

TRABAJOS ORIGINALES

# Efecto del ácido ursodeoxicólico en un modelo experimental de cáncer de colon

S. Pérez-Holanda, L. Rodrigo<sup>1</sup>, J. Viñas Salas<sup>2</sup> y C. Piñol Felis<sup>2</sup>

*Servicio de Cirugía. Hospital Valle del Nalón. Langreo, Asturias. <sup>1</sup>Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo. Asturias. <sup>2</sup>Departamento de Medicina y Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Hospital Universitario "Arnau de Vilanova". Universidad de Lleida*

## RESUMEN

**Objetivos:** analizar si la administración oral del ácido ursodeoxicólico previene la aparición y desarrollo de carcinogénesis colónica en ratas.

**Material y métodos:** ciento diez ratas de la raza "Sprague-Dawley" de 10 semanas de vida, de ambos sexos, fueron divididas en 5 grupos: a) 20 ratas control, sin tratamiento; b) 20 ratas, tratadas con ácido ursodeoxicólico (AUDC), a 4 mg/kg/día, junto con etanol, a 1,23 g/kg peso al día, añadidos al agua de bebida, desde el principio del estudio y durante 24 semanas; c) 30 ratas, 18 dosis semanales, de 21 mg/kg peso de dimetilhidracina (DMH) subcutánea, desde el principio del estudio, junto con las mismas dosis de etanol y AUDC, que en el grupo B; d) 20 ratas, 18 dosis semanales subcutáneas de ácido etilen-diamino-tetracético; y e) 20 ratas, tratadas con las mismas dosis de etanol y las mismas inyecciones de DMH, que el grupo C. El sacrificio de todos los animales, se llevó a cabo en las semanas 25-27.

**Resultados:** no aparecieron tumores en ausencia de DMH. No se observaron diferencias significativas en el número de ratas que desarrollaron cáncer de colon, ni en el número de neoplasias por rata, ni en los hallazgos macro-microscópicos de los tumores, entre los animales del grupo C y del grupo E.

**Conclusiones:** la administración de ácido ursodeoxicólico, en la dosis y tiempo utilizados no modificó la carcinogénesis colónica, usando un modelo dinámico de administración concomitante de inducción tumoral con DMH en ratas.

**Palabras clave:** Cáncer de colon. Carcinogénesis. Dimetilhidracina. Tumores. Ácido ursodeoxicólico.

## ABSTRACT

**Aims:** the present study was designed to examine the effect of ursodeoxycholic acid as chemoprotective agent in experimental colon carcinogenesis in rats.

**Material and methods:** one hundred and ten 10-week-old, Sprague-Dawley rats were divided into five groups: group A (20), no treatment. Group B (20), receiving daily both ursodeoxycholic acid (UDCA) 4 mg/kg of body weight and ethanol 1.23 g/kg of body weight added to the drinking water from the beginning of the study through 24 weeks. Group C (30), receiving 18 weekly doses of dimethylhydrazine (DMH) 21 mg/kg of body weight subcutaneously from the beginning of the study, with the same doses of UDCA and ethanol as in group B. Group D (20), ethylen-diamin-tetracetic acid solution alone for 18 weeks. Group E (20), receiving the same doses of ethanol plus DMH injections as in group C. All experimental animals were sacrificed after 25-27 weeks.

**Results:** no tumors developed in dimethylhydrazine-free groups. No significant differences in number of tumor-free animals, number of tumors per rat, and macro-microscopic tumor findings were seen between animals in group C and animals in group E.

**Conclusions:** we concluded that such an ursodeoxycholic acid supplementation did not modify colorectal carcinogenesis using a dynamic DMH-induced model in rats.

**Key words:** Colon cancer. Carcinogenesis. Dimethylhydrazine. Tumors. Ursodeoxycholic acid.

*Pérez Holanda S, Rodrigo L, Viñas Salas J, Piñol Felis C. Efecto del ácido ursodeoxicólico en un modelo experimental de cáncer de colon. Rev Esp Enferm Dig 2007; 99: 491-496.*

## INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es un tumor muy frecuente que cursa con una elevada mortalidad en Occidente (1).

Recibido: 01-05-07.

Aceptado: 29-06-07.

