

Efecto de la desfuncionalización colónica en un modelo experimental de cáncer de colon

S. Pérez-Holanda, L. Rodrigo¹, J. Viñas-Salas², C. Piñol-Felis² y C. Ildefonso³

Servicio de Cirugía. Hospital Valle del Nalón. Langreo. Asturias. ¹Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo. Asturias. ²Departamento de Medicina y Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Hospital Universitario Arnau de Vilanova. Universidad de Lleida. ³Servicio de Cirugía. Hospital Grande Covián. Arriandas, Asturias

RESUMEN

Objetivo: examinar el efecto de la ausencia fecal en la aparición y desarrollo de la carcinogénesis colónica en ratas de ambos sexos.

Material y métodos: ciento treinta y ocho ratas "Sprague-Dawley" de 10 semanas de vida, de ambos sexos, divididas en 5 grupos: A) 20 ratas, sin tratamiento; B) 26 ratas, con una desfuncionalización colónica; C) 30 ratas, 18 dosis semanales de 21 mg/kg peso de dimetilhidracina (DMH) desde el principio del estudio; D) 20 ratas, 18 semanas con ácido etilen-diamino-tetracético; y E) 42 ratas, igual técnica quirúrgica que B, y las mismas inyecciones que C. El sacrificio tuvo lugar a las 25-27 semanas. Se estudió la incidencia de tumores colorrectales, su localización y los hallazgos anatómo-patológicos, comparando entre grupos.

Resultados: la ausencia de carcinógeno no desarrolló tumores. No hubo diferencias significativas entre el número total de tumores inducidos ni en el promedio de tumores por rata entre las ratas C y las E. La ausencia fecal provocó unos tumores de menor tamaño ($p = 0,007$), los cuales presentaron estirpes más glandulares ($p = 0,00009$), mejor diferenciadas ($p = 0,0054$) y menos invasivas ($p = 0,015$). Así mismo, la ausencia fecal modificó tanto el predominio natural de los machos sobre las hembras para desarrollar un mayor número de tumores colónicos DMH-inducidos ($p = 0,025$), como el predominio en el colon derecho de los carcinomas mucinosos DMH-inducidos ($p = 0,0065$).

Conclusiones: la desfuncionalización colónica en ratas provoca en los segmentos desfuncionalizados una alteración de los patrones de la carcinogénesis DMH-inducida.

Palabras clave: Cáncer. Carcinogénesis. Colon. Desfuncionalización. Dimetilhidracina. Neoplasia. Tumores.

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) de elevada mortalidad en Occidente (1) es el segundo de mayor incidencia en Asturias (13% de cánceres diagnosticados anualmente), causando 3,7% del total de los fallecimientos y 14,1% de las muertes por cáncer (2). Un metanálisis realizado demostró el papel ambiental en su inducción (3), pudiéndose reducir su incidencia en 30-35% con los hábitos alimentarios (4). También en modelos experimentales, la ausencia fecal colónica protegería frente al CCR (5), aunque los tumores inducidos no mostrarían varia-

ciones histológicas (6). La carcinogénesis también podría ser diferente entre el colon izquierdo y el derecho (7). Los tumores en presencia fecal serían mayores y más numerosos que los desarrollados en su ausencia (8,9). Por fin, el factor sexual también puede mostrar diferencias en la carcinogénesis.

Dada la dificultad técnica de estudios prospectivos a largo plazo (10), el estudio del CCR inducido con 1,2 dimetilhidracina (DMH) en ratas es un modelo experimental válido actualmente, superponible al humano, tanto en sus características macro-microscópicas como en su comportamiento clínico (11-13).

Nuestro objetivo es examinar el efecto de la ausencia fecal en la aparición y desarrollo de la carcinogénesis colónica en ratas de ambos sexos.

MATERIAL Y MÉTODOS

No se realizó ninguna preparación preoperatoria ni ayuno. Se practicó una anastomosis término-lateral (T-L) íleo-rectal a las ratas de los grupos B y E:

—Pesado; preparación del anestésico: hidrato de cloral (Panreac®, Barcelona) 4,5% intraperitoneal, a 1 ml/100 g (14).

