

Inhibición de la ciclooxigenasa-2 en la carcinogénesis cólica experimental

J. F. Noguera Aguilar, I. Amengual Antich¹, A. Plaza Martínez², J. Ibarra de la Rosa³, C. Tortajada Collado⁴, A. Gamundí Gamundí⁵ y J. J. Pujol Tugores⁶

*Unidad de Cirugía. Hospital Son Llàtzer. Baleares.*¹*Unidad de Anatomía Patológica. Fundación Hospital Manacor. Baleares.*²*Servicio de Cirugía Vascular. Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia.*³*Unidad de Anatomía Patológica. Hospital Son Llàtzer. Baleares.*⁴*Hospital Universitario Son Dureta. Baleares.*⁵*Fisiología Animal. UIB.*⁶*Unidad de Cirugía. Hospital Son Llàtzer. Baleares. Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS)*

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 en un

modelo de carcinogénesis cólica farmacológica en la rata.

Material y métodos: estudio experimental en 65 ratas Sprague-Dawley macho, asignadas a uno de los grupos: control (n = 20), con carcinogénesis farmacológica con 1-2 dimetilhidrazina; grupo ácido acetilsalicílico (n = 15), con carcinogénesis y adición

de AAS, grupo Inhibidores COX-2 a bajas dosis ($n = 15$), con carcinogénesis y adición de rofecoxib a dosis de 1,2 mg/kg, y grupo Inhibidores COX-2 a altas dosis ($n = 15$), con carcinogénesis y rofecoxib a dosis de 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: 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: el rofecoxib redujo la carcinogénesis cólica inducida en ratas, reduciendo la expresión COX-2 en los tumores y disminuyendo el porcentaje de colon neoplásico.

Palabras clave: Rofecoxib. Ácido acetilsalicílico. Cáncer colorrectal. Adenocarcinoma. Ciclooxigenasa.

INTRODUCCIÓN

Existen básicamente dos estrategias para la prevención del cáncer colorrectal (CCR): la detección precoz de la enfermedad y la quimioprevención. El tratamiento precoz de las lesiones precancerosas y del cáncer establecido reducen la incidencia y mortalidad del CCR (1-3). La quimioprevención es el uso de agentes químicos para prevenir el desarrollo del proceso de carcinogénesis, entre ellos se han propuesto algunos fármacos como los inhibidores de la enzima ciclooxigenasa.

Existe una evidencia creciente que sugiere que el ácido acetilsalicílico (AAS) y otros antiinflamatorios no esteroideos (AINE) reducen el riesgo de padecer cáncer colorrectal. Los estudios realizados sobre la poliposis cólica familiar establecen que el proceso de formación de pólipos cólicos se ve afectado por los AINE, detectando una reducción del riesgo de padecer CCR cuando se emplea de manera crónica AAS u otros AINE. El mecanismo molecular responsable de la quimioprevención no está perfectamente establecido y se debería establecer la dosis, duración y frecuencia de administración de estos fármacos para conseguir una actividad preventiva para el CCR (4).

La ciclooxigenasa (COX) cataliza los primeros pasos en la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Existen dos isoformas de COX: la COX-1 es constitutiva, está expresada siempre en todos los tejidos, mientras que la COX-2 es inducible por varios estímulos generalmente asociados con la inflamación aguda o crónica (5-7).

La actividad COX-2 parece estar relacionada con la proliferación neoplásica en las criptas aberrantes del colon, mediante la inhibición de la apoptosis en las células tumorales y el favorecimiento de la expansión tumoral al

inducir la angiogénesis en el tumor (8). La inhibición de la apoptosis está relacionada con el desarrollo tumoral y con la aparición de metástasis, mientras que la angiogénesis lo está con el desarrollo local del tumor y su capacidad de crecimiento.

La sobreexpresión de la COX-2 ha sido observada en tumores cólicos. Numerosos estudios han aislado la enzima en el estroma y en el epitelio de adenomas cólicos y del CCR (9-11), relacionando algunos autores incluso la intensidad de expresión de la COX-2 con la supervivencia (12).

