

Papel del Rofecoxib como inhibidor de la carcinogénesis en colon. Estudio experimental en ratas.

Javier Ibarra de la Rosa*, F. José Noguera Aguilar*, Isabel Amengual Antich**, Ángel Plaza Martínez***, Julio Moyano Muñoz*

* Hospital Son Llàtzer, Palma de Mallorca ESPAÑA

** Hospital de Manacor ESPAÑA

*** Hospital Universitario dr. Peset, Valencia. ESPAÑA

Resumen

Introducción: se ha comprobado a nivel clínico y experimental la existencia de sobreexpresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en los tumores de colon, por lo que los inhibidores de dicha enzima podrían tener un efecto preventivo.

El objetivo del estudio es investigar el efecto de la inhibición de la ciclooxigenasa empleando un modelo de carcinogénesis cólica, inducida farmacológicamente, en ratas.

Material y métodos: estudio experimental en 65 ratas Sprague-Dawley macho, distribuidas en 4 grupos: grupo control (n=20), carcinogénesis con 1-2 dimetilhidrazina; grupo ácido acetilsalicílico (n=15), carcinogénesis y adición de AAS; grupo Inhibidores COX-2 baja dosis (n=15), carcinogénesis y adición de rofecoxib 1.2 mg/kg y grupo Inhibidores COX-2 alta dosis (n=15), carcinogénesis y rofecoxib 3 mg/kg. El principal parámetro evaluado es el porcentaje de tejido cólico neoplásico y la expresión de COX-2 en el colon normal y neoplásico.

Resultados: la expresión de COX-2 es superior en los adenocarcinomas frente a los adenomas. El rofecoxib a dosis altas reduce el porcentaje de colon ocupado por adenocarcinomas inducidos ($p < 0.01$). El rofecoxib a dosis bajas presentó el mismo efecto sobre los adenomas ($p < 0.05$), sin efecto sobre los adenocarcinomas. La expresión COX-2 es superior en los adenocarcinomas frente a los adenomas. El rofecoxib redujo la expresión COX-2 respecto al control y AAS ($p < 0.01$), tanto en los adenomas como en los adenocarcinomas, no mostrando este efecto sobre el colon normal.

Conclusiones: nuestro estudio parece demostrar el papel del rofecoxib en la inhibición de la carcinogénesis cólica inducida en ratas, reduciendo la expresión COX-2 en los tumores y disminuyendo el porcentaje de colon neoplásico..

Introduccion

Existen dos estrategias para la prevención del cáncer colorectal (CCR): la detección precoz y la quimioprevención. Ambas pretenden reducir la incidencia y mortalidad del CCR⁽¹⁻³⁾. En la quimioprevención se emplean agentes químicos para prevenir el desarrollo del proceso de carcinogénesis. Entre ellos se encuentran los inhibidores de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2).

La ciclooxigenasa (COX) es la enzima que cataliza los primeros pasos en la síntesis de prostaglandinas. Existen dos isoformas: la COX-1, constitutiva y expresada siempre en todos los tejidos y la COX-2, inducible por varios estímulos generalmente asociados con la inflamación aguda o crónica⁽⁴⁻⁶⁾. La COX-2, además, parece estar relacionada con la proliferación neoplásica en las criptas

aberrantes del colon, mediante 2 mecanismos: inhibición de la apoptosis (relacionada con el desarrollo tumoral y con la aparición de metástasis) y estímulo de la angiogénesis en el tumor⁽⁷⁾ (desarrollo local y capacidad de crecimiento). De esta manera se ha observado sobreexpresión de COX-2 en tumores cólicos: numerosos estudios han aislado la enzima en el estroma y en el epitelio de adenomas cólicos y del CCR⁽⁸⁻¹⁰⁾, llegando algunos autores a relacionar la intensidad de expresión COX-2 con la supervivencia⁽¹¹⁾. El objetivo de nuestro estudio fue averiguar si la inhibición selectiva de la COX-2 tiene un efecto inhibitorio de la carcinogénesis inducida en el colon de la rata. Como objetivo secundario se valoró si dicho efecto es dosis dependiente. Existe una evidencia creciente de que el ácido acetilsalicílico (AAS) y otros anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) reducen el riesgo de padecer cáncer colorectal. De ellos, el Rofecoxib posee el mayor efecto inhibitorio sobre la COX-2.

Material y Métodos

En el estudio se incluyeron 65 ratas Sprague-Dawley (OFA-SD-hr) macho (Criffa, España), con una media de peso de 230 g (rango 190-280 g), que fueron distribuidas aleatoriamente a uno de los grupos: control (n=20), con carcinogénesis química con 1-2 DMH (Sigma-Aldrich, España); grupo AAS (n=15), con carcinogénesis química y adición de ácido acetilsalicílico a dosis diaria de 30 mg/kg, grupo ICOX-2 a bajas dosis (BD-ICOX-2) (n=15), con carcinogénesis y adición de rofecoxib a dosis de 1.2 mg/kg, y grupo ICOX-2 a altas dosis (AD-ICOX-2) (n=15), con carcinogénesis y adición de rofecoxib a dosis de 3 mg/kg.

Fármacos empleados.

Se administraron dieciocho inyecciones subcutáneas semanales de 1-2 DMH, a una dosis semanal de 25 mg/kg de peso. El rofecoxib y AAS fueron administrados por vía oral, mezclados con la dieta oral.

