

ORIGINAL PAPERS

Influence of rofecoxib on experimental colonic carcinogenesis in rats

J. F. Noguera Aguilar, A. Plaza Martínez¹, I. Amengual Antich², J. M. Morón Camis³, C. Tortajada Collado⁴ and J. J. Pujol Tugores⁵

¹IUNICS. General Surgery Unit and Digestive Diseases. Son Llàtzer Hospital. Balearic Islands. ²Vascular Surgery Department. Dr. Peset University Hospital. Valencia. ²Pathology Department. Manacor Hospital Foundation. Valencia. ³General and Digestive Tract Surgery. General Surgery Department. Son Dureta University Hospital. ⁴General Nurse. Son Dureta University Hospital. ⁵General and Digestive Tract Surgery. Son Llàtzer Hospital. Balearic Islands. Spain

Noguera Aguilar JF, Plaza Martínez A, Amengual Antich I, Morón Camis JM, Tortajada Collado C, Pujol Tugores JJ. Influence of rofecoxib on experimental colonic carcinogenesis in rats. Rev Esp Enferm Dig 2004; 96: 678-686.

ABSTRACT

Aim: to investigate the effect of a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, rofecoxib, in the prevalence of experimental colon tumors in rats.

Experimental design: experimental study with 35 male Sprague-Dawley rats, divided into four groups: a) control group without experimental manipulation (n = 5); b) pharmacological carcinogenesis with 1-2 dimethylhydrazine dihydrochloride (n = 10); c) pharmacological carcinogenesis and addition of acetylsalicylic acid (AAS) (n = 10); and d) carcinogenesis and addition of rofecoxib (n = 10). Carcinogenesis was induced with 1-2 dimethylhydrazine at a weekly dose of 25 mg/kg for 18 weeks. Colon tumors were isolated at 20 weeks. Antiinflammatory agents were given at a dose of AAS 30 mg/kg and rofecoxib at 3 mg/kg.

Results: the percentage of colonic tumors was significantly reduced in the rofecoxib group. This result was found for all tumors and for the malignant lesions, adenocarcinomas.

Conclusions: rofecoxib, a selective COX-2 inhibitor, reduced the percentage of drug-induced neoplastic glandular tissue in rats.

Key words: Rofecoxib. Colorectal cancer. Rat. Adenocarcinoma. AAS. Cyclooxygenase.

Recibido: 24-09-03.

Aceptado: 17-02-04.

Correspondencia: José Francisco Noguera Aguilar. Avenida Antonio Maura, 91, bajo 11. 07009 Pont d'Inca. Baleares. Fax: 971 202 173. e-mail: jnoguera@hsll.es.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the most common digestive cancer in Western Europe and in the United States (1), and the second leading cause of death in the Western world (2). In our country, it has an incidence of 20-30 cases per 100,000 inhabitants per year, and is responsible for 20% of malignancy-induced deaths (3,4). Colorectal cancer has an overall 5-year survival of 60% (5).

There are two major strategies for the prevention of CRC: either early detection of the disease and of premalignant lesions or chemical prevention. Early management of premalignant or early malignant lesions diminishes the incidence of CRC and its related mortality (6-8). Chemical prevention is based on using chemical (pharmacological or otherwise) agents to prevent the development of the carcinogenic process. Various agents have been proposed as possible chemopreventives of CRC, among them drugs such as cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors.

Cyclooxygenase (COX) is the enzyme catalyzing the first two steps in the synthesis of prostaglandins from arachidonic acid. Two COX isoforms have been identified that are structurally similar and catalyze the same chemical reaction, but acting on different places and times: COX-1 is constitutive and always present in all tissues, while COX-2 is inducible by a number of stimuli, mostly in association with both acute and chronic inflammation (9-11).

The activity of COX-2 seems to be related to tumor cell proliferation in aberrant colonic crypts by inhibiting cellular apoptosis –or programmed cell death– and the function of NK (natural killer) T cells, as well as by favoring tumor expansion through the induction of angiogenesis within the tumor (12). COX-2 is inducible by oncogens ras and scr, interleukin-1, hypoxia, benzopyrene, ultraviolet light, epidermal growth factor, and transforming growth factor alpha. Dexamethasone, antioxidants, and protein p53 suppress the expression of COX-2. The isoenzyme COX-2 synthesizes prostaglandin E2 (PGE2), which inhibits the apoptosis and associates with the development of metastatic disease. In addition, it induces interleukin-6 (IL-6), which bears some

relation to cancer cell invasion, and haptoglobin, which induces angiogenesis and the set-up of these cells.

COX-2 overexpression has been reported in colon tumors; consequently, a specific inhibition of COX-2 should prove a preventive manoeuvre. Many studies have isolated the enzyme COX-2 from the stroma of adenomas and from the stroma and epithelium of CRC (13-15). Likewise, some authors have even related the extent of COX-2 expression to CRC survival (16).

The present study attempts to evaluate whether rofecoxib (a selective COX-2 inhibitor with minimal effect on the COX-1 isoenzyme) has any inhibitory effect on drug-induced carcinogenesis in rats. As a secondary aim of this study was to assess whether this inhibitory effect is greater in rofecoxib treated rats than in the acetylsalicylic acid (AAS) –a non-selective COX inhibitor– group of animals.

Drug-induced carcinogenesis will clarify the protective effect of rofecoxib and AAS on induced tumor development. Carcinogenesis with 1-2 dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH) induces aberrant crypt formation at the intestinal epithelium and promotes carcinogenesis after induction. This dysplastic epithelium overexpresses COX-2, therefore a specific inhibition of this isoenzyme may have a suppressing effect on colonic induced tumors.