El objetivo del presente estudio es averiguar si la inhibición selectiva y no selectiva de la COX-2 tiene un efecto inhibitorio de la carcinogénesis inducida en el colon de la rata. Como objetivo secundario se valorará si el potencial efecto inhibitorio es dosis dependiente para los inhibidores selectivos de la COX-2 (ICOX-2).

El rofecoxib posee un efecto inhibitorio de la COX-2 mucho mayor que celecoxib y la inhibición de la COX-1 es prácticamente nula para este fármaco. Este hecho es el que nos lleva a testar este fármaco en el modelo experimental. El rofecoxib a las dosis empleadas en humanos para el dolor agudo y crónico no se ha mostrado eficaz para la prevención y tratamiento del CCR (13), por lo que se testarán dosis medias y altas de rofecoxib (1,2 y 3 mg/kg). Lo mismo ocurre con la dosis de AAS, testándose dosis altas ante la sospecha de inducir cambios en las criptas con dosis bajas, pero sin relevancia en las neoplasias inducidas (14-16).

La carcinogénesis química es inducida para determinar el efecto de los inhibidores de la COX sobre la iniciación y el desarrollo tumoral. La carcinogénesis cólica con 1-2 DMH induce la formación de criptas aberrantes en el epitelio intestinal y promueve el desarrollo tumoral tras su inducción. El epitelio displásico y neoplásico sobreexpresa la COX-2, y esta enzima inhibe la apoptosis y promueve la angiogénesis, por lo que la inhibición de la COX-2 podría frenar la inducción y el desarrollo de los tumores inducidos.

MATERIAL Y MÉTODO

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). Tras una semana de aclimatación al estabulario, fueron distribuidas aleatoriamente a uno de los siguientes 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 I-COX-2 a bajas dosis (BD-ICOX-2) ($n = 15$), con carcinogénesis y adición de rofecoxib a dosis de 1,2 mg/kg, y grupo I-COX-2 a altas dosis (AD-ICOX-2) ($n = 15$), con carcinogénesis y adición de rofecoxib a dosis de 3 mg/kg.

Condiciones dietéticas y ambientales

Las condiciones del estabulario fueron las siguientes: periodo luz/oscuridad de 12/12 horas (luz de 8:00 a.m.-8:00 p.m.); temperatura homogénea de 22 ± 2 °C, y humedad relativa del 60-70%. Las ratas permanecieron alimentadas hasta la inclusión en el estudio con dieta de mantenimiento A.04 (Panlab, España). Tras la inclusión en el estudio se administró dieta de mantenimiento suplementada con el fármaco MK-0966, rofecoxib, a dosis de 0,0027 y 0,0058%, y el fármaco AAS a dosis de 0,060% (Purina Lab., EE.UU.).

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.

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 a las concentraciones mencionadas de rofecoxib 0,0027% o 1,2 mg/kg, rofecoxib 0,0058% o 3 mg/kg y AAS 0,06% o 30 mg/kg.

Para el sacrificio de los animales se empleó una solución de ketamina, atropina y diazepam (50, 10 y 40% respectivamente), administrado a razón de 4 ml/kg por vía intramuscular.

Seguimiento y sacrificio

Los animales fueron examinados semanalmente, prestando especial atención al peso corporal, perímetro abdominal, presencia y calidad de las deposiciones y aparición de rectorragias, con el fin de detectar cuadros oclusivos intestinales y cuadros tóxicos derivados de las neoplasias digestivas. Todos los animales fueron sacrificados en la semana 20, con sobredosis anestésica, y el colon examinado en busca de tumores cólicos. Se realizó laparotomía media y transversa, en T, y el colon fue extirpado en su totalidad, desde el ano hasta el ciego incluyendo además 1 cm de intestino delgado terminal. Las piezas fueron fijadas en solución de formaldehído al 10% para su examen histológico.