Seguimiento y sacrificio.

Los animales fueron sacrificados en la semana 20, con sobredosis anestésica. El colon fue extirpado en su totalidad y las piezas fueron fijadas en solución de formaldehído al 10%.

Evaluación de los tumores cólicos.

Se examinó el colon de cada animal determinando tres parámetros: número de tumores, superficie tumoral y porcentaje tumoral (superficie global del colon/superficie del colon ocupado por tumor). En el estudio histológico se determinaron el tipo histológico, el grado histológico, la invasión tumoral y la afectación ganglionar.

Expresión cólica de ciclooxigenasa-2.

Se determinó la expresión de COX-2 en los adenomas y adenocarcinomas cólicos, así como en la mucosa normal adyacente a cada neoplasia. Las tinciones inmunohistoquímicas se realizaron sobre cortes de tejidos de 5-mm, fijados en formol al 10% y embebidos en parafina: Se empleó Ac anti-COX-2 (Santa Cruz Biotech., USA). Se analizó la positividad o negatividad de dicha expresión.

Análisis estadístico.

Los datos se analizaron con los programas SPSS y G-Stat, y el análisis estadístico se realizó con modelos Anova unifactorial (Test de Scheffé) y prueba Chi-cuadrado (χ^2). Se consideraron estadísticamente significativos valores de p inferior a 0.05.

Resultados

Se analizan a continuación los resultados de los 65 animales incluidos en el estudio.

Número de tumores: se hallaron 97 tumores cólicos, 72 adenocarcinomas y 25 adenomas. (Tabla 1). En el grupo control, la media de adenocarcinomas fue de 1.55 tumores malignos por animal, mientras que en los grupos con AAS y AD-ICOX-2 la media fue de 0.86, diferencias que fueron significativas ($p < 0.05$, Scheffé).

Superficie tumoral microscópica: en total 31.56 cm² de superficie cólica tumoral, 31.44 cm² correspondientes a adenocarcinomas. Las diferencias entre los grupos no fueron significativas.

Porcentaje tumoral microscópico: el mayor porcentaje se obtiene en el grupo control: 4.56%; en el grupo con rofecoxib a dosis bajas se reduce hasta el 3.52%; en el grupo con AAS baja al 2.94% y es inferior al 1% en el grupo con rofecoxib a dosis de altas. Las diferencias entre el último grupo y los grupos control y BD-ICOX-2 fueron significativas ($p < 0.01$, Scheffé, figura 1).

Expresión cólica de ciclooxigenasa-2: la expresión COX-2 fue más de 6 veces superior en los adenocarcinomas, (0.0043 adenomas y 0.27 adenocarcinomas), diferencia que fue significativa ($p < 0.01$, χ^2). En los adenocarcinomas se redujo la expresión COX-2 en los grupos con rofecoxib a dosis bajas y altas, respecto al grupo con AAS y control ($p < 0.001$, χ^2 , tabla 2). Esta disminución (estadísticamente significativa) sólo se apreciaba en el epitelio y estroma de los adenocarcinomas y no en la mucosa normal.

El 60% de la expresión COX-2 se halló en el epitelio cólico (figuras 2,3) y el 40% en el estroma cólico (figuras 4,5).

Estudio histológico: los adenocarcinomas fueron bien diferenciados en el 33.33% de los casos, moderadamente diferenciados en 37.5% y pobremente diferenciados en el 29.16% (figuras 6,7). Se aislaron un total de 344 ganglios linfáticos, albergando metástasis 18 de ellos (5.23%). Ninguna de estas diferencias fue significativa.

	NUMERO ADENOCAR.	MEDIA ADENOCAR.	NUMERO ADENOMAS	MEDIA ADENOMAS
CONTROL	28	1.55	12	0.65
AAS	13	0.86 *	8	0.53
BD-ICOX-2	18	1.28	0	0 *
AD-ICOX-2	13	0.86 *	5	0.38

Tabla 1. Valores totales y medios de adenomas y adenocarcinomas (*diferencia significativa respecto al control).

