3

RESULTADOS PRELIMINARES EN LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUIMIOTERAPÉUTICA DE BETA-SITOSTEROL EN UN MODELO DE OSTEOSARCOMA EN RATAS

Data de aceite: 04/07/2023

Rogelio Paniagua Pérez

Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Franco y Bourland Rebecca E.

Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Eduardo Madrigal Bujaidar

Laboratorio de Genética, ENCB, Instituto Politécnico Nacional

Isela Álvarez González

Laboratorio de Genética, ENCB, Instituto Politécnico Nacional

Victor M. Araujo Monsalvo

Servicio de Biomecánica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Victor M. Domínguez Hernández

Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Carlos J. Martínez Canseco

Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Raúl Pichardo Bahena

Servicio de Patología, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Hiram García Campillo

Bioterio, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Lidia Cruz Hernández

Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Alejandra Quintana Armenta

Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Lidia Ruíz Rosano

Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Elisa Martínez Coria

Servicio de Tomografía, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

Martín Luna Méndez

Servicio de Tomografía, Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII

RESUMEN: El osteosarcoma (OS) es un tumor maligno de hueso, constituye el 75% en pacientes jóvenes, afecta principalmente huesos de las extremidades inferiores. No existe ningún método eficaz para prevenir este tipo de cáncer y puede inducir la amputación. El beta-sitosterol (BS) es un compuesto vegetal. Estudios han demostrado propiedades biomédicas inmunomoduladoras, antimutagénicas,

antiinflamatorias y antioxidantes. El benzopireno (BZP) es un hidrocarburo, capaz de inducir OS. Considerando estos antecedentes, se planteó este proyecto de investigación. Por lo que el objetivo fue determinar en un modelo de carcinogénesis ósea en ratas, la actividad quimioterapéutica de beta-sitosterol en el desarrollo del osteosarcoma. Se indujeron lesiones neoplásicas mediante la administración perifemoral de BZP. De la 7ª a la 9ª semana se administró por vía oral BS. Se registró el peso de las ratas, se tomaron muestras sanguíneas para realizar estudios de genotoxicidad; se realizaron pruebas bioquímicas mediante para determinar velocidad de sedimentación (VSG), fosfatasa alcalina (FA) y deshidrogenasa láctica (DHL). Al cumplir la novena semana, se realizó eutanasia, se extrajeron los fémures, tibias, hígado y pulmones para su estudio histopatológico.

PALABRAS CLAVE: Osteosarcoma, Benzopireno, beta-sitosterol, quimioterapéutico, Murine model.

ABSTRACT: Osteosarcoma (OS) is a malignant bone tumor, constitutes 75% in young patients, mainly affects bones of the lower extremities. There is no effective method to prevent this type of cancer, and it can lead to amputation. Beta-sitosterol (BS) is a plant compound. Studies have shown immunomodulatory, antimutagenic, anti-inflammatory, and antioxidant biomedical properties of this compound. Benzopyrene (BZP) is a hydrocarbon, capable of inducing OS. Considering this background, this research project was raised. Therefore, the objective was to determine, in a model of bone carcinogenesis in rats, the chemotherapeutic activity of beta-sitosterol in the development of osteosarcoma. Neoplastic lesions were induced by perifemoral administration of BZP. From the 7th to the 9th week BS was administered orally. The weight of the rats was recorded, blood samples were taken for genotoxicity studies; biochemical tests were performed to determine sedimentation rate (ESR), alkaline phosphatase (FA) and lactic dehydrogenase (DHL). At the ninth week, euthanasia was performed, femurs, tibiae, liver and lungs were removed for histopathological study. Preliminary results show a chemoprotective activity of betasitosterol in the animals studied. The activity in Sprague Dawley rats being more evident compared to the results in Wistar rats.

KEYWORDS: Osteosarcoma, Benzopyrene, beta-sitosterol, chemotherapeutic, Murine model.

INTRODUCCIÓN

El osteosarcoma es una neoplasia maligna primaria, derivada del mesénquima óseo y típicamente forma tejido osteoide o hueso inmaduro. Suele ocurrir durante la adolescencia, durante la etapa de crecimiento. Es el tumor primario de hueso sólido más común [1] y constituye aproximadamente el 20 % de los sarcomas óseos primarios (American Cancer Society, 2018). Cada año se diagnostican entre 400 y 1000 casos nuevos en Estados Unidos [2,3], lo que supone una incidencia de 8/1.000.000 en la población general. Se considera una enfermedad juvenil ya que 7,5 de cada 10 casos aparecen en pacientes menores de 25 años [4]. La mayoría de los casos en pacientes mayores son sarcomas secundarios, es decir, sarcomas que surgen como complicación de enfermedades óseas preexistentes (enfermedad de Paget, osteomielitis crónica, infartos óseos crónicos) o

en tejidos previamente irradiados. Es uno de los pocos tumores que comienzan en los huesos y hacen metástasis a otras partes del cuerpo [5]. El osteosarcoma es considerado un complejo de resistencia a los tratamientos convencionales. Actualmente no existe un método eficaz para prevenir este tipo de cáncer. El tratamiento del osteosarcoma incluye quimioterapia, seguida de cirugía (amputación o cirugía de rescate) y quimioterapia posquirúrgica. A pesar de los avances significativos en el tratamiento del osteosarcoma, el pronóstico de los pacientes con metástasis sigue siendo malo, con una supervivencia general del 55 % después de la cirugía y la quimioterapia intensiva [6,7].