Evaluación de los tumores cólicos

Se examinó el colon de cada animal determinando tres parámetros: número de tumores, superficie tumoral y porcentaje tumoral. El porcentaje tumoral se determinó relacionando la superficie global del colon y la del colon ocupado por tumor, siendo el más fiel indicador de la cantidad de tejido tumoral al usar a cada animal como su

propio control. En el estudio histológico de las piezas cólicas se determinaron el tipo histológico de cada tumoración, 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, empleando técnicas de inmunohistoquímica con Ac anti-COX-2 (Santa Cruz Biotech., EE.UU.). Se analizó la positividad o negatividad de la expresión así como su localización.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con los programas SPSS y G-Stat, y el análisis estadístico se realizó con modelos Anova unifactorial de comparación de medias (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.

Mortalidad

La mortalidad global del estudio fue de 4,61% (3 animales de 65). Existieron dos muertes en el grupo control y otra en el grupo BD-ICOX-2, que no se reemplazaron al ocurrir estos decesos en mitad del estudio. En las necropsias realizadas a los animales, se hallaron como causa de muerte una hemorragia cerebral en el grupo control, no hallando la causa de la muerte en el animal del grupo con rofecoxib, y no siendo recuperable el tercer animal para estudio necrópsico.

Alteraciones al tránsito cólico

No aparecieron alteraciones al tránsito digestivo (presencia de heces formadas, perímetro abdominal estable y ganancia de peso positiva o nula al final del estudio, pero no negativa). Este hecho fue corroborado en el sacrificio de los animales, donde no se halló ninguna neoplasia que fuera total o parcialmente estenosante. La curva de crecimiento de los animales en los grupos de estudio se expresa en la figura 1.

Número de tumores

Se hallaron un total de 97 tumores cólicos en los 62 animales evaluados, con una media de 1,56 tumores cólicos por animal. De ellos, 72 fueron adenocarcinomas y 25 adenomas. La media de adenomas por animal fue de 0,40, mientras que la de adenocarcinomas fue de 1,16. La distribución de estos tumores se describe en la tabla I.

Tabla I. Valores totales y medios de adenomas y adenocarcinomas

	Número adenocar.	Media adenocar.	Número 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

*Diferencia significativa respecto al control.

Las diferencias fueron estadísticamente significativas al considerar el número de adenocarcinomas cólicos en los grupos. En el grupo control, la media de adenocarcinomas cólicos 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). En el grupo BD-ICOX-2 la media fue de 1,2 tumores por animal, inferior al control pero superior a los otros grupos con adición de antiinflamatorios.

Considerando los adenomas cólicos, el grupo control fue el que presentó la mayor incidencia, al igual que en los adenocarcinomas, con una media de 0,65 adenomas por rata. En el grupo con bajas dosis de rofecoxib, la incidencia de adenomas fue nula, diferencia esta que fue significativa respecto al grupo control ($p < 0,05$, Scheffé). En el grupo con AAS la media fue de 0,53 y en el grupo con rofecoxib a dosis altas fue de 0,38, diferencias estas no significativas.

En cuanto a la localización de los tumores, la mayoría se localizaron en el colon distal; 57,14% en los 5 cm distales del intestino grueso.

Superficie tumoral microscópica

En el conjunto de los animales se obtuvieron 31,56 cm² de superficie cólica tumoral; 0,12 cm² corresponden a tumores benignos y el resto, 31,44 cm², a adenocarcinomas. Al considerar los adenocarcinomas, las diferencias entre los grupos no fueron significativas. La superficie tumoral media para los adenomas fue mayor en el grupo control, 0,27 cm², siendo nula en el grupo BD-ICOX-2. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas para los adenomas (Tabla II).

Tabla II. Valores medios de superficie y porcentaje tumoral en adenomas y adenocarcinomas en los grupos de estudio

	Superficie tumoral adenocar.	Porcentaje tumoral adenocar.	Superficie tumoral adenoma	Porcentaje tumoral adenoma
Control	0,45	4,56	0,27	0,21
AAS	0,34	2,94	0,13	0,17
BD-ICOX-2	0,40	3,52	0*	0*
AD-ICOX-2	0,38	0,55*	0,11	0,09

*Diferencia significativa respecto al control.