MATERIAL AND METHODS

Fifty-seven colonic tumors were evaluated in thirty-five male Sprague-Dawley rats (Criffa, Spain). Rats (mean weight of 225 g; range, 165-300 g) were divided into four groups: a) five animals formed the strict control group, without any experimental manipulation, and ten animals in each experimental group; b) a group with drug-induced carcinogenesis ($n = 10$); c) a group with AAS modulation ($n = 10$); and d) a group with rofecoxib modulation ($n = 10$). The carcinogenic induction of colon neoplasms was carried out with DMH (Sigma-Aldrich, Spain). The simultaneous administration of nonsteroid antiinflammatory drugs (NSAIDs) was based on the oral administration of 30 mg/kg AAS (Aspirina®, Bayer, Spain) or 3 mg/kg rofecoxib (Vioxx®, MSD, Spain), both dissolved in the drinking water.

Dietary and environmental conditions

Rats were maintained in type III cages (Criffa, España) at two animals per cage. Environmental conditions at the animal storage area were: 12 h/12 h light/darkness cycle (light from 8:00 am to 8:00 pm); uniform temperature of 22 ± 2 °C, and relative humidity of 60-70%. Diet provided was maintenance diet A.04 (Panlab, Spain).

The study complied with the guidelines established in Spanish Royal Decree 223/1998 and European Directive 86/609/EEC on the protection of animals used in experimentation.

Carcinogenic induction and administration of NSAIDs

Colon tumors were induced with DMH, with eighteen weekly subcutaneous injections, at a weekly dose of 25 mg/kg of weight. NSAIDs were administered at a daily dose of 3 mg/kg rofecoxib or 30 mg/kg AAS. These drugs were given for 18 weeks postoperatively, starting at 8th postoperative day.

Follow-up and sacrifice

Animals were examined weekly, special attention was paid to their weight, abdominal perimeter, presence and quality of stools, and presence of massive rectal bleeding. All animals were sacrificed in week 20, and their colon was examined in search for colon tumors. Sacrifice was by anesthetic overdose, and the entire colon including 1 cm of the terminal ileum were removed and fixed in a 10% formaldehyde solution for histological examination.

Examination of colon tumors

The entire large intestine of each animal was examined to determine three parameters: number of tumors, tumor surface area, and percentage of tumor surface area (percentage of colon area occupied by tumor tissue). Tumor percentage was determined by estimating total colon surface area *versus* tumor surface area in the colon, which is the most reliable indicator of the amount of tumor tissue, acting each animal as its own control. The histological study of colon samples also established the histological type of tumors, as well as the histological grade, tumor invasion, and lymph node involvement.

Statistical analysis

The study data were analyzed using the SPSS and G-Stat software programs, and the statistical analysis was performed using one-factor ANOVA models and chi-squared tables. A significant difference was considered for p values < 0.05 .

RESULTS

The strict control group was made up of 5 animals without experimental manipulation, which were separated from the rest. In this group of animals, maintained in the same environmental and dietary conditions that the experimental animals, the spontaneous prevalence of colonic tumors was nil. Results for the rats included in the other three groups are analyzed subsequently. These rats were distributed in three experimental groups with carcinogenic induction using DMH ($n = 10$), carcinogenic modulation with AAS ($n = 10$), and carcinogenic modulation with rofecoxib ($n = 10$).

Mortality

The overall mortality rate in this study was of 0%. There was no mortality attributable to colonic induced neoplasm or derived from the administration of the carcinogenic agent or NSAIDs.

Alterations in colon transit

No alterations occurred in gastrointestinal transit; a macroscopic study of the colon after sacrifice disclosed no stenosing neoplasm, either totally or partially.

Number of tumors

A total of 57 colon tumors were found in the 30 animals exposed to DMH, with a mean of 1.9 colonic tumors per animal. Of these 57 tumors, 30 were malignant tumors (adenocarcinomas) and 27 were adenomas. The mean number of adenomas per animal was 0.9, whereas the mean number of adenocarcinomas was 1. The distribution of these tumors is shown in table I. Differences in prevalence of malignant and benign tumors between groups were not significant.

Table I. Number of colon tumors evaluated in the different study groups

	Adenoma	Adenocarcinoma	All
Control	0	0	0
DMH	10	10	20
AAS	8	13	21
Rofecoxib	9	7	16
Σ	27	30	57

Microscopic tumor surface area

The total colon tumor surface area for all animals included in the study was 16.74 cm^2 . Of this total area, 7.34 cm^2 corresponded to benign tumors and the rest, 9.13 cm^2 , to adenocarcinomas. Mean tumor surface was greater in the group with induced carcinogenesis when compared with both groups treated with NSAIDs, either with AAS or rofecoxib. This difference applied to all type tumors and to both adenomas and adenocarcinomas separately. Difference was significant between the groups with induced carcinogenesis and group treated with rofecoxib ($p < 0.05$) in the analysis of all neoplasms, but was not significant when benign and malignant tumors were considered separately, and so it was for the group of rats treated with AAS (Fig. 1).

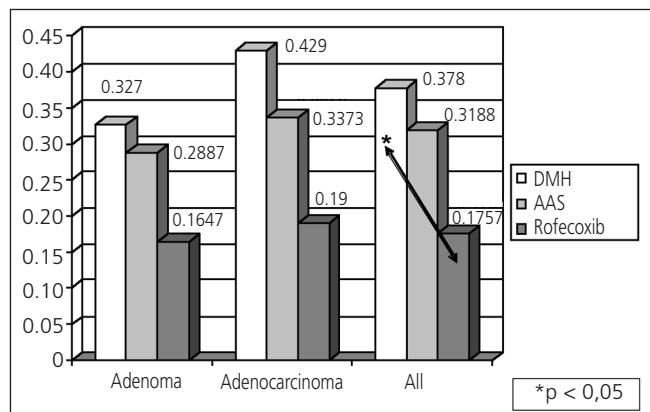


Fig. 1.- Microscopic surface of tumor tissue by malignancy in the study groups.