MODELOS ANIMALES

Los modelos animales utilizados en la investigación del tejido óseo son tan diversos como los materiales y las estrategias de reparación. Generalmente, y como en otras áreas de la ciencia, los estudios en animales se inician en modelos como el ratón o la rata, seguidos de conejos, cerdos y ovejas. La mayoría de los estudios se centran en animales medianos y grandes, debido a que la cirugía es compleja y requiere de un área grande para ser realizada y los resultados obtenidos en estos casos son más fácilmente extrapolables a un posible uso clínico. En cuanto a los modelos de lesión del tejido musculoesquelético, se utilizan tanto modelos de lesión crítica (lesiones que no se reparan espontáneamente) como modelos no críticos (lesiones que curan espontáneamente) [8]. La localización anatómica de estos defectos depende del objetivo del estudio. En este sentido, las más comunes son las lesiones y osteotomías en huesos largos (fémur, tibia, húmero y radio), cráneo, lesiones lumbares y lesiones en la región maxilofacial. Existe cierta controversia al comparar los resultados obtenidos en diferentes modelos animales. Esto se debe a que, en algunos casos, los compuestos que parecen funcionar en animales pequeños no funcionan en animales más grandes. Por ello, se considera de gran importancia la correcta elección del material de estudio, el tipo de lesión a realizar y el modelo animal elegido [9].

MODELOS DE INDUCCIÓN DE CÁNCER MURINO

Desde principios del siglo pasado hasta la actualidad, los modelos murinos han contribuido al conocimiento de la patogénesis de muchas enfermedades y al desarrollo de nuevas terapias. La tendencia actual de la investigación biomédica sugiere que, en un futuro próximo, la disponibilidad de modelos murinos mejorará enormemente gracias al gran número de técnicas de manipulación genética y proyectos de mutagénesis química existentes. Por tanto, el uso de estos modelos será fundamental para el estudio funcional de las secuencias obtenidas a partir de los proyectos de secuenciación del genoma humano y murino [10,11]. El uso de modelos murinos se debe a que estos modelos ayudan en la comprensión de la patogénesis de muchas enfermedades y el desarrollo de terapias para reemplazar la función defectuosa de un gen dado. En medicina experimental, el roedor es

un organismo modelo que ofrece muchas ventajas frente a otros modelos genéticos como la mosca *Drosophila*, la mosca *Caenorhabditis elegans* benatode, entre otros [12,13].

Estas ventajas son:

- Al ser un mamífero, gran parte de sus procesos bioquímicos son similares aunque no idénticos a los humanos.
- Tienen un tiempo de gestación muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en bioterio, lo que permite controlar las variables ambientales en los experimentos.
- Después de los humanos, son las especies más estudiadas desde el punto de vista genético
- Hay una gran cantidad de líneas definidas genéticamente, como líneas consanguíneas y congénitas, además de cientos de mutaciones y una gran cantidad de reordenamientos cromosómicos disponibles.
- Es el único animal que cuenta con sistemas eficientes para el cultivo de células embrionarias pluripotentes (células ES), lo que permite la realización de mutaciones dirigidas (ratones KO constitutivos y condicionales).

Algunos modelos reportados en la literatura para el desarrollo de OS son los siguientes: Se estableció un modelo animal para OS humano en hámsters dorados sirios recién nacidos, inyectando células OS humanas cultivadas adyacentes al fémur, todos los animales desarrollaron OS y metástasis pulmonares con una supervivencia de 36 días. media [8,14]. Otro modelo fue desarrollado con inyecciones intramedulares tibiales del virus del sarcoma murino de Moloney en tres cepas de ratas endogámicas neonatales, 10 días después presentaron tumores altamente malignos, produciendo mortalidad en todas las ratas tratadas [10]. Otro grupo de investigadores indujo OS con virus mediante la prueba de microtoxicidad de linfocitos, con inyección intratibial del virus del sarcoma murino de Moloney. El 73% de los animales inyectados progresaron a OS y causaron metástasis pulmonares con una supervivencia no superior a 2 meses [15]. Sin embargo, estos modelos tienen desventajas; la mortalidad es alta en cada uno de los modelos de benzopireno utilizados.

BENZOPIRENO

El benzopireno (BZP) es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) potencialmente cancerígeno. El alto contenido de BZP en algunos alimentos (frutos secos, embutidos, chorizo, especias, pizzas, pan de leña, carnes a la parrilla, café tostado) se debe a su proceso de elaboración que involucra procesos de combustión incompleta, también se puede encontrar en el tabaco. El BZP se produce por condensación de cinco anillos de benceno durante procesos de combustión a temperaturas de 300 a 600 °C. Desde 1775 los médicos británicos Pott y Hill, observaron alta incidencia de cáncer de escroto en el personal