Porcentaje tumoral microscópico

Este parámetro determina la formación de tejido glandular con neoplasia cólica ajustada al tamaño del colon de cada animal.

Considerando todos los adenocarcinomas cólicos inducidos, 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%, bajando al 2,94% en el grupo con ASA y siendo inferior al 1% en el grupo con rofecoxib a dosis altas, con un valor de 0,55%. Las diferencias entre el último grupo y los grupos control y BD-ICOX-2 fueron significativas ($p < 0,01$, Scheffé) (Fig. 2).

El porcentaje tumoral para los adenomas cólicos supone un porcentaje pequeño de tejido cólico, el 0,11% de la superficie cólica. Los resultados del porcentaje en los adenomas sigue una distribución similar a la obtenida en la superficie tumoral, siendo significativas las diferencias entre el grupo con rofecoxib a dosis bajas y el grupo control (0,21% en grupo control y 0% en grupo BD-ICOX-2, $p < 0,05$, Scheffé) (Fig. 2).

Expresión cólica de ciclooxigenasa-2

La expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 se determinó en el tejido cólico tumoral y en la mucosa cólica normal adyacente al tumor. Al determinar la COX-2 en el tejido tumoral, adenoma y adenocarcinoma, la expresión COX-2 fue más de 6 veces superior en los adenocarcinomas, con una media de 0,0043 en los adenomas y 0,27 en los tumores malignos, diferencia que fue significativa ($p < 0,01$, χ^2).

En los adenocarcinomas cólicos existió una disminución en la expresión COX-2 en los casos con rofecoxib a dosis bajas y altas, respecto al grupo con AAS y control ($p < 0,001$, χ^2) (Tabla III). Esta disminución sólo se apreciaba en el epitelio y estroma de los adenocarcinomas y no en la mucosa normal.

La expresión COX-2 en los adenomas mostró una reducción significativa en los grupos con rofecoxib respecto al control y AAS ($p < 0,01$, χ^2) (Tabla III).

Analizando de manera global la expresión de la COX-2 en colon normal y tumoral, el grupo con altas dosis de rofecoxib mostró reducciones significativas respecto del grupo control y del grupo con adición de AAS ($p < 0,05$, χ^2).

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

	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

Estudio histológico

Los adenomas (n = 25) representaron el 25,77% de los tumores inducidos, siendo el resto adenocarcinomas (74,22%). Los adenocarcinomas fueron bien diferenciados en el 33,33% de los casos, moderadamente diferenciados en 37,5% y pobremente diferenciados en el 29,16%. En cuanto al nivel de invasión en los adenocarcinomas, la mayoría alcanzaban la submucosa (57,14%), siendo invasores más allá de la submucosa en el 42,85%. Se aislaron un total de 344 ganglios linfáticos epicólicos (5,54 por animal, 4,77 ganglios por adenocarcinoma), albergando micrometástasis por adenocarcinoma 18 de ellos (5,23%). Ninguna de las diferencias entre los grupos en relación a estos parámetros fue estadísticamente relevante.

DISCUSIÓN

Se han publicado numerosos estudios que evalúan los AINE en la quimioprevención del CCR farmacológicamente inducido en modelos animales, mostrando que los AINE reducen la incidencia y la multiplicidad de estos tumores (17-19).

En cuanto a los inhibidores selectivos de la COX-2, la primera evidencia de su eficacia en animales se debe a estudios realizados sobre ratones Min (*multiple intestinal neoplasia*), con una mutación dominante del gen APC, que desarrolla múltiples adenomas intestinales (20). La administración de celecoxib frente a piroxicam y la de rofecoxib producen una disminución del número de adenomas (20-23). En modelos de carcinogénesis con ratas expuestas a azoximetano, se redujeron los focos aberrantes de las criptas del colon en un 40-49% si se administraba celecoxib, así como la incidencia de CCR y su multiplicidad en los animales expuestos al carcinógeno y tratados con celecoxib (24,25).