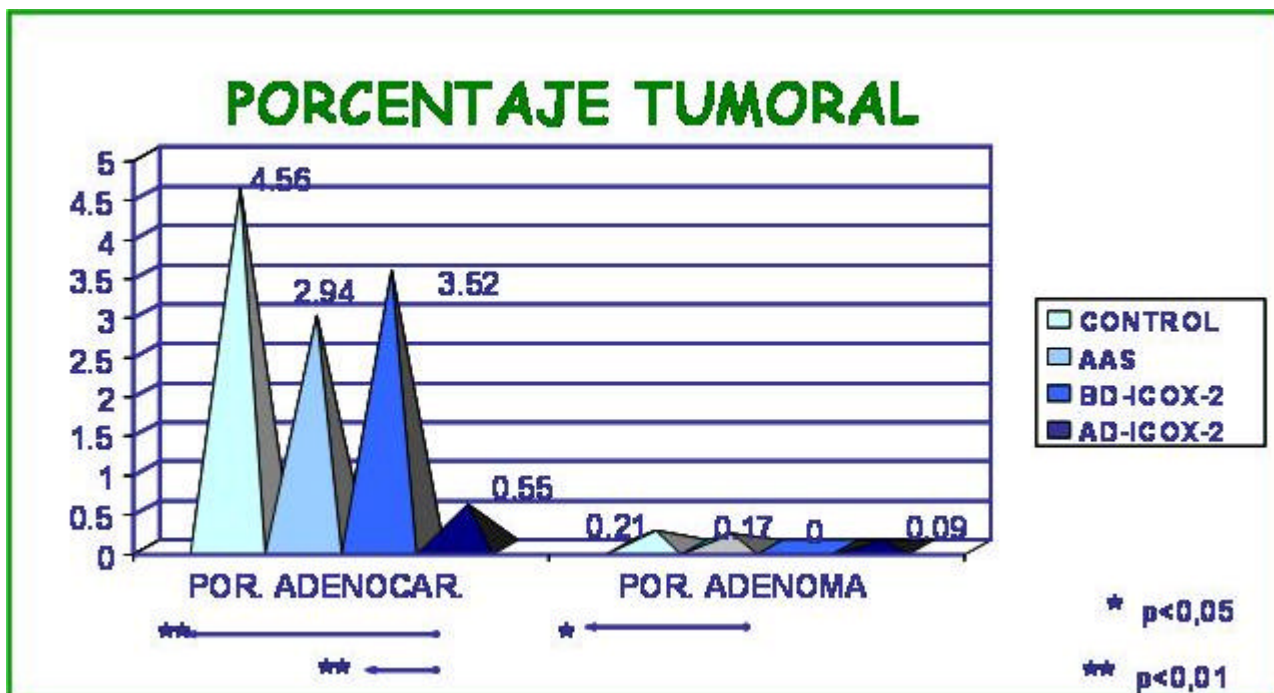


Figura 1. Porcentaje tumoral de adenomas y adenocarcinomas en los grupos de estudio.

	COX-2 TUMORAL ADENOCAR.	COX-2 GLOBAL ADENOCAR.	COX-2 TUMORAL ADENOMAS	COX-2 GLOBAL ADENOMAS
CONTROL	0.25	0.44	0.46	0.66
AAS	0.38	0.91	0.37	0.71
BD-ICOX-2	0 *	0.43	0 *	0
AD-ICOX-2	0.005 *	0.3	0 *	0.14

Tabla 2. Expresión de COX-2 en los adenomas y adenocarcinomas cólicos y en el global del colon (mucosa sana y tumoral).