Superficie microscópica de tejido tumoral en los distintos grupos de estudio.

Microscopic tumor percentage

If we consider the NSAIDs group, AAS and rofecoxib, and we analyze all induced tumors, both benign and malignant, NSAIDs produced a significant reduction ($p < 0.05$) in the microscopic tumor percentage when compared with rats with DMH-induced carcinogenesis. This situation changes when both NSAIDs were considered separately or when benign and malignant tumors were analyzed separately. The average tumor percentage was greater in the group with DMH-induced carcinogenesis versus the other groups. In the group in which rofecoxib was administered to modulate carcinogenesis, a significant reduction in tumor percentage was obtained, which is the most reliable parameter expressing the quantity of tumor induced. This effect was observed for tumors in general but was particularly significant for adenocarcinomas ($p = 0.038$, LSD, unifactorial ANOVA for mean comparison). However, adenomas did not decrease significantly. Although the group of animals treated with AAS had also a decrease in carcinogenesis, this change was not significant (Fig. 2).

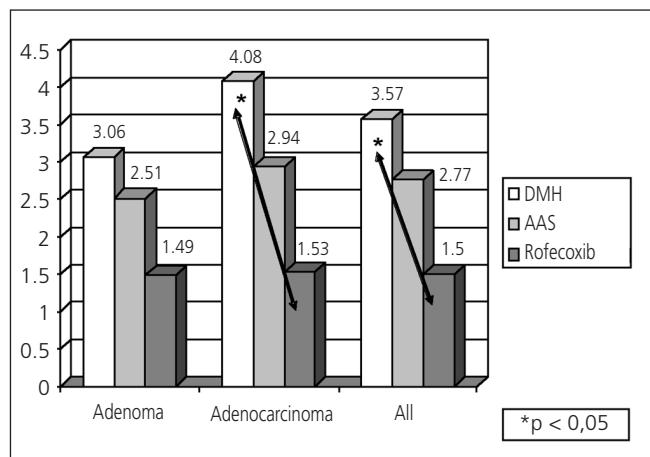


Fig. 2.- Microscopic tumor percentage in the different study groups, separated by malignancy or considered all together.

Porcentaje de tejido tumoral microscópico en los grupos de estudio.

Histologic study

The histological study of the excised colon revealed several different situations: presence of adenocarcinoma, presence of adenoma, colonic nodularity with normal mucosa, and presence of lymphoid hyperplasia in the colonic wall. Lymphoid hyperplasia was found in association with any of the above situations.

Adenomas ($n = 27$) accounted for 47.37% of induced tumors and were associated with lymphoid hyperplasia in 24 of 27 adenomas (88.89%). Thirty colonic adenocarcinomas were found, 52.63% of induced tumors, of which lymphoid hyperplasia was associated in 20 of these 30 cases (66.66%). Adenocarcinomas were well differentiated in 53.33% of cases, moderately differentiated in 16.67%, and poorly differentiated in 30% of the cases (Table II). As for the invasion extent of adenocarcinomas, most reached the submucosa (53.33%), 30% of them were "*in situ*", and 16.66% invaded beyond the submucosa (Table III). A total of 120 epicolic nodes (4 per rat) were isolated, 7 of them contained micrometastasis from an adenocarcinoma (5.8%). None of the differences in these parameters was significant between groups.

Table II. Histological grade of adenocarcinomas in different study groups

Group grade	DMH	AAS	Rofecoxib	Total (%)
WD	10.00	30.00	13.33	53.33
MD	6.67	6.67	3.33	16.67
PD	16.67	6.67	6.67	30.00
Total (%)	33.33	43.33	23.33	100

Well differentiated (WD); moderately differentiated (MD); and poorly differentiated (PD)

Table III. Invasion level of evaluated adenocarcinomas

Group invasion	DMH	AAS	Rofecoxib	Total (%)
<i>In situ</i>	6.67	13.33	10.00	30.00
Submucosa	16.67	26.67	10.00	53.33
Muscular	10.00	3.33	0.00	13.33
Subserosa	0.00	0.00	3.33	3.33
Total (%)	33.33	43.33	23.33	100

DISCUSSION

The first evidence of a relationship between NSAIDs and colon cancer was obtained in an epidemiological study conducted by Kune in 1988 (17), where a lower incidence of CRC was reported for patients with inflammatory bowel disease who were chronic users of sulfasalazine.

More than 100 studies have been published that evaluate the use of NSAIDs in the chemoprevention of drug-induced CRC in animal models, and over 85% of them have showed

that NSAIDs reduce the prevalence and multiplicity of these tumors (18,19).

In our study, we show that when both NSAIDs, AAS and rofecoxib, and all type tumors, both benign and malignant, are considered a significant reduction ($p < 0.05$) in the microscopic tumor percentage is seen in comparison with the DMH group. This effect of NSAIDs in the prevention of colic carcinogenesis is well known.

With regard to selective COX-2 inhibitors, the first evidence of their efficacy in animals come from studies conducted in Min (Multiple Intestinal Neoplasia) rats bearing a dominant mutation in the APC (Adenomatous Colon Polyposis) gene, which are characterized by the development of multiple intestinal adenomas at an early age (20). In these animals, the administration of celecoxib caused a greater reduction in the number of adenomas when compared to piroxicam. The administration of rofecoxib also causes similar effects in these rats (20-22). The effects of selective COX-2 inhibitors have also been studied in rats exposed to azoxymethane, a potent colon carcinogen. In these models of drug-induced carcinogenesis, aberrant foci of colon crypts were reduced by 40-49% when celecoxib was administered. Subsequent studies have confirmed significant reductions in the incidence of CRC and in its multiplicity in animals exposed to carcinogens and treated with celecoxib (23,24). Most of these studies have been carried out with celecoxib, but there are few studies with rofecoxib, which has a 2-fold greater selectivity for COX-2 than celecoxib.