Correspondencia: Sergio Pérez-Holanda. Camino del Cierrín, 14, Urb. La Fresneda, Siero. 33429 Asturias. e-mail: sergio.perez-holanda@sespa.pincast.es

En Asturias representa el 13% de los cánceres diagnosticados anualmente (2). Los factores ambientales juegan un papel destacado en su inducción (3); entre ellos, la dieta rica en grasas predispone al CCR, en parte debido a que aumentan la concentración de ácidos biliares secundarios en las heces, los cuales son promotores carcinogénicos (4,5).

El ácido ursodeoxicólico (AUDC) se utiliza actualmente en terapéutica humana (6-10). Este ácido biliar ha

sido descrito tanto como posible agente promotor carcinogénico (11,12) como posible agente protector frente al CCR (13-15). Ha sido recientemente descrito su posible empleo como agente quimioprotector (16,17), aunque la dosis y duración del mismo deben de ser aún establecidos.

Los estudios prospectivos clínicos a largo plazo de factores etiológicos ambientales sobre el CCR son difíciles de llevar a cabo (18). La inducción de CCR con 1,2-dimetilhidracina (DMH) en ratas, es un modelo experimental válido actualmente y superponible al humano, debido a que los tumores inducidos con DMH se parecen tanto en sus características macro-microscópicas como en su comportamiento clínico (19-21).

El objetivo del presente estudio ha sido el examinar si el efecto de la adición de un suplemento oral de AUDC podría prevenir, en la aparición y desarrollo de la carcinogénesis colónica en ratas de ambos sexos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se engloba dentro del mismo experimento del que se han publicado algunos resultados previamente, siendo los animales de la misma línea genética consanguínea. Se estableció un número mínimo de 20 ratas por grupo, en base a una inducción tumoral de 76-90% (22,23) a la dosis y tiempo establecidos, para una tasa de tumores entre 1,60 (24,25) y 1,87 (26-28), y una mortalidad variable y elevada. En base al número de ratas disponibles, nacidas de los mismos progenitores y que crecieron hasta la semana 10 de vida, se incrementó en 10 animales el grupo con dimetilhidracina, etanol y ácido ursodeoxicólico por su mayor mortalidad esperable, y por ser el grupo más relevante del presente trabajo.

La administración aislada de AUDC provocaba un sobrenadante en el agua de beber y desencadenó un leve rechazo del agua en los animales. Estos hallazgos experimentales fueron subsanados mezclando el AUDC con etanol. Así se consiguió un consumo homogéneo de AUDC entre grupos y alcanzar la dosis diseñada de AUDC. Ello obligó a diseñar los grupos B, C y E.

No fue posible el diseño del estudio comparando un grupo DMH con un grupo DMH + etanol + AUDC, al no ser conocido el efecto de etanol + AUDC sobre la carcinogénesis.

Así, ciento diez ratas "*Sprague-Dawley*" de 10 semanas de vida (Lab. Letica<sup>®</sup>, Barcelona, España), de ambos sexos y de igual línea genética, fueron distribuidas en cinco grupos: a) 20 ratas, sin tratamiento; b) 20 ratas, tratadas conjuntamente con ácido ursodeoxicólico (AUDC; Ursochol<sup>®</sup>, Zambon SA, Grupo Zambon, Barcelona, España) por vía oral, a la dosis de 4 mg/kg peso al día; junto con etanol oral a la dosis de 1,23 g/kg peso al día; y ambos añadidos juntos al agua de bebida, desde el principio del estudio hasta el sacrificio; c) 30 ratas, tratadas con 18 dosis semanales de 21 mg/kg peso de dimetilhidracina (DMH; Fluka Chemica A.G., Sigma Co.<sup>®</sup>, St. Louis, Mis-

souri, EE.UU.), administrado semanalmente (24,25), por vía subcutánea, desde el principio del estudio, junto con las mismas dosis de etanol y AUDC que B; d) 20 ratas, tratadas con ácido etilen-diamino-tetracético por vía subcutánea con el mismo volumen que C; y e) 20 ratas (grupo control DMH + etanol), con las mismas dosis de etanol e inyecciones de DMH que C.

La alimentación fue estándar (Dieta ITM-R20, Lab. Letica<sup>®</sup>, Barcelona, España), conteniendo 3% grasa y 5% fibra. El 50% de los animales de cada grupo eran pesados semanalmente hasta el momento del sacrificio. La cantidad ingerida de etanol y de UDCA se controló (29) y se cuantificó en función de la cantidad de agua corriente consumida por las ratas a lo largo del estudio. Las condiciones de habitabilidad fueron controladas (30,31). Los animales fueron separados en jaulas con un máximo de tres animales por jaula y sin juntar distintos sexos, para evitar la autofagia y agresiones (23-27).