—Anestesia, rasurado y colocación del animal.

—Colocación de microscopio óptico (x 4).

—Antisepsia. Incisión (2,5-3 cm). Colocación de paño fenestrado (15,16).

—Sección ileal a 5 mm de la válvula ileocecal (17), ligadura-sección vascular con seda 4/0 (18).

—Ligadura con seda 2/0 del íleon terminal, y sección proximal congruente (19).

—Incisión rectal de 5 mm a 3 cm del ano (9).

—Anastomosis íleo-rectal T-L con seda 4/0, con dos suturas continuas anudadas en sus extremos, que atraviesan todo el espesor de la pared intestinal.

—Cierre de pared continua monopiano de seda 2/0; piel a puntos simples.

El tiempo de la intervención aproximado fue de 35 min, devolviéndose a su jaula en decúbito lateral.

Los animales siguieron vigilancia clínica al menos de una vez al día, constatando su estado general y su grado de postración postanestésica. Iniciaron tolerancia oral hídrica en el momento del despertar y de la dieta a las 12 horas, viéndose restablecimiento del tránsito intestinal a las 48 horas. La inducción carcinogénica se inició al octavo día (20,21).

Se estableció un número mínimo de 20 ratas por grupo en base a una inducción tumoral conocida de 76-90% (22-23); para una tasa de tumores de 1,87; y una mortalidad variable y elevada (20,24-27).

138 ratas "Sprague-Dawley" de 10 semanas de vida (Lab. Letica®, Barcelona, España), de ambos sexos y de igual línea genética, fueron distribuidas en cinco grupos: A) 20 ratas: sin tratamiento; B) 26 ratas: intervención; C) se tomaron 30 ratas por la alta mortalidad obtenida en el mismo grupo en estudios previos (23-25); 18 inyecciones subcutáneas semanales continuadas de 21 mg/kg peso de 1,2 dimetilhidracina (DMH; Fluka Chemica A.G., Sigma Co.®, St. Louis, Missouri, EE.UU.) desde la semana 10 de vida. Se preparó semanalmente (23,28), aplicándose en la región lumbar; D) 20 ratas: mismo volumen de EDTA que C, mezclada con agua destilada, sin DMH; y E) se tomaron 42 ratas debido a la alta mortalidad obtenida en este grupo en estudios previos (26). Fueron intervenidas con la misma técnica que B y al octavo día (20), fueron tratadas con las mismas dosis de DMH que C. Para realizar la comparación tumoral entre los grupos C y E, aquellos obtenidos en colon descendente con heces, en la anastomosis y lo localizados en recto fueron excluidos del estudio.

La alimentación estándar (dieta ITM-R20, Lab. Letica®, Barcelona, España) tiene un 3% de grasa y un 5% de fibra, y la cantidad consumida en los grupos se controló durante el estudio. El 50% de los animales de cada grupo eran pesados semanalmente hasta el momento del sacrificio. El animalario se mantuvo a una temperatura y una humedad constantes, con un ciclo circadiano de luz-oscuridad de 12 horas (15,29). Los animales se separaron con un máximo de tres por jaula, y sin juntar distintos sexos, para evitar autofagia (23-25,28) y agresiones.

Se siguieron las recomendaciones del Comité Europeo de Ética (Directiva de la CEE 1986/609) y Real Decreto 1201/2005 sobre protección de animales utilizados para experimentación, en cuanto a protección, condiciones de cuidado, manejo, identificación, transporte, registro, confinamiento, condiciones estructurales, anestesia y competencias del personal.

Se sacrificaron entre las semanas 25 y 27 mediante una dosis letal de hidrato de cloral intraperitoneal. Un número fijo e igual de ratas de cada grupo se sacrificaron semanalmente (23,28).