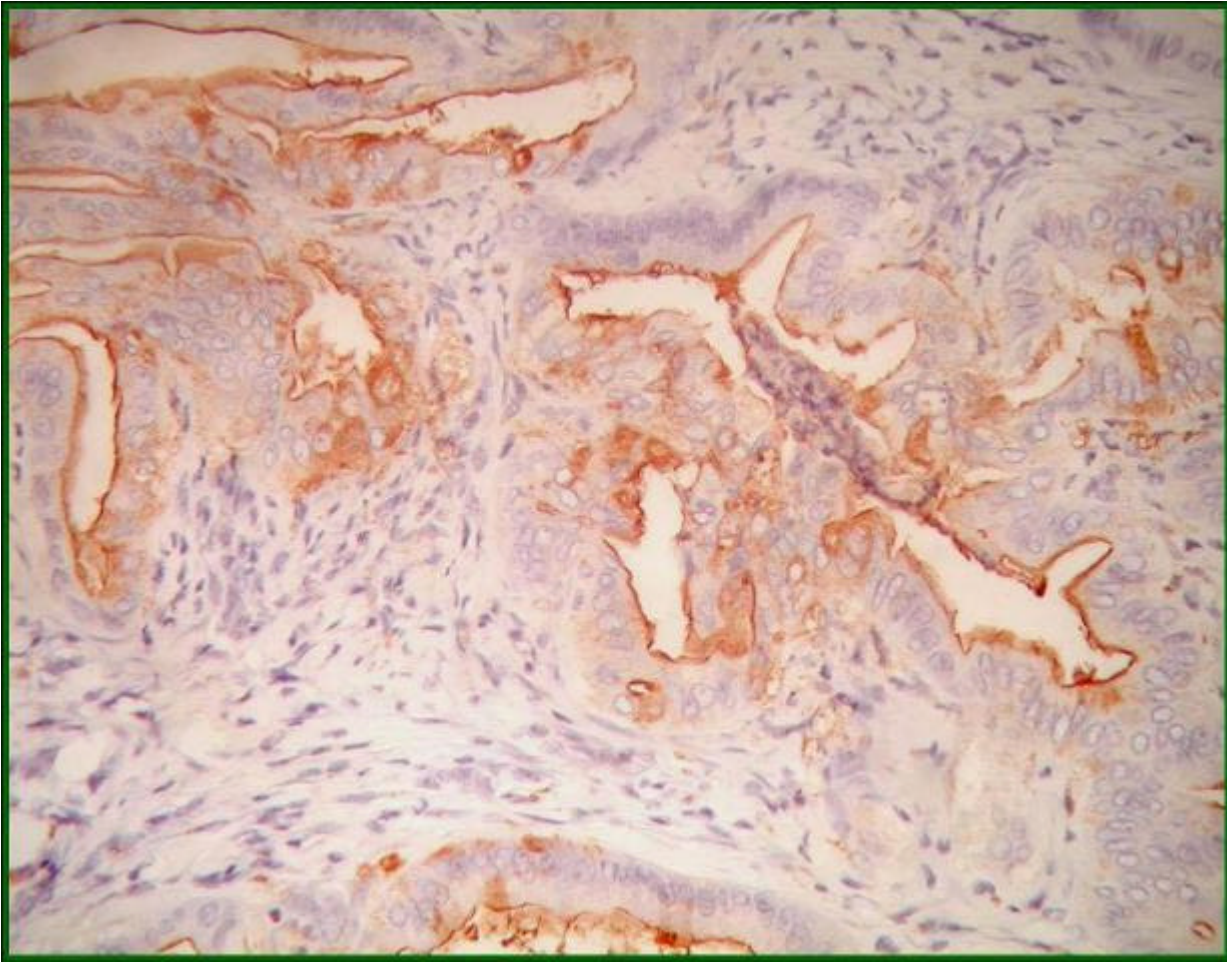


Figura 2. Positividad para COX-2 en componente epitelial tumoral. AC anti-COX-2 (x 200)

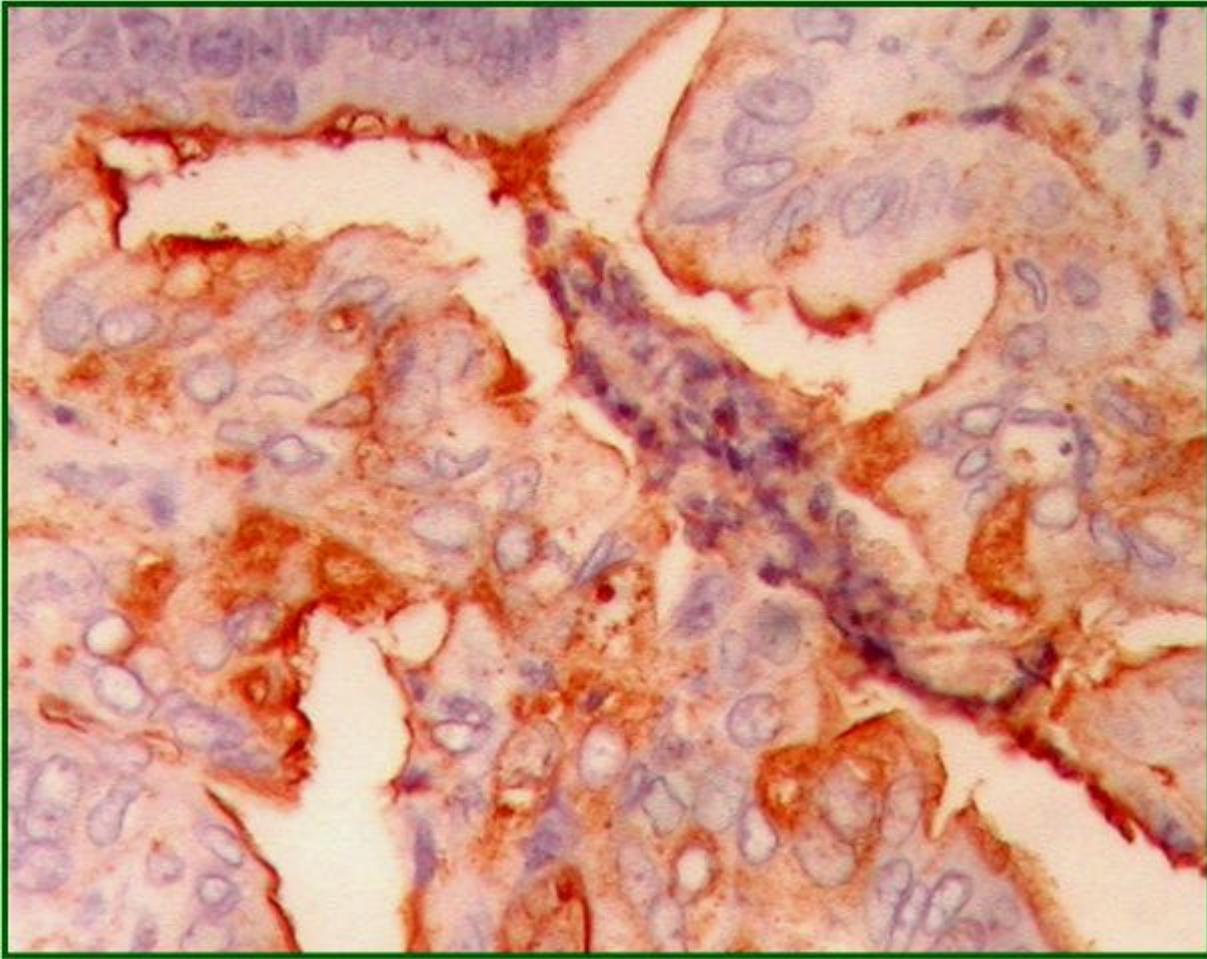


Figura 3. Positividad para COX-2 en componente epitelial tumoral. AC anti-COX-2 (x 400)