A lo largo de todo el estudio se siguieron las recomendaciones para el trato de animales de experimentación tanto del Comité Europeo de Ética (Directiva CEE 1986/609), como del RD 1201/2005 del 10 de octubre.

El sacrificio tuvo lugar entre las semanas 25<sup>a</sup> y 27<sup>a</sup>. Un número fijo e igual de ratas de cada grupo se sacrificaron semanalmente (23-25).

En la autopsia, se registró el número de tumores, su localización y tamaño, obtenido este de sus diámetros máximos longitudinal y transversal (24,25,31,32). Se tomaron muestras de los tumores en el ciego y colon ascendente (colon derecho) como del colon transversal y descendente (colon izquierdo). Se clasificaron (33,34) en función de su invasión parietal, grado de diferenciación, estirpe histológica, así como su asociación a la presencia de placa linfóide y su aspecto macroscópico. Se registraron también otros hallazgos encontrados.

## Análisis estadístico

El área tumoral se representó en forma de media  $\pm$  desviación estándar (DE), expresada en milímetros cuadrados. Se empleó el test bivariante para comparar las diferentes variables entre los grupos, especialmente entre los grupos terapéuticos C y E. Se utilizó el programa estadístico SPSS-10.1 (Chicago-Illinois). Se consideraron diferencias significativas, cuando el valor de p resultó igual o menor que 0,05.

## RESULTADOS

Se perdieron cinco ratas (4,5%) precozmente que fueron excluidas del estudio: 1 del grupo C (3,3%) y 4 del grupo E (20%). Una rata macho del grupo C falleció precozmente por un tumor oclusivo de colon descendente. En el grupo E, fallecieron dos ratas machos por sendos tumores oclusivos, y un tercero por hemorragia digestiva

baja, secundaria a un tumor colónico con metástasis hepáticas; así como una rata hembra, sin tumor.

No se observaron efectos adversos, tales como diarrea o deshidratación, en los animales que concluyeron el estudio.

No se observaron diferencias en la media de consumo de alcohol entre las ratas de los 3 grupos:  $1,23 \pm 0,0064$  g/kg peso al día en el grupo B;  $1,23 \pm 0,0071$  en el grupo C y  $1,23 \pm 0,0094$  en el grupo E ( $p = 0,77$ ).

Tampoco se observaron diferencias en la media de consumo de AUDC entre ellos:  $4 \pm 0,0021$  mg/kg peso al día en el grupo B; y  $4 \pm 0,0032$  en el grupo C ( $p = 0,81$ ).

No se encontraron diferencias en el peso de los animales entre los grupos C y E: para las ratas machos,  $531,64 \pm 78,71$  g y de  $556,82 \pm 27,68$  g respectivamente ( $p = 0,30$ ). Y para las ratas hembras,  $316,02 \pm 23,30$  g y  $307,50 \pm 35,90$  g respectivamente ( $p = 0,15$ ).

En los grupos sin DMH (A, B y D) no se encontraron tumores.

Se observaron 28 tumores colónicos en las 29 ratas C y 16 tumores en las 16 ratas E. No se observaron diferencias entre estos dos últimos grupos, en relación con el número de ratas libres de tumor, ni en el promedio de tumores hallados por rata (Tabla I).

No se encontraron diferencias entre los grupos C y E en cuanto al promedio del tamaño de los tumores colónicos encontrados, ni en su morfología macroscópica, ni en su localización (Tabla II).

En lo referente a las características microscópicas de los tumores no se observaron diferencias significativas entre los grupos C y E, respecto a la estirpe histológica, ni al grado de diferenciación tumoral, ni al grado de invasión parietal, ni a la asociación con tejido linfóide (Tabla III).

Las ratas C presentaron un mayor número de carcinomas mucinosos en el colon derecho (75%) que en el izquierdo (13,5%) ( $p = 0,003$ ). Esta tendencia también se observó en la localización de los tumores de las ratas E, 71,4% en el colon derecho y 33,3% en el colon izquierdo ( $p = 0,31$ ). Dos ratas hembras C, presentaron además metástasis hepáticas asociadas, confirmadas microscópicamente y secundarias a tumores colónicos derechos poco diferenciados y mucinosos (Tabla IV).