The compound MK-0966, rofecoxib, undergoes rapid absorption in rats and attains its peak blood concentration 30 minutes after administration. Dose greater than 5 mg/kg does not increase drug plasma levels in rats (25). It is primarily excreted in the bile, and metabolites derived from oxidation, glucuronoconjugation, or reduction of the drug are not active in terms of inhibition of COX, either 1 or 2 (26). The dosage used in this study, 3 mg/kg of body weight, is high when compared to typical doses used for arthritis and acute pain, but according to clinical studies on its pharmacokinetics, COX-2 inhibition is greater at higher doses, and the tolerability of these high doses was acceptable (27).

Most studies only refer to the number of colon tumors and omit parameters as important as tumor surface area and percentage of tumor area. When not referring to aberrant crypts or foci of dysplasia, but to induced colon tumors, we believe that the microscopic tumor percentage should be evaluated because it is the only parameter relating the amount of tumor tissue to the size of colon studied. The drug regimen used in our study was 25 mg/kg of DMH for 18 weeks, with sacrifice of animals in week 20, which has been shown to be more effective than other induction regimens using the same drug (28,29) and also to shorten the duration of the study.

In this study, we found that 3 mg/kg rofecoxib significantly reduced the tumor percentage of malignant colon tumors, drug-induced adenocarcinomas, when compared with the DMH-treated control group. This result is consistent with a study recently published by Oshima et al. showing that rofecoxib inhibited polyposis in APCdelta716 mice, a strain of mice that develop intestinal polyposis and sec-

ondary carcinomas (22). Although AAS induced a reduction in carcinogenesis when compared with controls, and there were also differences between AAS and rofecoxib, these differences were not significant. In previous studies including a greater number of animals, an inhibitory effect on induced carcinogenesis by non-selective NSAIDs was demonstrated.

Differences between study groups regarding degree of differentiation, invasion extent, and lymph-node involvement were not significant.

As rofecoxib causes a reduction in drug-induced colon carcinogenesis in rats, we believe that this drug should be assessed in future studies of colorectal cancer.

We believe that the dose that should be tested in clinical trials must be greater than those currently used. In two prominent clinical studies currently ongoing –the one by Becerra et al (30) in metastatic CRC and the other by David et al (31) in stage-II and -III CRC, still in its recruitment phase–, the dose of rofecoxib ranges from 25 to 50 mg daily, afar from those employed in this experimental study. The dose of 3 mg/kg of body weight employed in this study represents an approximate dose of 150-200 mg daily for adults between 50 and 70 kg, 3 to 4-fold greater than that currently used in clinical trials. These doses are well tolerated, as shown by initial phase-I and -II pharmacokinetic and security studies (25-27).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study has been co-supported by Asociación Española Contra el Cáncer and Junta Balear. We want to thank to the Departamento de Fisiología Animal de la Universitat de les Illes Balears (Prof. R. Rial, Prof. A. Gamundí) for their laboratory and environmental support.

REFERENCES

- Arnaud JP, Schloegel M, Ollier JC, Adloff M. Colorectal cancer in patients over 80 years of age. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 896-8.
- McGregor JR, Galloway DJ, McCulloch P, George WD. Anastomotic suture materials and implantation metastasis: an experimental study. *Br J Surg* 1989; 76 (4): 331-4.
- Domínguez F, Riera JR, Junco P, Tojo S, Díaz-Faes M. Influencia en el pronóstico a corto plazo de la sobreexpresión de la proteína p53 en carcinomas colorrectales. *Rev Esp Enferm Dig* 1994; 86 (5): 796-802.
- García JC, Cugat E, Angás J, González FJ, Reverter JC, Lacy AM. Cáncer colorrectal: resultados de un protocolo de seguimiento. *Cir Esp* 1993; 53 (6): 430-3.
- García JA, Morcillo MA, Vázquez JL, Zaragoza C, Moltó M, Cámaras J. Cáncer colorrectal en el anciano. Experiencia de los 5 primeros años en un Servicio de Cirugía de un hospital comarcal. *Cir Esp* 1996; 60: 256-7.
- Lieberman DA. Screening for colorectal cancer. *Clin Cornerstone* 2002; 4: 1-10.
- Benamouzig R, Chaussade S. La chimioprevención du cancer colorectal. *Presse Med* 2002; 31: 124-8.
- Sheehan KM, Sheehan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA* 1999; 282: 1254-7.
- Vane JR, Bakle YS, Botting RM. Cyclo-oxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 97-120.
- 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: 779-88.
- 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: 913-20.
- Williams CS, Mann M, DuBois R. The role of cyclo-oxygenases in inflammation, cancer and development. *Oncogene* 1999; 18: 7908-16.
- DuBois RN, Radhika A, Reddy BS, Entingh AJ. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology* 1996; 110: 1259-2.
- 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: 470-5.
- 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: 293-7.
- 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: 556-2559.
- 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: 4399-404.
- 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: 515-9.
- Rao CV, Rivenson A, Simi B. Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Cancer Res* 1995; 55: 1464-72.
- Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the Apc gene. *Science* 1992; 256: 668-70.
- 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: 5040-4.
- Oshima M, Murai N, Kargman S, Arguello M, Luk P, Kwong E, et al. Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apc ?716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 2001; 61: 1733-40.
- Reddy BS, Rao CV, Seibert K. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1996; 56: 4566-9.
- Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 409-12.
- Halpin RA, Geer LA, Zhang KE, Marks TM, Dean DC, Jones AN, et al. The absorption, distribution, metabolism and excretion of rofecoxib, a potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in rats and dogs. *Drug Metab Dispos* 2000; 28: 1244-54.
- Nicoll-Griiffith DA, Yergey JA, Trimble LA, Silva JM, Li C, Chaurat N, et al. Synthesis, characterization, and activity of metabolites derived from the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (MK-0966, Vioxx). *Bioorg Med Chem Lett* 2000; 10: 2683-6.
- 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: 167-74.
- Noguera JF, Tortajada C, Morón JM, Plaza A, Amengual I, Pujol JJ. Experimental model for the study of perianastomotic recurrence in colorectal cancer. *Rev Esp Enf Dig* 2002; 94: 131-4.
- Noguera JF, Tortajada C, Zurita M, García JC, Álvarez C, Rial R. Nuevo régimen farmacológico para la inducción de tumores cólicos en ratas. *Span J Surg Res* 2000; 3: 33-5.
- Becerra CR, Frenkel EP, Ashfaq R, Gaynor RB. Increased toxicity and lack of efficacy of rofecoxib in combination with chemotherapy for treatment of metastatic colorectal cancer: a phase II study. *Int J Cancer* 2003; 105: 868-72.
- Kerr DJ. National Institutes of Health. Rofecoxib after surgery in treating patients with stage II or III colorectal cancer. USA (web en línea). Disponible en: <http://www.clinicaltrialss.gov> (visitada el 4 de enero de 2004).