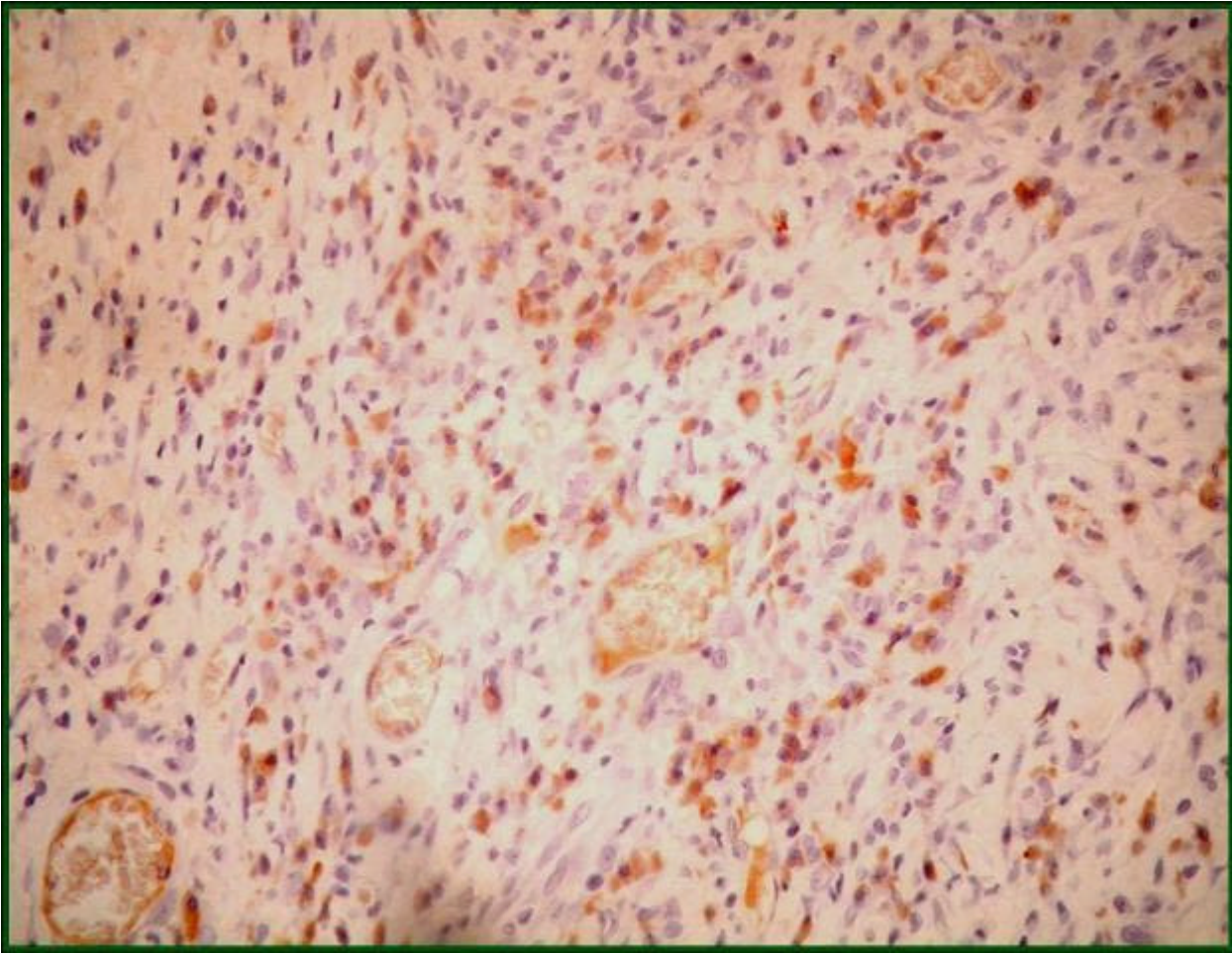


Figura 4. Positividad para COX-2 en componente estromal. AC anti-COX-2 (x 200)