**Tabla I. Incidencia tumoral y distribución**

	DMH + AUDC + OH Grupo C (n = 29)	DMH + OH Grupo E (n = 16)
Número de ratas al sacrificio, n (%)	29 (96,7)	16 (80)
Machos / Hembras, n	14/15	7/9
Número de ratas libres de tumor, n (%)	7 (24,1)	6 (37,5)
Machos, n (%)	3/14 (21,4)	1/7 (14,3)
Hembras, n (%)	4/15 (26,7)	5/9 (55,6)
Número total de tumores, n (%)	28 (96,5)	16 (100)
Machos / Hembras, n	15/13	12/4
Promedio tumores/rata, media $\pm$ DE	$1,45 \pm 0,66$	$1,60 \pm 1,02$
Machos	$1,55 \pm 0,82$	$2 \pm 0,89$
Hembras	$1,18 \pm 0,66$	$1 \pm 0$

AUDC: ácido ursodeoxicólico; OH: etanol; DE: desviación estándar; DMH: dimetilhidracina; n: número de casos.

**Tabla II. Características macroscópicas de los tumores**

	DMH + AUDC + OH Grupo C (n = 29)	DMH + OH Grupo E (n = 16)
Promedio tamaño tumoral, mm <sup>2</sup> $\pm$ DE	$85,64 \pm 113,05$	$45,87 \pm 53,13$
Machos	$57,73 \pm 56,07$ n = 15	$39,08 \pm 49,69$ n = 12
Hembras	$117,85 \pm 65,76$ n = 13	$66,25 \pm 65,76$ n = 4
Hallazgos macroscópicos tumorales, n		
Polipoideo	19 (67,9)	13 (81,3)
Plano	2 (7,1)	2 (12,5)
Otras morfologías	7 (25)	1 (6,2)
Distribución tumoral en el colon, n		
Colon derecho	12 (42,9)	7 (43,8)
Colon izquierdo	16 (57,1)	9 (56,2)

AUDC: ácido ursodeoxicólico; OH: etanol; DE: Desviación estándar; DMH: Dimetilhidracina; n: Número de tumores. Los datos entre paréntesis reflejan porcentajes del total.

**Tabla III. Características microscópicas de los tumores**

	DMH + AUDC + OH Grupo C (n = 29)	DMH + OH Grupo E (n = 16)
Estirpe histológica, n		
Adenocarcinomas	17 (60,7)	8 (50)
Carcinomas mucinosos	11 (39,3)	8 (50)
Grado de diferenciación, n		
Bueno	11 (39,3)	4 (25)
Moderado	5 (17,8)	5 (31,3)
Leve	12 (42,9)	7 (43,7)
Grado de invasión, n		
Carcinoma "in situ"	7 (25)	4 (25)
Diseminación peritoneal	5 (17,9)	1 (6,3)
Otros	16 (57,1)	11 (68,7)
Tejido linfóide asociado, n	5 (17,9)	5 (31,3)

AUDC: ácido ursodeoxicólico; OH: etanol; DE: desviación estándar; DMH: dimetilhidracina; n: número de tumores. Los datos entre paréntesis reflejan porcentajes del total.

**Tabla IV. Clasificación tumoral en función de la localización**

	DMH + AUDC + OH Grupo C (n = 29)	DMH + OH Grupo E (n = 16)
Colon derecho, n	12	7
Tamaño tumoral, mm <sup>2</sup> $\pm$ DE	$116,67 \pm 108,64$	$45,43 \pm 57,42$
Adenocarcinomas, n	3 (25)	2 (28,6)
Carcinomas mucinosos, n	9 (75)*	5 (71,4)
Colon izquierdo, n	16	9
Tamaño tumoral, mm <sup>2</sup> $\pm$ DE	$62,38 \pm 114,03$	$46,22 \pm 53,11$
Adenocarcinomas, n	14 (87,5)	6 (66,7)
Carcinomas mucinosos, n	2 (13,5)*	3 (33,3)

\*:  $p = 0,003$  (adenocarcinomas frente a carcinomas mucinosos entre colon derecho e izquierdo en el grupo DMH + AUDC); AUDC: ácido ursodeoxicólico; OH: etanol; DE: desviación estándar; DMH: dimetilhidracina; n: número de tumores. Los datos entre paréntesis reflejan porcentajes del total.