En la autopsia se examinaron las cavidades torácica y abdominal. Se registró el número de tumores, su localización y su tamaño. El tamaño se expresa en media \pm desviación estándar (en milímetros cuadrados, obtenido de sus diámetros mayores longitudinal y transversal)

(28,30). Se tomaron muestras para el estudio histológico de los tumores, tanto a nivel del ciego y ascendente (colon derecho) como del transversal y descendente desfuncionalizado (izquierdo). Se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se siguieron los criterios de Grau de Castro y Piqué Badía (31) y Lev (32), según su grado de invasión parietal, de su diferenciación, de su estirpe histológica (definiendo al carcinoma mucinoso cuando su componente de mucina es superior al 50%). Se registró su asociación a placa linfóide y su aspecto macroscópico. Se registraron otros hallazgos encontrados.

En la aplicación informática SPSS se registraron los datos, y se utilizó el test bivalente, con la corrección exacta de Fisher si fuera necesario, para comparar las diferentes variables entre los grupos C y E. Las diferencias fueron significativas cuando el valor de *p* resultó igual o menor que 0,05. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar (SD).

RESULTADOS

No completaron el estudio 27 ratas (19,6%): 10 ratas B (38,5%), 2 ratas C (6,7%) y 15 ratas E (35,7%).

Fallecieron el 80% (4 de 5) de los machos B: 2 por peritonitis fecaloidea por dehiscencia de sutura (a las 72 h); una por oclusión de asa ciega de colon; y otra por oclusión por estenosis anastomótica (primera semana). Seis hembras B no completaron el estudio (28,6%): una por obstrucción de delgado por adherencias (quinta semana); otra con caquexia extrema y heces líquidas, sin tumores (séptima semana); 1 por canibalismo (novena semana); y en 3 no se encontró causa (10, 12 y 13 semanas).

En el grupo C fallecieron 1 rata macho y una rata hembra sin causa aparente, sin tumores.

En el grupo E fallecieron 57,1% de los machos (12 de 21): 4 por dehiscencia de sutura y peritonitis fecaloidea (72 horas); 3 por oclusión de delgado (7 días); 2 machos por canibalismo (10 y 12 semana); 2 con sendos tumores colónicos, no siendo posible su estudio microscópico; y 1 con tumor maligno anastomótico oclusivo. En las hembras E se encontraron 3 muertes anticipadas (14,3%): 1 con oclusión del colon desfuncionalizado (7 días); 1 con adherencias e isquemia intestinal (14 semana), sin tumores; y 1 (14 semana), con oclusión de delgado por úlcera benigna anastomótica.

En los grupos B y E se perdieron el 80 y 57,1% de los machos y el 28,6 y 14,3% de las hembras, respectivamente (Fisher, *p* = 0,31).

La mortalidad postoperatoria global fue 17,6% (12 de 68); en machos fue del 42,3% (11 de 26) y en hembras del 2,4% (1 de 42) (*p* < 0,00001).

No hubo diferencias significativas entre el peso de los animales del grupo C y del E (Tabla I). En las ratas E, los segmentos excluidos tuvieron significativamente menor longitud comparados con las ratas C, tanto en los machos como en las hembras (Tabla I).

Tabla I. Descripción morfométrica de la muestra

	Grupo DMH (C)	Grupo DMH + IQ (E)
Peso medio al sacrificio en gramos (media ± SD)		
Machos	505,47 ± 62,62	521,67 ± 108,89
Hembras	322,01 ± 27,36	314,44 ± 49,67
Longitud media de los segmentos en machos en cm (media ± SD)		
Ciego	4,80 ± 0,68	2,78 ± 0,76
	(p < 0,001)	
Ascendente	3,22 ± 0,64	2,22 ± 0,44
	(p < 0,001)	
Transverso	3,26 ± 0,59	2,72 ± 0,44
	(p = 0,016)	
Longitud media de los segmentos en hembras en cm (media ± SD)		
Ciego	4,60 ± 0,55	2,44 ± 0,62
	(p < 0,001)	
Ascendente	3,22 ± 0,65	2,25 ± 0,71
	(p < 0,001)	
Transverso	3,57 ± 0,62	2,39 ± 0,63
	(p < 0,001)	

SD: desviación estándar; DMH: dimetilhidracina; IQ: intervención quirúrgica.