encargado de la limpieza de chimeneas (chimney deshollinadores) [16]. Aproximadamente cien años después, se informaron hallazgos similares en Alemania y Escocia, entre trabajadores de la industria de alquitrán de hulla y parafina. Estas observaciones llevaron a la conclusión de que los derivados del petróleo y del carbón contenían sustancias capaces de inducir tumores. confirmado en 1918, cuando los investigadores japoneses Yamagiwa e Ichikawa demostraron que el alquitrán aplicado a la piel de los conejos inducía cáncer [17]. Hallazgos similares en ratas fueron documentados en 1920, en Inglaterra por Kennaway informado por Hugues. Sin embargo, dado que el alquitrán y el hollín son mezclas de varias sustancias y el aislamiento de los posibles compuestos químicos responsables de tales resultados era complejo, no fue hasta 1920 que se identificaron los HAP aislados del alquitrán como posibles responsables de producir tumores en la piel de ratones [18]. En 1931 se aisló del carbón uno de los HAP, el benzopireno (BZP), en el mismo año se sintetizó y se demostró que era el responsable de la producción de tumores cancerosos en animales de experimentación. También se encontró en alquitrán de hulla, alquitrán y hollín [19], uno de los primeros carcinógenos claramente identificados. En estudios epidemiológicos en trabajadores expuestos a hornos de coque, durante el proceso industrial de coquización del carbón, se encontró que las plantas de asfalto, fundiciones e instalaciones de aluminio tienen mayor índice de cáncer de pulmón que quienes no realizaban esas actividades laborales, lo que se atribuyó a la exposición a HAP [20]. Posteriormente, las investigaciones revelaron que también se encontraron PAH en alimentos consumidos por humanos [21]. BZP aparentemente actúa sobre el gen K-Ras, provocando una mutación en un área específica del gen que se puede cotejar en el ADN de pacientes con cáncer de pulmón. Este hallazgo no solo sirve para determinar que el tabaco es cancerígeno, sino que también puede ser útil para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas basadas en la información específica disponible para el ADN dañado por el cáncer [22].

BETA-SITOSTEROL

Es un fitosterol con estructura similar a la del colesterol de la grasa animal, se diferencia por la presencia de un grupo etil en la cadena lateral (figura 1). Todas las plantas, incluyendo las frutas, verduras, granos, especias y semillas poseen este compuesto. Los aceites de plantas son una fuente particularmente rica en beta-sitosterol, el cual se utiliza en el tratamiento de hipercolesterolemia, así como para modular la función inmune, la inflamación e interviene en el control de la producción de citocinas. La investigación también ha demostrado que el beta-sitosterol ayuda a normalizar la función de linfocitos T-cooperadores y células supresoras [23].

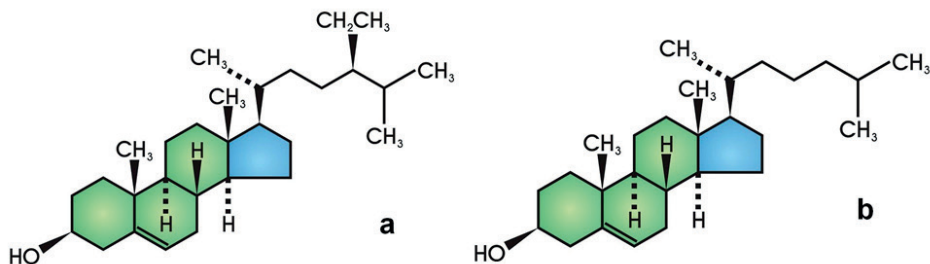


Figura 1. Estructura química de colesterol (a) y beta-sitosterol (b).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales:

Se utilizaron 10 ratas macho Sprague Dawley y 10 ratas Wistar, donadas por el IMSS-Siglo XXI y el Instituto Nacional de Rehabilitación LGII Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, con un peso promedio de 180 g, divididas en 4 grupos y mantenidas en cajas de policarbonato. Las condiciones ambientales fueron: Período de luz/oscuridad de 12/12 horas; temperatura de 22 ± 2 °C y humedad relativa de 60-70%, con acceso libre a alimento (Rodent Lab Chow 5001, Purina) y agua. El procedimiento experimental fue aprobado por el Comité de Ética y Bioseguridad del Instituto Nacional de Rehabilitación LGII.

Reactivos

Beta-sitosterol, benzopireno, aceite mineral, dimetilsulfóxido, ketamina, xilacina, isofluorano, colorante Giemsa y NaCl se adquirieron de Sigma Chemicals (St. Louis, MO, EE. UU.).

Inducción de OS con administración de BZP y BS

Las lesiones se indujeron mediante la administración perifemoral cada 24 horas durante 30 días a una dosis de 20 mg/kg de BZP (Sigma-Aldrich), disueltos en dimetilsulfóxido, el volumen de administración fue de 0,3 mL. A los grupos control negativo se les administró en la porción distal del fémur derecho en una inyección perifemoral y en tres puntos, una administración diaria de 0,3 ml de dimetilsulfóxido (vehículo de BZP) durante 30 días. 2 grupos experimentales (uno de ratas Sprague Dawley y otro de Ratas Wistar) a quienes se les administró en la porción distal del fémur derecho en inyección perifemoral y en tres puntos, una administración diaria de 20 mg/kg de BZP diluida en dimetilsulfóxido durante 30 días, posteriormente se les administró a los controles negativos aceite mineral VO y los grupos de tratamiento 200 mg/kg de beta-sitosterol durante 3 semanas, se les realizó

eutanasia al completar las 9 semanas a todos los animales para su estudio, se realizó evaluación morfológica y obtención de muestras de sangre.

Descripción de los procedimientos

1. Desde el día 0 se registró diariamente el peso de las ratas.
2. El día 0 y semanalmente hasta el final del estudio se obtuvieron muestras de sangre (dos gotas) de la punta de la cola haciendo un pequeño corte (1 mm), para realizar un frotis de sangre para estudios de genotoxicidad y citotoxicidad, mediante la prueba de micronúcleos.
3. Desde el final de la primera semana después de la manipulación farmacológica y hasta el sacrificio de las ratas, se evaluó el estado de los fémures tratados.
4. En la semana 0 y cada tres semanas se tomaron muestras de sangre (1 mL) de vena mandibular y/o retroorbitaria para determinar velocidad de sedimentación (método de Westergreen), proteína C reactiva (ELISA), fosfatasa alcalina y deshidrogenasa láctica (análisis colorimétrico).
5. Para los procedimientos en los que se requería sedación de los animales, se utilizó isofluorano colocado en un frasco de boca ancha, en el que se introducía al animal en estudio el tiempo necesario para que llegara a un estado sedado.