En el grupo C, una rata macho presentó un tumor yeyunal localizado, y una rata hembra presentó una carcinomatosis peritoneal secundaria a un tumor yeyunal poco diferenciado, ambas sin lesiones malignas colónicas asociadas.

## DISCUSIÓN

Para estudiar el cáncer colorrectal (CCR) controlando las diversas variables que intervienen en su inducción, la carcinogénesis colónica inducida con 1,2-dimetilhidracina (DMH) en ratas es un modelo muy utilizado desde hace más de 3 décadas (19-21), ya que estos tumores de colon semejan a los humanos, tanto en sus características macroscópicas, como en su comportamiento evolutivo.

La incidencia de carcinogénesis colónica espontánea en ratas es baja, estimada en 2-3 casos/100.000 ratas observadas (35). En ausencia de tratamiento con un carcinogénico experimental no es de esperar la aparición de ningún tumor, como así sucedió en ausencia de DMH.

Las dietas ricas en grasas predisponen al CCR, en parte debido a que aumentan la concentración de ácidos biliares secundarios en las heces, los cuales son promotores carcinogénicos (4,5). Dentro de estos, el ácido ursodeoxicólico (AUDC) es el 7-beta-epímero del ácido quenodeoxicólico, y es utilizado actualmente en terapéutica humana (6-10).

No se presentaron efectos secundarios esperables del consumo de etanol ni del AUDC, como son la deshidratación o la diarrea, que podrían haber alterado la proporción entre grupos del consumo de ambas sustancias al alterar el equilibrio hidroelectrolítico. Así los grupos no presentaron diferencias significativas en el consumo de etanol (25), ni en el de AUDC, siendo por ello comparables y consiguiendo la dosis diaria diseñada y utilizada en terapéutica humana.

Con este diseño de administración concomitante de DMH y etanol (36-38), a las dosis y tiempos establecidos (25,39-41), se demostró previamente que el etanol no modificó la carcinogénesis colónica, por lo que era esperable su inocuidad en el presente estudio. Este trabajo se engloba dentro del mismo experimento, del que ya se han publicado algunos resultados previamente.

En estudios humanos (11), se observa que el AUDC administrado se transforma en el 7-beta-epímero-quenodeoxicólico, que se conjuga con las nitrosaminas de la luz intestinal originando un carcinógeno de acción directa y vida media prolongada; cuyo efecto a nivel experimental en ratas, podría venir mediado por un aumento de la permeabilidad tisular por estimulación de los mastocitos (42); por incremento del número de células a nivel de la cripta glandular colónica (12,30); o por inhibición de la esfingomielinasa alcalina del epitelio (43), también observada en patología humana.

En clínica humana, la administración de dosis bajas, de 4 mg/kg/día de AUDC durante un tiempo corto de unas 3 semanas, redujo significativamente la concentración de ácido deoxicólico (tomado como biomarcador de daño tisular) (13); así mismo, se observa una reducción significativa del riesgo relativo de CCR, con dosis altas de 13-15 mg/kg/día de AUDC y de forma prolongada, durante un promedio de 12 años (44). También se confirma una cierta eficacia en la prevención del cáncer de colon, mediante el tratamiento con AUDC a dosis medias,

entre 9-10 mg/kg/día, administrado durante 6-14 años (5); así como una disminución de la incidencia de adenomas y displasias de alto grado de colon, con 8-10 mg/kg/día durante 3 años (16).

En estudios realizados en ratas, este efecto protector podría explicarse por una inhibición de la expresión del oncogen K-ras y de la actividad de la ciclooxigenasa-2 de las células tumorales del colon (15); así como por una reducción de la secuencia adenoma-carcinoma a nivel del epitelio colónico (14,45).