El rofecoxib tiene una absorción oral rápida y los incrementos de dosis por encima de 5 mg/kg no se traducen en un aumento del nivel plasmático del fármaco en la rata (26). Tiene excreción biliar primaria y sus metabolitos no son activos en cuanto a la inhibición de las ciclooxigenasas 1 ó 2 (27). La dosis que se ha usado en este estudio, 0,0027 y 0,0058%, correspondería con dosis de 1,2 y 3

mg/kg de peso. Estas concentraciones del fármaco son elevadas si las relacionamos con las dosis habituales usadas en artrosis y en dolor agudo, pero según estudios clínicos de farmacocinética, la inhibición de la COX-2 es mayor a dosis más altas y la tolerancia es aceptable (28). En octubre de 2004, el laboratorio MSD retiró el rofecoxib del mercado farmacéutico para evitar su uso clínico dada la existencia de una tasa de eventos cardiovasculares mayor a la esperada, según resultados de seguridad derivados del estudio APPROVe sobre prevención de aparición de adenomas cólicos en humanos. Esta retirada afecta de momento a la utilización aceptada en ficha técnica, pero la investigación en el campo del CCR debería seguir con los coxibs, siendo el rofecoxib el fármaco con mayor potencia inhibidora de la COX-2.

La mayoría de estudios sólo hacen referencia al número de tumores cólicos dejando de lado parámetros tan importantes como la superficie y porcentaje tumoral. Cuando no hablamos de criptas aberrantes o 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 magnitud del colon estudiado. El modelo de carcinogénesis farmacológica empleado está ampliamente aceptado en la experimentación animal para estudio del CCR (29,30), apareciendo alrededor del 60% de los tumores inducidos en el colon distal en una distribución similar a la que ocurre en humanos (31).

Atendiendo a los adenomas inducidos, encontramos que el número de los mismos y el porcentaje tumoral de tejido adenomatoso fue significativamente inferior en el grupo con dosis bajas de rofecoxib respecto al control. A pesar de la incidencia relativamente baja de adenomas en el estudio respecto al global de las neoplasias, se observa una importante reducción para los tumores benignos con dosis bajas de inhibidor selectivo de la COX-2.

En cuanto a los adenocarcinomas inducidos, se halló una reducción significativa en el número de los mismos cuando se administró AAS y rofecoxib a dosis altas. Cuando se analizó el porcentaje tumoral, sólo el inhibidor selectivo de la COX-2 a altas dosis mostró una reducción significativa. Las dosis bajas de rofecoxib no se mostraron eficaces para proteger de la inducción y promoción de los adenocarcinomas, en contraposición a los resultados obtenidos con estas dosis para los adenomas. Estos resultados concuerdan con los publicados recientemente por Oshima y cols., que demuestran que el tratamiento con el I-COX-2 rofecoxib, produce una reducción dosis dependiente del número y del tamaño de las neoplasias cólicas inducidas (22).

El efecto frenador de la carcinogénesis inducida mediada por la inhibición de la COX-2 se ha acompañado de reducciones significativas de la expresión de la enzima COX-2 determinada por inmunohistoquímica en el tejido neoplásico.

Con los resultados obtenidos se puede ver el efecto preventivo de la adición de dosis altas de I-COX-2 en la

formación de adenocarcinomas cólicos inducidos en ratas. El I-COX-2 a dosis bajas consiguió este mismo efecto protector frente a la aparición de tumores benignos, 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 (13-16,32) en los que se analizaba su efecto sobre las criptas colónicas displásicas, sin hallar un efecto claro sobre las neoplasias cólicas inducidas (33,34).

Recientemente, Becerra y cols. (13) han encontrado un fracaso en el efecto preventivo del rofecoxib sobre el cáncer colorrectal avanzado en humanos. Las dosis empleadas en este estudio son incluso inferiores a las que

nosotros hemos empleado como dosis inferiores de rofecoxib, por lo que creemos que las dosis testadas no son útiles como quimiopreventivas del CCR.

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.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Fisiología Animal de la Universitat de les Illes Balears (Prof. R. Rial), por el asesoramiento y apoyo en la experimentación animal.