Después de la eutanasia y en el momento de la apertura quirúrgica del abdomen se realizó una evaluación macroscópica del estado orgánico de la rata, con especial atención al pulmón, hígado, riñón, bazo e intestino. Se extrajeron los fémures, tibias, pulmones e hígado y se lavaron con un amortiguador. Luego se colocaron en tampón de formalina al 10% y las muestras se fijaron y mantuvieron a 4°C hasta su estudio histológico.

Estudio histopatológico de fémur y tibia de rata

Una vez obtenidos los fémures y tibias de rata, cada muestra se lavó con un amortiguador, posteriormente se fijó en formalina tamponada al 10%, manteniéndolas toda la noche a una temperatura de 4 °C, durante 12 horas. Los fémures y las tibias se colocaron en una solución descalcificadora (ácido nítrico al 5% durante 96 horas). El hueso se neutralizó introduciéndolo en una solución de carbonato al 10%. solución y se lava con agua corriente durante 15 minutos. Las muestras se incluyeron en parafina. Las preparaciones histológicas se sumergieron en xilol para eliminar el exceso de parafina. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos en un micrótopo rotatorio tipo Minot. El tejido se cortó hasta llegar a tejido intacto en rodajas de 5 micras, y luego se colocó con un cepillo en un baño de flotación. Las laminillas se marcaron con el número correspondiente a la muestra. Se realizó la selección y colocación del corte en la corredera. El exceso de agua se escurrió en las preparaciones histológicas y se fijó con calor (placa con termostato a 56-58 °C). El desparafinado de los cortes histológicos se realizó en estufa o estufa a

60°C por 30 min. Luego pasaron por una serie de alcoholes en concentración decreciente para rehidratar la muestra (100°, 95° y 70°). Se lavaron con agua para eliminar el exceso de alcohol. Se sumergieron en hematoxilina durante 10 minutos, se lavaron con agua para eliminar los excesos y se pasaron rápidamente por alcohol ácido. Se realizó nuevamente un lavado, se sumergieron por 30 segundos en eosina. Pasaron por otra serie de alcoholes, esta vez en orden creciente (70°, 95° y 100°). deshidratar la muestra, lograr el montaje con una cola no soluble en agua. Finalmente, se dejaron en remojo 10 minutos en xilol, antes de realizar el montaje final y observación al microscopio [15].

Estudio histopatológico de pulmón e hígado

Los órganos se colocaron en formalina al 10% durante 24 horas. Después de embeberlos en parafina, los tejidos se cortaron en rodajas de 2 a 4 mm de espesor. Se sumergieron en xilol para eliminar el exceso de parafina. Luego se sumergieron secuencialmente en alcohol de concentración decreciente para rehidratarlos (100°, 95° y 75°). Se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de alcohol, luego se sumergieron en hematoxilina durante 10 minutos, se lavaron con agua corriente, se pasaron rápidamente por alcohol ácido y finalmente se sumergieron en eosina durante 30 segundos. Luego se deshidrataron sumergiéndolos secuencialmente en alcohol cada vez más concentrado (75°, 95° y 100°). para ser montado en las láminas con cola no hidrofílica. Finalmente se empaparon con xilol durante 10 minutos antes de finalizar el montaje, y se observa en el microscopio [18].

Evaluación de genotoxicidad y citotoxicidad en sangre periférica mediante tinción de Giemsa,

Una vez obtenidas las muestras de sangre de la cola de la rata, se colocaron en portaobjetos perfectamente limpios y se realizaron frotis de sangre. Para la tinción de las muestras, como primer paso, se fijaron con metanol sumergiéndolas por 5 minutos, luego se lavaron con agua corriente y se tiñeron por 18 minutos en tinción de Giemsa al 4% en tampón fosfato pH 6.8, las placas se observaron al microscopio de inmersión. Los eritrocitos policromáticos (EPC) se tiñeron de violeta y los eritrocitos normocrómicos (ENC) de azul. Los micronúcleos se observaron de color violeta intenso. Para evaluar la citotoxicidad se determinó la relación entre el número de EPN y ENC. El recuento se hizo en 2000 células por grupo en los tiempos establecidos y se determinó la cantidad de eritrocitos normocrómicos micronucleados para evaluar la genotoxicidad [24,25].

RESULTADOS

Los resultados parciales durante la administración de BZP y después de la

administración de BS fueron los siguientes: El peso de los animales en ambas cepas, presentó una disminución estadísticamente significativa de la tercera a la 7ª semana, sin embargo, el peso comenzó a estabilizarse a partir de la 8ª semana (Figura 2). Las pruebas bioquímicas presentaron diferencias estadísticamente significativas a partir de la 3ª semana de tratamiento con BZP en los valores de la VSG, FA y DHL, en todas las ratas tratadas, sin embargo, a partir de la 8ª semana se observó una disminución de la FA y DHL en algunos animales administrados con BS (Figura 3). El estudio histopatológico demostró la formación de OS en el fémur tratado. El BZP fue altamente genotóxico en ambas cepas de ratas, observándose una diferencia estadísticamente significativa con la prueba de micronúcleos (MN) desde la primera semana de tratamiento con BZP con una frecuencia de hasta 27.36 ± 0.32 MN en 1000 eritrocitos policrómicos, siendo un poco menos evidente en las ratas W (figura 4).