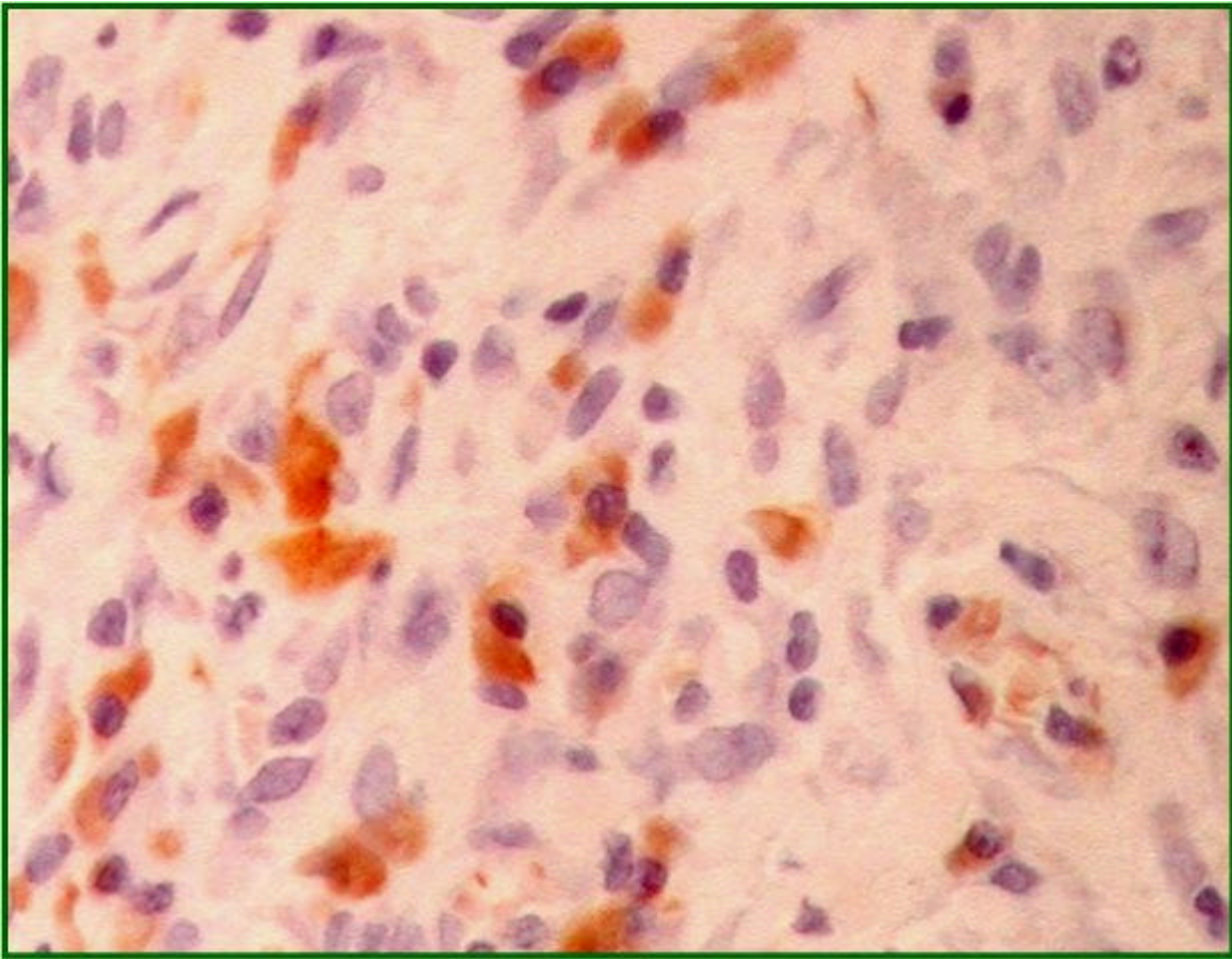


Figura 5. Positividad para COX-2 en componente estromal. AC anti-COX-2 (x 400)