En los grupos A, B y D no se encontraron tumores. Se observaron 25 tumores en las 28 ratas C, y 10 en las 27 ratas E (Tabla II). En el grupo E los tumores se localizaron 2 en ascendente, 4 en transverso, 4 en descendente desfuncionalizado, 10 en la anastomosis y 13 en el recto.

Hubo un menor número de animales machos libres de tumor que de hembras libres de tumor, tanto en las ratas C (14,3 vs. 78,6%; p = 0,0006) como en el grupo E (0 vs. 50%; p = 0,011) (Tabla II). En presencia de carcinógeno, el predominio natural de los machos sobre las hembras para desarrollar un mayor número de tumores colónicos, fue alterado por efecto de la ausencia fecal, siendo la proporción de tumores en hembras C del 12%, y del 50% en hembras E (p = 0,025) (Tabla II).

En cuanto a las características macroscópicas estudiadas (Tabla III), los tumores de los segmentos excluidos del grupo E fueron significativamente de menor tamaño que los tumores del grupo C (p = 0,007). Sin embargo, no

Tabla II. Incidencia tumoral y distribución

	Grupo DMH (C)	Grupo DMH + IQ (E)
Número de ratas al sacrificio, n (%)		
Machos:Hembras, n	14:14	9:18
Número de ratas libres de tumor, n (%)		
Machos, n (%)	2/14 (14,3%)	0/9 (0%)
Hembras, n (%)	11/14 (78,6%)*	9/18 (50%)**
Número total de tumores, n		
Machos:Hembras, n	22:3	5:5
	(p = 0,025)	
Promedio de tumores/rata (media ± SD)		
Machos	1,83 ± 1,34	0,40 ± 0,83
Hembras	1,00 ± 0,00	0,35 ± 1,17

Hembras frente a machos: *Dentro del grupo DMH, p = 0,0006; **dentro del grupo DMH + IQ, p = 0,011; SD: desviación estándar; DMH: dimetilhidracina; IQ: intervención quirúrgica; n: número de tumores.

Tabla III. Características macroscópicas de los tumores

	Grupo DMH (C) (n = 25)	Grupo DMH + IQ (E) (n = 10)
Promedio tamaño tumoral en mm ² (media ± SD)		
Global	55,40 ± 157,29	0,82 ± 0,40
	(p = 0,007)	
Machos	59,45 ± 167,40	1,0 ± 0,00
Hembras	25,67 ± 33,65	20,33 ± 14,01
Hallazgos macroscópicos tumorales		
Polipideo, n (%)	20 (80%)	1 (10%)
Mucosa normal, n (%)	2 (8%)	4 (40%)
Otras morfologías, n (%)	3 (12%)	5 (50%)
Distribución tumoral en el colon		
Colon derecho, n (%)	8 (32%)	6 (60%)
Colon izquierdo, n (%)	17 (68%)	4 (40%)

SD: desviación estándar; DMH: dimetilhidracina; IQ: intervención quirúrgica; n: número de tumores.

hubo variaciones significativas ni en su aspecto ni en su localización.

En cuanto a las características microscópicas de los tumores (Tabla IV), en los segmentos excluidos se presentaron un mayor número de adenocarcinomas (frente a carcinomas mucinosos, considerando un componente mucinoso > 50% del adenocarcinoma; p = 0,00009), un mejor grado de diferenciación tumoral (p = 0,0054), y un menor grado de invasión parietal (p = 0,015), frente a los tumores de los segmentos funcionalizados del grupo C. No hubo diferencias entre ambos grupos en la asociación de los tumores con tejido linfoide.