Influencia del rofecoxib sobre la carcinogénesis cólica experimental en ratas

J. F. Noguera Aguilar, A. Plaza Martínez¹, I. Amengual Antich², J. M. Morón Canis³, C. Tortajada Collado⁴ y J. J. Pujol Tugores⁵

IUNICS. Unidad de Cirugía General. Hospital Son Llàtzer. Baleares. ¹Servicio de Cirugía Vascular. Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia. ²Servicio de Anatomía Patológica. Fundación Hospital de Manacor. Valencia. ³Servicio de Cirugía General. Hospital Universitario Son Dureta. ⁴Enfermería. Hospital Son Dureta. ⁵Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo. Hospital Son Llàtzer. Baleares

RESUMEN

Objetivo: investigar el efecto de un inhibidor selectivo de la ciclooxygenasa-2, rofecoxib, en la incidencia de tumores cólicos a nivel experimental.

Diseño experimental: estudio experimental con 35 ratas Sprague-Dawley macho, asignadas aleatoriamente a uno de los cuatro grupos: a) control (n=5), sin manipulación experimental; b) carcinogénesis farmacológica (n=10); c) carcinogénesis farmacológica y ácido acetilsalicílico (n=10), con administración de este fármaco al tiempo de la carcinogénesis farmacológica; y d) carcinogénesis farmacológica y rofecoxib (n=10) con administración de este fármaco junto a la carcinogénesis farmacológica. La inducción carcinogénica se realizó con 1,2-dimetilhidrazina dihidrocloruro a dosis semanal de 25 mg/kg de peso durante 18 semanas. Se analizaron los tumores cólicos inducidos en la semana 20. Los antiinflamatorios se administraron por vía oral a razón de ácido acetilsalicílico 30 mg/kg de peso del animal y rofecoxib 3 mg/kg.

Resultados: el porcentaje de tejido tumoral cólico fue inferior en el grupo con rofecoxib respecto al grupo control, tanto considerando todos los tumores conjuntamente como los adenocarcinomas por separado. El ácido acetilsalicílico no mostró diferencias significativas respecto al grupo control.

Conclusiones: el rofecoxib, inhibidor selectivo de la ciclooxygenasa-2, reduce la aparición de tejido glandular neoplásico inducido farmacológicamente en ratas, suponiendo un freno a la carcinogénesis cólica inducida.

Palabras clave: Rofecoxib. Cáncer colorrectal. Rata. Adenocarcinoma. Ácido acetilsalicílico. Ciclooxygenasa.

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es el cáncer digestivo más frecuente en Europa Occidental y los Estados Unidos (1) y la segunda causa de muerte en el mundo occidental (2). Nuestro país presenta una incidencia de 20-30 casos por 100.000 habitantes y año, siendo responsable del 20% de las muertes por procesos malignos (3,4). El CCR presenta una supervivencia global del 60% a los 5 años (5).

Existen fundamentalmente dos estrategias en la prevención del CCR: la detección precoz de la enfermedad y de las lesiones premalignas, y la quimioprevencción. El tratamiento precoz de las lesiones premalignas o malignas en estadio inicial, disminuye la incidencia y la mortalidad por CCR (6-8). La quimioprevencción es la utilización de agentes químicos (farmacológicos o

no) para prevenir el desarrollo del proceso de carcinogénesis. Se han propuesto diversos agentes que podrían actuar como posibles quimiopreventivos del CCR, entre ellos destacan fármacos como los inhibidores de la ciclooxygenasa-2 (COX-2).

La ciclooxygenasa (COX) es la enzima que cataliza los dos primeros pasos de la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico. Existen dos isoformas de COX, estructuralmente similares y que catalizan la misma reacción química, pero que actúan en lugares y momentos diferentes: la COX-1 es constitutiva y está presente siempre en todos los tejidos, mientras que la COX-2 es inducible por varios estímulos generalmente asociados con la inflamación aguda o crónica (9-11).

La actividad COX-2 parece relacionada con la proliferación neoplásica en criptas aberrantes del colon, por inhibir la apoptosis o muerte celular programada de las células tumorales, por frenar la función de los linfocitos T-NK ("natural killer") y por favorecer la expansión tumoral induciendo la angiogénesis en el tumor (12). La COX-2 es inducible por oncogenes *ras* y *scr*, interleukina-1, hipoxia, benzopireno, luz ultravioleta, factor de crecimiento epidérmico y factor de necrosis tumoral alfa. La dexametasona, sustancias antioxidantes y la proteína p53 suprimen la expresión de la COX-2. La isoenzima COX-2 sintetiza prostaglandina E2 (PGE2) que inhibe la apoptosis y se asocia con la aparición de metástasis tumorales. Además, induce la interleukina-6 (IL-6) que se relaciona con la invasión de las células cancerosas y la haptoglobina, que estimula la angiogénesis y la implantación de dichas células.