Actualmente, la dosis mínima eficaz de quimioprevención para CCR no está bien definida y su uso no está aún establecido (17). En nuestro estudio se ha utilizado la dosis mínima preventiva eficaz (4 mg/kg/día), la cual pudiera haber resultado insuficiente para poder demostrar dicha protección frente a la carcinogénesis colónica, al no haber encontrado diferencias ni en la frecuencia ni en la agresividad de los tumores de colon entre los grupos C y E. No obstante, hubo parámetros cuya comparación no alcanzó diferencias estadísticamente significativas como es el tamaño de los tumores, a pesar de presentar tan gran diferencia de medias (sus intervalos de confianza se solapan), mientras que otros, como es la localización de las lesiones, con aparente similitud de datos presentaron diferencias estadísticamente significativas. Posiblemente estos resultados sean causados por un escaso tamaño muestral, lo que también pudo ser un obstáculo para demostrar el posible efecto protector del AUDC.

El diseño de administración concomitante de AUDC y agente carcinogénico puede resultar controvertido. La administración, a dosis similar a nuestro estudio durante dos semanas, de AUDC durante la inducción (14) reduce significativamente tanto la incidencia tumoral, como el número de criptas aberrantes (tomado como marcador de lesión pretumoral), mientras que la administración en fases de promoción/progresión provocó una reducción significativa de la incidencia tumores de colon en ratas, pero no del número de criptas aberrantes. Por tanto, el modelo de administración concomitante del AUDC y del inductor tumoral utilizado en nuestro estudio, pudiera haber inhibido su efecto protector frente al CCR, con lo que no se observaron diferencias macro-microscópicas ni morfológicas en la carcinogénesis colónica observada entre las ratas de los grupos C y E.

Hemos interpretado, al igual que en patología humana, la estirpe mucinosa del adenocarcinoma como una variedad poco diferenciada, con entidad propia y con evolución diferente del adenocarcinoma "no mucinoso" (33). Como en estudios previos (25), hemos encontrado un significativo mayor número de carcinomas mucinosos en el colon derecho, respecto al izquierdo en las ratas C.

Se comprobó que este diferente comportamiento entre colon derecho e izquierdo, como ya ha sido confirmado por otros estudios (46-49). Los tumores derechos mostraron su habitual peor comportamiento respecto a los izquierdos, y dicho comportamiento fue un efecto totalmente independiente de los agentes exógenos utilizados.

Estos resultados no son comparables al de otros autores (28,50), al haber utilizado en este trabajo la clasificación morfológica de Grau de Castro-Piqué Badía (33) y Lev (34), descrita en otros estudios (24,25,51).

Concluimos señalando que el suplemento oral con AUDC a la dosis de 4 mg/kg/día, durante 24 semanas: a) no mostró su efecto protector frente a la inducción tumoral inducida por DMH en un modelo concomitante de carcinogénesis colónica; y b) confirmamos la existencia de una diferencia histológica marcada entre los tumores localizados a nivel del colon derecho e izquierdo, e independiente de los agentes exógenos administrados.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha recibido ayudas concedidas por el Departamento de Medicina y Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Lleida y de la Comisión de Investigación del Hospital del Valle del Nalón, Langreo (Asturias). Este trabajo recibió el Segundo Premio de los III Premios Diseño de Proyectos de Investigación 2006-7, del Área VIII, Asturias.