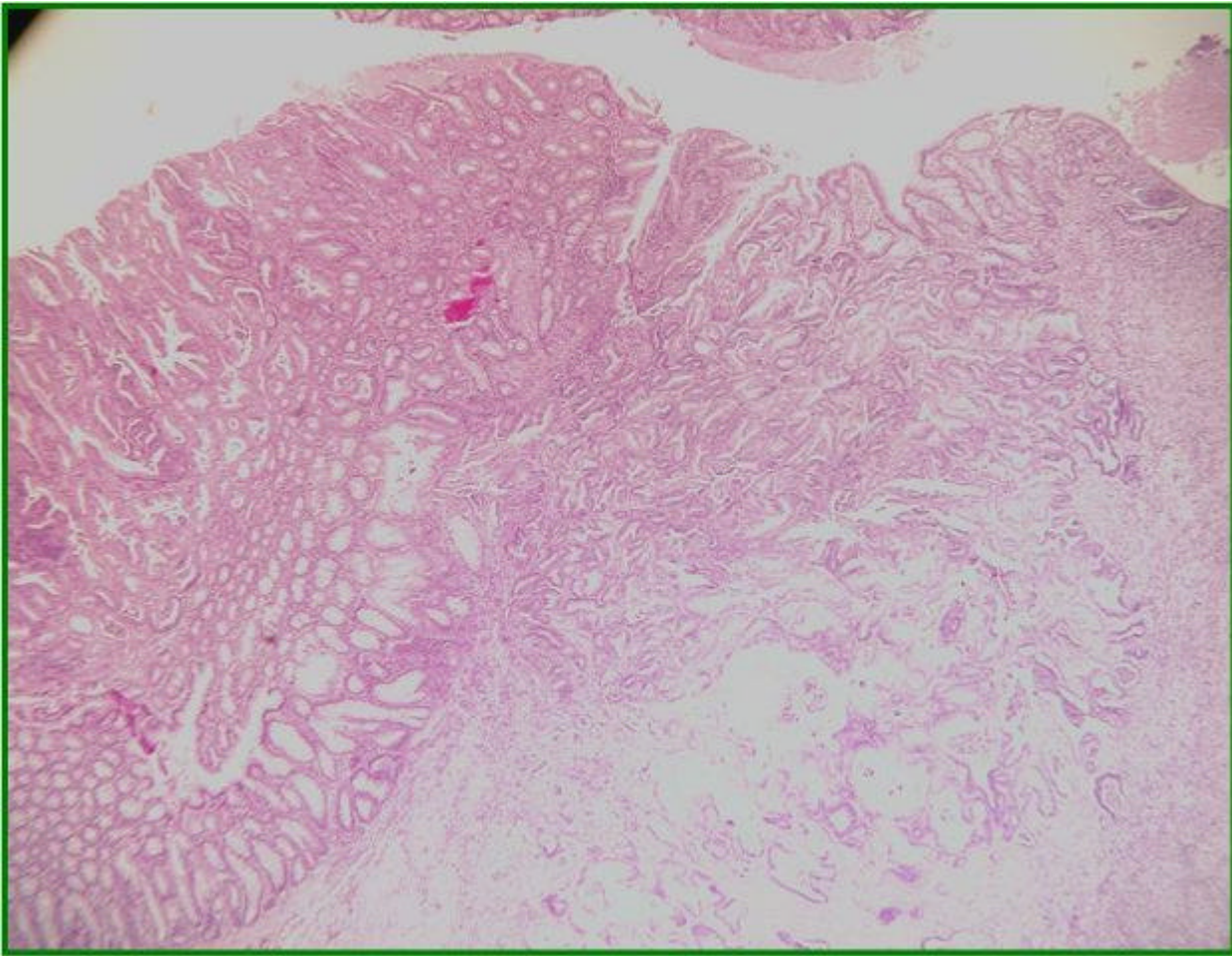


Figura 6. Mucosa colónica con cambio adenomatoso en continuidad con adenocarcinoma infiltrante moderadamente diferenciado. HE (x40)

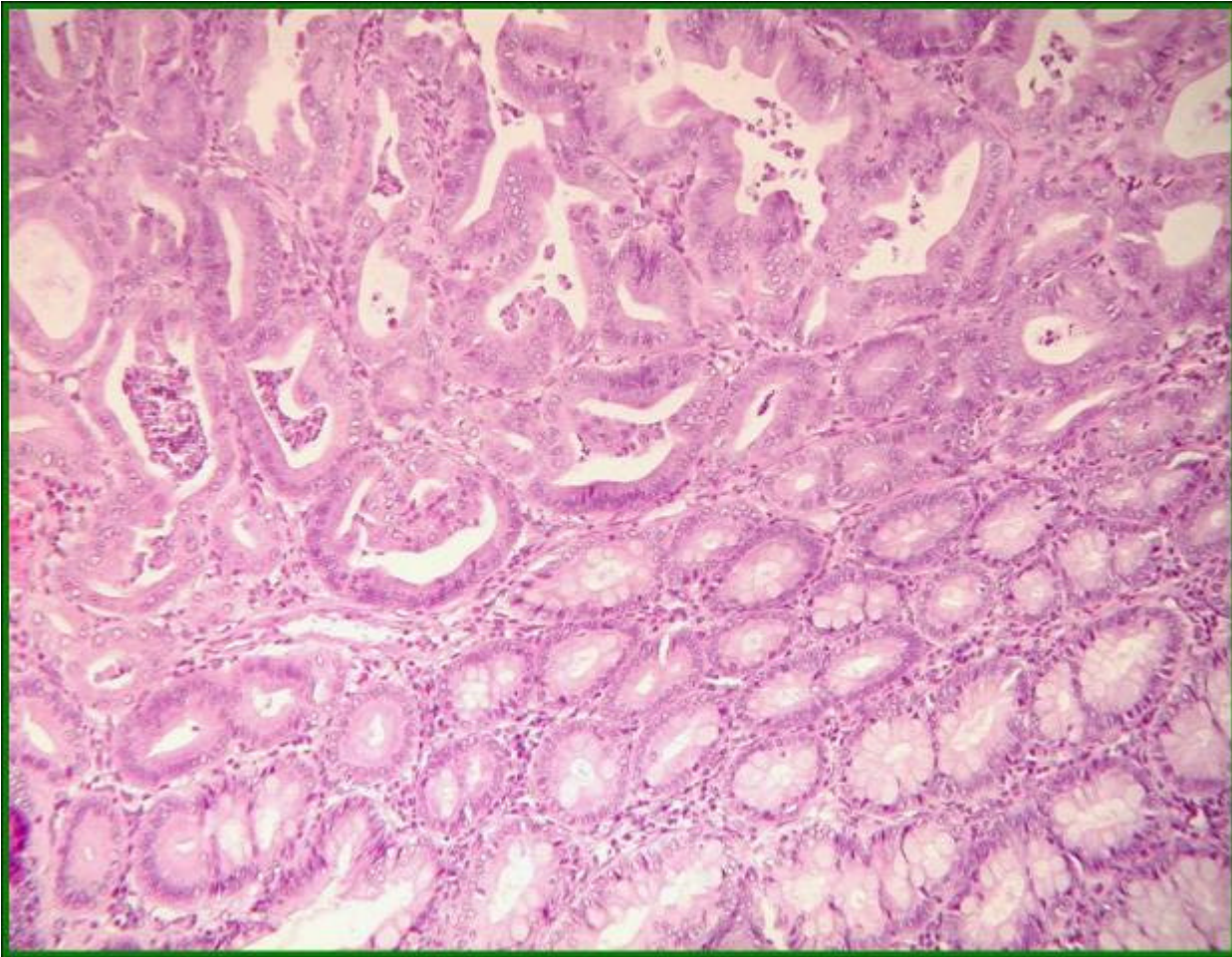


Figura 7. Mucosa colónica con cambio adenomatoso (displasia moderada-severa). HE (x200)

Discusión

La primera evidencia de la relación entre los AINEs y el cáncer de colon se deriva de un estudio epidemiológico realizado por Kune en 1988⁽¹²⁾, observando la menor incidencia de CCR en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal consumidores crónicos de sulfasalazina.