La sobreexpresión de COX-2 se ha observado en tumores de colon; por consiguiente, los inhibidores específicos de la COX-2 podrían servir como agentes preventivos. Múltiples estudios han logrado aislar la enzima COX-2 del estroma de los adenomas y del estroma y del epitelio de los CCR (13-15), incluso algunos autores han relacionado la extensión de la expresión COX-2 con la supervivencia del CCR (16).

El presente estudio pretende valorar si existe un efecto inhibidor del rofecoxib sobre la carcinogénesis inducida. Este fármaco es un inhibidor selectivo de la COX-2, con una despreciable capacidad para inhibir la COX-1. Como objetivo secundario se pretende valorar si este efecto es mayor con el rofecoxib que con el ácido acetilsalicílico (AAS), inhibidor este último no selectivo de la COX.

Se inducirá carcinogénesis farmacológica, para dilucidar el efecto protector del rofecoxib y del AAS en el desarrollo

tumoral inducido. La carcinogénesis inducida con 1-2 dimetilhidracina dihidrocloruro (DMH) provoca la formación de focos de criptas aberrantes en el epitelio intestinal y promociona la carcinogénesis tras su inducción. Este epitelio displásico sobreexpresa la COX-2 por lo que los inhibidores específicos de la COX-2 pueden tener un efecto supresor sobre los tumores colónicos inducidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el estudio se emplearon 35 ratas Sprague-Dawley macho (Criffa, España), con un peso medio de 225 g (rango 165-300 g), distribuidas en cuatro grupos: a) cinco animales en el grupo tomado como control estricto, sin manipulación experimental, y diez animales en cada grupo experimental; b) grupo con carcinogénesis farmacológica ($n=10$); c) grupo con modulación con AAS ($n=10$); y d) grupo con modulación con rofecoxib ($n=10$). La inducción carcinogénica de las neoplasias colónicas se realizó con DMH (Sigma-Aldrich, España). La administración simultánea de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se realizó con AAS por vía oral disuelto en el agua de bebida (Aspirina®, Bayer, España) y con rofecoxib oral, disuelto en agua de bebida (Vioxx®, MSD, España).

Condiciones dietéticas y ambientales

Las ratas fueron alojadas en jaulas tipo III (Criffa, España), con dos animales por jaula. Las condiciones ambientales del estabulario fueron: periodo luz/oscuridad de 12/12 horas (luz de 8,00 am- 8,00 pm); temperatura homogénea de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, y humedad relativa del 60-70%. La dieta suministrada fue dieta de mantenimiento A.04 (Panlab, España).

Se cumplieron las directrices marcadas por el Real Decreto 223/1998 y por la Directiva de la Unión Europea 86/609/CEE, sobre la protección de animales utilizados para experimentación.

Inducción carcinogénica y administración de AINE

Los tumores de colon se indujeron mediante la administración semanal de una dosis de 25 mg de DMH/kg de peso por inyección subcutánea durante 18 semanas. Los AINE se administraron a una dosis diaria de 3 mg/kg de rofecoxib o de 30 mg/kg de AAS.

Seguimiento y sacrificio

Se examinaron los animales semanalmente, prestando atención especial a su peso, perímetro abdominal, presencia y calidad de las deposiciones y aparición de rectorragias. Todos los animales fueron sacrificados en la semana 20 tras la intervención farmacológica y el colon fue examinado en busca de tumores en el colon. El sacrificio se realizó con sobredosis anestésica y se practicó una laparotomía media buscando la existencia de tumores extradigestivos o de tumores macroscópicos en el intestino delgado. El colon fue extirpado en su tota-

lidad, desde el ano hasta el ciego incluyendo además 1 cm de intestino delgado terminal. Las piezas fueron fijadas en solución de formol al 10% para su examen histológico.

Estudio de los tumores cólicos

Se examinó todo el intestino grueso de cada animal, buscando tumores macroscópicos y microscópicos para determinar tres parámetros: número de tumores, superficie tumoral y porcentaje de superficie tumoral (porcentaje de superficie cólica ocupada por tejido tumoral). La superficie y porcentaje tumoral se determinaron por ser más fieles indicadores de la cantidad de tejido tumoral que el mero tamaño del tumor. En el estudio histológico de las piezas colónicas se determinaron los parámetros descritos, evaluando además el tipo histológico de cada tumor, el grado histológico, la invasión tumoral y la afectación ganglionar.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con los programas SPSS y G-Stat, y el análisis estadístico se realizó con modelos Anova unifactorial y Chi-cuadrado.

RESULTADOS

Se ha considerado por separado el grupo control estricto ($n=5$) en el que no se realizó ninguna manipulación. En este grupo, tras haberse mantenido en las mismas condiciones dietéticas y ambientales que el resto de animales, la incidencia espontánea de tumores cólicos o extracolónicos fue nula. Se analizan a continuación los resultados obtenidos en los 30 animales restantes, repartidos en los tres grupos experimentales a los que expusimos a la inducción carcinogénica ($n=10$), a la modulación con el AAS ($n=10$) o a la modulación con el rofecoxib ($n=10$).

Mortalidad

La mortalidad global del estudio fue del 0%. No hubo mortalidad atribuible a las neoplasias cólicas inducidas ni derivada de la administración del carcinógeno o de los AINE.

Alteraciones al tránsito cólico

No aparecieron alteraciones del tránsito gastrointestinal y el estudio macroscópico del colon tras el sacrificio de los animales no detectó ninguna neoplasia que fuera total o parcialmente estenosante.

Número de tumores

Se halló un total de 57 tumores cólicos en los 30 animales estudiados, con una media de 1,9 tumores por animal. De estos 57 tumores, 30 fueron tumores malignos, adenocarcinomas, y 27 fueron adenomas. La distribución de estos tu-

mores se describe en la tabla I. No hubo diferencias significativas entre los grupos en relación con la incidencia de tumores malignos o benignos.