Las ratas C presentaron un mayor número de carcinomas mucinosos en el colon derecho (75%) comparado con el izquierdo (17,6%) (p = 0,006). Se observan diferencias significativas con respecto al grupo E (p = 0,0065), en el que la estirpe adenocarcinoma predomina tanto en los tumores de colon derecho (100%) como en el colon izquierdo (100%) (Tabla V).

Tabla IV. Características microscópicas de los tumores

	Grupo DMH (C) (n = 25)	Grupo DMH + IQ (E) (n = 10)
Adenocarcinomas, n (%)		
	16 (64%)	10 (100%)
	(p = 0,00009)	
Carcinomas mucinosos, n (%)		
	9 (36%)	0 (0%)
Grado de diferenciación		
Bien, n (%)	5 (20%)	10 (100%)
	(p = 0,0054)	
Moderado, n (%)	8 (32%)	0 (0%)
Pobre, n (%)	12 (48%)	0 (0%)
Grado de invasión		
Carcinoma <i>in situ</i> , n (%)	5 (20%)	8 (80%)
	(p = 0,015)	
Afectación del peritoneo, n (%)		
Otros, n (%)	1 (4%)	1 (10%)
	19 (76%)	1 (10%)
Tejido linfoide asociado, n (%)		
	7 (28%)	4 (40%)

DMH: dimetilhidracina; IQ: intervención quirúrgica; n: número de tumores.

Tabla V. Clasificación tumoral en función de la localización

	Grupo DMH (C) (n = 25)	Grupo DMH + IQ (E) (n = 10)
Colon derecho, n	8	6
Tamaño tumoral (media ± SD)	129,50 ± 272,99	25,00 ± 33,94
Adenocarcinomas, n (%)	2 (25%)	6 (100%)
	(p = 0,0065)	
Carcinomas mucinosos, n (%)	6 (75%)*	0 (0%)
Colon izquierdo, n	17	4
Tamaño tumoral (media ± SD)	20,53 ± 21,62	15,75 ± 14,66
Adenocarcinomas, n (%)	14 (82,4%)	4 (100%)
Carcinomas mucinosos, n (%)	3 (17,6%)	0 (0%)

*p = 0,006 (adenocarcinomas frente a carcinomas mucinosos en el colon izquierdo del grupo); SD: desviación estándar; DMH: dimetilhidracina; IQ: intervención quirúrgica; n: número de tumores.

Se encontraron en sendas ratas C un tumor de intestino delgado y un tumor ótico. Una rata macho E presentó una carcinomatosis peritoneal, y una rata hembra E presentó múltiples metástasis hepáticas y esplénicas, comprobadas microscópicamente.

DISCUSIÓN

La mortalidad global en estudios quirúrgicos en ratas (28), es alta; por ello, su rendimiento es bajo (16,33,34). En nuestro estudio perdimos al 19,6% de ellas, incluyendo los grupos no intervenidos. Nuestra mortalidad postoperatoria fue 17,9%, lo cual también consideramos un rendimiento adecuado (7,19,35). Esa rentabilidad fue superior en las hembras frente a los machos.

La atrofia macro-microscópica de segmentos desfuncionalizados (7,36) explica la menor longitud encontrada, tanto en machos como en hembras.

La incidencia de carcinogénesis colónica espontánea es menor de 2-3 ratas/100.000 ratas observadas (37). En ausencia de carcinógeno no esperamos encontrar ningún tumor, como así resultó. La 1,2-dimetilhidracina (DMH) en ratas provoca tumores colónicos equiparables y superponibles en patología humana (11-13). Tiene propiedades mutagénicas (38) sobre el epitelio intestinal, con un efecto aditivo tanto por vía sanguínea como luminal (11). En nuestras ratas E, esta vía hematogena explica que no desapareciera por completo el efecto carcinogénico.

En España, la incidencia del cáncer colorrectal (CCR) pasó de 10 casos en 1990 (39,40), a 32/100.000 habitantes/año en 1998 (41). Estratificada por sexos es superior para hombres, que para mujeres (42). La evidencia epidemiológica de una menor incidencia de CCR en mujeres fue reproducible en nuestro modelo. Se comenta un menor riesgo de CCR asociado al uso de anticonceptivos orales, o a la edad temprana del primer embarazo (43); también (44) la hormonoterapia sustitutiva reduciría el riesgo de desarrollar pólipos adenomatosos colónicos.