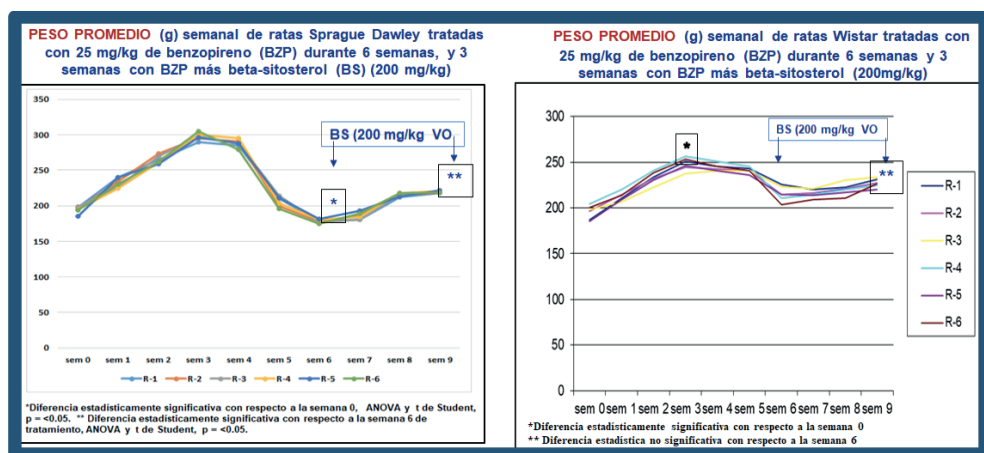
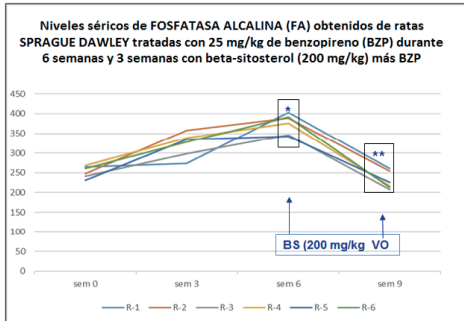
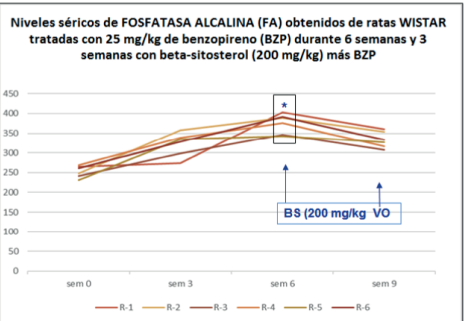


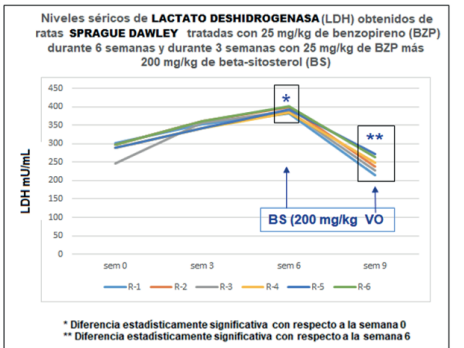
Figura 2. Pesos promedio obtenidos de ratas Sprague Dawley y ratas Wistar tratadas con benzopireno (BZP) y beta-sitosterol (BS)



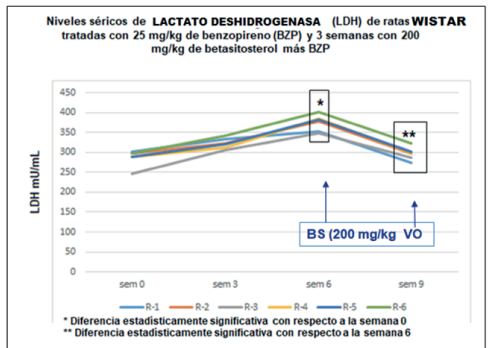
*Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la semana 0, ANOVA y t de Student, $p < 0.05$. ** Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la semana 6 de tratamiento, ANOVA y t de Student, $p < 0.05$.



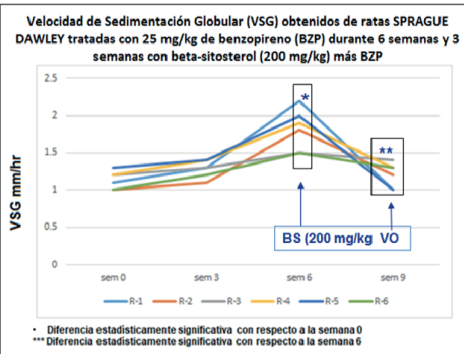
*Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la semana 0, ANOVA y t de Student, $p < 0.05$.