Tabla I. Número de tumores evaluados en los distintos grupos de estudio

	Adenoma	Adenocarcinoma	Todos
Control	0	0	0
DMH	10	10	20
AAS	8	13	21
Rofexosib	9	7	16
Σ	27	30	57

Superficie tumoral microscópica

En el conjunto de los animales se obtuvieron 16,47 cm² de superficie cólica tumoral. De estos, 7,34 cm² correspondían a tumores benignos y el resto, 9,13 cm², a adenocarcinomas. La media de la superficie tumoral fue mayor en el grupo con carcinogénesis inducida que en los grupos con AAS o con rofecoxib, tanto para todos los tumores considerados en conjunto, como para los adenomas y adenocarcinomas por separado. Las diferencias sólo fueron significativas entre los grupos con carcinogénesis inducida y con rofecoxib cuando se analizan conjuntamente todos los tumores, tanto los benignos como los malignos. En el grupo con rofecoxib disminuyó de forma significativa la formación de neoplasias benignas y malignas inducidas farmacológicamente ($p<0,05$). Las diferencias, sin embargo, no fueron significativas cuando se analizaron por separado los tumores benignos y malignos, así como tampoco lo fueron las diferencias en el grupo de animales tratados con AAS (Fig. 1).

Porcentaje tumoral microscópico

Si consideramos los AINE en conjunto, AAS y rofecoxib, y analizamos todos los tumores estudiados, benignos y malignos, se consigue con los AINE una reducción significativa ($p < 0,05$) en el porcentaje microscópico tumoral, respecto al grupo de ratas tratadas sólo con DMH. Esta situación cambia cuando se consideran los AINE por separado o cuando analizamos independientemente los tumores benignos o malignos. El porcentaje tumoral medio fue mayor en el grupo con carcinogénesis con DMH que en los otros dos grupos. En el grupo en el que se administró rofecoxib para modular la carcinogénesis farmacológica, se consiguió una reducción significativa en el porcentaje tumoral, que es el parámetro más fiable como expresión de la cantidad de tumor provocado. Esta reducción se produjo tanto en los tumores considerados en su conjunto como en los adenocarcinomas ($p=0,038$, LSD y Scheffé, Anova unifactorial de comparación de medias), si bien en los adenomas esta reducción no fue significativa. En el grupo tratado con AAS se produjo también una disminución en la carcinogénesis, pero este cambio no alcanzó significación estadística (Fig. 2).

Estudio histológico

Al realizar este estudio nos encontramos con varias situaciones diferentes: presencia de adenocarcinoma, presencia de adenoma, nodularidad colónica con mucosa normal y presencia de hiperplasia linfoide en la pared cólica. La hiperplasia linfoide se encontró asociada con cualquiera de las situaciones mencionadas.

Los adenomas (n=27) representaron el 47,37% de los tumores inducidos, de los que en 24 casos hallamos hiperplasia linfoide asociada a los adenomas (88,89%). También hallamos 30 adenocarcinomas, el 52,63% de los tumores inducidos. En 20 de estos casos (66,66%), estas lesiones se encontraban asociadas a hiperplasia linfoide. Los adenocarcinomas estaban bien diferenciados en el 53,33% de los casos, moderadamente diferenciados en 16,67% y pobremente diferenciados en el 30% restante (Tabla II). En cuanto al nivel de invasión, la mayoría de los adenocarcinomas (53,33%) alcanzaban la submucosa, eran "*in situ*" el 30% e invasores más allá de la submucosa el 16,66% (Tabla III). Se aislaron un total de 120 ganglios epicólicos (4 por rata), de los que 7 (5,8%) albergaban micrometástasis de adenocarcinoma. Ninguna de las diferencias entre los grupos en relación a estos parámetros fue relevante.

Tabla II. Grado histológico de los adenocarcinomas en función del grupo de estudio

Grupo grado	DMH	AAS	Rofecoxib	Total (%)
BD	10,00	30,00	13,33	53,33
MD	6,67	6,67	3,33	16,67
PD	16,67	6,67	6,67	30,00
Total (%)	33,33	43,33	23,33	100

Tabla III. Grado de invasión de los adenocarcinomas evaluados

Grupo invasión	DMH	AAS	Rofecoxib	Total (%)
<i>In situ</i>	6,67	13,33	10,00	30,00
Submucosa	16,67	26,67	10,00	53,33
Muscular	10,00	3,33	0,00	13,33
Subserosa	0,00	0,00	3,33	3,33
Total (%)	33,33	43,33	23,33	100

DISCUSIÓN

La primera evidencia de la relación entre los AINE y el cáncer de colon procede de un estudio epidemiológico realizado por Kune, en 1988 (17), donde se observa una menor incidencia de CCR en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal que tomaban crónicamente sulfasalazina.

Existen más de 100 estudios publicados que evalúan la eficacia de los AINE en la quimioprevencción del CCR inducido farmacológicamente en modelos animales y en más del 85% de ellos se demuestra que los AINE reducen la incidencia y la multiplicidad de estos tumores (18,19). En nuestro estudio hemos podido comprobar cómo considerando los dos AINE con-

juntamente, AAS y rofecoxib, y analizando todos los tumores estudiados, benignos y malignos, se consigue con los AINE una reducción significativa ($p < 0,05$) en el porcentaje microscópico tumoral, en relación con el grupo tratado sólo con DMH. Este hallazgo aislado no aporta nada nuevo, ya que bien es conocido el efecto de los AINE en la prevención de la carcinogénesis colorrectal.