Se han publicado estudios evaluando los AINEs en la quimioprevención del CCR en modelos animales, mostrando que reducen su incidencia y multiplicidad^(13,14).

La primera evidencia de la eficacia de los inhibidores de la COX-2 en animales se observó en ratones Min (multiple intestinal neoplasia). En ellos, la administración de celecoxib frente a piroxicam produce una disminución mayor del número de adenomas.

Del mismo modo, la administración de rofecoxib produce efectos similares en estos ratones⁽¹⁵⁻¹⁸⁾.

Existen escasos trabajos con rofecoxib, dos veces más selectivo por la COX-2 que el celecoxib. La mayoría de estudios sólo hacen referencia al número de tumores cólicos. Creemos que se debe evaluar el porcentaje tumoral microscópico, dado que es el único parámetro que relaciona la cantidad de tejido tumoral con la magnitud del colon estudiado.

Las dosis usadas en este estudio son mayores de las empleadas en artrosis y dolor agudo, pero la inhibición de la COX-2 es mayor a dosis más altas y la tolerancia es aceptable⁽¹⁹⁾.

Atendiendo al número de adenocarcinomas inducidos, se halló una reducción significativa cuando se administró AAS y rofecoxib a dosis altas, pero al analizar el porcentaje tumoral, sólo el inhibidor selectivo de la COX-2 a altas dosis mostró una reducción significativa. Este efecto frenador de la carcinogénesis inducida se ha acompañado de reducciones significativas de la expresión de la enzima COX-2 determinada por inmunohistoquímica en el tejido neoplásico.

Conclusiones

Con los resultados obtenidos se puede ver el efecto preventivo de la adición de dosis altas de COX-2 en la formación de adenocarcinomas cólicos inducidos en ratas. El COX-2 a dosis bajas consiguió este mismo efecto protector frente a la aparición de adenomas cólicos. El inhibidor no selectivo de la COX, AAS, sólo redujo el número de adenocarcinomas, sin conseguir una reducción en el porcentaje tumoral. La dosis de AAS empleada fue superior a la de otros estudios en los que se analizaba su efecto sobre las criptas colónicas displásicas, sin hallar un efecto claro sobre las neoplasias cólicas inducidas. Estos resultados experimentales en el animal de laboratorio precisarán de estudios posteriores para investigar el efecto quimiopreventivo sobre el CCR de las dosis altas de inhibidores de la COX-2.

Bibliografía

- 1.- Lieberman DA. Screening for colorectal cancer. *Clin Cornerstone* 2002;4:1-10.
- 2.- Benamouzig R, Chaussade S. La chimioprevención du cancer colorectal. *Presse Med* 2002;31:124-128.
- 3.- Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA* 1999;282 (13):1254-1257.
- 4.- Vane JR, Bakle YS, Botting RM. Cyclo-oxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97-120.
- 5.- Brooks P, Emery P, Evans JF, Fenner H, Hawkey CJ, Patrono C, et al. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2. *Rheumatology* 1999;38:779-788.
- 6.- Lipsky PE, Brooks P, Crofford LJ, DuBois R, Graham D, Simon LS, et al. Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. *Arch Intern Med* 2000;160:913-920.
- 7.- Williams CS, Mann M, DuBois R. The role of cyclo-oxygenases in inflammation, cancer and development. *Oncogene* 1999;18:7908-7916.
- 8.- DuBois RN, Radhika A, Reddy BS, Entingh AJ. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology* 1996;110:1259-1252.
- 9.- Bamba H, Ota S, Kato A, Adachi A, Itoyama S, Matsuzaki F. High expression of cyclooxygenase-2 in macrophages of human colonic adenoma. *Int J Cancer* 1999;83:470-475.
- 10.- Reddy BS, Hirose Y, Lubet R, Steele V, Kelloff G, Paulson S, et al. Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. *Cancer Res* 2000;60:293-297.
- 11.- Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase -1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* 1995;55:2556-2559.
- 12.- Kune GA, Kune S, Watson LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations and medications.: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res* 1988; 48: 4399-4404.
- 13.- Wargovich MJ, Chen CD, Harris C. Inhibition of aberrant crypt growth by nonsteroidal anti-inflammatory agents an differentiation agents in the rat colon. *Int J Cancer* 1995; 60: 515-519.
- 14.- Rao CV, Rivenson A, Simi B, Zang E, Kelloff G, Steele V, et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Cancer Res* 1995; 55: 1464-1472.
- 15.- Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, et al. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the Apc gene. *Science* 1992; 256: 668-670.
- 16.- Jacoby RF, Seibert K, Cole CE, Kelloff G, Lubet RA. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis. *Cancer Res* 2000; 60: 5040-5044.
- 17.- Oshima m, Murai N, Kargman S, Arguello M, Luk P, Kwong E, et al. Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apc⁷¹⁶ mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 2001; 61: 1733-1740.
- 18.- **Evans JF.** Rofecoxib (vioxx), a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, is chemopreventive in a mouse model of colon cancer. *Am J Clin Oncol* 2003; 26(4): 62-5.
- 19.- Depre M, Ehrlich E, Van Hecken A, De Lepeleire I, Dallob A, Wong P, et al. Pharmacokinetics, COX-2 specificity, and tolerability of supratherapeutic doses of rofecoxib in humans. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56(2): 167-174.