## BIBLIOGRAFÍA

- Greenwald P. Colon cancer overview. *Cancer* 1992; 70 (Supl. 5): 1206-15.
- Rayón Suárez C. Programa de Atención al Cáncer 2005-2007. Servicio de Salud del Principado de Asturias. Servicio de Publicaciones del Principado de Asturias, Imprenta Narcea SL, Oviedo, 2005: 31.
- Trock B, Lanza E, Greenwald P. Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 650-61.
- Reddy BS. Dietary fat and its relationship to large bowel cancer. *Cancer Res* 1981; 41: 3700-5.
- Tung BY, Emond MJ, Haggitt RC, Bronner MP, Kimmey MB, Kowdley KV, et al. Ursodiol use is associated with lower prevalence of colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Ann Intern Med* 2001; 134: 89-95.
- Poupon R, Chrétien Y, Poupon RE, Ballet F, Calmus Y, Darnis F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis? *Lancet* 1987; 1: 834-6.
- Poupon RE, Balkau B, Eschwege E, Poupon R and the UDCA-PBC study group. A multicenter controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1991; 324: 1548-54.
- Calmus Y, Gane P, Rouger P, Poupon R. Hepatic expression of class I and class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis: Effect of ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 1990; 11: 12-5.
- Vademecum Internacional. 47ª ed. Madrid: CMP Medicom Editorial SA; 2006. p. 2146.
- American Medical Association. Drug evaluations. En: Annual. Department of Drugs, Division of Drugs and Toxicology 1991; 44: 826-30.
- Dayal B, Ertel NH. Studies on N-nitroso bile acid amides in relation to their possible role in gastrointestinal cancer. *Lipids* 1997; 32: 1331-40.
- Lapré JA, Van der Meer R. Diet-induced increase of colonic bile acids stimulates lytic activity of fecal water and proliferation of colonic cells. *Carcinogenesis* 1992; 13: 41-4.
- Hess LM, Krutzsch MF, Guillen J, Chow HH, Einspahr JG, Batta AK, et al. Results of a phase I multiple-dose clinical study of ursodeoxycholic acid. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2004; 13: 861-7.
- Wali RK, Stoiber D, Nguyen L, Hart J, Sitrin MD, Brasitus T, et al. Ursodeoxycholic acid inhibits the initiation and postinitiation phases of azoxymethane-induced colonic tumor development. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2002; 11: 1316-21.
- Khare S, Cerda S, Wali RK, von Lintig FC, Tretiakova M, Joseph L, et al. Ursodeoxycholic acid inhibits ras mutations, wild-type Ras activation, and cyclooxygenase-2 expression in colon cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3517-23.
- Alberts DS, Martínez ME, Hess LM, Einspahr JG, Green SB, Bhattacharyya AK, et al. Phase III trial of ursodeoxycholic acid to prevent colorectal adenoma recurrence. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 846-53.
- Langman M, Boyle P. Chemoprevention of colorectal cancer. *Gut* 1998; 43: 578-85.
- Weisburger JH. Causes, relevant mechanisms, and prevention of large bowel cancer. *Semin Oncol* 1991; 18: 316-36.
- Banerjee A, Quirke P. Experimental models of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 490-505.
- Barkla DH, Tutton PJ. Ultrastructure of 1,2-dimethylhydrazine-induced adenocarcinomas in rat colon. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61: 1291-9.
- Druckrey H, Preussman R, Matzkies F. Selektive Erzeugung von Darmkrebs bei Ratten durch 1,2-Dimethylhydrazin. *Naturwissenschaften* 1967; 58: 285-6.
- Hupp T, Buhr HJ, Ivancovic S, Beck N. Tierexperimentelle Untersuchungen zur karzinogeninduzierten Tumorbildung an Kolotomien in Abhängigkeit von Nahtmaterialien (Animal experiment studies of carcinogen-induced tumor development in colostomies in relation to suture materials). *Langenbecks Arch Chir* 1992; 377: 9-13.
- Viñas Salas J, Biendicho Palau P, Piñol Felis C, Miguelsanz García S, Pérez Holanda S. Calcium inhibits colon carcinogenesis in an experimental model in the rat. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1941-5.
- Pérez-Holanda S, Rodrigo L, Viñas-Salas J, Piñol-Felis C, Ildefonso C. Effect of defunctionalization on colon carcinogenesis in the rat. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 644-54.
- Pérez Holanda S, Rodrigo L, Viñas Salas J, Piñol Felis C. Effect of ethanol consumption on colon cancer in an experimental model. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 87-96.
- Buenestado García J, Reñé Espinet JM, Piñol Felis C, Viñas Salas J. Modelo experimental de cáncer colorrectal. *Rev Esp Enferm Dig* 2002; 94: 367.
- Buenestado García J, Piñol Felis C, Reñé Espinet JM, Pérez Holanda S, Viñas Salas J. Silk suture promotes colon cancer in an experimental carcinogenic model. *Dig Liver Dis* 2002; 34: 609-10.
- Noguera Aguilar JF, Tortajada Collado C, Moron Canis JM, Plaza Martínez A, Amengual Antich I, Pujol Tugores JJ. Modelo experimental para el estudio de la recidiva locoregional del cáncer colorrectal. *Rev Esp Enferm Dig* 2002; 94: 131-8.
- Seitz HK, Simanowski UA. Alcohol and carcinogenesis. *Ann Rev Nutr* 1988; 8: 99-119.
- Glauert HP, Bennink MR. Influence of diet or intrarectal bile acid injections on colon epithelial cell proliferation in rats previously injected with 1,2-dimethylhydrazine. *J Nutr* 1983; 113: 475-82.
- Hardman WE, Cameron IL. Colonic crypts located over lymphoid nodules of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats are hyperplastic and at high risk of forming adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2353-61.
- Riboli E, Cornee J, Macquart-Moulin G, Kaaks R, Casagrande C, Guayader M. Cancer and polyps of the colorectum and lifetime consumption of beer and other alcoholic beverages. *Am J Epidemiol* 1991; 134: 157-66.
- Grau de Castro JJ, Piqué Badía JM. Cáncer colorrectal. En: *Monografías clínicas en oncología*. Barcelona: Ed. Doyma SA; 1990; 8: 63-75.
- Lev R. Adenomatous polyps of the colon: Pathological and clinical features. New York: Springer-Verlag Inc.; 1990. p. 1-2: 1-18.
- Winkler R, Pfeiffer M, Ayisi K, Dörner A. Spontaneous colostomy cancer in rat: a handy model of colonic carcinogenesis. En: Malt RA, Williamson RCN. *Colonic carcinogenesis*. Boston: MTP Press Limited, Harvard Medical School 1982; 23: 245-52.
- Seitz HK, Czygan P, Waldherr R, Veith S, Raedsch R, Kässmodel H, Kommerell B. Enhancement of 1,2-Dimethylhydrazine-induced rectal carcinogenesis following chronic ethanol consumption in the rat. *Gastroenterol* 1984; 86 (5 Pt 1): 886-91.
- Seitz HK, Simanowski UA, Garzon FT, Rideout JM, Peters TJ, Koch A, et al. Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat. *Gastroenterol* 1990; 98: 406-13.