En cuanto a los inhibidores selectivos de la COX-2, la primera evidencia experimental de su eficacia la hallamos en estudios realizados en ratones Min (*multiple intestinal neoplasia*), que poseen una mutación dominante del gen APC (poliposis cólica adenomatosa) y que se caracterizan por desarrollar múltiples adenomas intestinales a edades tempranas (20). En estos animales, la administración de celecoxib frente a piroxicam produce una mayor disminución del número de adenomas. Del mismo modo, la administración de rofecoxib produce efectos similares en estos ratones (20-22). También se han estudiado los efectos de los inhibidores selectivos de la COX-2 en ratas expuestas al azoximetano, un potente carcinógeno cólico. En estos modelos de carcinogénesis inducida farmacológicamente se redujeron los focos aberrantes de las criptas del colon en un 40-49% si se administraba celecoxib. Estudios posteriores han confirmado importantes reducciones en la incidencia de CCR y en su multiplicidad en los animales expuestos al carcinógeno y tratados con celecoxib (23,24). La mayoría de estos estudios se han realizado con el celecoxib, pero existen muy pocos en los que se haya empleado el rofecoxib, cuya selectividad por la COX-2 es doble a la de celecoxib.

El rofecoxib, también conocido como MK-0966, se absorbe rápidamente por vía oral en ratas y alcanza su concentración máxima en sangre a los 30 minutos de la ingesta. Las dosis mayores de 5 mg/kg no se traducen en un mayores aumentos del nivel plasmático del fármaco en la rata (25). Se excretan preferentemente por vía biliar y sus metabolitos derivados de su oxidación, glucurononconjunción y reducción no son activos en cuanto a la inhibición de las ciclooxygenasas 1 ó 2 (26). La dosis que se ha usado en este estudio, 3 mg/kg, correspondería a dosis alta de fármaco si la relacionamos con las dosis habitualmente usadas en el tratamiento de la artrosis o del dolor agudo, pero según estudios clínicos de farmacocinética, la inhibición de la COX-2 es mayor a dosis más altas y la tolerancia es correcta (27).

La mayoría de los estudios hacen referencia sólo al número de tumores cólicos dejando de lado parámetros tan importantes como la superficie y porcentaje tumoral. Cuando no hablamos de criptas aberrantes o de focos displásicos, sino de tumores cólicos inducidos, creemos que se debe evaluar el porcentaje tumoral microscópico, dado que es el único parámetro que relaciona la cantidad de tejido tumoral con la totalidad del colon estudiado. El régimen farmacológico empleado de 25 mg/kg de DMH durante 18 semanas con sacrificio en la semana 20 ha mostrado que es más eficaz que otros regímenes inductores con el mismo fármaco (28,29), además de conseguir acortar el tiempo de estudio.

En este estudio hemos encontrado que el rofecoxib reduce significativamente el porcentaje tumoral de los tumores malignos, adenocarcinomas inducidos farmacológicamente, respecto al grupo control con inducción farmacológica con DMH. Este resultado coincide con el reciente estudio publicado por

Oshima y cols. en el que el rofecoxib inhibe la poliposis en ratones APCdelta716, raza de ratones que desarrollan poliposis cólica y carcinomas secundarios (22). Aunque el AAS produjo una disminución de la carcinogénesis respecto al control y hubo también diferencias entre el AAS y el rofecoxib, estas diferencias no fueron significativas. En estudios previos en los que se ha empleado un mayor número de animales, sí se ha podido observar un efecto inhibidor de los AINE no selectivos sobre la carcinogénesis inducida farmacológicamente.

La dosis de AAS empleada en el estudio (30 mg/kg de peso) también correspondería a una dosis elevada y superior a la empleada en el tratamiento del dolor agudo y crónico, al igual que en el caso del rofecoxib. El hecho de que con el AAS no se consiga una reducción significativa de la carcinogénesis puede obedecer a que el número de eventos evaluados no era muy elevado. Este hecho, por el contrario, va a favor del rofecoxib, pues con este mismo número de eventos se consigue una reducción significativa en el porcentaje tumoral. La diferencia entre ambos fármacos a la que atribuimos los diferentes resultados está relacionada con la escasa inhibición de la actividad COX-2 que se logra con el AAS y la específica y elevada inhibición de esta actividad que se consigue con el rofecoxib.

No encontramos diferencias significativas entre los grupos del estudio en lo relacionado con el grado de diferenciación tumoral, el de invasión y la afectación ganglionar.

Dado que el rofecoxib produce una inhibición de la carcinogénesis cólica inducida farmacológicamente en ratas, creemos que es un fármaco que se debe evaluar en futuros estudios relacionados con el cáncer colorrectal.

Las dosis que creemos que se deberían probar en los ensayos clínicos han de ser superiores a las que en la actualidad se vienen empleando. En los dos estudios clínicos relevantes que se están realizando en la actualidad, como el de Becerra y cols. (30) en CCR metastásico y el que está todavía en fase de reclutamiento de David y cols. (31) en CCR en estadios II y III, las dosis de rofecoxib empleadas son de 25 a 50 mg diarios, muy alejadas de las que empleamos en este estudio experimental. Los 3 mg/kg de peso que empleamos en nuestro estudio supondrían unas dosis aproximadas de 150-200 mg diarios para adultos entre 50 y 70 kg de peso, es decir, unas 3-4 veces más de las empleadas en la actualidad en los ensayos clínicos. Estas dosis son bien toleradas tal como se demuestra en los estudios iniciales de farmacocinética y de seguridad en fases I y II (25-27).

Por los resultados obtenidos en nuestro estudio experimental creemos que el rofecoxib a dosis elevadas, de 3 mg/kg de peso, puede tener un papel importante en la modulación del cáncer colorrectal. Dicho efecto a estas dosis debería ser evaluado en posteriores estudios clínicos.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido cofinanciado por la Asociación Española Contra el Cáncer y Junta de Baleares. Queremos agradecer la colaboración del Departamento de Fisiología Animal de la Universitat de les Illes Balears, especialmente a los Profesores R. Rial y A. Gamundí.