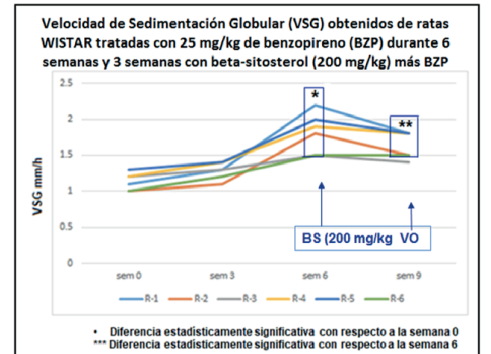
* Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la semana 0
** Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la semana 6



* Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la semana 0
** Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la semana 6



* Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la semana 0
***Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la semana 6



* Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la semana 0
*** Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la semana 6

Figura 3. Valores bioquímicos obtenidos de ratas Sprague Dawley y ratas Wistar tratadas con benzopireno (BZP) y beta-sitosterol (BS)

Columna1	R-1 SD	R-1 W	R2-SD	R-2 W	R-3 SD	R-3 W	R-4 SD	R-4 W	R-5 SD	R-5 W	R-6 SD	R-6 W
Sem 0	1.13±0.16	1±0.5	1.5±.08	2.1±0.4	2.0±0.23	0.93±0.3	1±0.12	1.3±0.4	1.74±0.21	1.98±0.2	1.14±0.32	1.3±0.6
Sem 1	*18.26±0.26	4.97±0.2	*19.8±0.36	5.63±0.2	*19.3±0.36	*7.10±0.1	*20±0.93	*6.73±0.1	*22±0.62	*6.1±0.23	*19.1±0.38	*8.73±0.71
Sem 2	*19.3±0.29	*8.1±0.14	*26.8±0.17	*7.9±0.14	*17.7±0.52	*9.5±0.08	*23.5±0.44	*7.1±0.14	*18.6±0.19	*11.2±0.13	*17.33±0.61	*9.1±0.35
Sem 3	*26.4±0.31	*7.5±0.08	*25±0.12	*11.5±0.8	*29.76±0.11	*13.1±0.1	*26.93±0.61	*9.5±0.12	*29.5±0.24	*13.3±0.32	*25.38±0.33	*11.3±0.36
Sem 4	*20.5±0.22	*14.5±0.4	*24.4±0.38	*18.2±0.1	*28.16±0.21	*19.4±0.5	*23.83±0.27	*16.3±0.23	*27.5±0.34	*14.14±0.21	*27.36±0.14	*16.6±0.17
Sem 5	*27.4±0.51	*19.1±0.6	*28±0.19	*19.8±0.6	*29.76±0.11	*18±0.24	*31.43±0.41	*15.45±0.35	*28.9±0.29	*16.4±0.45	*30.38±0.30	*17.8±0.31
Sem 6	*30.5±0.41	*18.2±0.7	*29.5±0.28	*18.0±0.26	*30.16±0.34	*18.2±0.43	*33.5±0.58	*20.4±0.71	*32.5±0.13	*19.3±0.22	*31.33±0.32	20.6±0.23
Sem 7	*20.5±0.5	**11.2±0.7	*22.2±0.3	*15.8±0.11	*20.5±0.42	*16.4±0.52	*29.1±0.31	*16.4±0.33	*23.4±0.45	*17.4±0.62	*26.4±0.12	**13.8±0.6
Sem 8	*21.2±0.1	**10.6±0.6	*17.5±0.34	*16.8±0.34	*18.24±0.22	*15.4±0.67	**14.3±0.22	**12.3±0.11	**17.4±0.35	*14.2±0.91	**14.5±0.32	**10.1±0.6
Sem 9	**12.6±0.43	**10.3±0.5	**13.2±0.11	*15.2±0.23	**11.16±0.21	*14.8±0.45	**12.5±0.11	**13.6±0.36	**14.2±0.11	**13.7±0.11	**12.5±0.56	**8.3±0.5

Figura 4. Frecuencia de micronúcleos en ratas Sprague Dawley (SD) y ratas Wistar (W) tratadas con benzopireno (BZP) 25 mg/kg por 6 semanas y 3 semanas con beta-sitosterol (BS) 200 mg/kg más BZP.

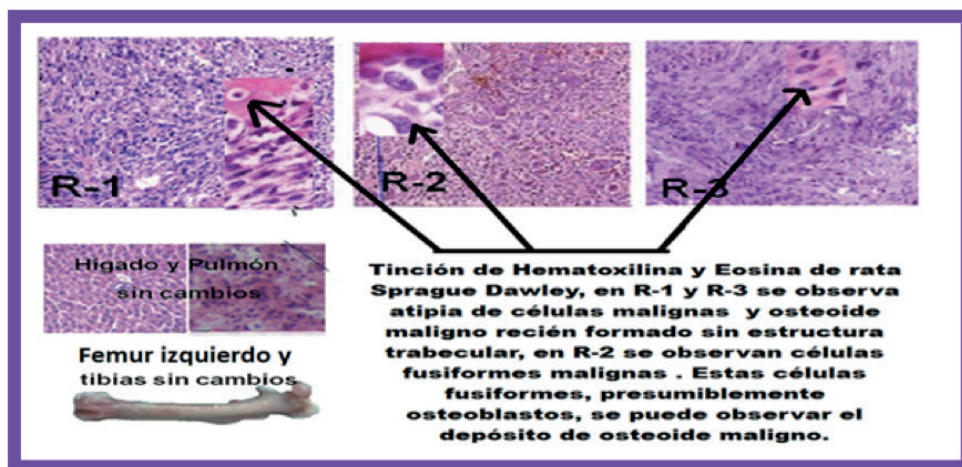


Figura 5. Resultados histológicos de ratas Sprague Dawley tratadas con benzopireno y beta-sitosterol.