38. McGarrity TJ, Peiffer LP, Colony PC, Pegg AE. The effect of chronic ethanol administration on polyamine content during dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis* 1988; 9: 2093-8.
39. Kune GA, Vitetta L. Alcohol consumption and the etiology of colorectal cancer: A review of the scientific evidence from 1957 to 1991. *Nutr Cancer* 1992; 18: 97-111.
40. Barra S, Negri E, Franceschi S, Guarneri S, La Vecchia C. Alcohol and colorectal cancer: a case-control study from northern Italy. *Cancer Causes Control* 1992; 3: 153-9.
41. Newcomb PA, Storer BE, Marcus PM. Cancer of the large bowel in women in relation to alcohol consumption: A case-control study in Wisconsin (United States). *Cancer Causes Control* 1993; 4: 405-11.
42. Erickson RA, Chang K, Lifrak E, Rivera N, Stachura J. 16,16-Dimethyl-prostaglandin E2 reduces bile acid-mediated intestinal vascular injury in rats. *Gastroenterology* 1992; 102 (4 Pt 1): 1295-305.
43. Duan RD, Cheng Y, Tauschel HD, Nilsson A. Effects of ursodeoxycholate and other bile salts on levels of rat intestinal alkaline sphingomyelinase: a potential implication in tumorigenesis. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 26-32.
44. Pardi DS, Loftus EV Jr, Kremers WK, Keach J, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid as a chemopreventive agent in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterol* 2003; 124: 889-93.
45. Kasbo J, Saleem M, Perwaiz S, Mignault D, Lamireau T, Tuchweber B, et al. Biliary, fecal and plasma deoxycholic acid in rabbit, hamster, Guinea pig, and rat: Comparative study and implication in colon cancer. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1381-4.
46. Park HS, Goodlad RA, Wright NA. The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. *Cancer Res* 1997; 57: 4507-10.
47. Klurfeld DM. Dietary fiber-mediated mechanisms in carcinogenesis. *Cancer Res* 1992; 52 (Supl. 7) : S2055-S9.
48. Gerhardtsson de Verdier M, Romelsjo A, Lundberg M. Alcohol and cancer of the colon and rectum. *Eur J Cancer Prev* 1993; 2: 401-8.
49. McGarrity TJ, Peiffer LP, Colony PC. Cellular proliferation in proximal and distal rat colon during 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis. *Gastroenterol* 1988; 95: 343-8.
50. Noguera Aguilar JF, Amengual Antich I, Plaza Martínez A, Ibarra de la Rosa J, Tortajada Collado C, Gamundi Gamundi A, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition in colon experimental carcinogenesis. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 637-47.
51. Pérez-Holanda S. Réplica "Relación entre el grado de diferenciación celular del cáncer colorrectal y su distribución topográfica". *Rev Esp Enferm Dig* 2002; 94: 568.