Para constatar estas diferencias en este estudio hemos utilizado animales de ambos sexos, encontrándose un menor número de animales machos libres de tumor con respecto a las hembras, en los grupos DMH-inducidos. La anulación significativa de la proporción del número de tumores en el grupo E de los machos con respecto a las hembras parece un resultado contradictorio con la hipótesis de la protección hormonal frente al CCR. En un importante estudio (45) se postula que este efecto protector hormonal en hembras, es mediado a través de la reducción de la concentración de ácidos biliares secundarios fecales, y de la modulación de la absorción de calcio de las células colónicas tumorales. Lo cual explica nuestros hallazgos.

Estudios epidemiológicos avalan la mayor incidencia de CCR con el incremento de la edad. Iniciamos la inducción tumoral en la semana 10 en el grupo control, y en la 11 en el grupo intervenido. Esto podría suponer un defecto del diseño del estudio. Un estudio (46) que compara la inducción tumoral colónica en animales jóvenes y viejos ha señalado igual riesgo en ambos casos. Otros autores observan un mayor riesgo de CCR en animales con edades más tardías, asociado a déficits de coenzimas (47) o enzimas (48). No parece pues, que la diferencia de 7 días en el inicio de la inducción tumoral en nuestras ratas haya influido en nuestros resultados; además, corresponde la menor inducción tumoral al grupo de edad más tardía, y no al contrario.

El tamaño tumoral en ausencia fecal fue significativamente inferior. Parece explicarse por la más lenta progresión de la secuencia adenoma-carcinoma (8,49) debido a la ausencia de la vía carcinogénica intraluminal y a la ausencia del efecto cocarcinogénico fecal (1,32,50-53).

La mayor incidencia de tumores DMH-inducidos en el colon izquierdo viene explicada por la mayor susceptibilidad de la mucosa, la mayor concentración de carcinógeno tras la deshidratación fecal y la reducción del tránsito intestinal (54). En estudios experimentales pareados (54,55), el índice de criptas aberrantes DMH-inducidas en el colon izquierdo es alta, no evidenciándose este efecto en el colon derecho, reflejo de la secuencia adenoma-carcinoma en la carcinogénesis izquierda, y una carcinogénesis *de novo* en el colon derecho (7). En nuestras ratas, no hubo diferencias significativas ni en el número ni en el tamaño de los tumores en el colon derecho de las ratas C respecto al grupo E. Estos hallazgos sugieren que la ausencia fecal en el colon derecho no tiene repercusiones en la carcinogénesis en dicho segmento, como parece desprenderse de los autores mencionados. Sin embargo, no coincidimos con otros estudios (6), que indican que los tumores inducidos tanto en los segmentos excluidos como en los funcionales no muestran diferencias histológicas entre sí, ya que, si bien el colon izquierdo muestra este comportamiento, el colon derecho de nuestros animales no.

Diversos estudios asocian la localización derecha de los tumores con su peor diferenciación histológica

(28,51). En nuestro estudio se observó en las ratas C un mayor número de carcinomas mucinosos en el colon derecho respecto al colon izquierdo. Dicho comportamiento dejó de observarse en las ratas E, donde el predominio de los tumores del colon derecho correspondió a formas bien diferenciadas de la estirpe adenocarcinoma; comportamiento similar a la patología humana (54).

Concluimos que:

—Las características microscópicas de los tumores co-

lónicos en ausencia fecal fueron significativamente de menor agresividad que en su presencia.

—En nuestro estudio, la ausencia fecal en el colon derecho modificó las estirpes histológicas tumorales encontradas.

—Las ratas hembras mostraron mejor rendimiento experimental con mayor resistencia frente a agresiones externas (intervenciones) y agentes químicos carcinogénicos (DMH).