DISCUSIÓN

Estudios experimentales en animales sobre benzopireno lo han clasificado como un tóxico que afecta la fertilidad en ratas y otras especies animales, porque los metabolitos resultantes interfieren con la función normal del ovario [26]. Tsai-Turton, et al. [27], en 2007, evaluaron la acumulación de metabolitos de BZP en microsomas hepáticos y testiculares de ratas, hámsters y cerdos, encontrando que varios de estos interfieren con la formación y función de los gametos, contribuyendo así a la infertilidad. En tejidos celulares de hígado y ovario de varias especies (ratas, ratones, cabras, ovejas, cerdos y vacas) se observó que ante la exposición a 5 µg/g de BZP los metabolitos resultantes se adhieren al receptor de estrógenos, reduciendo la actividad de estos; la exposición prolongada a BZP provoca un secuestro de estas en las lipoproteínas de alta densidad que son esenciales para la biosíntesis de hormonas esteroideas en el ovario, lo que conduce a

la reducción de la secreción de gonadotropinas, como la hormona estimulante del foliculo (FSH) y la hormona luteinizante (LH), con resultados negativos. resulta en las etapas finales del desarrollo folicular, disminuyendo la fertilidad [28,29]. Se ha informado que BZP es un potente inductor de OS, con características similares a la fisiopatología de OS en humanos y la supervivencia es de hasta 8 meses en animales tratados [14]. Dados los efectos cancerígenos y mutagénicos del Benzopireno, proponemos este compuesto como sustancia química para inducir osteosarcoma en ratas Sprague Dawlwy. Wester y colegas [30], demostraron el potencial carcinogénico de la administración oral de BZP, estos investigadores expusieron a 104 ratas Wistar durante cinco días a la semana a cantidades de 0, 3, 10 o 30 mg de BZP por kg de peso corporal, durante dos años y posteriormente se realizaron estudios histopatológicos. Los resultados mostraron el desarrollo de tumores en el hígado en 99 de las 104 ratas, con una dosis estimada de 3-5 mg/kg, con un intervalo de confianza del 90%, de igual forma mostraron sarcomas en tejidos blandos, como la piel. y mamas con una dosis de 10 mg/kg. Tanto los tumores de piel como los de hígado se consideraron relevantes para humanos en dosis altas.

Respecto a beta-sitosterol en una revisión publicada por Ovesna et al [31], grabaron la inhibición experimental de desarrollo de cáncer de colon y de mama por taraxasterol y β -sitosterol. Indicaron que estos compuestos pueden afectar a diferentes niveles de desarrollo del tumor, tales como sus efectos inhibitorios sobre la creación, promoción e inducción de las células cancerosas, así como inhibición de la invasión de las células del tumor y metástasis. Suplemento dietético con BS disminuye los niveles de 17β -estradiol (E2) lo que sugirió que altos niveles de fitosteroles puede tener efecto beneficioso en las mujeres con cáncer de mama [32]

El análisis genotóxico se utiliza para determinar cuánto daño ejerce en el DNA los xenobióticos, que pueden por lo tanto afectar a humanos expuestos a ellas. Paniagua-Pérez [33] reportaron la genotoxicidad del β -sitosterol, incluyendo el ensayo de toxicidad aguda, que demostró potencial letal baja (38%) de este compuesto. Los resultados indicaron que no SCE (hermana intercambios del cromátide) aumento fue inducido por las dosis probadas (200, 400, 600 y 1000 mg/kg), así como no hay cambios en la cinética de proliferación celular, o en el índice mitótico. En dicho informe, la más alta dosis aplicada mostró el 80% de la DL50. Por esta razón, β -sitosterol no se considera como genotóxico y citotóxico. La seguridad de este compuesto estimula los científicos para llevar a cabo más investigaciones farmacológicas de este esterol [33].

Los resultados de un estudio demostraron eso beta-sitosterol en la carcinogénesis de colon inducida por el 1, 2-dimetilhidrazina en elevación de ratas causadas en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, que recomiendan el compuesto como un medicamento quimiopreventivo efectivo para la carcinogénesis de colon [34]. Beta-sitosterol estimula enzimas antioxidantes por la activación del receptor de estrógeno/PI3-cinasa-dependent pathway. La proporción de glutatión GSH y GSH total se recuperó después del

tratamiento de β -sitosterol, sugiriendo que este fitosterol puede ser una buena alternativa de tratamiento ROS [35].

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que la administración de BZP contribuye en ratas Sprague Dawley y Wistar a la inducción de OS, datos preliminares sugieren que la administración de BS puede ayudar a disminuir la actividad carcinogénica del BZP, lo que nos da la pauta para continuar con otros estudios que permitan considerar el uso del BS en personas con OS.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Paniagua-Pérez Rogelio, Franco y Bourland Rebecca E, Madrigal-Bujaidar Eduardo, Álvarez-González Isela, diseñaron este tema de investigación y escribieron el manuscrito; Martínez-Canseco Carlos J, Araujo Monsalvo Victor M, Domínguez Hernández Víctor M, Martínez Coria Elisa, Diseñaron y ejecutaron parte de la metodología; Cruz Hernández Lidia, Ruiz Rosano Lidia, García Campillo Hiram, Quintana Armenta Alejandra, realizaron los experimentos y recolectaron y analizaron los datos.

AGRADECIMIENTO:

Los autores desean agradecer a por su apoyo a de la Fuente Sánchez Jorge A y Mejenes López Ricardo N, por su apoyo en la ejecución de la etapa experimental en el Bioterio del INRLGII.

CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors of this manuscript we have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

1. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA (2009) Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer* 115: 1531.
2. Harrison DJ, Geller DS, Gill JD, et al. (2018) Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 18: 39-50.
3. Anderson ME (2016) Update on survival in osteosarcoma. *Orthop Clin North Am* 47: 283-292.
4. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA (2009) International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int J Cancer* 125: 229-234.
5. Morrow JJ, Khanna C (2015) Osteosarcoma genetics and epigenetics: emerging biology and candidate therapies. *Crit Rev Oncog* 20: 173-197.

6. Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco M, et al. (2011) Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? *Eur J Cancer* 47: 2431.
7. Aljubran AH, Griffin A, Pintilie M, et al. (2009) Osteosarcoma in adolescents and adults: survival analysis with and without lung metastases. *Ann Oncol* 20: 1136.
8. Ottaviano L, Schaefer KL, Gajewski M, et al. (2010) Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: a trans-European EuroBoNet effort. *Genes Chromosomes and Cancer* 49: 40-51.
9. Ek ET, Dass CR, Choong PF (2006) Commonly used mouse models of osteosarcoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 60: 1-8.
10. Mohseny AB, Machado I, Cai Y, et al. (2011) Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease. *Laboratory Investigation* 91: 1195-1205.
11. Mestas J, Hughes CC (2004) Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *Journal of immunology* 172: 2731-2738.
12. Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, et al. (2011) Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol* 2011: 969618.
13. Volk SW, Bohling MW (2013) Comparative wound healing--are the small animal veterinarian's clinical patients an improved translational model for human wound healing research? *Wound Repair Regen* 21: 372-381.
14. Brunschwig, AD Bissell (1938) Production of osteosarcoma in a mouse by the intramedullary injection of 1,2-benzpyrene. *Archives of Surgery* 36.
15. Akeida K, Nishimura A, Satonaka H, et al. (2009) Three-dimensional alginate spheroid culture system of murine osteosarcoma. *Oncology Reports* 22: 997-1003.
16. Baker JR (1946) *Cytological Technique*. Methuen, London.
17. Liu Z, Wang J, Yin P, et al. (2009) RGD-fasI induces apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Mol Immunol* 6: 285-293.
18. Zurera LJ, Canis M, Marchal T, (2008) Histological study of the effect of pre-transplant chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *Radiología* 50: 47-53.
19. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2010) Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 92: 1-853.
20. Salehi F, Turner MC, Phillips KP, et al. (2008) Review of the etiology of breast cancer with special attention to organochlorines as potential endocrine disruptors. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11: 276-300.
21. Lawal AT (2017) Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environmental Science* 3.
22. Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, et al. (2001) Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 92: 1525- 1530.

23. Barnes DW, Carr TE, Evans EP, et al. (1970) 90Sr-induced osteosarcomas in radiation chimaeras. *Int J Radiat Biol* 18: 531- 537.
24. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, et al. (1991) Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. *Environm Molec Mut* 18: 277-290.
25. Paniagua-Pérez R, Madrigal-Bujaidar E, Reyes-Cadena S, et al. (2008) Cell protection induced by beta-sitosterol: inhibition of genotoxic damage, stimulation of lymphocyte production, and determination of its antioxidant capacity. *Arch Toxicol* 103: 569- 573.
26. (2008) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food [1] - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J* 724: 2-114.
27. Tsai-Turton M, Nakamura BN, Luderer U (2007) Induction of apoptosis by 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene in cultured preovulatory rat follicles is preceded by a rise in reactive oxygen species and is prevented by glutathione. *Biol Reprod* 77: 442- 451.
28. Smith TL, Merry ST, Harris DL, et al. (2007) Species-specific testicular and hepatic microsomal metabolism of benzo(a) pyrene, an ubiquitous toxicant and endocrine disruptor. *Toxicol In Vitro* 21: 753-758.
29. Harris DL, Huderson AC, Niaz MS, et al. (2009) Comparative metabolism of benzo(a)pyrene by ovarian microsomes of various species. *Environ Toxicol* 24: 603-609.
30. Wester PW, Muller JJ, Slob W, et al. (2012) Carcinogenic activity of benzo[a]pyrene in a 2 year oral study in Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 50: 927-935.
31. Ovesna Z, Vachalkova A, Horvathova K. Taraxasterol and beta-sitosterol: new naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. *Neoplasma*. 2004;51:407-14.
32. Ju YH, Clausen LM, Allred KF, Almada AL, Helferich WG. β -sitosterol, β -sitosterol glucoside, and a mixture of β -sitosterol and β -sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells *In vitro* and in ovariectomized athymic mice. *J Nutr*. 2004;134:1145-51.
33. Paniagua-Perez R, Madrigal-Bujaidar E, Reyes-Cadena S, Molina-Jasso D, Gallaga JP, Silva-Miranda A, et al. Genotoxic and cytotoxic studies of beta-sitosterol and pteropodine in mouse. *J Biomed Biotechnol*. 2005;2005:242-7.
34. Baskar AA, Al Numair KS, Paulraj MG, Alsaif MA, Al Muamar M, Ignacimuthu S. β -Sitosterol prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status and histoarchitecture in rats with 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. *J Med Food*. 2012;15:335-43.
35. Vivancos M, Moreno JJ. β -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free Radical Biol Med*. 2005;39:91-7.
36. Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, et al. (2011) Neutral loss and precursor ion scan tandem mass spectrometry for study of activated benzopyrene-DNA adducts. *Anal Bioanal Chem* 401: 1983-1991.
37. Culp SJ, Gaylor DW, Sheldon WG, et al. (1998) A comparison of the tumors induced by coal tar and benzo[a]pyrene in a 2-year bioassay. *Carcinogenesis* 19: 117-124. 37. Ozaki T, Nakagawara A (2010) p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *J Biomed Biotechnol* 2011.